

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELE CRISTIANE MESOMO

**OBTENÇÃO DE EXTRATO DE GENGIBRE (*Zingiber officinale* Roscoe) USANDO
CO₂ SUPERCRÍTICO E PROPANO COMPRIMIDO: CINÉTICA DE EXTRAÇÃO E
ATIVIDADE BIOLÓGICA**

CURITIBA

2013

MICHELE CRISTIANE MESOMO

**OBTENÇÃO DE EXTRATO DE GENGIBRE (*Zingiber officinale* Roscoe) USANDO
CO₂ SUPERCRÍTICO E PROPANO COMPRIMIDO: CINÉTICA DE EXTRAÇÃO E
ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Agnes de Paula Scheer

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza

CURITIBA

2013

Mesomo, Michele Cristiane

Obtenção de extrato de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) usando CO₂ supercrítico e propano comprimido: cinética de extração e atividade biológica / Michele Cristiane Mesomo. – Curitiba, 2013.
74 f. : il.; graf., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Agnes de Paula Scheer

Coorientador: Marcos Lúcio Corazza

1. Gengibre - Extração com fluido supercrítico. I. Scheer, Agnes de Paula. II. Corazza, Marcos Lúcio. III. Título.

CDD 664.022

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde, inspiração e serenidade.

Aos meus pais, por acreditarem em mim e estarem sempre ao meu lado mesmo quando muito longe. Obrigada pelo amor, pela paciência e incentivo, serão meus guias eternos.

À minha irmã Aliandra, por ser um exemplo de luta e perseverança. Muito obrigada por ter me acolhido e me dado carinho em todos esses anos.

Aos meus orientadores, professora Agnes de Paula Scheer e professor Marcos Lúcio Corazza, pelo incentivo, paciência, pelos ensinamentos, pela confiança e amizade, minha profunda gratidão, serão sempre um exemplo pra mim.

Aos professores membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite para contribuir valiosamente com o trabalho.

Ao colega e amigo professor Dr. Osmar Roberto Dalla Santa, pela brilhante orientação na realização do trabalho e pela amizade conquistada no dia a dia de trabalho na Universidade Estadual do Centro Oeste. Agradeço também por ter conciliado os meus dias de idas e vindas a Curitiba e as minhas aulas na UNICENTRO.

À professora Dr^a. Elisa Perez, pela orientação, apoio, amizade e por ter possibilitado a realização de parte do trabalho no CIMPE da UNICENTRO.

Às alunas Luisa, Aline, Priscila, Sâmela, Paula pelo suporte no desenvolvimento do trabalho.

À Dr^a. Lílian Côcco, do Laboratório de Análise de Combustíveis Automotivos (LACAUT), pelo suporte nas análises cromatográficas.

Ao professor Dr. Lúcio Cardoso Filho, do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá, pela disponibilização da estrutura e pelos ensinamentos.

A todos os professores do Departamento de Engenharia de Alimentos (DEALI) da UNICENTRO, pela amizade e colaboração.

Às amigas conquistadas no curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFPR, Valesca, Priscilla, Renata e Diana, pela amizade e por dividirem comigo os bons e maus momentos e tornarem ainda mais agradáveis as horas de

trabalho.

Ao secretário da Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Paulo Roberto Krainski, pela amizade e competência.

A todos os amigos que, de longe ou de perto, contribuíram seja me ouvindo e incentivando ou participando, efetivamente, do meu dia a dia. Muito obrigada do fundo do meu coração. São os amigos que tornam a vida mais leve e agradável.

À CAPES/REUNI, pelo apoio financeiro.

“Quando os ventos de mudanças sopram, algumas pessoas levantam barreiras, outras constroem moinhos de vento.”

Érico Veríssimo

RESUMO

O gengibre e seus produtos são internacionalmente comercializados para uso nas indústrias de alimentos, química e farmacêutica. Os compostos presentes nos óleos voláteis apresentam diversas propriedades que os tornam altamente valiosos. O uso da extração supercrítica tem crescido muito nos últimos anos, entretanto, ainda é necessária a obtenção de informações experimentais para a construção de plantas industriais. Este trabalho relata o processo de obtenção de extrato de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) por hidrodestilação, CO₂ sub e supercrítico e propano comprimido. A atividade biológica dos extratos obtidos foi avaliada pela determinação da atividade antioxidante, conteúdo fenólico e atividade antibacteriana. As extrações foram realizadas em escala de laboratório a pressões de 8,0 MPa, 16,5 MPa e 25,0 MPa, utilizando CO₂ e 3,0 MPa, 6,5 MPa e 10,0 MPa utilizando propano e, em 20 °C, 40 °C e 60 °C para ambos os solventes. As condições de extração testadas proporcionaram um rendimento máximo de 3,21 %, para a extração de CO₂ e 2,75 %, para a extração utilizando propano como solvente. Quando CO₂ foi utilizado como solvente, a pressão e a temperatura apresentaram efeito significativo sobre o rendimento da extração. Quando foi usado propano, a variável mais importante foi a pressão, que apresentou efeito positivo sobre o rendimento da extração. Os perfis químicos foram determinados por cromatografia em fase gasosa e foram semelhantes para os dois solventes, em que os compostos principais foram α -zingibereno, β -sesquifelandreno, α -farneseno, geranial β -bisaboleno e β -eudesmol. Para o óleo essencial obtido por hidrodestilação, α -curcumeno, geranial e canfeno foram os compostos mais abundantes. Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados nos extratos obtidos utilizando o método de redução do composto fosfomolibdênio. Tanto os extratos obtidos utilizando CO₂ supercrítico quanto os extratos obtidos utilizando propano comprimido apresentaram efeitos antioxidantes. A maior atividade antioxidante ($931,67 \pm 2,51$ mg de α -tocoferol . g de extrato⁻¹) foi encontrada para os extratos obtidos com CO₂ supercrítico a 40 °C e 16,5 MPa. Os ensaios de atividade antibacteriana foram realizados nos extratos obtidos utilizando CO₂ como solvente e no óleo essencial usando o método de difusão em ágar. Os extratos obtidos usando CO₂ supercrítico apresentaram efeitos antibacterianos contra as bactérias Gram-positivas testadas. O óleo essencial obtido por hidrodestilação foi diferente de todas as amostras testadas, com a menor capacidade de inibição de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* que o extrato obtido via tecnologia supercrítica. Para *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri*, bactérias Gram-negativas, o óleo essencial apresentou baixa inibição, 2,45 mm e 3,57 mm de raio, respectivamente.

Palavras-chave: Extração supercrítica, gengibre, propano, CO₂, atividade antioxidante, atividade antibacteriana, composição química.

ABSTRACT

Ginger and its products are marketed internationally for use in the food, chemical and pharmaceutical. The volatile compounds present in oils have many properties which make them highly valuable. The use of supercritical extraction has grown tremendously in recent years, however it is still necessary to obtain experimental information for the construction of industrial plants. This work reports the process to obtain of ginger extract (*Zingiber officinale* Roscoe) by hydrodistillation, sub and supercritical CO₂ and compressed propane. Antioxidant activity effect, phenolic content and antibacterial activity were evaluated on the extracts obtained. The extractions were performed in a laboratory scale unit at pressures of 8.0 MPa, 16.5 MPa and 25.0 MPa using CO₂ and 3.0 MPa, 6.5 MPa and 10.0 MPa using propane, and at 20 °C, 40 °C and 60 °C for both solvents. The operating conditions tested achieved a maximum yield of 3.21 wt% for the CO₂ extraction and 2.75 wt% for the extraction using propane as solvent. When CO₂ was used as solvent, the pressure and temperature presented significant effect on the extraction yield. When propane was used, the most important variable was the pressure that presented a positive effect on the extraction yield. The chemical profiles were determined by gas chromatography and were similar for the two solvents, in which the main compounds were α -zingiberene, β -sesquiphellandrene, α -farnesene, geranial, β -bisabolene and β -eudesmol. For the oil obtained by hydrodistillation, α -curcumeno, geranial and camphene were the most abundant compounds. The antioxidant activity assays were performed on the extracts obtained using the phosphomolybdenum reducing method. The extracts obtained using supercritical CO₂ and compressed propane presented antioxidant effects. The highest antioxidant activity (931.67 ± 2.51 mg of α -tocopherol . g of extract⁻¹) was found for extracts obtained using supercritical CO₂ as solvent at 313.15 K and 16.5 MPa. The antibacterial activity assays were performed on the extracts obtained using CO₂ as solvent and the essential oil obtained using the agar well method. The extracts obtained using supercritical CO₂ presented antibacterial effects against Gram-positive bacteria. The oil obtained by hydrodistillation was different from all samples tested, with the lowest capacity for inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria then the supercritical extract. For *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*, Gram-negative bacteria, the oil showed low inhibition, 2.45 mm and 3.57 mm radius, respectively.

Keywords: Supercritical extraction, ginger, propane, CO₂, antioxidant activity, antibacterial activity, chemical composition.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AEAC	Capacidade antioxidante equivalente a ácido ascórbico
ANOVA	Análise de variância
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
CER	<i>Constant extraction rate period</i>
CG-FID	Cromatografia em fase gás com detector de ionização em chamas
CO ₂	Dióxido de carbono
DC	<i>Diffusion-controlled rate period</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EC	<i>Escherichia coli</i>
ε	Porosidade do leite
FER	<i>Falling extraction rate period</i>
FRP	Poder de redução férrica
GC-MS	Cromatografia em fase gás com espectrofotômetro de massas
GP	Galato de propila
HD	Hidrodestilação convencional
L	Comprimento
LACAUT	Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos
LACTA	Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LM	<i>Listeria monocytogenes</i>
LOOH	Hidroperóxido lipídico
MAHD	Hidrodestilação assistida por micro-ondas
MoO ₃ P ₂ O ₅ .51H ₂ O	Ácido Fosfomolibdico
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sódio
Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	Tungstato de Sódio dihidratado
OEC	<i>Overall extraction curve</i>
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Pc	Pressão crítica
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SF	<i>Shigella flexneri</i>
SFE	<i>Supercritical fluid extraction</i>
SFME	Extração de micro-ondas sem solventes
ST	<i>Salmonella typhimurium</i>
TBHQ	Terc- butilhidroquinona
Tc	Temperatura crítica
TSA	Ágar tripticase de soja
U	Umidade
ϕ	Diâmetro interno

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 OBJETIVOS.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 GENGIBRE.....	16
2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GENGIBRE.....	18
2.2.1 Atividade antioxidante total.....	20
2.2.2 Atividade antimicrobiana.....	25
2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	27
2.3.1 Extração por arraste de vapor d'água.....	27
2.3.2 Extração com solvente orgânico.....	28
2.3.3 Extração por fluido supercrítico.....	29
2.4 ESTUDOS SOBRE A OBTENÇÃO E ANÁLISES DE EXTRATO DE GENGIBRE.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA.....	39
3.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E DA DENSIDADE DAS PARTÍCULAS.....	40
3.3 EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO.....	40
3.4 HIDRODESTILAÇÃO.....	41
3.5 PROCESSO DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	41
3.6 ANÁLISE DO EXTRATO.....	42
3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.....	43
3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	43
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES.....	45
4.2 COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS DE GENGIBRE.....	50
4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	54
4.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO E DO EXTRATO DE GENGIBRE.....	57

5 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

O uso de matérias primas de origem vegetal para a obtenção de extratos é uma atividade de grande interesse para a indústria de alimentos, de perfumes, de cosméticos e de fármacos. Extratos naturais de plantas têm sido utilizados para vários fins durante muitos anos (JONES, 1996) e, mais recentemente, investigados quanto ao seu potencial como medicamentos alternativos e para a preservação de alimentos. Os compostos presentes nos óleos voláteis apresentam diversas propriedades que os tornam altamente valiosos, seja para fins medicinais, para fins alimentícios, como aromatizantes e corantes, ou para a fabricação de perfumes.

As tecnologias de extração para obtenção destes produtos apresentam um papel importante devido a grande biodiversidade de matérias primas disponíveis em nosso país. A opção por um processo de extração deve ser baseada em um conjunto de fatores, entre eles rendimento, qualidade do produto, tempo de operação e custo.

O desenvolvimento de novas técnicas de separação nas indústrias químicas e de alimentos tem recebido um grande impulso nos últimos anos devido, a imposições ambientais, regulamentos de saúde pública e à necessidade de minimização de custos energéticos (COELHO; OLIVEIRA; D'AVILA, 1996). O uso de solventes orgânicos para obtenção de extratos de plantas, além de apresentar resíduos frequentemente proibidos ou indesejáveis em alimentos, apresenta o problema de transformação oxidativa que o extrato sofre quando o solvente é eliminado (SEBASTIÁN et al., 1998). Para resolver este problema, alguns processos baseados na tecnologia de extração via fluido supercrítico têm sido desenvolvidos. O dióxido de carbono é o solvente mais utilizado na extração com fluido supercrítico. Além de ser não tóxico e apresentar temperatura crítica baixa, pode ser utilizado na extração de matéria prima natural, principalmente na indústria de alimentos e farmacêutica (WAGNER; PAVLÍCEK, 1993). O propano também tem despertado interesse principalmente pelo seu poder de solvatação e custo. Alguns trabalhos realizados utilizando propano em condições subcríticas alcançaram bons rendimentos de extrato (CORSO et al., 2010; PEDERSSETTI et al., 2011)

Os extratos naturais são competitivos em relação aos sintéticos, pois além da vantagem das suas fontes, possuem qualidades sensoriais mais próximas às suas

matrizes vegetais de origem (MEIRELES, 2003). O ajuste da temperatura e da pressão dos solventes de extração permite uma alta seletividade, que possibilita a obtenção de um produto mais próximo do esperado. Outra vantagem da aplicação de fluidos supercríticos é a elevada taxa de transferência de massa dos solutos no fluido, causada pela maior difusividade, menor viscosidade e menor tensão superficial em relação ao solvente líquido, o que faz dos fluidos supercríticos um método promissor de extração e separação de compostos naturais (SIHVONEN et al., 1999; RAVENTÓS; DUARTE; ALARCÓN, 2002).

Dentre as matérias primas vegetais empregadas nos processos de extração encontra-se o gengibre. O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) é uma planta da família Zingiberaceae, herbácea, perene (MONTEIRO, 1999) sendo o rizoma amplamente difundido nos setores alimentícios e industriais. A utilização do gengibre pode ser na forma “in natura” ou na forma de extratos, óleos essenciais e óleoresina. O Estado do Paraná é um dos maiores produtores nacionais (rizomas “in natura”) de gengibre, totalizando 1232,00 t.ano⁻¹ (DE ALMEIDA; ELPO; GIROTTO, 2007). O município de Morretes, região litorânea do Paraná, é responsável por 70 a 90 % do volume de exportações brasileiras.

De modo geral, os trabalhos presentes na literatura descrevem vários estudos relacionados com as principais atividades apresentadas pelos extratos ativos de gengibre e seus principais compostos. Apesar dos mecanismos biológicos, pelos quais os principais componentes dos extratos ativos destas plantas manifestam seus efeitos nos sistemas celulares não terem sido ainda completamente elucidados, existe um grande interesse na utilização deste tipo de compostos, principalmente do ponto de vista terapêutico e industrial.

A preocupação com a substituição dos aditivos sintéticos, utilizados pela indústria de alimentos, como o BHA e o BHT, por produtos naturais aumenta o interesse por métodos de extração e caracterização de compostos com potencial atividade antioxidante e efeito antimicrobiano a partir de fontes naturais. Estes compostos estão presentes nas mais diversas espécies vegetais, em várias partes da planta, como nos frutos, sementes, folhas e raízes (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997). No entanto, a utilização destes compostos naturais em alimentos é ainda muito restrita.

Diante da importância econômica regional do cultivo do gengibre e com o

intuito de identificar, esclarecer e contribuir para o entendimento dos fenômenos envolvidos no processo de extração, torna-se interessante estudar o processo de obtenção de extratos de gengibre com alto teor de compostos ativos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 GERAL

A partir da representatividade da produção paranaense de gengibre, matéria prima muito utilizada na indústria farmacêutica e de alimentos, o objetivo deste trabalho foi obter um extrato oleoso de rizomas de gengibre por diferentes métodos de extração com a finalidade de avalia-los e identificar a composição química e o potencial biológico dos diferentes extratos obtidos.

1.1.2 ESPECÍFICOS

- Determinar os rendimentos de extração por meio do emprego de diferentes métodos de extração: hidrodestilação e extração via fluido supercrítico com CO₂ e propano como solventes.
- Levantar os principais parâmetros do processo (pressão e temperatura) de obtenção do extrato de gengibre utilizando solvente pressurizado (CO₂, propano);
- Determinar as condições operacionais (temperatura, pressão e solvente) que maximizam o rendimento em extrato;
- Comparar o perfil químico do extrato de gengibre obtido por diferentes solventes pressurizados e diferentes métodos de extração;
- Determinar as curvas cinéticas de extração supercrítica;
- Determinar a atividade antioxidante e conteúdo fenólico total dos diferentes extratos de gengibre;

- Determinar a atividade antibacteriana do óleo essencial e dos diferentes extratos de gengibre.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GENGIBRE

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) (Figura 1) é uma planta da família Zingiberaceae herbácea, perene (MONTEIRO, 1999) sendo o rizoma amplamente difundido nos setores alimentícios e industriais, especialmente como matéria-prima para fabricação de bebidas, perfumes e produtos de confeitarias como pães, bolos, biscoitos e geleias, além do uso na medicina popular (SACCHETTI et al., 2005). O gênero *Zingiber* inclui aproximadamente 85 espécies.

O rizoma do gengibre apresenta corpo alongado, um pouco achatado, com ramos fragmentados irregularmente, de 3 a 16 cm de comprimento, 3 a 4 cm de largura e 2 cm de espessura. Externamente, sua coloração varia do amarelo ouro a marrom brilhante, com estrias longitudinais (ELPO, 2004). Internamente, apresenta cor marrom-amarelada com numerosos feixes fibrovasculares e abundantes células oleaginosas contendo oleorresina e 1 % a 4 % de óleo essencial (ZANCAN et al., 2002).



FIGURA 1 – VISTA GERAL DA PLANTA E DAS FLORES DE *Zingiber officinale* Roscae.

No mundo todo o gengibre é muito conhecido por seu sabor picante e odor

levemente cítrico. A cultura do gengibre tornou-se efetivamente comercial no Brasil somente nas últimas décadas, após a introdução da variedade de rizomas gigantes por agricultores japoneses (TAVEIRA MAGALHÃES et al., 1997).

O Brasil está entre os pequenos produtores, cuja produção destina-se principalmente para a exportação, 70 a 80 %, comercializada principalmente no estado fresco, destinando-se especialmente aos mercados dos Estados Unidos da América, Reino Unido, Holanda e Canadá (NEGRELLE; ELPO; RÜCKER, 2005). Atualmente, o Estado do Paraná é um dos maiores produtores nacionais de gengibre (rizomas *in natura*) sendo que a maior área plantada está concentrada no litoral.

Como planta medicinal, o gengibre é uma das mais antigas e populares do mundo. Suas propriedades terapêuticas são resultado da ação de várias substâncias, especialmente do óleo essencial que contém dentre outros compostos canfeno, felandreno, zingibereno e zingerona (ZARATE; SUKRASNO; YEOMAN, 1992).

É tradicionalmente utilizado na medicina popular para aliviar sintomas de inflamação, doenças reumáticas e desconfortos gastrintestinais (PFEIFFER et al., 2006; WEI et al., 2005; PADMA; CHRISTIE; RAMKUMA, 2007). Seus extratos e seus principais compostos pungentes, os gingeróis, têm mostrado recentemente variada atividade biológica, incluindo efeito como agentes antineoplásicos (WANG et al., 2003; SURH; LEE; LEE, 1998) antiespasmódicos e antieméticos (AFZAL et al., 2001) inibidores de enzimas (TJENDRAPUTRA et al., 2001), anti-hemorrágicos (THOMSON et al., 2002), antifúngicos (FICKER et al., 2003; SACCHETTI et al., 2005), inibitórios da síntese de óxido nítrico (IPPOUSHI et al., 2003), protetores de células neurais (KIM; KIM, 2004), anti-reumáticos (RAI et al., 2006), microbicidas (MORENO et al., 2006), anti-inflamatórios e antioxidantes (SURH, 2003; JIANG et al., 2005; HABSAH et al., 2000; DEDOV et al., 2002; LANTZ et al., 2007). O extrato de gengibre de extração supercrítica apresenta efeitos antioxidante e bactericida, tendo mostrado atividade no tratamento de células cancerígenas “in vitro” de mama e pulmão (ZANCAN et al., 2002).

O grande interesse em óleos voláteis pelas indústrias de aroma e fragrância, incluindo companhias de bebidas, de alimentos e de perfumes, requer produtos de alta qualidade e preços competitivos. A indústria de alimentos cada vez mais busca

produtos que aumentem a vida de prateleira dos produtos processados, como os antioxidantes, ou que tragam algum benefício para a saúde.

2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GENGIBRE

Os rizomas apresentam alto teor de água (80 a 90 %) e grande quantidade de amido e fibras (5,4 a 16,2 %) (TAVEIRA MAGALHÃES et al., 1997). Os rizomas secos apresentam de 1 a 3 % de óleo essencial que fornecem o sabor característico. O óleo essencial é uma mistura de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas (SIMÕES; SPITZER, 2003), enquanto a oleorresina contém, além dos constituintes aromáticos voláteis, os componentes não voláteis, responsáveis pela pungência característica do gengibre (TAVEIRA MAGALHÃES et al., 1997). Quimicamente os óleos essenciais são compostos de hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos contendo enxofre, apresentando diferentes concentrações. Os terpenos são formados por unidades de isopreno (Figura 2), sendo classificados de acordo com a quantidade de unidades isoprênicas (C5): monoterpenos (C10); sesquiterpenos (C15); diterpenos (C20); triterpenos (C30) e carotenóides (C40) (CASTRO et al., 2004; BRIELMANN et al. 2006). Quando estes compostos contêm elementos adicionais, usualmente o oxigênio, são denominados terpenóides.

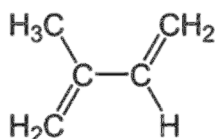
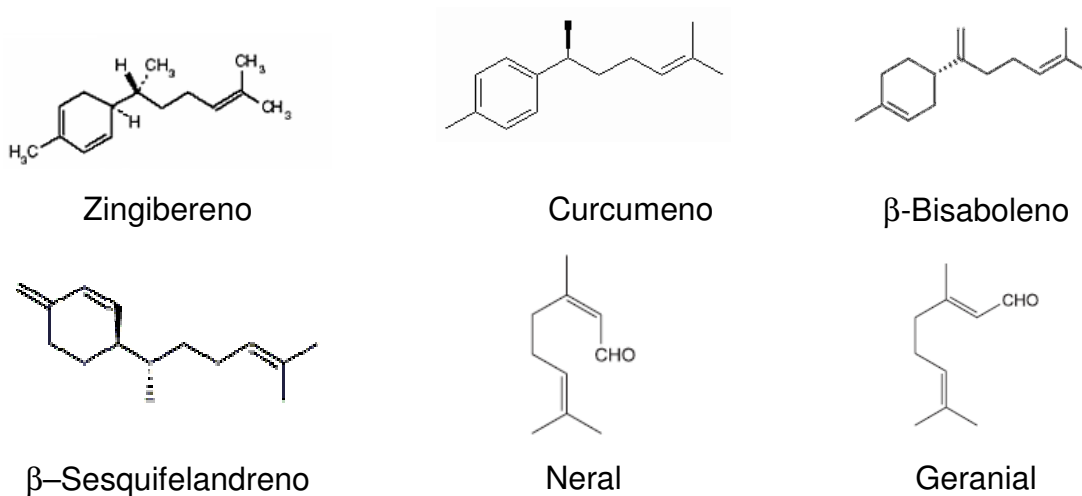


FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOPRENO

O extrato obtido dos rizomas de gengibre desidratados pode conter 5 % de monoterpenos, 65 % de sesquiterpenos, e 30 % de compostos oxigenados, entre eles os gingeróis e os shogaóis, estes últimos encontrados na oleorresina. Os monoterpenos são substâncias voláteis devido a sua baixa massa molecular (PERES, 2004) e no gengibre são representados em maior quantidade pelo neral, geraniol, geranial e acetato de geranila (SAKAMURA, 1987).

O extrato obtido por CO₂ geralmente apresenta uma pequena quantidade de oleorresina, que é parte não volátil responsável pelo gosto, devido a presença de gingerona, gingeróis e shogaóis (BARTLEY; FOLEY, 1994). Os principais compostos do óleo são zingibereno, ar-curcumeno, bisaboleno, sesquifelandreno ou terpenóides, como neral, geranial, geraniol, terpineol, nerolidol (GOVINDARAJAN, 1982). A Figura 3 apresenta as estruturas químicas dos principais compostos encontrados no gengibre. A composição dos rizomas e dos seus óleos essenciais pode sofrer influência de fatores como a origem geográfica, radiação, temperatura, método de secagem, época de colheita, solo entre outros (ELPO, 2004; GOUINGUENÉ; TURLINGS, 2002).

Bartley (1995) utilizando CO₂ supercrítico para a obtenção de extrato de gengibre identificou os seguintes compostos no extrato: 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, 8-shogaol, 10-shogaol (os números dos prefixos descrevem a posição do grupo funcional) (Figura 2), gingeridiona e hexahidrocurcumeno. Os extratos obtidos por extração supercrítica demonstraram qualidade superior àqueles obtidos por extração com solvente orgânico e arraste a vapor, pois apresentam maior quantidade de compostos presentes no gengibre “in natura”. Nos extratos obtidos por extração supercrítica predominam os seguintes compostos: neral e geranial (terpenóides), zingibereno, α -bisabuleno e β -sesquifelandreno (sesquiterpenos) (BARTLEY; FOLEY, 1994).



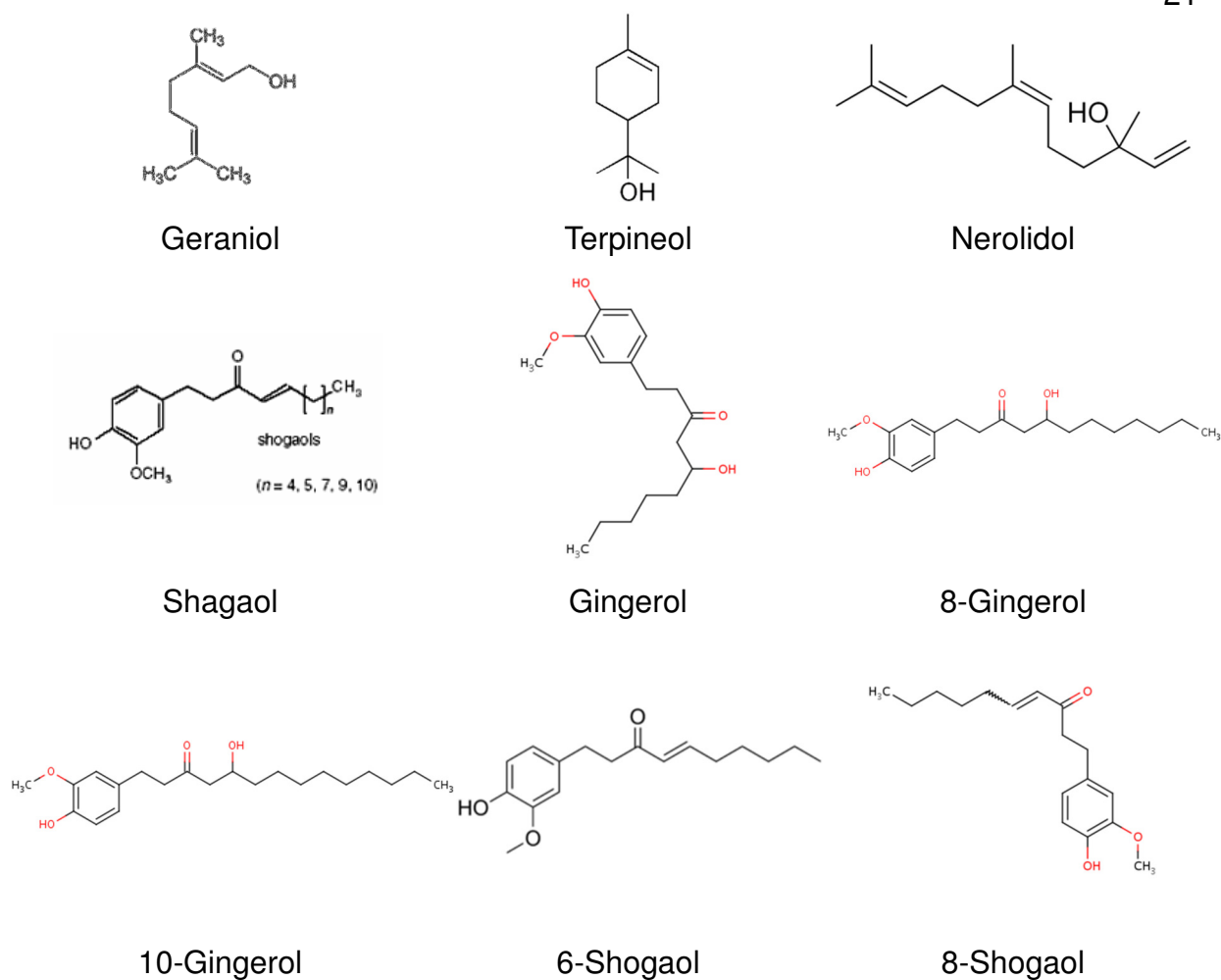


FIGURA 3 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS ENCONTRADOS NO GENGIBRE.

Monteiro (1999) obteve por arraste a vapor óleo volátil de gengibre com os seguintes compostos majoritários: α -zingibireno, α -curcumeno, α -farneseno e β -sesquifelandreno (sesquiterpenos). O mesmo autor comparou o teor de cariofileno (sesquiterpeno) no óleo volátil obtido por arraste a vapor e no extrato obtido por extração supercrítica observando que no óleo volátil o teor foi o dobro do detectado no extrato SFE.

2.2.1 Atividade antioxidante

O estabelecimento de dados sobre o teor antioxidante de uma grande

variedade de vegetais seria útil para a investigação epidemiológica e apoio para orientações dietéticas, visto que estes antioxidantes podem ajudar a aliviar o estresse oxidativo, ou seja, prevenir os radicais livres de biomoléculas, tais como proteínas, DNA e lipídios (SHAHIDI; NACZK, 2004).

Entre as substâncias de origem vegetal capazes de agir como antioxidantes estão incluídos minerais, vitaminas, proteínas (especialmente da soja), pigmentos carotenoides e compostos fenólicos, entre outros. Os fenólicos estão largamente distribuídos nos alimentos, sendo a quantidade presente na alimentação humana bastante significativa (VAN ACKER et al., 1996; KÄHKÖNEN et al., 1999; SOARES, 2002).

Os antioxidantes podem ser compreendidos como um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais, normalmente baixas quando comparadas as concentração dos substratos oxidáveis, retardam ou inibem significativamente a oxidação daquele substrato pela reação com os radicais livres, impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo e aumentando a vida útil de uma grande variedade de alimentos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; SHERWIN, 1972; HALLIWELL, 1990). Podem ser divididos em sintéticos, substâncias utilizadas na indústria alimentícia, destacando-se o BHT, BHA, GP, TBHQ (SOUSA et al., 2007) ou naturais tais como: α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonóides) (SOUSA et al., 2007).

O organismo humano produz constantemente radicais livres por meio de suas atividades metabólicas normais que envolvem reações de transferência de elétrons. Os radicais livres são definidos como sendo moléculas ou átomos que possuem elétrons de valência desemparelhados, tornando-os altamente reativos. Muitos processos indesejados de oxidação, incluindo a deterioração de alimentos, envolvem a presença de radicais livres. A peroxidação lipídica é um tipo de dano oxidativo que ocorre nas membranas celulares quando ácidos graxos insaturados reagem com níveis excessivos de ROS para formar radicais de ácidos graxos e hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Esse processo desencadeia a autooxidação de ácidos graxos poliinsaturados, o que não somente diminui o valor nutricional dos alimentos, mas está também associado a danos na membrana celular, envelhecimento, doenças cardíacas e câncer (SPITELLER, 2001; SURH, 2002). Além disso, a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) é um fator

importante no desenvolvimento de doenças coronarianas e aterosclerose (FRANKE et al., 2005).

O crescente interesse por alimentos naturais e evidências de que alguns compostos antioxidantes sintéticos podem promover o desenvolvimento de alguns efeitos colaterais como alergias e possíveis ações promotoras de câncer (RIZVI, 1994; BOTTERWERCK et al., 2000), tem aumentado a demanda por compostos naturais com atividade similar. Antioxidantes naturais na indústria de alimentos são importantes não apenas devido a sua utilidade como método de prevenção da oxidação, mas também pelos efeitos benéficos na saúde humana (IBAÑEZ et al., 2003).

Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis por maior capacidade antioxidante, sendo representados pelos flavonóides e isoflavonóides, taninos, lignanas, xantonas e outros (RAZAVI et al., 2008; SACCHETTI et al., 2005).

Os óleos essenciais são eficazes antioxidantes naturais e capazes de competir com os antioxidantes sintéticos. As propriedades antioxidantes dos óleos essenciais, no entanto, são determinadas pela sua composição. Óleos com altos teores de substituintes fenólicos são capazes de diminuir significativamente os processos de oxidação de aldeídos insaturados, mesmo em baixas concentrações. As propriedades antioxidantes dos óleos essenciais constituídos de hidrocarbonetos terpênicos e álcoois são determinadas por α - e γ -terpenos e seus sesquiterpenos análogos (MISHARINA; TERENINA; KRIKUNOVA, 2009). Os compostos fenólicos podem ser definidos quimicamente como substâncias que possuem pelo menos um anel aromático e um ou mais grupamentos hidroxila, podendo apresentar também outros grupos substituintes em sua estrutura, como glicosídios, ésteres ou metil ésteres. Os compostos fenólicos de fontes vegetais têm origem em uma das principais classes de metabólitos secundários de plantas e podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides (derivados da fenilalanina e ácido acético) e os não flavonóides (derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico). Os compostos fenólicos denominados não flavonóides podem ser derivados de ácidos hidroxibenzóico, gálico e elágico, derivados dos ácidos caféico, *p*-cumárico e hidroxicinamatos ou ainda derivados de *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol-glucosídeo (BURNS et al., 2001).

Extratos de gengibre têm sido identificados como contendo um elevado teor de compostos antioxidantes (SHOBANA; NAIDU, 2000; HALVORSEN; HOLTE; MYHSTAD, 2002; MASUDA et al., 2004; STOILOVA et al., 2007; SINGH et al., 2008; OBOH; AKINYEMI; ADEMILUYI, 2012). A *oleorresina* de gengibre possui em sua composição gingeróis que são cetonas fenólicas com propriedades antioxidantes e pungentes. Normalmente o gingerol está presente em quantidades variadas em diferentes variedades da planta (GRUENWALD, 2004).

Vários estudos têm mostrado que o tratamento com aquecimento pode reduzir a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico total nos extratos (CHAN; LIM; OMAR, 2007; SIKORA et al., 2008; DING et al., 2011). A utilização de extração com fluido supercrítico (SFE) pode reduzir significativamente os problemas relacionados com a degradação térmica dos compostos (PRONYK; MAZZA, 2009), e facilita a recuperação do solvente devido à volatilidade do fluido.

Muitos métodos são usados para estimar a atividade antioxidante de uma substância ou uma mistura de substâncias. Estudos demonstraram que a atividade antioxidante é fortemente influenciada pelo método de determinação, razão pela qual os dados da literatura são difíceis de serem comparados. Além disso, as propriedades antioxidantes de óleos essenciais dependem da composição qualitativa e quantitativa dos sistemas em teste (RUBERTO; BARATTA, 2000; DORMAN; DEANS, 2000; EL-GHORAB; MANSOUR; EL-MASSRY., 2004; LEE; SHIBAMOTO, 2002; LEE; SHIBAMOTO, 2001). Por esta razão, vários métodos de análise de diferentes classes de fenólicos e compostos antioxidantes têm sido recentemente realizados. Conseqüentemente, deve-se estudar qual o melhor método de avaliação da atividade antioxidante para cada caso, considerando todos os prós e contras de cada método.

O conteúdo de compostos antioxidantes é influenciado pela estrutura química, método de extração empregado, tamanho das partículas da amostra, tempo e condições de armazenamento, bem como pelo método de análise, seleção de padrões e presença de substâncias interferentes, como gorduras, terpenos e clorofilas. Por essas razões, nenhum método de extração é totalmente eficiente na extração de todos os fenólicos ou de uma classe específica de compostos fenólicos em alimentos. A solubilidade dos polifenóis é determinada pelo tipo de solvente (polaridade) utilizado, grau de polimerização dos fenólicos, interação de fenólicos

com outros constituintes do alimento e formação de complexos insolúveis. Os solventes mais frequentemente utilizados para a extração de compostos fenólicos incluem metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformamida e suas combinações (ANTOLOVICH et al., 2002).

Existem vários métodos para avaliar a atividade antioxidante, como o método de formação do complexo fosfomolibdênio ou a atividade antioxidante em relação à redução de um radical, como o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995; HUANG; OU; PRIOR, 2005; FONSECA et al., 2009; REBELO et al., 2009). O método da formação do complexo fosfomolibdênio baseia-se na redução do Mo⁺⁶ para Mo⁺⁵ com subsequente formação do complexo fosfato-Mo⁺⁵, que se distingue por sua coloração verde em pH ácido e absorção máxima em 695 nm. Este método destaca-se pela sensibilidade e pela facilidade de reprodução, avaliando-se a atividade antioxidante relativa (AAR) ao efeito desempenhado pela vitamina C (ARBOS et al., 2004).

Aruoma et al. (1995) estudaram a atividade antioxidante do gengibre em pó e os resultados demonstraram que concentrações maiores que 5 mg.mL⁻¹ inibem a peroxidação de lipossomas fosfolipídicos. Além disso, o gengibre demonstrou excelente poder de captura de radicais hidroxila, sendo capaz de reagir com o ácido hipocloroso a uma taxa suficiente para proteger as enzimas catalase e α -1-1-proteinase contra inativação. Na presença de certos reagentes, o gengibre exerceu ação pro-oxidante.

Justo et al., (2008) estudaram o potencial antioxidante de extratos de gengibre obtidos por extração supercrítica e os resultados obtidos indicam que a metodologia de extração por fluido supercrítico, por aplicar condições não agressivas, permite obter extratos com alta atividade antioxidante, o que demonstra o potencial para atingir alto valor comercial do ponto de vista da sua atividade biológica. Chan et al. (2009) avaliaram o efeito da secagem sobre as propriedades antioxidantes de folhas de diferentes vegetais. Os métodos de secagem testados (micro-ondas, estufa e secagem ao sol) resultaram em forte diminuição do conteúdo de fenólicos totais, da capacidade antioxidante equivalente a ácido ascórbico (AEAC) e do poder de redução férrica (FRP).

A capacidade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais são fortemente influenciados pelos solventes utilizados na obtenção dos extratos de fontes vegetais

secas (SULAIMAN et al., 2011).

El-Ghorab et al. (2010) avaliaram a composição química e a atividade antioxidante do óleo volátil de gengibre obtido por hidrodestilação. Os compostos principais encontrados nas amostras, tanto para gengibre seco, quanto para gengibre fresco, foram canfeno, p -cineol, α -terpineol, zingibereno e ácido pentadecanóico e as amostras apresentaram alta atividade antioxidante quando avaliadas pelos métodos DPPH e FRP.

Vegetais e alimentos contém uma grande variedade de compostos fenólicos e seus derivados. Além da capacidade antioxidante como bloqueadores dos radicais na reação em cadeia, os compostos fenólicos são capazes de eliminar o radical hidroxila, superóxido e oxigênio singlet (ARUOMA, 1997; ARNAO, 2000). A inativação de radicais de oxigênio por compostos fenólicos ocorre pela formação de espécies de menor reatividade ou pela ação como doador de hidrogênio (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Apesar de a literatura apresentar vários estudos que avaliam a atividade antioxidante dos extratos de gengibre, extratos obtidos via tecnologia supercrítica utilizando CO_2 como solvente não têm sido amplamente investigados e não há estudos sobre extratos de gengibre obtidos utilizando propano comprimido como solvente.

2.2.2 Atividade antimicrobiana

Extratos e óleos essenciais de plantas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de micro-organismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias. A atividade antibacteriana dos extratos vegetais e dos óleos essenciais pode ser útil para a preservação de alimentos crus e processados, em indústrias de produtos farmacêuticos, na medicina alternativa e em terapias naturais (LIS-BALCHIN; DEANS, 1997).

Hoje em dia, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas com foco em novos compostos antimicrobianos com estruturas químicas diferentes e novos mecanismos de ação. A contaminação de alimentos por micro-organismos é uma ameaça para a saúde humana e também resulta em redução da qualidade de

alimentos processados e perdas para indústrias. A crescente demanda dos consumidores por alimentos frescos e naturais que são seguros para o consumo tem despertado o interesse de pesquisadores por óleos vegetais e extratos com potencial atividade antimicrobiana, que têm uma menor incidência de reações adversas em comparação com os sintéticos (MOHANTY; COCK, 2009).

Acredita-se que a maioria dos óleos essenciais exerce seu efeito antimicrobiano através de modificações na estrutura da parede celular do micorganismo. Mais especificadamente, altera a permeabilidade de membrana citoplasmática pela modificação no gradiente de íons hidrogênio (H⁺) e potássio (K⁺), causando a interrupção dos processos essenciais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, etapas da fosforilação e outras reações dependentes de enzimas, resultando em perda do controle quimiosmótico da célula afetada e, conseqüentemente, a morte bacteriana (DORMAN; DEANS, 2000).

Várias pesquisas realizadas com plantas demonstraram que os compostos fenólicos como os flavonóides possuem potente ação antibacteriana (NASCIMENTO, LUCATELLI; SILVA, 2000). Estudos revelaram que o extrato metanólico de rizomas de *Zingiber officinale* possui significativas atividades antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus* (ANBU JEBA SUNILSON et al., 2009). Sivasothy et al. (2011) avaliaram a atividade antibacteriana dos *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade utilizando a técnica de micro-diluição, o que revelou que tanto as folhas quanto os óleos do rizoma foram moderadamente ativos contra as bactérias Gram-positivas *Bacillus licheniformis*, *Bacillus spizizenii* e *Staphylococcus aureus*, e contra as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* e *Pseudomonas stutzeri*.

Kader et al. (2011) investigaram o efeito antimicrobiano de extratos etanólicos de *Zingiber zerumbet* Smith e suas frações solúveis em clorofórmio e éter de petróleo contra bactérias e fungos. O extrato etanólico apresentou a maior atividade antibacteriana e antifúngica, especialmente contra *Vibrio parahemolyticus*.

Singh et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial e da oleorresina (etanol, metanol, CCl₄ e iso-octano) de gengibre, *Zingiber officinale*, obtidos por hidrodestilação e Soxhlet. Todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana moderada a boa, sendo que o óleo essencial e a oleorresina de CCl₄ apresentaram 100 % de inibição para *Fusarium moniliforme*.

Apesar de vários estudos que avaliam a atividade antimicrobiana de extratos naturais serem encontrados na literatura, extratos obtidos com a utilização de CO₂ como solvente não têm sido extensivamente investigados.

2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Os óleos essenciais de plantas possuem alto valor agregado; entretanto, são compostos de uma mistura complexa de substâncias, muitas delas facilmente termodegradáveis. O fracionamento convencional de óleos essenciais em destiladores a vácuo pode levar à decomposição destes constituintes termolábeis, e o aquecimento prolongado em contato com a água pode conduzir à hidrólise de ésteres, polimerização de aldeídos ou à decomposição de outros compostos.

A qualidade do extrato de plantas é muito influenciada pela metodologia de extração utilizada. A extração de compostos bioativos de plantas tem sido realizada por vários métodos, entre eles, os sistemas aquosos (SIVASOTHY et al., 2011; KAMAZERI et al., 2012), os alcoólicos (KADER et al., 2011; CHAN; LIM; OMAR, 2007) e, mais recentemente, os fluidos supercríticos (FORNARI et al., 2012; MESOMO et al., 2012).

2.3.1 Extração por arraste de vapor d'água

A extração por arraste de vapor d'água é um dos métodos mais simples e mais utilizados. Na indústria de óleos essenciais existem três tipos de extrações, distinguidas pela forma como se estabelece o contato entre a amostra e a água, na fase líquida ou de vapor; a primeira é chamada de hidrodestilação, onde a amostra fica imersa na água contida em um recipiente; a segunda pela ação do vapor da água colocada em ebulição e separada da amostra por uma tela; e a terceira por injeção direta de vapor no material acondicionado em cesto metálico (WILLIAMS, 1996).

2.3.2 Extração com solvente orgânico

A extração por solvente foi desenvolvida para permitir maior extração a menores temperaturas. Neste tipo de extração, o solvente passa através de um leito espesso de partículas preparadas de modo que o solvente possa escoar facilmente. A separação dos compostos é conseguida pela transferência destes de uma fase para outra (sólido-líquido, líquido-líquido). A extração por solvente utiliza as diferenças em interações intermoleculares na fase líquida (WENNERSTEN, 1992). O processo constitui-se em duas etapas: a primeira, rápida e fácil, de dissolução, e outra mais demorada, de difusão, e por isso, considerada a etapa limitante. Como resultado, tem-se uma extração com velocidade elevada no início e em seguida, decrescente, não se atingindo uma remoção completa, na prática (MORETTO; FETT, 1998).

Normalmente, a extração por solvente é realizada a temperaturas e pressões ambientes, como no caso da percolação. Aplicam-se pressões mais altas quando são necessárias temperaturas mais elevadas, ou seja, quando as condições de equilíbrio ou de transferência de massa são mais favoráveis em temperaturas mais elevadas (WENNERSTEN, 1992).

A extração por solventes tem como principais desvantagens o fato dos solventes clássicos serem geralmente pouco seletivos e sua eliminação aumentar os custos energéticos e os riscos de perda dos compostos voláteis.

Mesmo sendo um método muito utilizado na extração de compostos orgânicos, o tempo de extração que costuma ser muito elevado, variando de 1 a 72 horas, pode ser considerado uma restrição (MIGUEL; ANDRADE, 1989). Além disso, os solventes normalmente são tóxicos e deixam resíduos no extrato obtido, o que dificulta a sua aplicação na área farmacêutica e de alimentos. Neste processo, o solvente extrai o material orgânico retido na amostra, a temperatura de ebulição do solvente, o que em algumas situações pode provocar transformações químicas nos componentes extraídos. O processo de extração não é seletivo e, basicamente, a temperatura de extração e a natureza do solvente determinam o poder de dissolução (SYNDER; KIRKLAND, 1979; VALE, 1997).

2.3.3 Extração por fluido supercrítico

A extração por fluido supercrítico é uma técnica alternativa e tem sido empregada para a obtenção de extratos de alto valor agregado a partir de plantas e diversos produtos naturais, tanto na área acadêmica como industrialmente, especialmente para os setores de alimentos, de fármacos e de cosméticos (QUISPE-CONDORI et al., 2005; DANIELSKI; MICHIELIN; FERREIRA, 2007).

A utilização de um fluido pressurizado (em condições super ou subcríticas) para a obtenção de extratos é conhecido por ser um método rápido e eficiente para a extração de compostos não-polares a partir de fontes vegetais. Solventes supercríticos ou pressurizados são de particular interesse uma vez que as suas propriedades físico-químicas (densidade, difusividade, viscosidade, constante dielétrica) podem ser ajustadas por meio da alteração da pressão e da temperatura, o que permite o controle do poder de solvatação e da seletividade do solvente durante o processo de extração (PRONYK; MAZZA, 2009). As condições moderadas utilizadas para obter extratos naturais podem reduzir significativamente os problemas relacionados com a degradação térmica dos compostos (PRONYK; MAZZA, 2009; REVERCHON; DE MARCO, 2006). Além disso, facilita a recuperação do solvente devido à volatilidade do fluido e permite a obtenção de bons rendimentos de extratos limpos associados a um tempo de extração curto.

As altas solubilidades, taxas de transferência de massa e seletividade fazem da extração por tecnologia de fluido supercrítico uma metodologia bastante atrativa. A seletividade do processo de extração depende principalmente da densidade do solvente supercrítico, a qual pode ser alterada pela variação das condições do processo. O baixo calor latente de evaporação no processo e a alta volatilidade dos solventes permitem obter extratos ativos isentos de resíduos tóxicos e com uma qualidade final elevada quando comparados aos produtos obtidos por técnicas convencionais. Além disto, a extração levada a cabo a baixas temperaturas preserva os produtos termicamente degradáveis (BALACHANDRAN; KENTISH; MAWSON, 2006).

A extração de produtos naturais sólidos com fluido pressurizado é feita utilizando um extrator de leito fixo, onde o leito é formado pelo próprio material vegetal. No início do processo extrativo a matriz sólida absorve o solvente

supercrítico, que é alimentado no extrator puro e distribuído uniformemente no interior do leito fixo de partículas sólidas, o que faz com que a estrutura das células e os canais intercelulares dilatam, diminuindo a resistência à transferência de massa. Ao mesmo tempo, ocorre a dissolução dos compostos que podem ser extraídos pelo solvente e os mesmos são transferidos por difusão de dentro do sólido até a sua superfície. A transferência de massa do soluto da fase sólida para a fase fluida ocorre pelo escoamento do solvente através do material vegetal, e em qualquer ponto dentro do extrator a concentração de óleo na fase sólida e fluida varia continuamente até que o equilíbrio seja alcançado. O processo ocorre em regime transiente, pois o leito permanece fixo e a concentração do óleo na fase fluida varia com o tempo e a posição. A mistura soluto/solvente é facilmente separada em um decantador (BRUNNER, 1994).

De acordo com Recansens et al. (1999), a extração com fluidos supercríticos sofre influência da temperatura, pressão, tamanho da partícula, velocidade do fluido, densidade e natureza do solvente. Sendo que a taxa de extração é maior quanto maior a solubilidade do soluto no solvente.

Um fluido supercrítico é definido como uma substância que está acima da sua temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c). O ponto crítico representa a maior temperatura e pressão em que a substância pode existir como vapor e líquido em equilíbrio.

O diagrama de fases apresentado na Figura 4 mostra as áreas onde uma substância pura existe como gás, líquido, sólido ou como um fluido supercrítico. A curva representa a temperatura e pressão onde duas fases coexistem em equilíbrio (no ponto triplo, as três fases coexistem), conhecida como curva de vaporização. Conforme a temperatura e a pressão são aumentadas ao longo da curva de vaporização, o líquido torna-se menos denso, devido à expansão térmica, e o gás torna-se mais denso, devido ao aumento da pressão. Eventualmente, as densidades das duas fases convergem e tornam-se idênticas, a distinção entre o gás e o líquido desaparece, e a curva de vaporização chega ao final no ponto crítico.

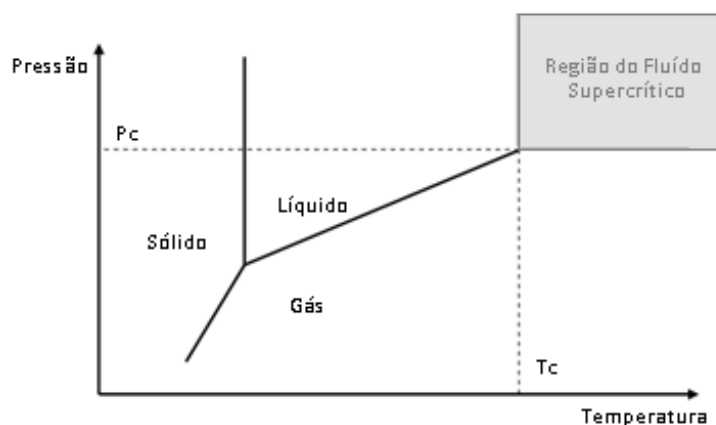


FIGURA 4 – DIAGRAMA GENÉRICO DE FASES DE UMA SUBSTÂNCIA PURA

Uma das propriedades do fluido supercrítico é de apresentar características intermediárias entre líquido e gás. Nas regiões próximas ao ponto crítico o fluido tem densidade e difusividade similar à de líquido, porém viscosidade comparável à dos gases. Assim, o fluido supercrítico apresenta bom poder de solvatação e alta difusividade.

A escolha de um solvente para extração como fluido supercrítico deve atender os seguintes requisitos: possuir bom poder de solvatação, ser inerte ao produto, ser facilmente separado do produto, ser relativamente barato e ter pressão crítica baixa por razões econômicas. Para a aplicação da tecnologia supercrítica, existe uma série de substâncias que podem ser usadas como fluido supercrítico, de acordo com Hierro (1994). A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de substâncias que podem ser utilizadas como fluidos supercríticos e sua respectiva T_c e P_c .

Diversos fluidos podem ser aplicados em condições subcríticas e supercríticas. No entanto, o CO_2 é o solvente mais amplamente utilizado para obter extratos naturais, devido à suas características termodinâmicas e suas propriedades físico-químicas. Este solvente apresenta ponto crítico em condições relativamente brandas, T_c de 31 °C e P_c de 7,29 MPa (BRUNNER, 1994). Além disso, pode ser comumente empregado na indústria de alimentos e de aromas por ser não tóxico, não carcinogênico, não inflamável, não ser prejudicial à saúde humana quando inalado a baixas concentrações, ser facilmente removido do material extraído e ecologicamente correto (MUKHOPADHYAY, 2000; DANH et al., 2009). Além disso, quando o CO_2 supercrítico é usado como solvente para a extração de compostos termolábeis, a atividade biológica destes compostos é relativamente elevada,

quando comparados com os solventes orgânicos (SEBASTIAN et al., 1998; SCHWARZ; TERNES, 1992; CASAS et al., 2009). Isto é devido principalmente ao fato de que no processo convencional é empregado um solvente orgânico em temperaturas mais elevadas que podem provocar a oxidação dos compostos especialmente durante a recuperação do solvente.

TABELA 1 – ALGUNS DOS SOLVENTES UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (HIERRO, 1994)

Substância	T _c (°C)	P _c (MPa)
CO₂	31	7,29
Água	374	21,72
Metano	-82	4,54
Etano	32	4,82
Propano	97	4,19
Pentano	197	3,33
Etileno	9	4,97
Tolueno	319	4,06
Metanol	240	7,99
Etanol	241	6,06
Acetona	235	4,64
Éter etílico	194	3,59

Estudos mostram que o propano também tem sido utilizado para extração de produtos naturais, com resultados interessantes (ILLÉS et al., 2000; HEGEL et al., 2007; HAMDAN et al., 2008; FREITAS et al., 2008; CORSO et al., 2010). Embora não apresente muitas das qualidades do dióxido de carbono, em algumas situações, poderia ser um solvente melhor para extração de óleos e produtos naturais. O propano é relativamente barato, não deixa resíduo tóxico e tem um alto poder de solvatação (SPARKS et al., 2006). Além disso, as pressões envolvidas na extração de óleo utilizando propano são mais baixas do que aquelas na extração de óleos vegetais com CO₂ supercrítico, e a solubilidade de óleos vegetais em CO₂ supercrítico é baixa se comparada à solubilidade em propano, pois o propano líquido ou pressurizado é completamente miscível no óleo a temperatura ambiente. Do ponto de vista econômico, processos com baixas pressões e temperaturas, podem reduzir custos na extração, com alto rendimento, em menor tempo, e consequentemente menor consumo de solvente, sendo possível, portanto, otimizar o

processo. (ILLÉS et al., 2000; ILLÉS et al. 1997; BRAVI et al., 2002; HEGEL et al., 2007; CORSO, 2008; FREITAS et al., 2008; PEDERSSETTI, 2008).

No entanto, as informações sobre as comparações entre os processos de extração empregando CO₂ supercrítico e propano comprimido ainda são escassas na literatura, especialmente no que diz respeito à obtenção de compostos bioativos. Aspectos relacionados com a cinética de extração, assim como a composição química dos extratos são extremamente importantes para melhorar a compreensão dos fenômenos envolvidos no processo de extração com fluidos pressurizados.

Zancan et al. (2002) observaram que a taxa de transferência de massa e rendimento aumenta com a diminuição da densidade de CO₂ e estes autores observaram que a eficiência global do processo foi aumentada depois de um aumento de temperatura de 25 °C para 30 °C.

Norulaini et al. (2009) avaliaram o efeito de diferentes combinações de temperatura, pressão e de massa de CO₂ sobre o rendimento da extração de gengibre e observaram que a interação entre a pressão e a temperatura reduz o rendimento e a interação entre a temperatura e a massa de CO₂ apresentou um efeito positivo sobre o rendimento da extração. A combinação de baixa pressão e baixa temperatura conduziu a rendimentos mais baixos, enquanto que a alta pressão (50 MPa) e baixas temperaturas (30 °C – 40 °C) aumentaram o rendimento da extração.

Monteiro (1999) estudou a extração do óleo essencial/oleorresina de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) com CO₂ supercrítico, de modo a avaliar a influência do tamanho da partícula, da temperatura e do tempo de extração no rendimento global e na composição química do óleo volátil/oleorresina de gengibre. Os resultados obtidos mostraram que os rendimentos mais elevados e mais baixos foram obtidos quando partículas de tamanho médio e a mistura de todos os tamanhos foram utilizados, respectivamente. O autor também avaliou os efeitos da pressão (7,0 MPa a 25,0 MPa) e da temperatura (16 °C e 38 °C) sobre a taxa de transferência de massa durante a extração e no rendimento de oleorresina obtida durante o período em que a taxa de extração foi constante. A análise estatística realizada por estes autores mostrou que o efeito de pressão foi predominante no processo.

Pederssetti et al. (2011) investigaram o processo de extração de óleo de sementes de canola (*Brassica napus*) usando CO₂ supercrítico e propano

comprimido como solventes. Os resultados indicaram que a pressão e a temperatura são variáveis importantes no processo de extração com CO₂, enquanto que para o propano apenas a temperatura teve efeito sobre o rendimento. A extração com propano foi mais rápida e maiores rendimentos foram encontrados. Os extratos apresentaram composição química semelhante. Resultados semelhantes foram encontrados por Corso et al. (2010) que avaliaram a extração de sementes de gergelim (*Sesamun indicum* L.). Vale ressaltar que nos dois casos a matéria-prima era rica em triacilglicerol.

Quando duas fases de composições diferentes ficam em contato durante certo intervalo de tempo pode ocorrer transferência de massa de uma fase para outra até atingir um estado de equilíbrio, que em alguns casos é denominado de solubilidade. Os processos de destilação, absorção, dessorção, separação por membranas, extração sólido-líquido, extração líquido-líquido e, também, os processos de extração envolvendo fluidos supercríticos baseiam-se na diferença do potencial químico das fases em equilíbrio (SANT'ANA, 1996).

O comportamento cinético de uma extração é descrito por uma curva global de extração (*Overall extraction curve* – OEC). Uma curva global de extração é determinada considerando a massa de extrato determinada em função do tempo de extração. A informação fornecida é o tempo requerido para uma batelada (um ciclo de extração). Uma OEC típica pode ser descrita por três etapas (MEIRELES, 2008):

i) Etapa de taxa de extração constante (CER, *constant extraction rate period*): a retirada do extrato que está recobrando a superfície externa da partícula ocorre a uma velocidade aproximadamente constante, predominando o fenômeno de convecção.

ii) Etapa com taxa decrescente de extração (FER, *falling extraction rate period*): começa a aparecer resistência à transferência de massa na interface sólido-fluido devido a falhas na camada superficial de soluto que recobre as partículas. Os efeitos de transferência de massa por convecção e por difusão são importantes.

iii) Etapa controlada pela difusão (DC, *diffusion-controlled rate period*): período caracterizado pela retirada do extrato através do mecanismo de difusão. Nesta etapa não há soluto na superfície da partícula sólida.

Uma das maiores dificuldades na simulação das curvas globais de extração é

encontrar um modelo matemático que represente de forma generalizada o que ocorre nos processo de extração com fluido supercrítico (SFE).

2.4 ESTUDOS SOBRE A OBTENÇÃO E ANÁLISES DE EXTRATO DE GENGIBRE

Roy, Goto e Hirose (1996) estudaram os efeitos da vazão do solvente, distribuição de tamanho de partícula, temperatura (15 °C - 80°C) e pressão (8-30 MPa) sobre a cinética de extração supercrítica de gengibre com CO₂. Para a pressão de 24,5 MPa, a taxa de transferência de massa aumentou com o aumento da temperatura, enquanto a 10.8 MPa, diminuiu (ROY; GOTO; HIROSE, 1996). Yoney et al. (1995) usou um tipo de gengibre chinês para verificar a influência das variáveis de processo no rendimento e na composição dos extratos Estes autores observaram que o aumento da vazão do solvente promoveu a diminuição da concentração de compostos voláteis e o aumento na quantidade extraída de 6-gingerol.

Spiro et al. (1990) estudaram a extração de 6-gingerol de gengibre jamaicano a 30 °C usando vários solventes: diclorometano, etanol, álcool isopropílico e uma mistura de acetona e água (80:20 (v:v)). As maiores quantidades de 6-gingerol foram extraídas com álcool isopropílico. Os coeficientes de partição de 6-gingerol sobre estes solventes orgânicos são maiores do que para o dióxido de carbono (SPIRO; KANDIAH, 1990).

Badalyan, Wilkirson e Chun (1998) observaram que o uso do etanol (2 %, em massa), como cosolvente aumentou a produtividade em aproximadamente 10 % para gengibre australiano em comparação com o rendimento obtido com CO₂ líquido puro a 25 °C, no entanto, a 35 °C o rendimento diminuiu. As curvas de extração global obtidas por esses autores apresentaram a forma típica: taxa constante de extração (CER), taxa de decaimento de extração (FER) e difusão controlada (DC). Os autores determinaram que, durante o período CER foram extraídos os compostos mais voláteis, que formam o óleo essencial de gengibre. No período de FER, eles obtiveram a oleorresina, responsável por 50 % do rendimento global. Com esses resultados, os autores concluíram que o uso do etanol como co-solvente aumentou a produtividade durante esta fase do processo. O período DC foi

responsável por aproximadamente 15 % do rendimento global (BADALYAN; WILKIRSON; CHUN, 1998).

Monteiro (1999) estudou a extração supercrítica do óleo volátil / *oleorresina* de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) com CO₂ supercrítico, com objetivo de avaliar a influência da temperatura, tamanho de partículas e tempo de extração no rendimento global e na composição química do óleo volátil / *oleorresina* de gengibre. Os resultados encontrados pelo autor mostraram que o maior e menor rendimentos foram obtidos quando as frações médias (secas a 30 °C / 60 min) e a mistura de todas as frações respectivamente foram usadas. Também foram avaliados os efeitos das variáveis de processo: pressão de 7 a 25 MPa, temperatura de 16 a 40 °C e vazão do solvente, na taxa de transferência de massa, no tempo de extração e no rendimento da oleorresina para o período de taxa de extração constante. A análise estatística concluiu que o efeito da pressão foi predominante no processo.

Nóbrega et al. (1997) obtiveram maiores quantidades 6-gingerol no final do processo de SFE. Monteiro (1999) observou que a taxa de transferência de massa na SFE de gengibre realizada a 40 °C é significativamente menor do que a 30 °C. Os rizomas de gengibre podem ter até 80 % de carboidratos (TAVEIRA MAGALHÃES, 1997) e a 40 °C pode iniciar a gelatinização do amido. Este fenômeno pode obstruir as paredes celulares das partículas de gengibre, causando a diminuição da taxa de transferência de massa. Assim, considerando a presença de amido e que alguns dos componentes do extrato de gengibre são termolábeis, os autores recomendam que a temperatura do processo deve ser mantida abaixo de 40 °C.

Zancan et al. (2002) avaliaram os efeitos da temperatura, pressão e da adição de cosolvente (etanol e álcool isopropílico), sobre a cinética de extração da *oleorresina* de gengibre. Os resultados mostram que a temperatura e a interação entre a pressão e o solvente afetaram significativamente o rendimento total. A taxa de transferência de massa aumentou com a pressão na ausência do co-solvente e diminuiu quando etanol e álcool isopropílico foram utilizados. As principais substâncias presentes no extrato de gengibre foram α -zingibereno, gingeróis e shogaóis; as quantidades desses compostos foram significativamente afetadas pela temperatura, pressão e solventes. No entanto, a atividade antioxidante do extrato de gengibre permaneceu constante em aproximadamente 80 % e diminuiu para

aproximadamente 60 % na ausência de gingeróis e shogaóis.

Wang et al. (2006) estudaram a extração de óleos essenciais a partir de materiais vegetais secos por micro-ondas, adicionando um meio de absorção de micro-ondas (MAM) a um reator e extração de micro-ondas sem solventes (SFME). Com um poder de irradiação de micro-ondas de 85 W, em cerca de 30 minutos os óleos essenciais foram extraídos completamente. Os resultados encontrados foram comparados com aqueles obtidos através da utilização de SFME convencional, hidrodestilação assistida por micro-ondas, (MAHD) e hidrodestilação convencional (HD), e a conclusão foi que a SFME é um meio viável de extração de óleos essenciais a partir de materiais vegetais secos, pois houve poucas diferenças entre a composição dos óleos essenciais extraídos.

Bua-in e Paisooksantivatana (2009) avaliaram a variação na composição do óleo essencial e na atividade antioxidante de extratos de gengibre de diferentes regiões da Tailândia obtidos por extração em micro-ondas (BUA-IN; PAISOOKSANTIVATANA, 2009). Tais autores concluíram que os rizomas provenientes das diferentes regiões possuem quantidades diferentes de óleo essencial, sendo que as amostras coletadas da Tailândia ocidental continham maior quantidade ($11,07 \text{ mL.kg}^{-1}$), enquanto as do leste da Tailândia continham o menor volume ($4,95 \text{ mL.kg}^{-1}$). Foram identificados 15 compostos nas amostras estudadas, porém não foram identificadas diferenças significativas nos componentes do óleo essencial entre as fontes estudadas. A atividade antioxidante dos extratos etanólicos mostrou-se significativamente diferente ($p < 0,05$), sendo que o extrato do rizoma do norte apresentou a maior atividade (80,88 %), seguido por aqueles do leste (76,47 %), do sul (72,51 %), do nordeste (67,38 %), do oeste (66,66 %) e da região central (57,63 %).

Puengphan e Sirichote (2008) monitoraram o conteúdo de 6-gingerol durante o processo de secagem e de extração com CO_2 supercrítico de gengibre e analisaram as propriedades dos extratos bioativos obtidos. Após o processo de secagem ($11,54 \pm 0,29$ % de umidade), o conteúdo de 6-gingerol dos rizomas de gengibre foram reduzidos de $21,15 \pm 0,13$ para $18,81 \pm 0,15 \text{ mg.g}^{-1}$ (base seca). A extração supercrítica de gengibre com CO_2 foi realizada nas condições de 20 MPa a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e 23 MPa a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Os extratos de ambas as condições apresentaram 6-gingerol nas quantidades de $238,94 \pm 0,79$ e $170,50 \pm 0,45 \text{ mg.g}$ de extrato $^{-1}$, e teor

de fenóis totais de $183,96 \pm 1,25$ e $126,04 \pm 0,72$ mg de ácido gálico.g de extrato⁻¹, respectivamente (PUENGPHEAN; SIRICHOTE, 2008).

Rodrigues et al. (2002) avaliaram a aplicação do método dinâmico para a medida da isoterma de solubilidade em sistemas pseudo-ternários constituído pelo material vegetal (estrutura celulósica + soluto) e CO₂. Os dados experimentais foram medidos em dois laboratórios independentes, utilizando três equipamentos e três espécies vegetais diferentes: cravo da Índia (*Eugenia caryophyllus*), gengibre (*Zingiber officinale*) e eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*). A solubilidade para o sistema botões de cravo-da-índia/ CO₂ variou de 0,220 a 0,277 (kg de extrato.kg de CO₂⁻¹) na isoterma de 15 °C. A solubilidade para o sistema gengibre/ CO₂ variou de $2,00 \times 10^{-3}$ a $7,2 \times 10^{-3}$ kg de extrato.kg de CO₂⁻¹ no intervalo de pressão 10 a 30 MPa e temperatura 20 °C a 40 °C. A solubilidade do sistema eucalipto/CO₂, na isobárica de 6,67 MPa, variou de 3,95 a $4,7 \times 10^{-3}$ kg de extrato.kg de CO₂⁻¹.

Diante dos trabalhos apresentados pela literatura, a presente investigação pretende contribuir para o levantamento dos principais parâmetros envolvidos no processo de obtenção do extrato de gengibre utilizando diferentes processos de extração e comparar o perfil químico dos extratos de gengibre obtidos. Além disso, estudar a atividade antioxidante e antibacteriana dos extratos obtidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

Os rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) foram adquiridos de um produtor da cidade de Morretes, região litorânea do Estado do Paraná, Brasil. Os rizomas (40 kg) foram colhidos em agosto de 2010, lavados e sanitizados, depois armazenados em temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ em embalagens plásticas de polipropileno (1 kg), protegendo os rizomas contra a ação dos micro-organismos e retardando as reações bioquímicas. As amostras foram cortadas em toletes, ainda com casca, e secas em estufa com circulação de ar a temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ZANCAN *et al.*, 2002) até peso constante. O gengibre seco foi armazenado em sacos plásticos de polipropileno (1 kg) em freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Imediatamente antes da extração, as amostras de gengibre seco e congeladas foram moídas em moinho de facas e separadas usando peneiras da série Tyler com diferentes aberturas, com ajuda de um agitador mecânico (Produtest, São Paulo, Brasil). Para caracterização físico-química do material foi estimado o diâmetro médio das partículas pelo método apresentado por Gomide (1983), Equação 2, considerando a fração mássica do material moído nas seguintes séries: mesh 12 (25 %), mesh 14 (10 %), mesh 20 (25 %), mesh 28 (25 %) e mesh 48 (15 %) (GOMIDE, 1983).

$$D_m = \sum X_i \cdot D_i \quad (2)$$

Onde:

D_m = Diâmetro médio das partículas

x_i = fração de massa retida na peneira

D_i = diâmetro de abertura da peneira

3.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E DA DENSIDADE DAS PARTÍCULAS

O conteúdo de umidade (U) das amostras de gengibre foi determinado pelo método de destilação com tolueno, de acordo com AOCS (1998), que distingue água do material volátil. Os valores foram calculados pela Equação 1 (AOCS, 1998).

$$U = \left(\frac{V_{H_2O} \cdot \rho_{H_2O}}{m_{amostra}} \right) \times 100 \quad (1)$$

onde V_{H_2O} é o volume da fase aquosa, ρ_{H_2O} é a densidade da água e $m_{amostra}$ é a massa da amostra.

Para posterior estudo da modelagem do processo, foi calculada a densidade real do gengibre moído, que foi determinada utilizando-se a técnica da picnometria em gás hélio pelo Instituto de Química da Unicamp, Campinas, Brasil. A densidade aparente foi calculada usando-se o volume total da célula de extração e a massa total de gengibre necessária para empacota-la. Com os dados de densidade real e aparente, foi calculada através da Equação 3 a porosidade do leito.

$$\varepsilon = 1 - \frac{d_a}{d_r} \quad (3)$$

Onde:

ε = porosidade

d_a = densidade aparente das partículas

d_r = densidade real das partículas

3.3 EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO

O extrato etéreo foi obtido de aproximadamente 5 g de gengibre seco e moído, em triplicata, por extração em Soxhlet (Nova Etica, Brazil) usando éter de

petróleo a 60 °C por 6 horas, seguido pela remoção do solvente a 40 °C, de acordo com a metodologia oficial determinação de extrato etéreo da AOAC (1999).

3.4 HIDRODESTILAÇÃO

O método da hidrodestilação foi empregado para obtenção do óleo essencial dos rizomas de gengibre usando o aparato de Clevenger de acordo com a metodologia recomendada pela Farmacopéia Brasileira (1999). Um total de 25 g de gengibre seco e moído foi homogeneizado e colocado em um balão de fundo redondo com 1000 mL de água destilada. A mistura foi levada a ebulição por 180 minutos em pressão atmosférica. O óleo amarelo brilhante obtido foi separado e seco com sulfato de sódio anidro para a remoção de traços de umidade. O óleo foi armazenado em frascos âmbar a temperatura de 4 °C até seu uso nas análises.

3.5 PROCESSO DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

Os experimentos de extração foram realizados na unidade de extração supercrítica do Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada (LACTA), da Universidade Federal do Paraná. A obtenção dos extratos de gengibre foi realizada em um extrator batelada (0,08 m³ de volume interno, $L = 0,16$ m, $\phi = 2,52 \times 10^{-2}$ m), com controle de temperatura e pressão. O sistema é composto por um extrator encamisado para controle de temperatura, um banho ultratermostatizado, uma válvula agulha para controle de fluxo na saída do extrator, uma bomba tipo seringa de alta pressão, uma bomba de deslocamento positivo, e ainda, sensores e transdutores de pressão e temperatura. Para a determinação da cinética de extração supercrítica e subcrítica, foram usados os solventes CO₂ (White Martins S.A., 99,5 % de pureza na fase líquida) e propano (White Martins S.A., 99,5 % de pureza na fase líquida). As extrações foram conduzidas em vazões que variaram de 0,19 a 0,96 kg.min⁻¹ para o CO₂ e de 0,43 a 0,52 kg.min⁻¹ para o propano. Para determinar a influência dos fatores principais, pressão e temperatura, foi usado um planejamento fatorial 2² com triplicata do ponto central. Para todas as corridas, o extrator foi

carregado com 25 g de gengibre seco e moído, com conteúdo de umidade de $10,80 \pm 1,04$ %, formando um leito fixo. Os experimentos foram realizados nas temperaturas de 20, 40 e 60 °C para ambos os solventes e pressão de 8,0, 16,5 e 25,0 MPa para o CO₂ e 3,0, 6,5 e 10,0 MPa para o propano. As amostras de extrato de gengibre foram coletadas em frascos âmbar em intervalos de 10 minutos, com um tempo total de processo de 180 minutos. Na Figura 5 é apresentado um diagrama esquemático da unidade de extração para fluidos pressurizados.

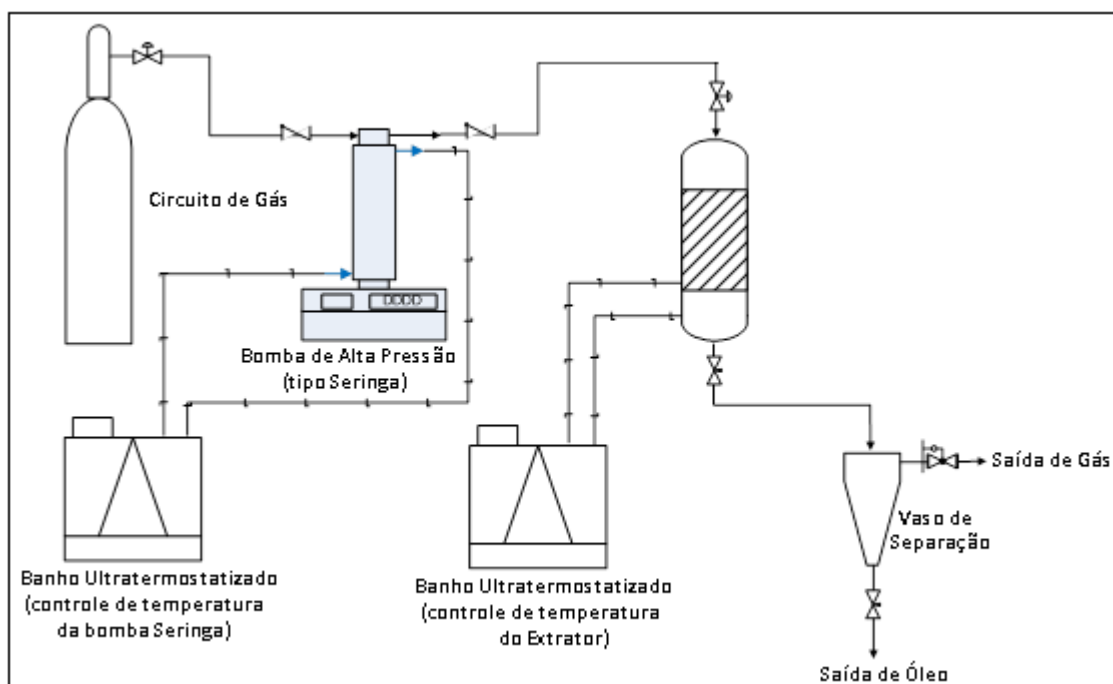


FIGURA 5 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO APARATO EXPERIMENTAL MONTADO EM ESCALA DE LABORATÓRIO PARA A OBTENÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS UTILIZANDO FLUIDO PRESSURIZADO COMO SOLVENTE.

3.6 ANÁLISE DO EXTRATO

A determinação da composição química dos extratos obtidos foi realizada no Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos (LACAUT) por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização em chamas (CG-FID) (VARIAN, modelo 450-GC) equipado com coluna capilar de sílica fundida (CP-SIL 8CB; 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) usando hélio como gás de arraste (White Martins Gases Industriais, 99,9 % de pureza). As temperaturas do injetor e detector foram 250 °C e 300 °C,

respectivamente. A seguinte programação foi usada: 60 °C – 250 °C a 3 °C.min⁻¹, a razão de split foi 1:200 e a vazão de hélio 1,0 cm³.min⁻¹. A preparação das amostras para injeção foi realizada pela diluição simples do extrato coletado em etanol (P.A. grau cromatográfico). A quantificação dos componentes principais foi conduzida pelo método da normalização simples de áreas onde a porcentagem de área de cada componente foi dividida pela área total dos compostos detectados e o resultado foi multiplicado por 100. A identificação dos componentes principais foi realizada por CG-MS (Varian, modelo CP 3800 / Saturn 2000) nas mesmas condições analíticas usadas para o sistema CG-FID e a mesma coluna cromatográfica. A identificação foi confirmada pela comparação do espectro de massa com os dados da biblioteca do CG e o índice de retenção (ADAMS, 2007).

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

A atividade antioxidante total dos extratos obtidos via tecnologia supercrítica (CO₂ e propano como solventes) foi determinada pelo método espectrofotométrico de redução do composto fosfomolibdico descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999). O método é baseado na redução de Mo⁺⁶ para Mo⁺⁵ com subsequente formação do complexo fosfato-Mo⁺⁵, que apresenta absorção máxima em 695 nm. Uma alíquota de 0,02 mL da solução (0,01 mL de extrato de gengibre e 25 mL de etanol) foi combinada com 1,5 mL da solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônia 4 mM). As amostras foram incubadas a 95 °C por 90 minutos. Em seguida as amostras foram resfriadas até temperatura ambiente, centrifugadas e a absorbância da solução foi medida a 695 nm contra um branco (1,5 mL da solução reagente e 0,02 mL de etanol). Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mg de α-tocoferol / g de extrato (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

As propriedades antibacterianas do óleo essencial de gengibre (obtido por

hidrodestilação) e dos extratos (obtidos utilizando CO₂ como solvente) foram testadas pelo método de difusão em ágar (BAUER et al., 1996). Foram testadas 2 cepas de bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e *Listeria monocytogenes* (ATCC19111) e 4 cepas de bactérias Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC14028), *Shigella flexneri* (ATCC12022).

As cepas selecionadas foram inoculadas em 10 mL de caldo tripticase de soja (TSB) a 37 °C por 24 horas. Suspensões dessas bactérias (100 µL) foram preparadas, ajustadas comparando-se com tubo padrão de turbidimetria 0,5 da escala Mc Farland e semeadas usando swab estéril em placas contendo ágar tripticase de soja (TSA). Depois da completa absorção do inoculo pelo meio de cultura foram feitos poços (orifícios) de 7 mm de diâmetro. O óleo essencial e os extratos de gengibre foram dissolvidos em DMSO (1 mL de óleo / extrato em 3 mL de DMSO) e 40 µL dessa solução foi adicionada nos diferentes poços (orifícios) nas placas. As placas foram mantidas a temperatura ambiente (20 °C) por 3 horas para a difusão da solução no meio de cultura antes do crescimento das bactérias e incubadas a 37°C por 24 horas. Como controle negativo foi usado 40 µL de DMSO e como controle positivo 40 µL de tetraciclina (10 mg.mL⁻¹). A atividade antibacteriana foi determinada pela formação ou não de halos de inibição ao redor dos poços (orifícios). Os ensaios foram realizados em triplicata e os diâmetros dos halos de inibição (em mm) foram medidos.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente usando o software *Statistica* 7.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA), e cada resposta foi avaliada independentemente. O teste de Tukey foi usado para avaliar as diferenças entre as médias considerando um valor-p menor que 0,05 ($p < 0,05$) como estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES

As características das partículas e do leito usados no processo de extração supercrítico foram: diâmetro médio das partículas de $6,27 \times 10^{-4}$ m, densidade real das partículas de $1900,00 \text{ kg.m}^{-3}$, densidade aparente do leito de $226,42 \text{ kg.m}^{-3}$ e porosidade do leito de 0,88. O conteúdo de umidade do gengibre fresco foi de $83,91 \pm 1,67$ % (massa de água / massa de sólido seco) e para o gengibre seco foi de $10,80 \pm 1,04$ %.

A Tabela 2 apresenta as condições experimentais aplicadas na obtenção dos extratos e óleo essencial de gengibre e o rendimento obtido em cada processo. As densidades dos solventes nas condições aplicadas para processo de extração supercrítica também são apresentadas na Tabela 2. O rendimento dos extratos foi calculado como a massa de extrato obtida pela massa de material seco adicionada ao extrator. O rendimento da extração foi calculado no final do tempo de extração (180 min) para permitir a comparação direta entre os resultados obtidos nas diferentes condições experimentais. Os resultados obtidos nas extrações com CO_2 e propano e hidrodestilação foram correlacionados com os valores obtidos com éter de petróleo, visto que esta é a metodologia oficial para a determinação de extrato etéreo. Os resultados encontrados como porcentagem de extração podem ser vistos na Tabela 2.

A extração com éter de petróleo realizada na temperatura de ebulição do solvente por 6 h possibilitou um rendimento de 3,09 % em relação ao material seco adicionado no extrator (desvio padrão de 0,13 % baseado na triplicata dos ensaios). O maior rendimento de extrato de gengibre ($3,21 \text{ g de óleo. kg de gengibre}^{-1}$), usando CO_2 como solvente, foi obtido na pressão de 25,0 MPa e temperatura de 60 °C, que correspondem aos maiores valores de pressão e temperatura testados. Os menores rendimentos foram obtidos nos experimentos com menor pressão (8,00 MPa) a 60 °C. É importante observar que a densidade do CO_2 a 8,00 MPa e 60 °C ($193,00 \text{ kg.m}^{-3}$ como reportado na Tabela 2) (ANGUS; ARMSTRONG; REUCK, 1976) é menor que a densidade crítica do CO_2 de $466,06 \text{ kg.m}^{-3}$, sendo portanto

uma condição fora da região supercrítica para o CO₂. Assim, o rendimento de extração foi menor provavelmente devido ao fato de que nessas condições a densidade do CO₂ foi menor quando comparada com outras condições de pressão-temperatura aplicadas neste estudo, resultando em menor solubilidade do extrato e também em baixas taxas de transferência de massa durante a extração. Pode-se notar que os experimentos usando pressões de 25,0 MPa e 16,5 MPa também possibilitaram bons rendimentos, demonstrando o efeito positivo da pressão no processo de extração. A hidrodestilação, realizada próxima ao ponto de ebulição da água, durante 180 minutos alcançou um rendimento de extração de 1,79 % em relação ao material seco alimentado no Clevenger (desvio padrão de 0,10 % em massa com base em três ensaios).

TABELA 2 – CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RENDIMENTOS OBTIDOS NAS EXTRAÇÕES DE GENGIBRE USANDO CO₂, PROPANO E ÉTER DE PETRÓLEO COMO SOLVENTES E HIDRODESTILAÇÃO.

Ensaio	Solvente	T (°C)	P (MPa)	Densidade (kg.m ⁻³) ^d	Vazão (kg.min ⁻¹)	Rendimento da extração ^a (%)	Tempo de extração (min)	Porcentagem de extração ^b (%)
1	CO ₂	20 °C	8,0	828,8	0,83	1,97	180	63,75
2	CO ₂	20 °C	25,0	964,1	0,96	2,42	180	78,32
3	CO ₂	60 °C	8,0	193,0	0,19	0,22	180	7,12
4	CO ₂	60 °C	25,0	788,7	0,79	3,21	180	103,88
5 ^c	CO ₂	40 °C	16,5	803,8	0,80	2,35 (± 0,11)	180	77,35
6	Propano	20 °C	3,0	506,1	0,51	1,98	180	64,08
7	Propano	20 °C	10,0	521,5	0,52	2,29	180	74,11
8	Propano	60 °C	3,0	434,9	0,43	2,01	180	65,05
9	Propano	60 °C	10,0	467,4	0,47	2,70	180	85,11
10 ^c	Propano	40 °C	6,5	486,1	0,49	2,51 (± 0,12)	180	83,17
11	Éter de petróleo	-	0,09	-	-	3,09 (± 0,13)	360	100,00
12	Hidrodestilação	-	0,09	-	-	1,79 (± 0,10)	180	57,93

^a (massa de extrato dividida pela massa de material seco no leito) x 100.

^b (massa de extrato obtida na extração com solvente pressurizado no final do tempo total de extração dividida pela massa de extrato obtido com éter de petróleo)x100.

^c Valores médios e desvio padrão dos ensaios em triplicata.

^d As densidades do CO₂ e do propano foram obtidas de Angus, Armstrong e Reuck (1956) e Linstrom e Mallard (2012), respectivamente.

As curvas cinéticas obtidas na extração de gengibre usando as condições descritas na Tabela 2 com CO₂ supercrítico como solvente são apresentadas na Figura 6. Para todas as extrações a vazão de CO₂ foi de $1,0 \pm 0,2 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. Pode-se ver na Figura 6 que a maior taxa inicial de extração foi alcançada para a condição com CO₂ subcrítico, 20 °C e 8,0 MPa. Apesar disso, depois de 60 minutos de extração ocorre o termino com menor rendimento (1,97 %) e porcentagem de extração (63,75 %). A extração supercrítica com CO₂ a 60 °C e 25,0 MPa representa a condição mais eficiente, uma vez que o extrato de gengibre foi obtido com uma alta taxa inicial e o rendimento da extração e a porcentagem de extração foram maiores.

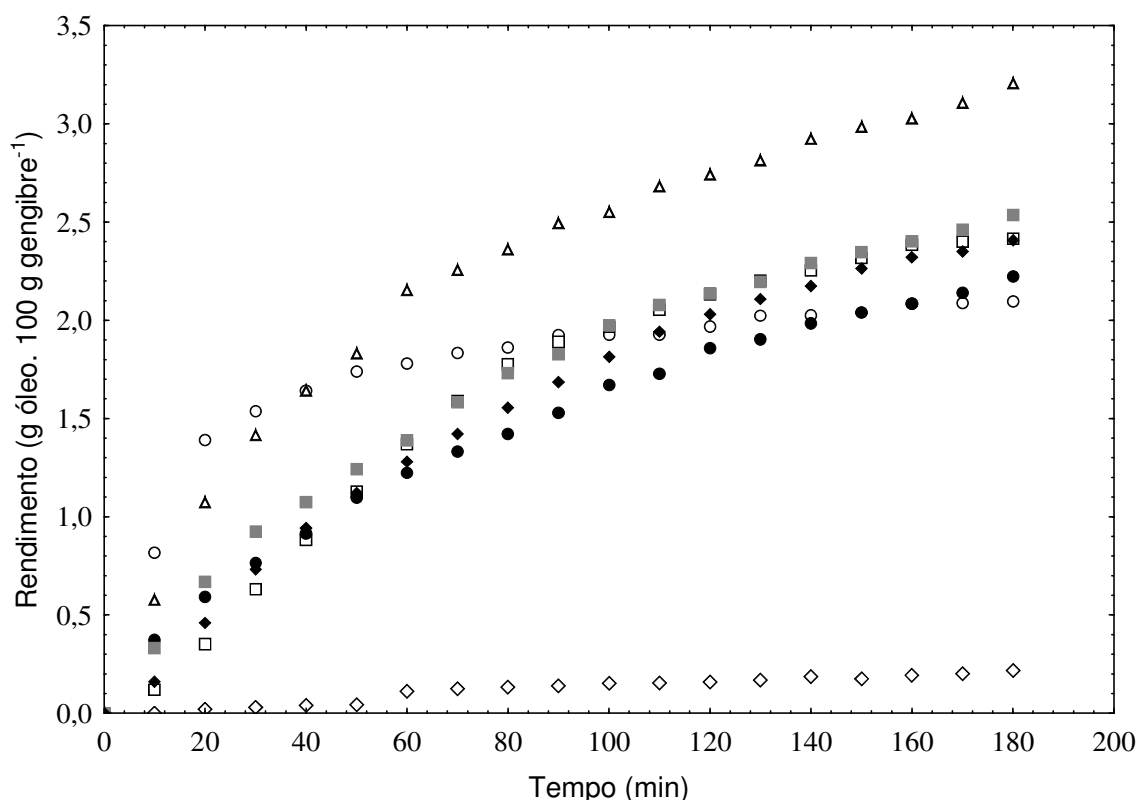


FIGURA 6 – CURVAS CINÉTICAS EXPERIMENTAIS PARA O PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE GENGIBRE USANDO CO₂ COMO SOLVENTE (○) 20 °C E 8,0 MPa, (□) 20 °C E 25,0 MPa, (◇) 60 °C E 8,0 MPa, (△) 60 °C E 25,0 MPa. SÍMBOLOS PREENCHIDOS SÃO AS TRIPLICATAS DO PONTO CENTRAL (40 °C E 16,5 MPa).

Considerando as extrações com propano como solvente pode-se observar que a pressão apresenta um efeito positivo no rendimento da extração. De acordo com os resultados obtidos na faixa de pressão e temperatura estudadas nota-se que

o efeito da temperatura não foi significativo. Na pressão de 3,0 MPa, temperaturas de 20 °C e 60 °C promoveram rendimentos similares de 1,98 % e 2,01 %, respectivamente. Quando a pressão é aumentada de 3,0 MPa para 10,0 MPa e a temperatura é mantida constante, o rendimento aumenta. De acordo com Corso et al., (2010) quando propano foi usado como solvente em extrações de sementes de sésamo, o efeito da temperatura foi mais pronunciado que o efeito da pressão. A literatura cita que o propano comprimido é considerado melhor solvente para a extração de triacilgliceróis que o CO₂ (HAMDAN et al., 2008; FREITAS et al., 2008; LANZA et al., 2005; NDIAYE et al., 2006a; NDIAYE et al., 2006b). Apesar disso, em relação à extração de gengibre deste estudo, o propano apresentou resultados satisfatórios quando comparados com os resultados obtidos para CO₂ supercrítico em termos de rendimento de extração.

A Figura 7 mostra as curvas cinéticas obtidas na extração de gengibre usando as condições descritas na Tabela 2 com propano como solvente. A partir das curvas cinéticas pode-se notar que a extração de gengibre usando propano comprimido a 60 °C e 10,0 MPa, e no ponto central (40 °C e 16,5 MPa) permitiu alcançar uma taxa constante de extração mais rapidamente que as outras condições estudadas. A maior quantidade de extrato foi obtida no início do processo, dentro de 30 a 60 min. Durante este período a taxa de extração aumentou quase linearmente com o tempo devido a transferência de massa ser facilitada pelo óleo presente na superfície. Depois de 60 a 80 min a massa de extrato foi extraída mais lentamente, com pouco aumento no rendimento. Depois deste período a massa extraída aumentou lentamente até os 150 min e permaneceu constante até o final do processo. As curvas para as outras condições testadas tiveram comportamento muito similar e fica evidente que o aumento da pressão e temperatura (60 °C e 25 MPa) aumentou o rendimento durante o período de extração, destacando a influência desses parâmetros na taxa de transferência de massa.

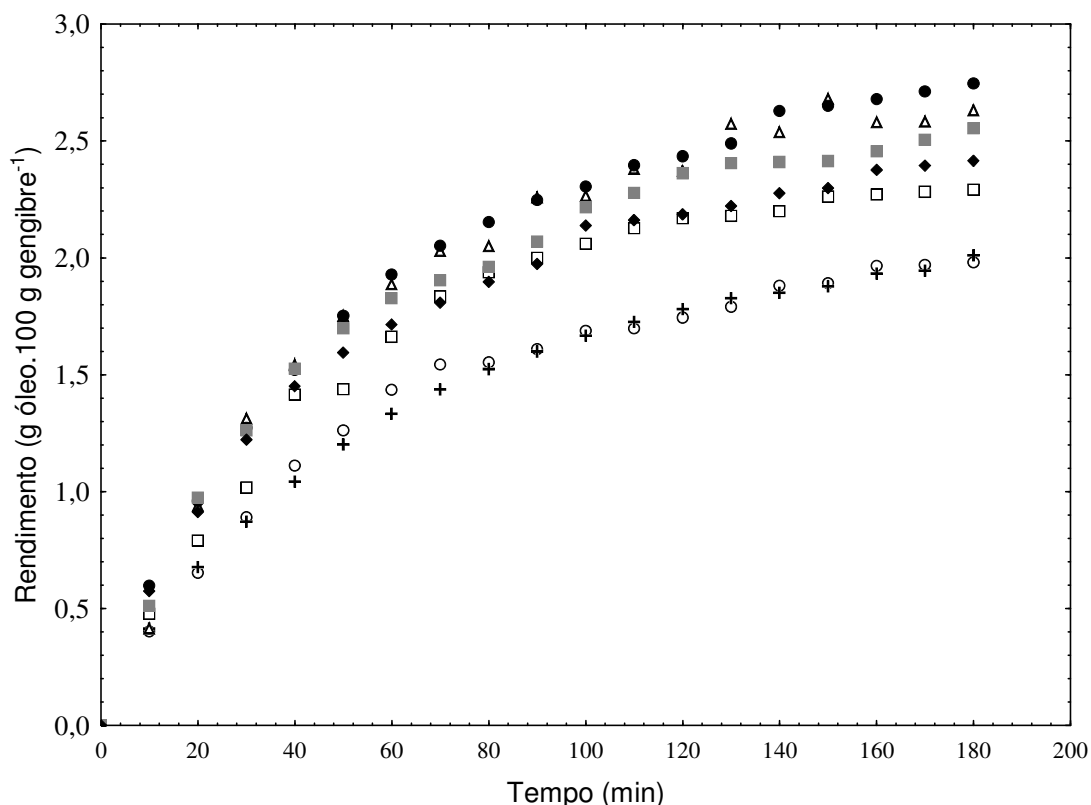


FIGURA 7 – CURVAS CINÉTICAS EXPERIMENTAIS PARA O PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE GENGIBRE USANDO PROPANO COMO SOLVENTE (●) 20 °C e 3,0 MPa, (□) 20 °C e 10,0 MPa, (△) 60 °C e 3,0 MPa, (◇) 60 °C e 10,0 MPa. SÍMBOLOS PREENCHIDOS SÃO AS TRIPLICATAS DO PONTO CENTRAL (40 °C e 6,5 MPa).

Como mencionado anteriormente, as curvas cinéticas da extração usando propano a 3,0 MPa e temperaturas entre 20 °C e 60 °C (Ensaio 6 e 8 – Tabela 2) mostram comportamento similar, como dados sobrepostos e rendimentos inferiores aos obtidos nas demais condições. Em todas as condições com propano o comportamento das curvas cinéticas foi similar ao comportamento observado quando CO₂ foi usado como solvente, no entanto, o período de taxa de extração constante foi alcançado mais rapidamente e o rendimento foi ligeiramente reduzido.

A solubilidade é fortemente influenciada pela temperatura e moderadamente influenciada pela pressão próxima ao ponto crítico, entretanto acima desse ponto, ambos os efeitos (temperatura e pressão) exercem influência significativa na solubilidade, sendo que a solubilidade aumenta com aumento da pressão e diminui com aumento da temperatura. O efeito da temperatura sobre a solubilidade é complexo, visto que, com aumento da temperatura ocorre uma elevação da pressão

de vapor do soluto, promovendo uma maior solubilidade, por outro lado, a densidade do solvente diminui, provocando também uma diminuição da solubilidade (KING; BOTT, 1993).

A densidade do fluido supercrítico, que determina seu poder de solvatação, diferentemente dos líquidos, pode ser ajustada por uma pequena variação de pressão ou temperatura. Na vizinhança do ponto crítico uma pequena elevação de pressão aumenta sensivelmente a densidade do fluido, e este efeito diminui com o aumento da distância dos valores críticos, por isso o poder de solvatação de um fluido supercrítico pode ser controlado mais facilmente do que o de um solvente líquido (SIHVONEN et al., 1999; RAVENTÓS; DUARTE; ALARCÓN, 2002).

4.2 COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS DE GENGIBRE

Para avaliar o efeito das variáveis de processo (método, solvente, temperatura e pressão) sobre a composição de extrato de gengibre foram realizadas análises por GC-MS e GC-FID nas amostras coletadas após 180 min de extração (final das extrações). A Tabela 3 mostra a quantificação dos compostos principais dos extratos de gengibre obtidos utilizando CO₂ e propano como solventes e hidrodestilação. O extrato obtido utilizando éter de petróleo não foi analisado, pois não pode ser aplicado em produtos alimentícios devido a possibilidade de ter resíduos tóxicos do solvente. Alguns cromatogramas são apresentados no Anexo A.

A partir dos resultados de composição apresentados na Tabela 3 pode-se observar que o gengibre contém um elevado número de substâncias ativas e pungentes. A análise cromatográfica revelou que os perfis químicos dos extratos são semelhantes e, de acordo com a biblioteca do CG-MS, contém monoterpenos, terpenóides e sesquiterpenos. Os compostos mais abundantes, de acordo com a biblioteca do CG-MS, são α -zingibereno, β -sesquifelandreno, α -farneseno, geranial, β -bisaboleno e β -eudesmol. Os compostos identificados nas amostras utilizadas neste estudo estão de acordo com relatos da literatura (ZANCAN et al., 2002; MONTEIRO, 1999; BARTLEY; FOLEY, 1994).

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DE VOLÁTEIS DETECTADA POR CG DE ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS DE GENGIBRE OBTIDOS USANDO HIDRODESTILAÇÃO E CO₂ E PROPANO COMO SOLVENTES.

Compostos ^a	Índice de Retenção	CO ₂					Propano					H ₂ O
		Ensaio 1 8 MPa, 293,15 K	Ensaio 2 25 MPa, 293,15 K	Ensaio 3 ^c 8 MPa, 333,15 K	Ensaio 4 25 MPa, 333,15 K	Ensaio 5 ^b 16,5 MPa, 313,15 K	Ensaio 6 3 MPa, 293,15 K	Ensaio 7 10 MPa, 293,15 K	Ensaio 8 3 MPa, 333,15 K	Ensaio 9 10 MPa, 333,15 K	Ensaio 10 ^b 6,5 MPa, 313,15 K	Ensaio 11 ^b Hidrodestilação
α-zingibereno	1492	30,86	25,65	-	27,53	26,12 (1,17)	26,22	32,29	30,01	30,5	31,67 (0,28)	1,64 (0,16)
β-sesquifelandreno	1522	12,94	11,21	-	12,10	10,60 (0,28)	11,22	13,33	12,26	12,60	12,22 (0,30)	0,74 (0,66)
α-farneseno	1501	11,49	8,64	-	9,93	9,30 (0,27)	9,52	11,70	11,25	10,65	11,09 (0,10)	1,29 (0,83)
Geranial	1269	9,17	7,25	-	5,55	8,26 (0,36)	5,03	7,96	8,55	5,01	8,81 (0,10)	10,66 (1,33)
β-bisaboleno	1505	5,63	4,92	-	5,42	5,27 (0,06)	5,00	5,88	5,32	5,59	5,60 (0,25)	4,45 (0,55)
β-eudesmol	1655	2,97	10,49	-	5,80	9,38 (3,39)	7,58	2,43	2,93	2,80	3,42 (0,54)	11,32 (1,75)
α-curcumeno	1478	4,04	3,65	-	3,78	3,57 (0,36)	4,20	4,22	3,49	4,58	3,39 (0,01)	1,95 (1,10)
Formato de Isobornila	1239	1,97	1,97	-	3,04	2,08 (0,61)	1,77	2,11	2,74	2,17	2,80 (0,17)	1,62 (0,09)
Geraniol	1250	1,25	1,14	-	1,34	1,21 (0,07)	0,80	1,06	1,38	1,09	1,18 (0,02)	1,33 (0,29)
α-pineno	933	n.d.	n.d.	-	0,08	0,05 (0,01)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,88 (0,80)
Canfeno	949	n.d.	0,09	-	0,25	0,19 (0,01)	0,05	0,17	0,09	0,16	0,18 (0,00)	3,14 (0,89)
Eucaliptol	1032	n.d.	0,08	-	0,25	0,19 (0,06)	0,11	0,36	0,23	0,33	0,47 (0,03)	1,64 (0,16)
α-copaeno	1374	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,01 (0,00)
α-terpineol	1191	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,36 (0,13)

^a Resultados em % de área. Resultados segundo a biblioteca do CG-MS.

^b Valor médio e desvio padrão de ensaios em triplicata.

^c Não houve amostra suficiente para a quantificação dos constituintes químicos.

n.d. = Não detectado

*As moléculas dos principais compostos estão apresentadas na Figura 3.

Para o óleo essencial de gengibre obtido por hidrodestilação, os compostos principais foram semelhantes aos compostos encontrados em extratos supercríticos, mas a quantidade foi diferente. Os compostos mais abundantes no óleo essencial obtido por hidrodestilação foram α -curcumeno (11,26% de área), geranial (10,63% de área) e canfeno (5,25% de área). Na literatura, foram encontradas muitas variações na composição química do óleo essencial de gengibre. AGRAWAL et al. (2001), por exemplo, relataram o composto curcumeno como o principal constituinte nos rizomas de gengibre fresco. Neral e geranial possivelmente contribuem para o forte aroma de limão nos rizomas de gengibre (WOHLMUTH et al., 2006).

Os compostos α -pineno, canfeno e eucaliptol foram encontrados nas amostras de óleo essencial, porém não estavam presentes nos extratos obtidos utilizando CO₂ e propano como solventes. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por El-Ghorab et al. (2010), que analisaram o óleo essencial de gengibre por GC-MS e relataram que os principais componentes voláteis presentes em amostras de gengibre fresco e seco foram canfeno, α -terpineol, farneseno, p -cineol, zingibereno, isobutirato de geranila.

É interessante notar que o composto α -zingibereno, que foi o composto mais abundante nos extratos supercríticos, foi identificado no óleo essencial, mas em pequena quantidade, o que pode diferenciar o potencial ativo dos produtos obtidos. Sivasothy et al. (2011) também encontraram uma maior quantidade de outros compostos, não sendo o α -zingibereno o composto principal. Eles avaliaram a composição de óleos obtidos a partir de rizomas utilizando pentano como solvente e os compostos mais abundantes foram canfeno (14,50 %), geranial (14,30 %) e acetato de geranila (13,70 %). Estas diferenças significativas na composição dos óleos podem ser atribuídas à procedência do material, ao cultivo, ao estágio vegetativo e fase de crescimento da planta em estudo (SARI et al., 2006).

Dabague (2008) avaliou a composição do óleo essencial de gengibre proveniente de produtores da região de Morretes – PR que passou por diferentes períodos de secagem em temperatura ambiente e encontrou como constituintes principais geranial e neral em todas as amostras, independentemente das procedências e seus teores aumentaram com o período de secagem. Eucaliptol, canfeno e β -felandreno apresentaram-se estáveis nas procedências com diminuição durante os períodos de secagem. Neral e geranial podem ser isolados e utilizados

pela indústria de perfumes e de alimentos como matéria-prima na síntese de vitamina A e β -caroteno. Ainda, o geranial e neral podem ser transformados em geraniol e nerol que tem alto preço no mercado pelas indústrias por possuírem odor de rosa e laranja.

Zancan et al. (2002) encontraram como componentes principais nas frações de gengibre coletadas durante as fases da taxa de extração constante (CER) e da taxa decrescente de extração (FER), α -zingibereno, β -sesquifelandreno, β -bisaboleno, geranial, neral e citrionelol. O maior teor de gingerol e shogaols (93,14 % em massa) foi obtido na fase de difusão controlada (DC).

Onyenekwe e Hashimoto (1999), após 6 horas de hidrodestilação de gengibre seco (*Zingiber officinale* Roscoe) da Nigéria, obtiveram um rendimento de óleo de 2,4 % em massa. Os cromatogramas de óleo apresentaram mais de 266 picos e os principais componentes foram α -zingibereno (29,54 %), β -sesquifelandreno (18,42 %), farneseno (6,46 %), neral (2,5 %), geranial (3,46 %) e α -farneseno (1,92 %). Bednarczyk e Kramer (1975) atribuíram o aroma de gengibre ao terpineol, neral, geranial β -sesquifelandreno, α -curcumeno, cis-nerolidol e β -sesquifelandrol.

Através da ANOVA foi avaliado o efeito das variáveis pressão e temperatura sobre a resposta concentração de α -zingibereno (% área) nos extratos obtidos nas diferentes condições de extração testadas utilizando CO₂ e propano como solventes. Considerando-se as amostras obtidas a partir de CO₂ supercrítico nas diferentes condições de extração, os efeitos de temperatura e pressão não foram significativos estatisticamente ($p < 0,05$), em termos da % de área de α -zingibereno. Estes resultados contradizem as conclusões de Zancan et al. (2002).

Em relação aos efeitos de pressão e da temperatura sobre a resposta concentração de α -zingibereno para os extratos obtidos utilizando propano comprimido, os resultados foram análogos aos verificados para o CO₂ supercrítico, isto é, pressão e temperatura não apresentaram efeitos significativos estatisticamente para o conteúdo de α -zingibereno ($p < 0,05$). Além disso, quando os resultados obtidos com CO₂ supercrítico foram comparados com os de propano comprimido em termos de composição química não foram encontradas diferenças significativas.

Quando os resultados obtidos com CO₂ e propano foram comparados com os resultados da hidrodestilação em termos de composição química, houveram

diferenças significativas nas quantidades dos compostos principais. Deve-se notar que os ensaios com CO₂ e propano como solventes proporcionaram maiores rendimentos demonstrando que a extração supercrítica é uma boa opção para a obtenção de extratos naturais. Alguns compostos foram detectados pela análise cromatográfica, porém não foram identificados, provavelmente esses compostos são esteroides.

4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

Para a determinação da atividade antioxidante total foram escolhidos os extratos obtidos via tecnologia supercrítica, uma vez que a atividade biológica do óleo essencial já foi comprovada. A Tabela 4 mostra a média e o desvio padrão obtidos para a atividade antioxidante total, expressa em mg de α -tocoferol.g de extrato⁻¹, dos extratos de gengibre obtidos em diferentes condições de temperatura e de pressão usando CO₂ e propano como solventes. Os resultados foram analisados estatisticamente e a resposta foi avaliada de forma independente. O teste de Tukey foi utilizado para avaliar as diferenças entre as médias, considerando um p-valor inferior a 0,05 (p < 0,05) estatisticamente significativo.

TABELA 4 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL E CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL DOS EXTRATOS DE GENGIBRE OBTIDOS USANDO CO₂ E PROPANO COMO SOLVENTE.

Amostra	Condições de extração	Atividade antioxidante total (mg α -tocoferol / g de extrato)**
1	CO ₂ /293,15 K/ 8 MPa	867,70 ^b (\pm 20,80)
2	CO ₂ /293,15 K/ 25 MPa	787,76 ^c (\pm 25,15)
3	CO ₂ /333,15 K/ 8 MPa	***
4	CO ₂ /333,15 K/ 25 MPa	854,42 ^b (\pm 19,99)
5*	CO ₂ /313,15 K/ 16,5 MPa	931,67 ^a (\pm 2,51)
6	Propano/293,15 K/ 3 MPa	519,62 ^e (\pm 5,00)
7	Propano/293,15 K/ 10 MPa	484,64 ^e (\pm 19,99)
8	Propano/333,15 K/ 3 MPa	484,65 ^e (\pm 29,98)
9	Propano/333,15 K/ 10 MPa	694,49 ^d (\pm 29,98)
10*	Propano/313,15 K/ 6,5 MPa	672,84 ^d (\pm 20,19)

* Valor médio de ensaios em triplicata.

**Valores com a mesma letra sobrescrita ao longo da mesma coluna não são diferentes significativamente ($p < 0,05$).

*** Não houve amostra suficiente para a quantificação da atividade antioxidante total e conteúdo fenólico total.

O extrato com a maior atividade antioxidante total ($931,67 \pm 2,51$ mg α -tocoferol.g de extrato⁻¹) foi obtido quando o CO₂ foi usado como solvente sob condições intermediárias de pressão e temperatura, sendo esse valor significativamente ($p < 0,05$) superior aos valores obtidos para os outros extratos. Sob as condições extremas testadas, a pressão tem efeito negativo e a temperatura teve efeito positivo sobre a atividade antioxidante total. Empregando propano como solvente, em pressões mais baixas a temperatura não foi significativa ($p < 0,05$), mas em pressões mais elevadas o aumento de temperatura conduziu a uma maior atividade antioxidante. Assim, pode ser visto que, para as condições testadas, o CO₂ fornece extratos com atividade antioxidante total mais elevada que o propano.

A atividade antioxidante dos extratos de plantas é associada, em geral, a compostos específicos ou classes de compostos, por exemplo, gingeróis e shogaols no caso do gengibre (ZANCAN et al., 2002). Zancan et al. (2002) demonstraram experimentalmente que as frações ricas em gingeróis e shogaóis apresentam maior atividade antioxidante do que as outras frações sem essas substâncias. No entanto, embora a ausência de tais substâncias tenha conduzido uma redução de 20 % na atividade antioxidante total, esta fração ainda mostrou atividade antioxidante. Assim, existem outras substâncias que proporcionam atividade antioxidante, sendo um exemplo o sesquifelandreno. El-Baroty et al. (2010) verificaram moderada atividade antioxidante em amostras de óleo essencial de gengibre obtido a partir de rizomas, aplicando o ensaio antioxidante de DPPH. Outro composto importante nos extratos de gengibre é o α -farneseno, que é quimicamente instável e pode sofrer autooxidação facilmente na presença de oxigênio (JU; BRAMLAGE, 1999), o que justifica sua presença no extrato de gengibre e não óleo essencial obtido por hidrodestilação.

Singh et al. (2008) avaliaram a atividade antioxidante do óleo essencial e oleorresina de gengibre (*Zingiber officinale*) obtidos por hidrodestilação e usando solventes tais como etanol, metanol, CCl₄, e isoctano como solventes. A atividade antioxidante foi avaliada através de testes in vitro, incluindo os métodos peróxido, anisidina, valor ácido tiobarbitúrico e radicais DPPH e tiocianato férrico. Todas as

amostras obtidas pelos diferentes solventes apresentaram propriedades antioxidantes melhores que as do BHA, que é um antioxidante sintético. As atividades de todas as oleorresinas foram equivalentes e menores que do óleo essencial de gengibre.

Zancan et al. (2002) estudaram o efeito da temperatura (298,15 K e 308,15 K) e da pressão (20,0 MPa e 25,0 MPa), sobre a atividade antioxidante dos extratos obtidos utilizando CO₂ como solvente. Os resultados demonstram que as atividades antioxidantes dos extratos de gengibre foram muito semelhantes para as frações recolhidas após 2, 4, 9 e 11 h de extração. Além disso, as condições de pressão e temperatura estudadas não afetaram a atividade antioxidante dos extratos, e resultou uma atividade antioxidante média de 80 %, determinada usando o método da oxidação do β-caroteno e do ácido linolénico.

Em um estudo recente, El-Ghorab et al. (2010) investigaram os compostos fenólicos totais (aplicando o método de Folin-Ciocalteu) e atividade antioxidante dos extratos de gengibre obtidos utilizando metanol e hexano como solventes e observaram que o maior teor de fenólicos totais estava presente nos extratos metanólicos de gengibre fresco (5,70 mg de ácido gálico.g amostra secas⁻¹). A atividade antioxidante foi determinada utilizando os métodos DPPH e redução férrica (FRP). A maior atividade antioxidante foi obtida para o óleo essencial de gengibre obtido a partir de gengibre seco (83,87 ± 0,50%), este valor foi muito próximo ao encontrado para gengibre fresco (83,03 ± 0,54 %). O FRP dos óleos essenciais foi muito semelhante ao valor obtido com o método DPPH.

Estudos têm demonstrado que a atividade antioxidante é fortemente influenciada pelo método de determinação, e, assim, os resultados relatados na literatura são difíceis de serem comparados. Além disso, as propriedades antioxidantes dos óleos essenciais são dependentes da composição qualitativa e quantitativa dos sistemas em teste (EL-GHORAB; MANSOUR; EL-MASSRY, 2004; RUBERTO; BARATTA, 2000; DORMAN; DEANS, 2000; LEE; SHIBAMOTO, 2002; LEE; SHIBAMOTO, 2001).

Em geral, todos os organismos possuem sistemas antioxidantes que os protegem de problemas de oxidação, mas tais sistemas não podem oferecer proteção total. Assim, é de interesse incluir antioxidantes naturais, tal como extrato de gengibre, na dieta humana.

4.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO E DO EXTRATO DE GENGIBRE

Uma vez que os extratos de gengibre obtidos utilizando CO₂ como solvente apresentaram maior atividade antioxidante e devido ao cuidado de se trabalhar com o mesmo lote de matéria-prima e a pequena quantidade disponível, optou-se por analisar apenas tais extratos quanto a sua atividade antibacteriana e comparada com o óleo essencial de gengibre obtido por hidrodestilação. Para a avaliação da atividade antibacteriana foram testados contra duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* (SA) e *Listeria monocytogenes* (LM)) e quatro Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Escherichia coli* (EC), *Salmonella typhimurium* (ST), *Shigella flexneri* (SF)).

Os resultados da investigação da atividade antibacteriana são apresentados na Tabela 5. Percebe-se que diferentes espécies bacterianas apresentaram diferentes níveis de sensibilidade para o óleo e os extratos de gengibre testados. *Escherichia coli* (EC), *Salmonella typhimurium* (ST) e *Shigella flexneri* (SF), bactérias Gram-negativas, apresentaram-se completamente resistentes a todos os extratos testados (obtido utilizando CO₂ supercrítico). Outros autores estudaram o efeito antibacteriano dos extratos obtidos a partir de diferentes espécies de gengibre e também não encontraram inibição para bactérias Gram-negativas (CHANDARANA; BALUJA; CHANDA, 2005).

Todos os extratos e o óleo essencial testados mostraram efeitos inibidores sobre *Staphylococcus aureus* (SA) e *Listeria monocytogenes* (LM), as bactérias Gram-positivas, e *Pseudomonas aeruginosa* (PA), Gram-negativa. A atividade antibacteriana foi menor para os extratos obtidos sob as condições de maior pressão e temperatura (ensaio 4), e estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) dos outros extratos e do óleo essencial, sendo este último estatisticamente diferente ($p < 0,05$) de todas as amostras testadas, com a menor inibição de bactérias Gram-negativas. Isto contradiz alguns trabalhos encontrados na literatura que dizem que as bactérias Gram-positivas são mais resistentes aos óleos essenciais em relação a bactérias Gram-negativas (SIVASOTHY et al., 2011; SARI et al., 2006). Apenas para *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri*, bactérias Gram-negativas, o óleo essencial foi mais ativo do que os extratos, uma vez que os extratos não apresentaram atividade de inibição e o óleo apresentou ligeira inibição. Nenhuma

das amostras testadas apresentou inibição da bactéria *Escherichia coli*.

Embora estejam presentes em baixas concentrações, alguns compostos, como α -pineno, α -terpineol e geraniol, podem ter efeito sobre a eficiência global das atividades antibacterianas dos óleos e extratos em ação sinérgica com os demais constituintes (GILES; ZHAO; AGBOOLA, 2010; VAGIONAS et al., 2007). A significativa atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos de especiarias e ervas se deve aos compostos fenólicos presentes nessas amostras (SINGH et al., 2008).

O óleo essencial e os extratos de gengibre exibiram propriedades antimicrobianas consideráveis contra bactérias Gram-positivas, portanto, eles poderiam ser usados como conservantes naturais contra patógenos de origem alimentar, para retardar a deterioração microbiana ou para preservar óleos comestíveis e vários outros alimentos. No entanto, uma investigação mais aprofundada sobre as atividades desses óleos contra outros patógenos deve ser realizada.

TABELA 5 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS DE GENGIBRE CONTRA ALGUMAS ESPÉCIES BACTÉRIAS USANDO O MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.

Amostra	Condições de extração	Diâmetro da zona de inibição (mm)***					
		SA	LM	PA	ST	SF	EC
1	CO ₂ /293,15 K/ 10,00 MPa	15,77 (±0,43) ^a	20,27 (±0,35) ^a	9,45 (±0,45) ^{ab}	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a
2	CO ₂ /293,15 K/ 25,00 MPa	16,73 (±0,60) ^a	18,88 (±0,13) ^b	10,00 (±0,13) ^{ab}	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a
3	CO ₂ /333,15 K/ 10,00 MPa	**	**	**	**	**	**
4	CO ₂ /333,15 K/ 25,00 MPa	13,85 (±0,83) ^b	16,62 (±0,88) ^c	8,85 (±0,05) ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a
5*	CO ₂ /313,15 K/ 17,50 MPa	15,22 (±0,22) ^a	19,85 (±0,22) ^{ab}	9,21 (±0,28) ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a
6*	Hidrodestilação	8,15 (±0,92) ^c	8,66 (±0,72) ^d	1,16 (±0,03) ^c	2,45 (0,35) ^a	3,57 (0,25) ^a	0,00 ^a

SA = *Staphylococcus aureus*, LM = *Listeria monocytogenes*, PA = *Pseudomonas aeruginosa*, ST = *Salmonella typhimurium*, SF = *Shigella flexneri*, EC = *Escherichia coli*.

* Valor médio e desvio padrão de ensaios realizados em triplicata.

** Não houve amostra suficiente para a avaliação da atividade antibacteriana.

*** Os dados são as médias e desvio padrão de ensaios realizados em triplicata. Valores com a mesma letra sobrescrita ao longo da mesma coluna não são diferentes significativamente ($p < 0,05$).

5 CONCLUSÕES

A busca por produtos naturais, com características funcionais ou apelo saudável, faz do gengibre uma matéria-prima importante para a indústria de alimentos, química e farmacêutica, já que o Brasil possui uma grande produção e o Estado do Paraná tem relevante representatividade no mercado nacional.

A obtenção do extrato de gengibre via tecnologia supercrítica se revelou satisfatória uma vez que apresentou bom rendimento, sendo maior que o rendimento obtido por hidrodestilação e por solvente orgânico. Para a extração via tecnologia supercrítica foram avaliados os solventes CO₂ supercrítico e propano comprimido. Os maiores rendimentos de extratos de gengibre foram 32,1 g de extrato / kg de gengibre e 27,0 g de extrato / kg de gengibre utilizando CO₂ supercrítico a 25,0 MPa e 333,15 K e propano comprimido a 10,0 MPa e 333,15 K, respectivamente. Para o CO₂ supercrítico, a pressão apresentou efeito positivo sobre o rendimento. Temperatura e pressão mostraram efeito positivo sobre o rendimento da extração, quando foi usado propano como solvente, mas o efeito da temperatura não é tão significativo quanto o efeito da pressão. O rendimento encontrado utilizando hidrodestilação, durante 180 minutos, foi de 1,79 g / 100g de material seco alimentado no Clevenger, ficando bem abaixo dos melhores resultados obtidos quando CO₂ e propano foram utilizados como solventes.

Os extratos obtidos com CO₂ supercrítico e propano comprimido apresentaram composição química semelhante e as substâncias mais abundantes foram α -zingibereno, β -sesquifelandreno, α -farneseno, geranial β -bisaboleno e β -eudesmol. As variáveis do processo (temperatura e pressão) não afetaram a quantidade do composto α -zingibereno no extrato para ambos os solventes (CO₂ supercrítico e comprimido propano). Para o óleo essencial de gengibre obtido por hidrodestilação, os compostos principais foram semelhantes aos compostos encontrados nos extratos supercríticos, porém em quantidade diferente. Os compostos mais abundantes foram α -curcumeno (11,26%), geranial (10,63%) e canfeno (5,25%). Os compostos α -pineno, canfeno e eucaliptol foram encontrados nas amostras de óleo essencial, porém não estavam presentes nos extratos obtidos utilizando CO₂ e propano como solventes.

Alta atividade antioxidante foi observada para os extratos de gengibre obtidos

utilizando CO₂ e propano como solventes. No entanto, sob as condições aplicadas no presente estudo observou-se que os extratos obtidos a partir de CO₂ supercrítico apresentaram maior atividade antioxidante total. Portanto, através da determinação das propriedades dos extratos de gengibre pode-se avaliar seu potencial como conservantes naturais para aplicação nas indústrias de alimentos e farmacêutica.

Os extratos obtidos utilizando CO₂ supercrítico e o óleo essencial obtido por hidrodestilação apresentaram atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-positivas testadas, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, e contra a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. O óleo obtido por hidrodestilação foi diferente de todas as amostras testadas, com a menor capacidade de inibição da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Para as bactérias *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri*, bactérias Gram-negativas, o óleo essencial mostrou ligeira inibição.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. **Allured Publishing Corporation**: Carol Stream, 2007.
- AFZAL, M.; AL-HADIDI, D.; MENON, M.; PESEK, J.; DHAMI, M. S. Ginger: an ethnomedical, chemical and pharmacological review. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, 18, 159, 2001.
- AGRAWAL, M., WALIA, S., DHINGRA, S., KHAMBAY, B.P.S. Insect growth inhibition, antifeedant and antifungal activity of compounds isolated/derived from *Zingiber officinale* Roscae (ginger) rhizomes. **Pest. Manag. Sci.**, 57, 289-300, 2001.
- ANBU JEBA SUNILSON, J., SURAJ, R., REJITHA, G., ANANDARAJAGOPA, K. *In vitro* antibacterial evaluation of *Zingiber officinale*, *Curcuma longa* and *Alpinia galangal* extracts as natural foods preservatives. **American Journal of Food Technology**, 4, 192-200, 2009.
- ANGUS, S. A.; ARMSTRONG, B.; REUCK, K. M. International Thermodynamics Tables of the Fluid State Carbon Dioxide. **Pergamon Press**: Elmsford, NY, 1976.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, 127, 183–198, 2002.
- AOAC. Official Methods of Analysis. **Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, 1999.
- A.O.C.S. American Oil Chemists' Society. **Official methods and recommended practices of the A.O.C.S.** Fifth edition, U.S.A, 1998.
- ARBOS, K. A.; VILLAS-BOAS, L. B.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Influência de diferentes técnicas de cultivo sobre o potencial antioxidante de crucíferas. **Alimentos e Nutrição**, 15 (1), 55-61, 2004.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogenic radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, 11, 419–421, 2000.
- ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, 75 (2), 199-212, 1997.
- ARUOMA, O. I.; SPENCER, J. P. E.; WARREN, D.; JENNER, P.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B. Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. **Food Chemistry**, 60 (2), 149-156, 1995.
- BADALYAN, A. G.; WILKIRSON, G. T.; CHUN, B. Extraction of Australian ginger root with carbon dioxide and ethanol entrainer. **Journal of Supercritical Fluids**, 13, 319–324, 1998.
- BALACHANDRAN, S.; KENTISH, S. E.; MAWSON, R. The effect of both preparation

method and season on the supercritical extraction of ginger. **Separation and Purification Technology**, 48 (2), 94-105, 2006.

BARTLEY, J. P. A new method for determination of pungent compounds in ginger (*Zingiber officinale*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 68 (2), 215-222, 1995.

BARTLEY, J. P.; FOLEY, P. Supercritical fluid extraction of Australian-grown ginger (*Zingiber officinale*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 66 (3), 365-371, 1994.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. **Am. J. Clin. Pathol**, (45), 493-496, 1996.

BEDNARCZYK, A. A.; KRAMER, A. Identification and evaluation of the flavor significant components of ginger essential oil. **Chemical Senses and Flavor**, 1, 377-386, 1975.

BOTTERWERCK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHRM, R. A.; KLEINJANS, J., BRANDT, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food Chemistry Toxicology**, 38, 599-605, 2000.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology** (Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologies) 28, 25-30, 1995.

BRAVI, M., BUBBICO, MANNA, R., VERDONE, F. N. Process optimisation in sunflower oil extraction by supercritical CO₂. **Chemical Engineering Science**, 57, 2753-2764, 2002.

BRIELMANN, H.L.; SETZER, W.N.; KAUFMAN, P.B.; KIRAKOSYAN, A. Phytochemicals: The chemical components of plants. **Natural products from Plants**. 2. ed. London: Taylor&Francis Group. 2006.

BRUNNER, G. Gas extraction: an Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes. 1 ed. **Darmstadt, Alemanha: Steinkopff**, 387p, 1994.

BUA-IN, S.; PAISOOKSANTICATANA, Y. Essential Oil and Antioxidant Activity of Cassumunar Ginger (*Zingiberaceae: Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr.) Collected from Various Parts of Thailand. Kasetsart. **Natural Science**, 43, 467-475, 2009.

BURNS, J.; GARDNER, P. T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G. G.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Extraction of Phenolics and Changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 5797-5898, 2001.

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; TORRES, A.; MACÍAS, F.A.; DE LA

- OSSA, E.M. Extraction of natural compounds with biological activity from sunflower leaves using supercritical carbon dioxide. **Chemical Engineering Journal**, 152, 301-306, 2009.
- CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H. e MOSQUIM, P.R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários. 2. ed. **Visconde do Rio Branco**: [s.e.], p.49, 2004.
- CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; WONG, S. K.; LIM, K. K.; TAN, S. P.; LIANTO, F. S.; YONG, M. Y. Effect of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. **Food Chemistry**, 113, 166-172, 2009.
- CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; OMAR, M. Antioxidant and antibacterial activity of leaves of *Etilingera* species (Zingiberaceae) in Peninsular Malaysia. **Food Chemistry**, 104, 1586-1593, 2007.
- CHANDARANA, H., BALUJA, S., CHANDA, S. V. Comparison of antibacterial activities of selected species of Zingiberaceae family and some synthetic compounds. **Turkish Journal of Biology**, 29, 83-97, 2005.
- COELHO, L. A. F.; OLIVEIRA, J. V.; D'ÁVILA, S. G. The Effects of Temperature and Solvent Density on the Characteristics of the Extracts from SCFE of *Rosemary* Oil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 13, 51, 1996.
- CORSO, M. P.; FAGUNDES-KLEIN, M. R.; SILVA, E. A.; CARDOZO-FILHO, L.; SANTOS, J. N.; FREITAS, L. S.; DARIVA, C. Extraction of sesame seed (*Sesamun indicum* L.) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, 52, 56-61, 2010.
- CORSO, M. P. Estudo da extração de óleo de sementes de gergelim (*Sesamun indicum* L.) empregando os solventes dióxido de carbono supercrítico e n-propano pressurizado. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)** – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, p.93, 2008.
- DABAGUE, I.C.M. Rendimento e composição do óleo essencial de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) sob diferentes épocas de colheita e períodos de secagem. **Dissertação (Mestre em Agronomia)** - Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo – UFPR, Curitiba, PR, 2008.
- DANH, L. T.; MAMMUCARI, R.; TRUONG, R.; FOSTER, N. Response surface method applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Vetiveria zizanioides* essential oil. **Chemical Engineering Journal**, 155, 617-626, 2009.
- DANIELSKI, L., MICHIELIN, E. M. Z., FERREIRA, S. R. S. Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO₂: experimental solubility and empirical data correlation. **Journal of Food Engineering**, 78, 1054-1059, 2007.
- DE ALMEIDA, N. G; ELPO, E. R. S.; GIROTTO, A. Aspectos econômicos da cultura do gengibre. Curitiba: **Secretaria de Estado de Agricultura e do Abastecimento**, Departamento de Economia Rural, p.9, 2007.

- DEDOV, V. D.; TRAN, V. H.; DUKE, C. C.; CONNOR, M.; CHRISTIE, M. J.; MANDADI, S.; ROUFOGALIS, B. D. Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. **British Journal of Pharmacology**, 137 (6), 793-798, 2002.
- DING, S. H.; AN, K. J.; ZHAO, C. P.; LI, Y.; GUO, Y. H.; WANG, Z. F. Effect of drying methods on volatiles of Chinese ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Food and Bioproducts Processing**. In press: (2011).
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, 88, 308-16. 2000.
- EL-BAROTY, G. S.; ABD EL-BAKY, H. H.; FARAG, R. S.; SALEH, M. A. Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. **African Journal of Biochemistry Research**, 4, 167-174, 2010.
- EL-GHORAB, A. H.; NAUMAN, M.; ANJUM, F. M.; HUSSAIN, S.; NADEEM, M. A comparative study on chemical composition and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) and cumin (*Cuminum cyminum*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 58, 8231-8237, 2010.
- EL-GHORAB, A. H.; MANSOUR, A. F.; EL-MASSRY, K. F. Effect of extraction methods on the chemical composition and antioxidant activity of Egyptian marjoram (*Majorana hortensis* Moench). **Flavour Fragrance Journal**, 19, 54-61, 2004.
- ELPO, E. R. S. Cadeia produtiva do gengibre (*Zingiber officinale* Roscae) no estado do Paraná: Análise e recomendações para melhoria da qualidade. **Tese (Doutor em Ciências)** – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, UFPR, Curitiba, 2004.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA, **Ministério da Saúde – Agencia Nacional da Vigilância Sanitária**. 5 Edição. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 1999.
- FICKER, C.; SMITH, M. L.; AKPAGANA, K.; GBEASSOR, M.; ZHANG, J.; DURST, T.; ASSABGUI, R.; ARNASON, J. T. Bioassay-guided Isolation and Identification of Antifungal Compounds from Ginger. **Phytotherapy Research**, 17 (8), 897-902, 2003.
- FONSECA, A. M.; BIZERRA, A. M. C.; SOUZA, J. S. N, MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; MATTOS, M. C.; CORDEL, G. A.; BRAZ-FILHO R, LEMOS, T. L. G. Constituents and antioxidant activity of two varieties of coconut water (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19, 193-198. 2009.
- FORNARI, T., RUIZ-RODRIGUEZ, A., VICENTE, G., VAZQUEZ, E., GARCIA-RISCO, M.R., REGLERO, G. Kinetic study of the supercritical CO₂ extraction of different plants from *Lamiaceae* family. **Journal of Supercritical Fluids**, 64, 1- 8, 2012.
- FRANKE, A. A.; COONEY, R. V.; HENNING, S. M; CUSTER, L. J. Bioavailability and antioxidant effects of orange juice components in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 5170-5178, 2005.
- FREITAS L. S.; OLIVEIRA J. V.; DARIVA, C.; JACQUES R. A.; CARAMÃO, E. B.

Extraction of grape seed oil using compressed carbon dioxide and propane: extraction yields and characterization of free glycerol compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 2558-2564, 2008.

GILES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antibacterial properties of essential oil of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry*, 119(2), 731-737, 2010.

GOMIDE, R. Operações com sistemas sólidos granulares, in: R. Gomide (Ed.), *Operações Unitárias*, vol. 1, Edição do autor, São Paulo, 1983.

GOUINGUENÉ, S. P.; TURLINGS, T. C. J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiology**, 129, 1296-1307, 2002.

GOVINDARAJAN, V. S. Ginger-Chemistry, Technology and Quality Evaluation: Part 1, **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Ed. Thomas E. Furia, California, USA, 17 (1), 96, 1982.

GRUENWALD, J. **PDR for Herbal Medicine**, 3 ed. Thomson PDR, Montvale, NJ, 2004.

HABSAH, M.; AMRAN, M.; MACKEEN, M. M.; LAJIS, N. H.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N.; RAHMAN, A. A.; GHAFAR; ALI, A. M. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. **Journal Ethnopharmacology**, 72 (3), 403-410, 2000.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical research Communications**, 9 (1), 1-32, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Sciences**, 15 (4), 129-135, 1989.

HALVORSEN, B. L.; HOLTE, K.; MYHSTAD, M. C. W. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. **Journal of Nutrition**, 132, 461-471, 2002.

HAMDAN, S.; DAOOD, H.G.; TOTH-MARKUS, M.; V. ILLES. Extraction of cardamom oil by supercritical carbon dioxide and sub-critical propane. **Journal of Supercritical Fluids**, 44, 25-30, 2008.

HEGEL, P. E.; ZABALOY, M. S.; MABE, G. D. B.; PEREDA, S.; BRIGNOLE, E. A. Phase equilibrium engineering of the extraction of oils from seeds using carbon dioxide + propane solvent mixtures. **Journal of Supercritical Fluids**, 42, 318-324, 2007.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 13, 572-584, 2002.

HIERRO, M. T. G. **Temas Avanzados de Análisis Químicas**. Edinford S. A., Madrid, 1994.

- HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 841–1856, 2005.
- IBAÑEZ, E.; KUBÁTOVÁ, A.; SEÑORÁNS, F. J.; CAVERO, S.; REGLERO, G.; HAWTHOME, S. B. Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from *Rosemary* Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 375, 2003.
- ILLÉS, V.; DAOOD, H. G.; PERNECZKI, S.; SZOKONYA, L.; THEN, M. Extraction of coriander seed oil by CO₂ and propane at super and subcritical conditions. **Journal of Supercritical Fluids**, 17, 177-186, 2000.
- ILLÉS, V.; SZALAI, O.; THEN, M.; DAOOD, H.; PERNECZKI, S. Extraction of hiprose fruit by supercritical CO₂ and propane. **Journal of Supercritical Fluids**, 10, 209-218, 1997.
- IPPOUSHI, K.; AZUMA, K.; ITO, H.; HORIE, H.; HIGASHIO, H.; [6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774.1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions. **Life Sciences**, 73, 3427-3437, 2003.
- JIANG, H.; SOLYOM, A. M.; TIMMERMANN, B. N.; GANG, D. R. Characterization of gingerol-related compounds in ginger rhizome (*Zingiber officinale* Rosc.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 19, 2957-2964, 2005.
- JONES, F.A. Herbs – useful plants - Their role in history and today. **Eur J Gastroen Hepat**, 8, 1227-1231, 1996.
- JU, Z.; BRAMLAGE, W. J. Phenolics and lipid-soluble antioxidants in fruit cuticle of apples and their antioxidant activities in model systems. **Postharvest Biology and Technology**, 16, 107-118, 1999.
- JUSTO, O. R.; MORAES, A. M.; BARRETO, G. P. M.; MERCADANTE, A. Z.; ROSA, P. T. V. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Química Nova**, 31 (7), 1699-1705, 2008.
- KADER, G., NIKKON, F., RASHID, M.A., YEASMIN, T. Antimicrobial activities of the rhizomes extract of *Zingiber zerumbet* Linn. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 409-412, 2011.
- KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47 (10), 3954-3962, 1999.
- KAMAZERI, T.S.A.T.; SAMAH, O.A.; TAHER, M.; SUSANTI, D.; QARALLEH, H. Antimicrobial activity and essential oils of *Curcuma aeruginosa*, *Curcuma mangga*, and *Zingiber cassumunar* from Malaysia. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 202-209, 2012.
- KIM, D. S. H. L.; KIM, J. Y. Side-chain length is important for shogaols in protecting

- neuronal cells from β -amyloid insult. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 14 (5), 1287-1289, 2004.
- KING, M. B.; BOTT, T. R. Extraction of Natural Products Using Near-critical Solvents. **Blackie Academic & Professional**, Glasgow, UK, p.325, 1993.
- LANTZ, R. C.; CHEN, G. J.; SARIHAN, M.; SÓLYOM, A. M.; JOLAD, S. D.; TIMMERMANN, B. N. The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production. **Phytomedicine**, 14, 123-128, 2007.
- LANZA, M.; NDIAYE, P.M.; TAVARES, W.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Phase behavior of castor oil in compressed propane and n-butane. **Journal of Supercritical Fluids**, 34, 215-221, 2005.
- LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T. J. Determination of Antioxidant Potential of Volatile Extracts Isolated from Various Herbs and Spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50 (15), 4947-4952, 2002.
- LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T. Inhibition of malonaldehyde formation from blood plasma oxidation by aroma extracts and aroma components isolated from clove and eucalyptus. **Food and Chemical Toxicology**, 39 (12), 1199-1204, 2001.
- LINSTROM, P. J.; MALLARD, W.G. **National Institute of Standards and Technology**, Gaithersburg MD, 20899, <http://webbook.nist.gov/chemistry/fluid/>, (acessado em 27 de julho, 2012).
- LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S. G. **Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes***. **J. Appl. Bacteriol.**, 82, 759-762, 1997.
- MASUDA, Y.; KIKUZAKI, H.; HISAMOTO, M.; NAKATANI, N. Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. **BioFactors**, 21, 293-296, 2004.
- MEIRELES, M. A. A. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American plants. In: Jose Martinez. (Org.). **Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds**. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, p.243-274, 2008.
- MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction from solid: process Designer data (2001-2003). **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, 7, 321-330, 2003.
- MESOMO, M. C.; SCHEER, A. DE P.; PEREZ, E.; NDIAYE, P. M.; CORAZZA, M. L. Ginger (*Zingiber officinale* R.) extracts obtained using supercritical CO₂ and compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, 71, 102-109, 2012.
- MIGUEL, A.; ANDRADE, J. B. Rapid Quantification of tem polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols by direct HPLC separation after ultrasonic acetonitrile extraction. **International Journal Environmental Analytical Chemistry**, 35, 35-41, 1989.
- MISHARINA, T. A.; TERENINA, M. B.; KRIKUNOVA, N. I. Antioxidant Properties of

Essential Oils. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 45 (6), 642–647, 2009.

MOHANTY, S.; COCK, I. E. Evaluation of the antibacterial activity and toxicity of *Myrciaria cauliflora* methanolic leaf and fruit extracts. **Internet J. Microbiol**, 7, 2, 2009.

MONTEIRO, A. R. Extração do Óleo Essencial/Oleoresina de Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) com CO₂ supercrítico: uma avaliação do pré-tratamento e das variáveis de processo. **Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1999.

MORENO, S.; SCHEYER, T.; ROMANO, C. S.; VOJNOV, A. A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, 40 (2), 223-231, 2006.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1998.

MUKHOPADHYAY, M. **Natural extracts using supercritical carbon dioxide**. Boca Raton, FL: CRC Press (2000).

NASCIMENTO G. G. F.; LUCATELLI, J. F. P.C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, 31, 247-256, 2000.

NDIAYE, P. M.; LANZA, M.; TAVARES, F. W.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Phase behavior of olive and soybean oils in compressed propane and n-butane. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 23, 405-415, 2006a.

NDIAYE, P.M.; FRANCESCHI, E.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C.; TAVARES, F. W.; OLIVEIRA, J. V. Phase behavior of soybean oil, castor oil and their fatty acid ethyl esters in carbon dioxide at high pressures. **Journal of Supercritical Fluids**, 37, 29-37, 2006b.

NEGRELLE, R. R. B.; ELPO, E. R. S.; RÜCKER, N. G. A. Análise prospectiva do agronegócio gengibre no estado do Paraná. **Horticultura Brasileira**, 23 (4), 1022-1028, 2005.

NOBREGA, L. P.; MONTEIRO, A. R.; MEIRELES, M. A. A.; MARQUES, M. O. M. Comparison of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin obtained with ethanol and isopropanol with that obtained with pressurized CO₂. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 17, 408–412, 1997.

NORULAINI, N. A. N.; ANUAR, O.; OMAR, A. K. M.; ALKARKHI, A. F. M.; SETIANTO, W. B.; FATEHAH, M. O.; SAHENA, F.; ZAIDUL, I. S. M. Optimization of SC-CO₂ extraction of zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L) Smith. **Food Chemistry**, 114, 702-705, 2009.

OBOH, G.; AKINYEMI, A. J.; ADEMILUYI, A. O. Antioxidant and inhibitory effect of red ginger (*Zingiber officinale* var. *Rubra*) and white ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on Fe²⁺ induced lipid peroxidation in rat brain *in vitro*. **Experimental and**

Toxicologic Pathology, 64, 31-36, 2012.

ONYENEKWE, P. C.; HASHIMOTO, S. The composition of the essential oil of dried Nigerian ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **European Food Research and Technology**, 209, 407-410, 1999.

PADMA, V. V.; CHRISTIE, S. A. D.; RAMKUMA, K. M. Induction of Apoptosis by Ginger in HEP-2 Cell Line Is Mediated by Reactive Oxygen Species. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 100 (5), 302-307, 2007.

PEDERSSETTI, M. M.; PALÚ, F.; DA SILVA, E. A.; ROHLING, J. H.; CARDOZO-FILHO, L.; DARIVA, C. Extraction of canola seed (*Brassica napus*) oil using compressed propano and supercritical carbone dioxide. **Journal of Food Engineering**, 102, 189-196, 2011.

PEDERSSETTI, M. M. Análise Dos Efeitos Da Temperatura E Pressão Na Extração Supercrítica Do Óleo Essencial De Canola Com Dióxido De Carbono E N- Propano. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)** - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, p.65, 2008.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP. 1-10, 2004..

PFEIFFER, E.; HEUSCHMID, F. F.; KRANZ, S.; METZLER, M. Microsomal Hydroxylation and Glucuronidation of [6]-Gingerol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 8769-8774, 2006.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, 269, 337-341, 1999.

PRONYK, C.; MAZZA, G. Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. **Journal of Food Engineering**, 95, 215-226, 2009.

PUENGPHIAN, C.; SIRICHOTE, A. [6]-gingerol content and bioactive properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts from supercritical CO₂ extraction. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, 1, 29-36, 2008.

QUISPE-CONDORI, S.; S'ANCHEZ.D.; FOGLIO, M. A.; ROSA, P. T. V.; ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, 36, 40–48, 2005.

RAI, S.; MUKHERJEE, K.; MAL, M.; WAHILE, A.; SAHA, B. P.; MUKHERJEE, P. K. Determination of 6-gingerol in ginger (*Zingiber officinale*) using high-performance thin-layer chromatography. **Journal of Separation Science**, 29, 2292-2295, 2006.

RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: an overview. **Food Science and Technology International**, 8 (5), 269-284, 2002.

- RAZAVI, S. M.; NAZEMIYEH, H.; HAJIBOLAND, R.; KUMARASAMY, Y.; DELAZAR, A.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18, 1-5. 2008.
- REBELO, M. M.; SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19, 230-235. 2009.
- RECANSSENS, F.; ABAROUDI, K.; TRABELSI, F.; CALLOUD-GABRIEL, B. Mass transport enhancement in modified supercritical fluid. **Industrial Engineering Chemistry Research**, 38, 3505-3518, 1999.
- REVERCHON, E., DE MARCO, I. **Review, Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter.** **Journal of Supercritical Fluids**, 38, 146–166, 2006.
- RICE-EVANS, C., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, 2 (4), 152-159, 1997.
- RODRIGUES, V. M.; SOUSA, E. M. B. D.; MONTEIRO, A. R.; CHIAVONE-FILHO, O.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Determination of the Solubility of Extracts from Vegetable raw Material in Pressurized CO₂: A pseudo-ternary Mixture formed by Cellulosic Structure + Solute + solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, 22, 21-36, 2002.
- ROY, C. B.; GOTO, M.; HIROSE, T. Extraction of ginger oil with supercritical carbon dioxide: experimental and modeling. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, 35, 607–612, 1996.
- RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, 69, 167–174, 2000.
- SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, 91, 621-632, 2005.
- SAKAMURA, F. Changes in volatile constituents of *Zingiber officinale* rhizomes during storage and cultivation. **Phytochemistry**, 26 (8), 2207-2212, 1987.
- SANT'ANA, H. B. Desenvolvimento de uma Metodologia para Determinação da Solubilidade Óleos Essenciais em Dióxido de Carbono Pressurizado. **Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos)** – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 1996.
- SARI, M., BIONDI, D.M., KAABECHE, M. MANDALARI, G., D'ARRIGO, M., BISIFNANO, G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidante activities os the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. **Flavour and Fragrance Journal**, 21 (6), 890-898, 2006.

- SCHWARZ, K.; TERNES, W. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpens. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, 195, 99-103, 1992.
- SEBASTIÁN, S. L.; RAMOS, E.; IBÁÑEZ, E.; BUENO, J. M.; BALLESTER, L.; TABERA, J.; REGLERO, G. Dearomatization of Antioxidant *Rosemary* Extracts by Treatment with Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 13, 1998.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. Antioxidant properties of food phenolics. **Phenolics in food and nutraceuticals**, 403–437. Boca Raton: CRC Press, 2004.
- SHERWIN, E. R. Antioxidants for food, fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 49 (8), 468, 1972.
- SHOBANA, S.; NAIDU, K. A. Antioxidity activity of selected Indian spices. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 62, 107–110, 2000.
- SIHVONEN, M.; JÄRVENPÄÄ, E.; HIETANIEMI, V.; HUOPALAHTI, R. Advances in supercritical carbon dioxide Technologies. **Trends in Food Science & Technology**, 10, 217-222, 1999.
- SIKORA, E.; CIESLIK, E.; LESZCZNSKA, T.; FILIPIAK-FLORKIEWICZ, A.; PISULEWSKI, P. M. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aqua-thermal processing. **Food Chemistry**, 107, 55-59, 2008.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 467-495, 2003.
- SINGH, G.; KAPOOR, I. P. S.; PRATIBHA, S.; HELUANI, C. S.; LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food and Chemistry Toxicology**, 46, 3295-3302, 2008.
- SIVASOTHY, Y.; CHONG, W. K.; HAMID, A.; ELDEEN, I. M.; SULAIMAN, S. F.; AWANG, K. Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their antibacterial activities. **Food Chemistry**, 124, 514-517, 2011.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes, **Revista de Nutrição**, 15, 71-81, 2002.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M. C. C; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 30, 351-355, 2007.
- SPARKS, D.; HERNANDEZ, R.; ZAPPI, M.; BLACKWELL, D. ; FLEMING, T. Extraction of rice bran oil using supercritical carbon dioxide and propane. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 83, 885-891, 2006.

SPIRO, M.; KANDIAH, M.; PRICE, W. Extraction of ginger rhizome: kinetic studies with dichloromethane, ethanol, 2-propanol and acetone–water mixture. **International Journal of Food Science and Technology**, 25, 157–167, 1990.

SPIRO, M.; KANDIAH, M. Extraction of ginger rhizome: partition constants and other equilibrium properties in organic solvents and in supercritical carbon dioxide. **International Journal of Food Science and Technology**, 25, 566–575, 1990.

SPITELLER, G. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. **Mechanisms of ageing and development**, 122, 617-657, 2001.

STOILOVA, I.; KRASTANOV, A.; STOYANOVA, A.; DENEV, P.; GARGOVA, S. S. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). **Food Chemistry**, 102, 764-770, 2007.

SULAIMAN, S. F.; SAJAK, A. A. B.; OOI, K. L.; SUPRIATNO, SEOW, E. M. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, 24, 506-515, 2011.

SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature**, 3, 768-780, 2003.

SURH, Y. J.; LEE, E.; LEE, J. M. Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger. **Mutation Research**, 402, 259–267, 1998.

SYNDER, L. R; KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern liquid chromatography**, 2.ed. New York:, Inc, 246, 2979.

TAVEIRA MAGALHÃES, M.; KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; DUARTE, F. R.; CORNEJO, F. E. P.; MARQUES, L. M. R. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) Brasileiro: Aspectos Gerais, Óleo Essencial e Oleoresina. Parte 2 – Secagem, Óleo Essencial e Oleoresina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 17 (1), 132-136, 1997.

THOMSON, M.; AL-QATTAN, K. K.; AL-SAWAN, S. M.; ALNAQEEB, M. A.; KHAN, I.; ALI, M. The use of ginger (*Zingiber officinale* Roscae.) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 67, 475, 2002.

TJENDRAPUTRA, E.; TRAN, V. H.; LIU-BRENNAN, D.; ROUFOGALIS, B. D.; DUKE, C. C. Effects of ginger constituents and synthetic analogues on cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme in intact cells. **Bioorganic Chemistry**, 29, 156-163, 2001.

VAGIONAS, K.; GRAIKOU, K.; NGASSAPA, O.; RUNYORO, K.; CHINO, I. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja* species growing in Tanzania. **Food Chemistry**, 103(2), 319-324, 2007.

VALE, M. G. R. Extração de hidrocarbonetos em carvão mineral usando SFE, US e Soxhlet. **Tese de Doutorado**. PPGEMM-UFRGS, 152p., 1997.

- VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN DEN BERG, D.; TROMP, N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, 20 (3), 331-342, 1996.
- YONEY, Y.; OHINATA, H.; YOSHIDA, R.; YUKIO, S.; YOKOYAMA, C. Extraction of ginger flavor with liquid or supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, 8, 156–161, 1995.
- WAGNER, Z.; PAVLÍČEK, J. Vapour-liquid equilibrium in the carbon dioxide-p-cymene system at high pressure. **Fluid Phase Equilibria**, 90, 135-141. 1993.
- WANG, Z.; WANG, L.; LI, T.; ZHOU, X.; DING, L.; YU, Y.; YU, A.; ZHANG, H. Rapid analysis of the essential oils from dried *Illicium verum* Hook. f. and *Zingiber officinale* Rosc. by improved solvent-free microwave extraction with three types of microwave-absorption medium. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 386, 1863–1868, 2006.
- WANG, C. C.; CHEN, L. G.; LEE, L. T.; YANG, L. L. Effects of 6-gingerol, an antioxidant from ginger, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. **In Vivo**, 17 (6), 641-645, 2003.
- WEI, Q.-Y.; MA, J.-P.; CAI, Y.-J.; YANG, L.; LIU, Z.-L. Cytotoxic and apoptotic activities of diarylheptanoids and gingerol-related compounds from the rhizome of Chinese ginger. **Journal of Ethnopharmacology**, 102 (2), 177-184, 2005.
- WENNERSTEN, R. Extraction of organic compounds. Chap 9. In: In: RYDBERG, J.; MUSIKAS, C.; CHOPPIN, G. R. **Principles and practices of solvent extraction**. New York: Marcel Dekker, p. 115-356, 1992.
- WILLIAMS, DAVID G. **The chemistry of essential oils**. England: Micelle, 334p, 1996.
- WOHLMUTH, H.; SMITH, M. K.; BROOKS, L. O.; MYERS, S. P.; LEACH, D. Essential oil composition of diploid and tetraploid clones of ginger (*Zingiber officinale* Roscae) grown in Australia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54 (4), 1414-1419, 2006.
- ZANCAN, K. C.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, 24, 57-76, 2002.
- ZARATE, R.; SUKRASNO; YEOMAN, M. M. Application of two rapid techniques of column chromatography to separate the pungent principles of ginger, *Zingiber officinale* Roscoe. **Journal of Chromatography**, 609, 407 – 413, 1992.

