UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

**EXTRAÇÃO DE INSUMOS FARMACÊUTICOS POR
FLUIDO SUPERCRÍTICO**

ALDO ADOLAR MAUL

**Dissertação apresentada para
a obtenção do Grau de Mestre**

Orientador: Prof. Tit. Milton Leôncio Brazzach

São Paulo

1998

Aldo Adolar Maul

Extração de Insumos Farmacêuticos por Fluido Supercrítico

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre

Presidente e Orientador

1º Examinador

2º Examinador

À Deus, pela inspiração e
concretização deste trabalho.

À minha mãe, cujo amor
me fortalece, protege e guia.

Aos meus filhos,
Hermann, Érica, Elke, Werner e Willian
razão de ser maior de tudo que hoje faço.

Com amor e afeição à Sueko Higa de Lima.
Seu amor, vulnerabilidade, paciência e vigor
têm me inspirado a ser o melhor que posso ser
e nos momentos mais difíceis, a superá-los
e a aprender cada vez mais com meus erros.

Agradecimentos

À Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade na efetivação do curso e obtenção do título.

À bibliotecária Moema Rodrigues dos Santos, pela normalização das referências bibliográficas.

Ao Prof. Tit. Renato Baruffaldi, pelos ensinamentos e orientação, compartilhando sua experiência e indicando sempre o caminho da evolução em direção ao aprimoramento.

Ao meu falecido pai o saudoso Alexio Maul, pelo exemplo de perseverança e incentivo.

À diretoria da firma White Martins S.A., pelo empréstimo do extrator por fluido supercrítico PPI FC, modelo ES-204.

À diretoria da firma White Martins S.A., filial Osasco, pela manutenção do extrator, pelo bom atendimento e fornecimento gratuito dos gases.

À diretoria das firmas Messer-Griessheim e Flavex, da Alemanha, pelo fornecimento de literatura, tecnologia e uso das instalações industriais.

À diretoria da firma Damm Produtos Alimentícios Ltda, pelo fornecimento das matérias primas.

À diretoria das firmas Bayer do Brasil S.A., Indústrias Reunidas Jaraguá S.A. e Quest International S.A., pelo suporte analítico.

À Dra. Madalena Baron, do setor de Ciências Biológicas, depto de Bioquímica-Laboratório Químico de Biomassa e Biotecnologia (LQBB) da Universidade Federal do Paraná, pelos trabalhos conjuntos realizados e fornecimento de sementes de anonáceas.

Ao Prof. Tit. Roberto Wasicky, pela instalação do extrator à rede elétrica do Laboratório de Farmacognosia.

À Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi, pela colaboração ao permitir o uso das instalações e equipamentos do Laboratório de Farmacognosia.

Aos membros da Secretaria da Pós-Graduação, Benedita, Elaine e Jorge, pela paciência e múltiplos auxílios prestados.

Aos professores, pós-graduandos e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelas oportunas sugestões, pela compreensão, múltiplos auxílios e inestimável apoio, pelos ensinamentos que proporcionaram, pela boa receptividade, com gentileza e paciência, pelo estímulo e companheirismo com que sempre me trataram.

Ao Prof. Tit. Milton Leôncio Brazzach, de quem recebi mais do que orientação segura. Sua confiança foi meu estímulo a prosseguir, sua esperança, assim como a minha, de reduzir num futuro muito próximo o uso de solventes orgânicos tóxicos na extração de insumos farmacêuticos, alimentícios e cosméticos.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram na execução do presente trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS-----	V
LISTA DE FIGURAS-----	V
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS-----	VII
1 - INTRODUÇÃO-----	1
2 - OBJETIVOS-----	6
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	7
3.1 - DATAS IMPORTANTES NA EXTRAÇÃO POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS-----	7
4 - OS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS-----	12
4.1 - PROPRIEDADES DOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS-----	17
4.1.1 - DENSIDADE-----	18
4.1.2 - VISCOSIDADE-----	19
4.1.3 - DIFUSÃO-----	20
4.1.4 - PODER DE SOLVATAÇÃO-----	20
4.2 - MODIFICADORES-----	24
4.3 - EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO-----	25
4.3.1 - O DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO-----	29

4.3.2 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DA EXTRAÇÃO POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	31
4.3.2.1 - VANTAGENS	31
4.3.2.2 - DESVANTAGENS	33
4.3.3 - APARELHAGEM	36
4.3.3.1 - A FONTE DO FLUIDO SUPERCRÍTICO	36
4.3.3.2 - A BOMBA DE ALTA PRESSÃO	37
4.3.3.3 - O EXTRATOR	40
4.3.3.4 - O SEPARADOR	43
4.3.3.5 - OS ACESSÓRIOS	43
4.3.4 - OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR SFE	47
4.3.5 - EXTRAÇÃO DE SÓLIDOS	51
4.3.6 - EXTRAÇÃO DE LÍQUIDOS	51
5 - PARTE EXPERIMENTAL	53
5.1 - MATERIAL	53
5.1.1 - EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO	53
5.1.2 - OUTROS MATERIAIS E APARELHOS	56
5.1.3 - MATÉRIAS PRIMAS E REAGENTES	57
5.1.3.1 - AMOSTRAS	57
5.1.3.2 - SOLVENTES	58
5.1.3.3 - REAGENTES	58
5.1.3.4 - GASES	59
5.2 - MÉTODOS	60
5.2.1 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	60
5.2.2 - PROCESSOS DE EXTRAÇÃO	60
5.2.2.1 - PROCESSOS CONVENCIONAIS	61
5.2.2.1.1 - HIDRODESTILAÇÃO	61
5.2.2.1.2 - EXTRAÇÃO POR SOLVENTES	61

5.2.2.2 - EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO-----	62
5.2.3 - EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS E ANÁLISES EFETUADAS-----	64
5.2.3.1 - EXTRATO DE CARDAMOMO-----	64
5.2.3.2 - EXTRATO DE MANGERONA-----	64
5.2.3.3 - EXTRATO DE GUARANÁ-----	65
5.2.3.4 - EXTRATO DE ACETOGENINAS DE ANONÁCEAS-----	66
5.2.3.5 - EXTRATO DE PIMENTA PRETA-----	66
5.2.3.6 - EXTRATO DE PIMENTA VERMELHA-----	67
5.2.3.7 - EXTRATO DE ORÉGANO-----	67
5.2.3.8 - EXTRATO DE ZIMBRO-----	68
5.2.3.9 - EXTRATO DE COENTRO-----	68
5.2.3.10 - EXTRATO DE ALECRIM-----	69
5.2.3.11 - EXTRATO DE SÁLVIA-----	69
5.2.3.12 - EXTRATO DE GENGIBRE-----	70
5.2.3.13 - EXTRATO DE CÚRCUMA-----	70
5.2.4 - ANÁLISE-----	71
6 - RESULTADOS-----	73
6.1 - EXTRATO DE CARDAMOMO-----	73
6.2 - EXTRATO DE MANGERONA-----	74
6.3 - EXTRATO DE GUARANÁ-----	77
6.4 - EXTRATO DE ACETOGENINAS DE ANONÁCEAS-----	77
6.5 - EXTRATOS DE PIMENTA PRETA E VERMELHA-----	78
6.6 - EXTRATO DE ORÉGANO-----	79
6.7 - EXTRATO DE ZIMBRO-----	79
6.8 - EXTRATO DE COENTRO-----	80
6.9 - EXTRATO DE ALECRIM-----	80
6.10 - EXTRATO DE SÁLVIA-----	81
6.11 - EXTRATO DE GENGIBRE-----	82

6.12 - EXTRATO DE CÚRCUMA-----	82
7 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS-----	84
7.1 - CARDAMOMO E MANGERONA-----	84
7.2 - GUARANÁ-----	87
7.3 - ACETOGENINAS-----	88
7.4 - PIMENTAS PRETA E VERMELHA-----	89
7.5 - ORÉGANO-----	90
7.6 - ZIMBRO-----	91
7.7 - COENTRO-----	92
7.8 - ALECRIM-----	92
7.9 - SÁLVIA-----	93
7.10 - GENGIBRE-----	93
7.11 - CÚRCUMA-----	94
8 - CONCLUSÕES-----	95
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	97

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Propriedades físicas de alguns solventes comuns ordenados pela temperatura crítica-----	17
Tabela II - Parâmetros de solubilidade de Hildebrand de algumas substâncias-----	23
Tabela III - Comparações entre a extração por solventes no aparelho Soxhlet e a extração por fluidos supercríticos -----	27
Tabela IV - Comparação da ordem de magnitude das propriedades físicas de gases, líquidos e fluidos supercríticos.-----	31
Tabela V - Análise de condimentos extraídos por SFE e por Soxhlet-----	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução dos trabalhos publicados sobre extração por fluidos supercríticos.-----	3
Figura 2 - Diagrama de fases do dióxido de carbono-----	15
Figura 3 - Curva de Andrews para o dióxido de carbono-----	15
Figura 4 - Diagrama de fase genérica para qualquer substância-----	16
Figura 5 - Variação da densidade do dióxido de carbono com a pressão, a diversas temperaturas-----	22
Figura 6 - Fluxograma de um sistema de extração por fluido supercrítico modelo ES-204-----	26

Figura 7 - Diagrama de processo de extração por fluido supercrítico-----	26
Figura 8 - Aparelho de extração por fluido supercrítico, PPI FC modelo ES-204.-----	34
Figura 9 - Unidade de extração por fluido supercrítico com capacidade para 450 L.-----	35
Figura 10 - Típica operação intensificadora de estágio simples-----	38
Figura 11 - Bomba de alta pressão (compressor)-----	39
Figura 12 - Extrator ou vaso extrator, posição fechada-----	41
Figura 13 - Extrator, mostrando a alimentação com produto e detalhe do sistema de fechamento e selo de segurança-----	42
Figura 14 -Separador ou vaso separador, equipado com sistema elevatório, camisa de aquecimento e válvula de expansão-----	44
Figura 15 - Bomba de cossolvente, mostrando em detalhes, o motor, o reservatório, o monitor e ao lado o "Coolflow" (resfriador do sistema)-----	46
Figura 16 - Cromatograma GC obtido da extração com CO ₂ supercrítico de um condimento (orégano)-----	48
Figura 17 - Comparação da eficiência de extração de um composto orgânico, usando diferentes fluidos supercríticos e a extração por Soxhlet. Os traços nos topos correspondem a desvios experimentais (49)-----	49
Figura 18 - Unidade de extração por fluido supercrítico, com extratores em série, pertencente à firma Flavex Naturextrakte durch CO ₂ Extraction Technology, Alemanha-----	55
Figura 19 - Cromatograma a gás, comparativo entre os óleos essenciais de cardamomo, obtidos na extração por CO ₂ supercrítico e os obtidos pela hidrodestilação.-----	74
Figura 20 - Cromatograma a gás, comparativo entre os óleos essenciais de mangerona, obtidos na extração por CO ₂ supercrítico e os obtidos pela hidrodestilação-----	76

Figura 21 - Alguns componentes comuns de óleos essenciais e sua curva de pressão em função da temperatura-----86

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Observação: Optou-se pelo uso das abreviaturas em inglês, porque toda literatura consultada usa este tipo de nomenclatura. Além disso, não há uma normalização na tradução para o português, o que pode levar a erros na interpretação de leitura de dissertações, teses e trabalhos científicos. Um exemplo típico acontece com a cromatografia líquida de alta pressão, também conhecida como cromatografia de alta eficiência (HPLC), que foi traduzida como CLAD, CLAE ou CLAP e a extração por fluido supercrítico (SFE), traduzida como EFSC, ESC ou EFS (57, 175).

α - seletividade

β - razão de fases

δ - parâmetro de solubilidade de Hildebrand

d.i. - diâmetro interno

DMSO - dimetil sulfóxido

GC - cromatografia a gás

H - altura equivalente a um prato teórico

HPLC - cromatografia líquida de alta pressão ou de alta eficiência

Ir - índice de retenção de Kovats

IR - infravermelho

K - coeficiente de partição

k - razão capacitiva

L - comprimento

min. - minuto

MS - espectrômetro de massas

μm - micrometro

μL - microlitro

n - número de pratos teóricos

p.a. - para análise ou grau analítico

Pc - pressão crítica

Pr - pressão reduzida

ρ - densidade

p.a.- grau analítico

ρ_c - densidade crítica

ρ_r - densidade reduzida

Rs - resolução

s - segundo

SFC - cromatografia a fluido supercrítico

SFE - extração por fluido supercrítico

Tc - temperatura crítica

Tr - temperatura reduzida

TLC - cromatografia em camada delgada

UV - ultravioleta

Vc - volume crítico

Vr - volume reduzido

1 - INTRODUÇÃO

As primeiras observações da ocorrência de uma fase supercrítica foram relatadas pelo barão Cagniard de la Tour, em 1822 (170, 237). Ele notou visualmente que a ligação gás-líquido desaparecia quando a temperatura de certos materiais era aumentada por aquecimento individual em um recipiente de vidro fechado. Das primeiras experiências, foram descobertos, pela primeira vez, os pontos críticos de uma substância.

Os fluidos supercríticos são conhecidos há mais de um século, sendo chamados inicialmente de gases comprimidos. A primeira observação de que fluidos supercríticos dissolvem uma grande quantidade de material relativamente não volátil foi feita em 1879, por Hannay e Hogarth (97, 170, 223, 237, 245). Eles notaram que haletos de metais eram solúveis em etanol ($T_c=243^{\circ}\text{C}$, $P_c=63\text{ bar}$) e em tetracloreto de carbono ($T_c=178^{\circ}\text{C}$, $P_c=51\text{ bar}$) supercríticos. Verificaram que as concentrações de haletos metálicos em etanol supercrítico eram muito mais altas do que corresponderia a suas pressões de vapor individuais, que o aumento da pressão causava a dissolução dos materiais e que a sua diminuição precipitava os materiais dissolvidos no etanol e no tetracloreto supercríticos.

Na década de 30 houve um esforço para melhorar a tecnologia do refino do petróleo, que resultou na obtenção de muitos dados sobre o equilíbrio líquido-vapor de misturas de hidrocarbonetos a altas pressões

(237, 245). Em 1947, Messmore obteve uma patente para o desasfaltamento do petróleo usando fluidos supercríticos (66, 91, 97, 171).

A extração com fluidos supercríticos começou a ser usada na década de 1970 em escala industrial. Muitas patentes foram requeridas, principalmente sobre a descafeinação do café, a extração de lúpulo e de condimentos (1, 63, 76, 97, 123, 177, 214, 234).

Um desenvolvimento significativo na extração por fluidos supercríticos, veio com a patente de Zosel (170, 237), que incentivou estudos posteriores intensivos. Em 1970, ele reportou a descafeinação de sementes de café verdes com CO₂ (1, 170, 188). Esse processo era acompanhado da imersão das sementes, primeiro em água e depois em CO₂ supercrítico. A presença da água foi essencial para a extração eficiente da cafeína do interior das sementes, porque aumentava a polaridade da mistura solvente, ao se misturar ao dióxido de carbono supercrítico, funcionando com um modificador ou cossolvente (207).

Atualmente, mais de doze patentes foram emitidas, relativas a descafeinação do café o que representa um mercado anual de \$ 2-3 bilhões, só nos Estados Unidos da América (3, 14, 188).

A técnica de extração por fluidos supercríticos só emergiu como ferramenta analítica e tecnológica, de fato, no começo da década de 80 (14, 37, 245). Da mesma forma, o número de trabalhos publicados também cresceu rapidamente, como podemos ver na Figura 1.

As técnicas para a extração de componentes ativos de insumos naturais evoluíram significativamente nos últimos anos (170, 245, 237).

Os primeiros processos de extração foram de digestão de flores e condimentos em óleos e gorduras e de ervas e partes de plantas em água e vinho. Os óleos essenciais e fixos foram obtidos por expressão a frio. Isto foi seguido pela técnica de extração chamada de “enfleurage”, que consiste na absorção de substâncias voláteis de flores e plantas em gorduras (170, 237, 245). Mais tarde, no caso de produtos voláteis, predominou a destilação direta e a destilação por arraste de vapor d’água.

Figura 1: Evolução dos trabalhos publicados sobre extração por fluidos supercríticos. Foram publicados cerca de 600 artigos até junho de 1997. O ano de 1997 está incompleto, e por isso não aparece no gráfico.

Nos últimos anos, o processo de extração de matérias primas vegetais por diversos solventes, como por exemplo, o n-hexano, o benzeno, os álcoois etílico, metílico e propílico, a acetona, o pentano e diversos compostos clorados, como o clorofórmio, o tetracloreto de carbono, o cloreto de metileno e o dicloreto de etila, passaram a ser muito usados. Após a extração, o solvente é removido por evaporação ou destilação, à pressão reduzida, até a obtenção de um resíduo. A extração alcoólica deste resíduo

produz um absoluto, que é a forma típica dos extratos fluidos do mercado (14, 44, 88, 90, 170).

Cada um desses processos pode fornecer ingredientes de aromas e odores de muito alta qualidade a partir de vegetais, entretanto, a temperatura elevada (da destilação) e o uso de solventes, podem levá-los a divergir da qualidade original (102, 110, 158).

Há dois problemas associados com a extração a elevadas temperaturas. Primeiro, os danos de degradação térmica causados aos componentes, altamente sensíveis, de insumos farmacêuticos. Segundo, a perda potencial de componentes altamente voláteis, de baixo peso molecular, que não podem mais ser recuperados e incorporados aos extratos (179, 180, 182).

O problema da extração por solventes, é a impossibilidade de remover todo o solvente residual, sem um grande dispêndio de energia e custos. Na maioria das situações, o solvente residual pode ser indesejável num insumo farmacêutico, pela sua toxicidade ou mesmo pela interferência no sabor e no aroma, por reagir quimicamente com alguns componentes e induzir reações secundárias de oxidação, hidrólise e esterificação (179, 180, 118, 182).

Os processos de extração supercrítica sobressaem no ciclo evolutivo, destacando-se as seguintes características atuais como muito importantes: a utilização de uma tecnologia limpa que não deixa resíduos; o trabalho com solventes não tóxicos e não poluentes; a não alteração dos componentes químicos e a extração de produtos de alta qualidade, a custos e temperaturas relativamente baixos (10, 141, 202, 237).

A extração de matérias primas naturais com dióxido de carbono supercrítico, efetivamente, resolve questões associadas com as altas temperaturas e com o uso de solventes. As temperaturas empregadas são

bastante baixas neste processo, e o único solvente usado, o gás carbônico, dissipa-se completamente após a extração, sendo um componente do ar atmosférico (84, 86, 204, 237).

2 - OBJETIVOS

O presente trabalho tem por finalidade principal avaliar o potencial da extração por fluidos supercríticos, desenvolvendo um método de extração de insumos farmacêuticos, alimentícios ou fitoterápicos por fluido supercrítico, utilizando o dióxido de carbono.

Este método será comparado a extração por métodos tradicionais como a extração por aparelho Soxhlet e ou a hidrodestilação, através do aparelho de Clevenger.

Faz parte do trabalho, uma revisão bibliográfica sobre a extração por fluidos supercríticos.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. 1 - DATAS IMPORTANTES NA EXTRAÇÃO POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (63, 84, 145, 170, 188, 237)

1822 - Cagniard de la Tour descobriu o estado supercrítico do dióxido de carbono.

1861 - G. Gore tornou o naftaleno solúvel em gás carbônico.

1863 - T. H. Andrews determinou o estado supercrítico do dióxido de carbono.

1869 - T. H. Andrews determinou o ponto supercrítico do dióxido de carbono.

1873 - Van der Waals elaborou a equação estado e a lei dos estados correspondentes.

1939 - Horwath registrou a primeira patente desta tecnologia para concentrar sucos de frutas.

1954 - A. W. Francis descreveu a solubilidade de 261 compostos orgânicos em gás carbônico.

1963 - K. Zosel patenteou a extração de 68 diferentes matérias primas por gás carbônico.

1963-1972 - no Instituto de Pesquisas de Krasnodar (URSS), foram extraídas 80 diferentes plantas por esse processo.

1977 - Stahl e Schilz acoplaram a extração por fluido supercrítico com cromatografia em camada delgada (TLC).

1983 - Smith e Udseth acoplaram a SFE com espectrometria de massa (MS) e Unger e Roumeliotis com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

1985 - Sugiyama, Saito, Hondo e Senda, uniram SFE, SFC e espectrometria no ultravioleta (UV).

1986 - Schantz e Senda desenvolveram a SFE do solo.

1986 - Hawthorne e Miller desenvolveram a SFE dos materiais sorventes (91).

Em datas mais recentes, atividades de desenvolvimento comercial, de pesquisas e mesmo acadêmicas, envolvendo extração por fluido supercrítico, tem continuado a crescer.

Exemplos comerciais, agora incluem a extração de princípios amargos e aromáticos do lúpulo (9, 63, 97, 123, 257) para a indústria da cervejaria, a descafeinação do café e do mate (1, 3, 37, 135, 187, 188, 251), a remoção da nicotina do tabaco (97, 170) para a produção dos cigarros “light”, a obtenção comercial dos carotenos da cenoura (25, 33, 144, 173, 210, 255, 271), a produção de bases para cosméticos a partir de resíduos e das cervejarias (5, 155, 178, 179, 181), a extração de óleos essenciais de plantas (9, 34, 37, 47, 64, 77, 81, 111, 113, 156, 170, 179, 180, 212, 213, 214, 215, 226, 246, 251), a retificação, a desacidificação e a desodorização de óleos em geral (24, 74, 80, 126, 140, 216, 218, 223, 240), a extração de princípios ativos e insumos farmacêuticos de plantas medicinais (3, 14, 16, 34, 40, 64, 77, 81, 110, 111, 201, 214, 219, 224, 244, 246, 247, 248, 250), o processamento de óleos e gorduras comestíveis e a separação de ácidos graxos, triglicéridos e colesterol (15, 20, 31, 38, 39, 87, 132, 134, 148, 185, 259, 268).

Operações comerciais incluem firmas como a SKF, a Flavex, a HAG, a Messer Griesheim, a Marbet, a Hermesen e a HVG, na Alemanha; a Carlton United e a Pfizer Hops, na Austrália; a General Foods, a Pfizer, a Phillip

Morris, a Liquid Carbonic, a White Martins, a Hops Extraction Corp., a J. I. Haas Inc. e a Kerr-McGee, nos Estados Unidos da América; a Cal-Pfizer, a Cea-RP, a Cammilli Albert & Louie, na França; a Pauls & White e a Agrofarm, na Inglaterra e no Japão as firmas: Mori Oils Mills, Fuji Flavor, Sumitomo Seiko, Yasuma, Hasegawa Koryo, Takasago Foods e a Takeda Pharmaceuticals (170, 183, 188, 209).

As diferenças entre os óleos essenciais extraídos por dióxido de carbono supercrítico e os tradicionalmente destilados ou extraídos por solventes portanto podem ser resumidas, como segue:

- a) não tem resíduos de solventes,
- b) não apresentam notas de produtos de decomposição gerados durante a destilação,
- c) mais parecidos com o original devido à extração à baixa temperatura,
- d) mais notas características, porque o CO_2 extrai as características de um absoluto,
- e) melhor solubilidade porque não são gerados terpenos adicionais durante a extração,
- f) maior concentração de componentes aromáticos,
- g) menor possibilidade de degradação térmica dos componentes, pois a extração é levada a efeito em temperatura de até 50°C (para o gás carbônico a mínima é de $31,04^\circ\text{C}$),
- h) ajustando a polaridade, a pressão e a temperatura, podemos extrair seletivamente e fracionar amostras complexas com fluidos supercríticos. Entretanto, não é um processo de alta resolução. Para ser possível fracionar através da extração por fluido supercrítico, deve existir uma diferença significativa na polaridade ou no peso molecular dos componentes a separar das matérias primas,
- i) os resultados práticos mostraram que a técnica de extração por fluido supercrítico, usando CO_2 é fácil, rápida e segura de ser executada,

requerendo apenas alguns cuidados básicos quanto às normas de segurança,

j) para cada produto a ser extraído deve ser levado em conta a característica química, o estado físico e a composição teórica, independentemente do fato do soluto ser o mesmo. A extração pode produzir um bom resultado para um determinado produto, mas diferentes produtos necessitam de diferentes condições de extração,

k) a otimização das condições de extração por fluido supercrítico é relativamente simples para um determinado produto, mas na prática, devemos lembrar que os produtos são geralmente de composição complexa,

l) o uso de modificadores (vide página 24) ampliou a faixa de aplicações da SFE, necessitando ainda de maiores estudos na instrumentação necessária e adequada para o uso destes. Em função disso, devem-se estudar as propriedades dos modificadores e sua aplicação na SFE de compostos mais polares, como por exemplo, alguns insumos farmacêuticos (48).

Pela SFE podem ser feitos desenvolvimentos de processos para a indústria farmacêutica, de alimentos, cosmética, de perfumaria e indústrias de processamento químico, com os seguintes resultados:

* extração de fármacos de fontes botânicas (35, 53, 55, 68, 69, 94, 100, 106, 110, 153, 156, 226, 217, 219, 229, 243, 273, 241);

* processamento de produtos comestíveis e suplementos alimentícios (6, 8, 20, 29, 30, 31, 32, 33, 39, 55, 59, 112, 116, 130, 157, 162, 193, 235, 252);

* purificação de polímeros (135, 136, 137);

* extração e refino de óleos comestíveis (2, 24, 54, 96, 117, 134, 140, 141, 143, 191, 239, 268);

* concentração de óleos cítricos (74, 146, 152, 162, 182, 234);

* extração e fracionamento de óleos de sementes e ácidos graxos (47, 70, 139, 149, 160, 161, 185, 208, 221, 222, 227, 228, 239, 268);

* extração de aromas e insumos para cosméticos (23, 132, 155, 183, 197);

- * extração de inseticidas naturais, pesticidas e contaminantes (69, 71, 137, 138, 168, 184, 195, 200, 240, 242, 256, 262, 267);
- * extração de corantes naturais (50, 75, 132, 187, 197);
- * extração de gorduras de amidos (93, 187);
- * extração da lecitina pura da lecitina bruta (143, 218, 225, 227);
- * separação do colesterol do ovo, leite e carnes (20, 31, 32, 133, 96, 164, 233, 259, 268);
- * extração rápida de produtos naturais (49, 83, 85, 94, 95, 187, 194, 192, 197, 198, 206, 219, 226);
- * separação de compostos aromáticos de produtos do petróleo (78, 166, 208, 238, 249);
- * extração de hidrocarbonetos líquidos do carvão de pedra, da hulha e do solo (79, 136, 166, 171, 172, 195);
- * obtenção de extratos de condimentos em geral (60, 63, 169, 217);
- * extração e fracionamento de óleos essenciais (77, 81, 99, 100, 126, 156, 169, 197, 199, 201, 206, 209, 213, 243);
- * extração de produtos farmacêuticos (56, 89, 108, 109, 119, 151);
- * extração de produtos de fermentação microbiana (41, 42, 191, 270);
- * análises cromatográficas (SFC) (7, 11, 13, 18, 36, 43, 52, 65, 76, 98, 101, 103, 105, 107, 114, 118, 122, 125, 127, 128, 129, 154, 159, 163, 167, 172, 189, 190, 196, 203, 205, 230, 231, 232, 261, 263, 264, 265, 266, 269);
- * análises ambientais (21, 66, 186, 200, 238, 260).

4 - OS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Quando uma certa substância estiver acima de sua temperatura e pressão críticas, teremos então, um fluido supercrítico.

A temperatura crítica é definida como a temperatura acima da qual um gás não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto se eleve a pressão. Acima de sua temperatura crítica ele não pode condensar ou evaporar para formar um líquido ou um gás, mas é um fluido, com propriedades variando continuamente das gasosas às líquidas a medida que a pressão aumenta.

A pressão crítica é definida como aquela pressão correspondendo ao ponto crítico de pressão acima da qual somente pode existir um fluido supercrítico. Na região crítica existe apenas uma fase e esta possui algumas das propriedades de ambos, do gás e do líquido. O estado supercrítico é encontrado quando ambos, a temperatura e a pressão, estão acima de seus pontos críticos, portanto, é o fluido acima dos valores críticos de temperatura e pressão (145, 170, 236).

O diagrama de fases para o dióxido de carbono (Figura 2), mostra que acima de 31,04°C e 73,8 bar, atingimos o ponto em que o CO₂ se encontra na condição de fluido supercrítico (11, 84, 88, 135, 188, 237).

As curvas pressão-volume para o dióxido de carbono (Figura 2) mostram que os fluidos supercríticos não podem ser liquefeitos (131, 134, 236, 241). Na curva ABCD, obtida a 13,1°C, temos no trecho A-B um gás sendo comprimido. Na pressão B, começa a ocorrer a liquefação à pressão constante e o volume decresce rapidamente. O gás é convertido em um líquido com uma densidade muito maior. Portanto, na etapa B-C, o líquido e o gás coexistem, ocorrendo uma descontinuidade de estado. No ponto C, o dióxido de carbono está completamente liquefeito. O trecho C-D representa a compressão do líquido com pouca alteração do seu volume (135, 236). A curva a 21,5°C é parecida com a curva ABCD, diminuindo BC com o aumento da temperatura e isso ocorre até a temperatura de 31,1°C. Acima dessa temperatura não ocorre mais a liquefação, mesmo a pressões muito altas. Estas curvas, chamadas de curvas de Andrews (Figura 3), mostram portanto, que acima da temperatura crítica o sistema é monofásico (135, 236).

Os fluidos supercríticos são frequentemente comparados com base em seus parâmetros reduzidos, que incluem temperatura reduzida ($T_r = T/T_c$), pressão reduzida ($P_r = P/P_c$), volume reduzido ($V_r = V/V_c$) e densidade reduzida ($\rho_r = \rho/\rho_c$). Nessas expressões, T_c , P_c , V_c e ρ_c , são respectivamente, temperatura, pressão, volume e densidade críticas. Van der Waals relacionou os dados nas equações fundamentais dos estados correspondentes e na equação de estado.

$$\text{Equação estado correspondente : } (P_r + 3/V_r^2) \cdot (V_r - 1/3) = 8T_r/3 \quad (1)$$

$$\text{Equação estado : } (p + a/V^2) \cdot (V - b) = RT \quad (2)$$

Com isso, podemos generalizar um diagrama de fases para qualquer substância (Figura 4). As áreas realçadas na figura indicam as condições de

trabalho que alguns pesquisadores usaram para a extração por fluido supercrítico (78, 236).

Figura2 : Diagrama da fases do dióxido de carbono (135, 236)

Figura 3: Curva de Andrews para o dióxido de carbono (135,173,234)

Figura 4: Diagrama de fases genérico para qualquer substância (66, 67, 135, 173, 236)

4.1 - PROPRIEDADES DOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

As características de alguns fluidos que são ou não usados em extração por fluido supercrítico, estão descritas na Tabela I. Embora existam fluidos com diversas polaridades e propriedades adequadas à solubilização e eluição de solutos, a escolha de um fluido para uso em extrações depende frequentemente de considerações práticas.

Tabela I: Propriedades físicas de alguns solventes comuns ordenados pela temperatura crítica (84, 88, 135, 209, 237, 245, 261).

Gás	T _c (°C)	P _c (bar)	δ _c (g/mL)
nitrogênio	-147,00	33,934	-
metano	-82,49	46,407	-
etileno	9,21	50,313	0,220
dióxido de carbono	31,04	73,800	0,466
etano	32,25	48,839	0,203
óxido nitroso	36,45	72,549	0,457
hexafluoreto de enxofre	45,56	37,602	0,740
metanol	79,90	240,200	0,272
propileno	91,60	46,103	-
propano	96,85	42,557	0,220
frigen 12	111,70	39,400	-
amônia	132,40	112,998	0,240
pentano	196,60	33,300	0,232
hexano	234,20	29,600	0,234
água	374,40	226,800	0,344

As propriedades físicas de um fluido supercrítico são intermediárias entre um gás e um líquido típicos. Por exemplo, a densidade de um fluido supercrítico pode ser mudada pela variação da pressão aplicada sobre o fluido. Assim, um fluido supercrítico pode ter a densidade que oscila entre aquelas exibidas pelos gases até valores típicos dos líquidos, quando o fluido é comprimido a altas temperaturas (12, 209, 245, 261).

Um fluido supercrítico mantido a relativamente alta densidade tem a capacidade de dissolver uma variedade de materiais, exatamente como fazem os líquidos convencionais (14, 89, 135, 170, 209, 245, 261).

Fluidos supercríticos carregam as propriedades dos gases e dos líquidos:

- * compressibilidade semelhante a um gás, enchendo completa e uniformemente um recipiente,
- * dissolução de solutos, como um líquido (quando suficientemente comprimidos),
- * a viscosidade é baixa como a de um gás (produzindo baixas quedas de pressão em colunas de mercúrio),
- * a difusão é intermediária entre gases e líquidos, variando com a densidade.

4.1.1 - DENSIDADE

As propriedades físicas e químicas de um fluido supercrítico, tais como a força de solvatação e a viscosidade, são dependentes da densidade. Assim, pela modificação da densidade do fluido, é possível variar um fluido

com características de gás para as características de um líquido, sem cruzar a linha de equilíbrio gás/líquido (135, 209, 245, 261).

A densidade típica de um fluido supercrítico é de 100 a 1000 vezes maior do que a de um gás e é comparável a de um líquido. Como podem ser comprimidos facilmente, pequenas mudanças na pressão, produzem grandes variações na sua densidade e na sua capacidade de solubilizar compostos químicos (12, 65, 67, 237, 261).

Com o aumento da densidade, as interações moleculares são mais fortes, devido a uma diminuição das distâncias intermoleculares. Isso significa que um fluido supercrítico solvata quase da mesma maneira que um líquido (209, 261).

4.1.2 - VISCOSIDADE

Os fluidos supercríticos tem viscosidade semelhante a de um gás, de 10 a 100 vezes menores que a de um líquido. A viscosidade muito baixa daqueles fluidos permite características de fluxo muito favoráveis à extração. Portanto, a transferência de massa de solutos em extrações é muito mais rápida com fluidos supercríticos do que com líquidos (76, 209, 237, 261).

4.1.3 - DIFUSÃO

O coeficiente de difusão de um soluto é cerca de 10 a 100 vezes maior nos fluidos supercríticos do que numa fase líquida. A alta difusibilidade na extração com fluidos supercríticos é observada na sua melhor penetração em materiais sólidos de baixa porosidade e na transferência de massa muito mais rápida (197, 209, 261).

4.1.4 - PODER DE SOLVATAÇÃO

A capacidade de prever a solubilidade de solutos em fluidos supercríticos é muito importante para entender a sua extração. Na extração por fluido supercrítico o soluto deve ser compatível com o solvente a ser usado, em alguns casos, torna-se necessário acrescentar cossolventes para modificar a polaridade do fluido antes da extração (150, 261).

Métodos termodinâmicos tem sido usados para prever a solubilidade dos insumos farmacêuticos em fluidos supercríticos, envolvendo cálculos matemáticos e que quase sempre necessitam de dados experimentais para calcular os parâmetros de solubilidade (150, 237).

Excelentes informações sobre os mecanismos de solubilidade podem ser encontrados nos livros de McHugh e Krukonis (145) e Charpentier e Sevenants (245) e também em artigos de separatas (17, 22, 88, 113, 223, 217, 220, 269).

Como o poder de solvatação de um fluido está diretamente relacionado com a densidade, a capacidade de solvatar pode ser

modificada facilmente pela alteração da pressão, e em menor extensão, pela da temperatura (12). Assim, uma das propriedades mais importantes é a sua compressibilidade, que permite variar o parâmetro da solubilidade do fluido supercrítico, pela simples variação de densidade, propiciado em função da pressão e da temperatura. Esse fenômeno permite separações tais que não podem ser feitas com técnicas convencionais como destilação, filtração ou precipitação (237). Entretanto, a capacidade extrativa de um solvente supercrítico não pode ser explicada unicamente pelo aumento de sua densidade (135).

Giddings e colaboradores (78), sugeriram que a força de solvatação de um gás comprimido depende do "efeito de estado" e do "efeito químico". O efeito de estado é a influência do estado físico da substância, relativo a sua compressão e temperatura, ou seja, a densidade (Figura 5). Separado desse efeito, há o efeito químico, único para cada espécie química e dependente da polaridade, propriedades ácido-base e tendências de formação de pontes de hidrogênio.

As diferenças clássicas de solubilidade de substâncias líquidas se devem basicamente ao efeito químico. Isto porque é obtida pouca alteração em sua característica de solvente pelo efeito de estado. Por outro lado, a resposta do efeito de estado na compressão fornece graus de liberdade adicionais muito vantajosos para os gases comprimidos, quando empregados como solventes.

Os autores (78) desenvolveram uma maneira de calcular a força do solvente, usando o parâmetro de solubilidade de Hildebrand, δ (delta).

$$\delta = 1,25 P_c^{1/2} [\rho_r/\rho_r(\text{liq.})] \quad (3)$$

onde:

δ é dado em calorias por centímetro cúbico,

P_c é a pressão crítica, em bar,

ρ_r é a densidade reduzida do fluido supercrítico e

$\rho_r(\text{liq})$ é a densidade reduzida do líquido.

O parâmetro de solubilidade de Hildebrand para o CO_2 pode ser variado de 0,13 até 0,87, à 100°C, pelo aumento da pressão de seu valor crítico de 73,8 bar à 600 bar (237).

Figura 5: Variação da densidade do dióxido de carbono com a pressão, a diversas temperaturas (173, 209, 237, 261)

O dióxido de carbono supercrítico não tem a força de solvatação necessária na pressão de trabalho prática (80 a 600 bar) para solubilizar solutos muito polares. Em termos gerais, o dióxido de carbono é um excelente solvente para espécies não polares como alcanos e terpenos [$d = 6-8$ (cal/cm³)]; é razoável para espécies moderadamente polares, incluindo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, difenil policlorados, aldeídos, ésteres, álcoois, pesticidas organoclorados e gorduras [$d = 8-11$ (cal/cm³)] e não é indicado para compostos mais polares (Tabela II).

Tabela II: Parâmetros de solubilidade de Hildebrand de algumas substâncias (173, 237).

Fluido	parâmetro de solubilidade (δ)
etano	6,6
etileno	6,6
n-pentano	7,1
n-hexano	7,3
clorotrifluormetano	7,8
óxido nitroso	10,6
dióxido de carbono	10,7
etanol	12,7
amoníaco	13,2
metanol	14,4

4.2 - MODIFICADORES

Diversos pesquisadores concluíram que as propriedades de seletividade e a força de solvatação do CO_2 puro, supercrítico, são semelhantes às do hexano líquido, que é um solvente não polar (86, 88, 135).

Quando necessitamos extrair compostos polares, a primeira opção seria usar um solvente mais polar, como o amoníaco ou o metanol.

Por causa das dificuldades práticas no uso dos fluidos puros polares, a extração tem sido feita usando o dióxido de carbono contendo uma pequena quantidade de um modificador orgânico, também chamado de cossolvente.

Os modificadores ou cossolventes podem ser introduzidos por mistura prévia ao sistema ou pelo uso de uma segunda bomba, a bomba de cossolventes. A polaridade de um fluido pode ser aumentada pela simples adição de, por exemplo, 1 mol % de modificador, que pode levar a uma mudança substancial na sua densidade e o mais importante, é que essa adição produz um aumento grande nas propriedades de seletividade e solubilidade (88, 261).

Apesar do metanol ter sido o modificador de escolha, uma grande variedade de substâncias orgânicas tem sido usadas, como álcoois, ácidos orgânicos, clorofórmio, acetonitrila, água, acetona, dissulfeto de carbono, DMSO, tetrahidrofurano e cloreto de metileno.

A adição de modificadores aos fluidos supercríticos altera as propriedades críticas dos fluidos, que podem ser calculadas pelas equações abaixo:

$$T_c = X_a \cdot T_a + X_b \cdot T_b \quad (4)$$

$$P_c = X_a \cdot P_a + X_b \cdot P_b \quad (5)$$

Onde:

T_c e P_c são os parâmetros críticos da temperatura e pressão da mistura dos fluidos.

X_a e X_b são as frações molares dos fluidos A e B, respectivamente e

P_a e P_b são as pressões críticas correspondentes.

A escolha dos modificadores e suas concentrações é feita de modo empírico, porque não existem muitos dados de solubilidade dos solutos em fluidos supercríticos com modificadores, cujo mecanismo de ação ainda não foi bem entendido, embora um número crescente de estudos sobre modificadores em extração por fluido supercrítico tente elucidar o assunto (89, 151, 154, 171, 176).

4.3 - EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

A extração por fluido supercrítico segue o seguinte fluxograma (Figuras 6 e 7): o material a ser extraído é colocado num recipiente cilíndrico com terminações porosas, que por sua vez é colocado na câmara de extração. Seleciona-se a temperatura e a pressão ideais para o material específico a ser extraído e para o produto final desejado (vide item 5.2.2.2).

Figura 6: Fluxograma de um sistema de extração por fluido supercrítico ES-204

Figura 7: Diagrama de processo de extração por fluido supercrítico

Circula-se o gás supercrítico através do material, no extrator, até dissolver completamente as frações desejadas. Após completar o ciclo de extração, transfere-se a solução para um separador, onde a pressão é mantida abaixo do ponto crítico. Lentamente, o gás carbônico torna-se gasoso, perdendo suas propriedades de solvatação, a medida que a pressão diminui. Em dado momento, o soluto precipita na forma de uma fina camada que lembra uma neve e é coletado. Determina-se a eficiência da extração pelo método 30.020 e 3.138 da AOAC (4, 61). O dióxido de carbono expandido, em estado gasoso, circula através de um trocador de calor, é refrigerado e novamente liquefeito. O gás pode ser recomprimido ao estado fluido, completado em seu volume e ser usado em novas extrações, após restabelecidas as condições de temperatura e pressão que o recolocam de volta à região supercrítica (51, 105, 151).

Tabela III: Comparações entre a extração por solventes no aparelho Soxhlet e a extração por fluidos supercríticos (77, 208, 245, 261).

características	Soxhlet	SFE
velocidade de extração	lenta	rápida
recuperação	média	boa
seletividade	não	sim
fracionamento	não	sim
temperatura	alta*	baixa
polaridade	fixa	alterável
pós-concentração	sim	não
acoplamento	não	GC, HPLC, SFC e TLC

* - ponto de ebulição do solvente

Uma advertência deve ser feita sobre os perigos na operação com fluidos supercríticos. A extração envolve o uso de altas pressões e muitas operações exigem uma atenção muito maior quanto a segurança. Muitos dos perigos são invisíveis e todo o cuidado é pouco. A alta pressão conjugada com a temperatura pode causar explosões violentas.

Todas as precauções foram tomadas na fabricação do equipamento, como a instalação de inúmeras válvulas de segurança, praticamente em cada uma das etapas operacionais. O extrator, o separador, as bombas, os registros e a tubulação são todos construídos em aço inox 316, à prova de explosão, mas mesmo assim, todas as normas de segurança e instruções do fabricante foram rigorosamente seguidas.

Os processos tradicionais de preparação de amostras requerem, geralmente, um grande tempo do analista e o consumo de grandes quantidades de diversos solventes orgânicos. Como resultado do programa da EPA (Environmental Protection Agency) visando a redução de 50% do uso dos solventes orgânicos benzeno, tolueno, xileno, clorofórmio, cloreto de metileno, metiletilcetona, metilisobutilcetona, tetracloretileno, tricloroetileno e tricloroetano e a eliminação de 100% de clorofluorcarbono (CFC), tetracloreto de carbono (CCl_4) e tricloreto de etila ($\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3$) a partir de 01/01/96, nos Estados Unidos, o interesse em métodos alternativos que utilizem solventes menos tóxicos e de maior poder de solvatação está aumentando em todo o mundo (194, 237).

O custo da extração por fluido supercrítico é muito menor que uma extração com solventes líquidos (Tabela III, p. 27). Ela não expõe o operador aos perigos causados por solventes tóxicos e também evita a preocupação do que fazer com os solventes líquidos após a extração, o que no caso dos solventes clorados, é de extrema complexidade (237, 245, 261).

4.3.1 - O DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

As regras gerais da extração com dióxido de carbono supercrítico, podem ser assim resumidas (89, 90, 135, 236):

- * substâncias apolares são extraídas com facilidade;
- * compostos lipofílicos, como hidrocarbonetos, ésteres, éteres, cetonas e aldeídos, são facilmente extraídos;
- * substâncias polares, como açúcares, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, fosfatídeos, glicosídeos e sais orgânicos, não são solúveis;
- * o fracionamento é possível quando a substância apresenta diferenças na volatilidade, peso molecular ou pressão de vapor.

Abaixo listamos diversas razões porque o dióxido de carbono supercrítico deveria ser usado:

- * temperatura crítica baixa: 31,04°C. As extrações podem ser conduzidas a uma temperatura suficientemente baixa para não ofender as propriedades organolépticas e físicas dos extratos;
- * pressão crítica baixa: 73,8 bar. É fácil de obter e trabalhar em uma operação de produção industrial;
- * inerte. Não oferece riscos de reações secundárias, como oxidações, reduções, hidrólises e explosões, é pouco reativo;
- * alta pureza a um custo baixo, quando comparado a outros solventes p.a.;
- * é um gás a pressão ambiente;
- * seguro. O gás carbônico é um material inofensivo, não poluente, não tóxico, de uso significativo na gaseificação de bebidas;
- * a polaridade do gás carbônico está próxima àquela do pentano e do n-hexano, solventes apolares, comumente usados em extrações tradicionais por solventes (236);
- * os parâmetros de extração do dióxido de carbono supercrítico podem ser modificados, facilmente, pela adição de pequenas quantidades de outros

produtos, polares ou apolares, como a água e o etanol, conhecidos como modificadores e também pela seleção das condições de temperatura e pressão específicas (12, 209).

Essas opções adicionam flexibilidade e permitem a adequação de condições de extração para as necessidades específicas dos produtos a serem extraídos e o produto final desejado (47, 53, 78, 89, 135, 161, 186, 255).

Há outros gases que também tem propriedades solventes interessantes no seu estado supercrítico. Entretanto, por razões de custo, perigo de explosão, toxicidade, inflamabilidade e as razões acima descritas, não são usados comercialmente, com frequência (37, 191, 135, 170, 236).

A água é o solvente universal e o melhor para uma série de dissoluções, porém é uma péssima escolha para a extração por fluido supercrítico, por sua altíssima temperatura e pressão críticas (171, 236).

O óxido nitroso possui baixa temperatura e pressão críticas, entretanto, é muito inflamável e explosivo.

O metanol é um excelente solvente, porém sua temperatura crítica é alta e é um líquido, em condições ambientes.

O amoníaco é um solvente polar e com ótimas propriedades solvatantes, mas é altamente reativo e corrosivo, podendo dissolver os selos das bombas, sendo considerado um solvente muito perigoso (88, 89, 135, 237).

Como vimos, os fluidos supercríticos são na verdade gases altamente comprimidos, cujas propriedades físicas são intermediárias entre os gases e

os líquidos, como podemos ver na Tabela IV. Estes fluidos possuem características de transferência de massa semelhantes as de um gás e de solvatação, às de um líquido.

Tabela IV: Comparação da ordem de magnitude das propriedades físicas de gases, líquidos e fluidos supercríticos (135, 173, 237).

fase	densidade (g/mL)	coeficiente de difusão (cm ² /s)	viscosidade (g/cm.s)
gás a 1 bar	10 ⁻³	0,01 a 1,00	10 ⁻⁴
fluido supercrítico	0,2 a 0,9	10 ⁻⁴	10 ⁻³
líquido	1,00	<10 ⁻⁵	10 ⁻²

4.3.2 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DA EXTRAÇÃO POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

4.3.2.1 - VANTAGENS

Como os fluidos supercríticos tem menor viscosidade e maior difusibilidade, a transferência de massa é muito mais rápida, se comparada com a de solventes líquidos. Isto causa uma redução do tempo de extração de umas 48 horas para alguns minutos (88, 135, 237).

O uso de fluidos que tem baixa temperatura crítica (do CO₂ é de 31,04°C), permite que a temperatura de extração seja baixa, protegendo os solutos instáveis termicamente, como no caso de aromas e fragrâncias (12, 17, 110, 170), condimentos (58, 63, 237) e perfumes (12, 22, 67, 234).

Várias comparações entre a SFE e métodos convencionais de extração com solventes líquidos mostram que a recuperação é sempre maior para a extração por fluido supercrítico (36, 37, 50, 237).

A polaridade de um fluido pode ser alterada com um modificador. Esta mistura pode ser feita previamente ou durante a extração. A alteração da polaridade leva a um aumento da força de solvatação e com isso, a recuperação aumenta (45, 67, 82, 104, 150, 176).

A força de solvatação do fluido supercrítico aumenta com o aumento da sua densidade. Portanto, ela é seletiva e isto permite que as condições de extração sejam otimizadas para uma classe específica de compostos, simplesmente alterando a pressão de extração ou a temperatura (2, 186).

Uma das grandes vantagens da extração com fluidos supercríticos é a possibilidade de acoplamento ON-LINE entre o extrator e uma técnica cromatográfica, que pode ser a GC, HPLC, SFC ou a TLC (16, 23, 82, 90, 91, 100, 159, 165, 172, 265). Com isso, todo o material extraído é transferido diretamente para o cromatógrafo, evitando perdas e manipulação da amostra, aumentando a sensibilidade e possibilitando a automação da análise.

Das muitas vantagens particulares da extração à alta pressão, as principais são:

- * os solventes usados são gasosos à pressão normal e temperatura ambiente. Isso significa, que após a extração, eles podem ser facilmente eliminados de ambos, dos resíduos da extração e dos produtos extraídos e recuperados, pela simples descompressão;

- * a maioria dos gases usados são fisiologicamente seguros e inertes;
- * com muitos gases a extração de materiais é feita a baixas temperaturas, o que é extremamente importante quando se trabalha com produtos naturais;
- * os extratos não sofrem hidrólise, oxidação, esterificação, caramelização ou outras alterações térmicas e por isso representam o material original, quase fielmente;
- * o uso de dióxido de carbono supercrítico permite a extração diferencial de solutos não polares até solutos de polaridade média;
- * outra vantagem é que o CO₂ é um material inerte, não inflamável e como solvente, depois da água, é o de menor custo.

4.3.2.2 - DESVANTAGENS

O processo torna-se caro devido ao custo dos equipamentos. Nossa unidade de teste (Figura 8), pertencente a Liquid Carbonic, tem um custo estimado de R\$ 260.000,00 e processa somente 5,0 litros por vez.

Uma unidade industrial, com a qual trabalhamos na indústria Messer Griessheim, em Düsseldorf, na Alemanha, em 1990, custava mais de 4.000.000,00 DM (Figura 9) e processa 450 litros de cada vez.

Assim, produtos de baixo valor agregado e baixo rendimento, não podem ser economicamente extraídos por esse processo.

Figura 8: Aparelho de extração por fluido supercrítico, PPI FC modelo ES-204, da Liquid Carbonic.

Figura 9: Unidade de extração por fluido supercrítico com capacidade para 450 L, pertencente à Messer-Griessheim, Rehlingen, Alemanha (visto por trás).

4.3.3 - APARELHAGEM

Um aparelho para extração por fluido supercrítico (Figura 8) pode ser dividido em cinco partes, entre elas a fonte do fluido supercrítico, a bomba de alta pressão (um compressor), o extrator, o separador e os acessórios (trocadores de calor, válvulas de expansão, válvulas de segurança, linhas de distribuição, bomba de cossolvente, tanque de mistura, etc.). A seguir, serão discutidas cada uma dessas partes e suas funções no sistema de extração.

4.3.3.1 - A FONTE DO FLUIDO SUPERCRÍTICO

Conforme visto anteriormente, o CO_2 de alta pureza serve como fluido de escolha para todas as extrações. Escolhas alternativas ao dióxido de carbono puro, em mais de 90% dos casos, recairão sobre CO_2 com um modificador orgânico adicionado, o cossolvente (151, 154, 245) para aumentar a polaridade do fluido, em vez de fluidos alternativos, como amônio, propano ou hexafluoreto de enxofre.

A qualidade e a pureza do fluido usado para a SFE é muito importante. O CO_2 de qualidade inferior tem impurezas que não permitem o seu uso para certas aplicações específicas. Como o soluto, é na maioria das vezes, coletado durante um certo período de tempo, as impurezas do fluido também podem ser coletadas e concentradas.

A purificação do dióxido de carbono pode ser feita com materiais adsorventes, como a alumina ou o carvão ativo, mas de preferência, deve ser adquirido de um fornecedor confiável e de renome no mercado.

4.3.3.2 - A BOMBA DE ALTA PRESSÃO

A alimentação do solvente é processada através de um cilindro de alta pressão, conectado a unidade de extração. Inicialmente, o fluido percorre um resfriador (em detalhe no lado esquerdo da Figura 11), localizado antes do compressor, para garantir, na entrada da bomba, que este esteja no estado líquido.

A bomba tem a função de comprimir e circular o fluido através do sistema.

O uso do dióxido de carbono como fluido supercrítico não permite o uso de bombas convencionais. Para resolver o problema, o equipamento utiliza uma bomba do tipo amplificadora de pressão (Figura 10), onde um fluido hidráulico a baixa pressão é fornecido para um cilindro motriz, com um pistão de grande área, contrabalançado por um outro cilindro menor, com um pistão de área bem menor. A pressão do fluido de processamento na câmara de pistão menor será aumentado na exata proporção da razão das duas áreas. As bombas Hydro-pac são construídas usando um cilindro hidráulico de dupla ação com uma câmara de alta pressão em cada extremidade. Quando o cilindro hidráulico é movimentado, os pistões de alta pressão, alternativamente, comprimem e ejetam o gás de uma câmara, enquanto simultaneamente enchem a câmara oposta.

A direção de fluxo do fluido de processamento é controlado por válvulas controladoras de entrada e saída. O fluido hidráulico é isolado do fluido a ser comprimido e o espaço entre os dois é ventilado à atmosfera. O

cilindro hidráulico é comandado, internamente, por uma válvula de quatro vias. Não é requerido nenhum comando elétrico externo. O acionamento hidráulico é cuidadosamente acoplado à seção do intensificador para tornar a operação eficiente.

Figura 10: Típica operação intensificadora de estágio simples.

Trata-se de uma bomba amplificadora de pressão do fluido supercrítico (PPI, 24/05/91).

Figura 11: Bomba de alta pressão (compressor), vista da parte de trás do equipamento, mostrando também na parte lateral esquerda o vaso de mistura do cossolvente

4.3.3.3 - O EXTRATOR

O extrator ou vaso extrator (Figuras 12 e 13) é o principal equipamento do processo de extração por fluido supercrítico, sendo que sua capacidade varia em função da quantidade de substâncias que se deseja extrair de cada vez.

O processo normalmente funciona em batelada e quando se deseja uma operação semi-contínua, são colocados extratores em paralelo. Neste caso, terminada a extração em um deles, o mesmo é substituído para limpeza e realimentação de matéria prima.

Há necessidade de se manter a temperatura do solvente, na entrada do extrator, sob as mesmas condições da matéria prima em seu interior. Para tanto, utiliza-se um pré-aquecedor, localizado antes do extrator, que regula a temperatura do fluido na entrada do mesmo.

Quanto à matéria prima adicionada ao extrator, ela pode ser sólida ou líquida. Neste último caso, exige-se um agitador mecânico, a fim de promover uma permanente troca de massa e calor, mantendo-se a mistura homogênea durante todo o processo de extração. Caso a granulometria seja baixa, é aconselhável conectar um filtro na saída do extrator, para evitar o arraste de matéria prima pelo fluido junto com a solução.

Figura 12: Extrator ou vaso extrator, mostrando o agitador e camisa de aquecimento (em posição fechada).

Figura 13: Extrator, mostrando a alimentação com produto e detalhe do sistema de fechamento e selo de segurança (em posição aberta).

4.3.3.4 - O SEPARADOR

O separador tem por função a separação do extrato (Figura 14). A presença de um resfriador e de uma válvula de expansão na entrada do separador, reduz a pressão e a temperatura. Com estas mudanças nas condições do processo, o extrato precipita no fundo do recipiente.

Necessitando-se fazer uma separação fracionada, utilizam-se separadores em série. Em cada separador, diminui-se a pressão (principalmente) e a temperatura, permitindo que a separação dos produtos seja processada pela ordem decrescente em relação ao peso molecular.

4.3.3.5 - OS ACESSÓRIOS

No caso de um processo com recirculação de solventes (gás), tornando-o mais econômico, são necessários filtros para garantir a purificação do fluido utilizado e evitar que partículas da matéria prima sejam arrastadas para o separador.

Quando se trabalha com cossolvente, este é alimentado a partir de um reservatório, por uma bomba de cossolvente (Figura 15) que é ligada a um vaso de mistura, localizado antes do pré-aquecedor [pode ser visto na figura da bomba de alta pressão (Figura 11), na parte superior], promovendo a homogeneização entre solvente e cossolvente.

Figura 14: Separador ou vaso separador, equipado com sistema elevatório, camisa de aquecimento e válvula de expansão, em azul, acima.

Convém lembrar sempre que a parte de segurança é importante e prioritária, devido ao alto risco de se trabalhar em condições de elevadas pressões.

Alarmes sonoros e luminosos fazem parte do sistema, acusando valores excedentes de temperatura e pressão, durante o processamento. Também são utilizados discos de ruptura, tanto no extrator como no separador, pré-aquecedor, reservatório de cossolvente e nas linhas de alta pressão, que suportam condições um pouco mais drásticas que os limites estabelecidos para os alarmes sonoros e visuais.

Figura 15: Bomba de cossolvente, mostrando em detalhes, o motor, o reservatório e o monitor. Ao lado esquerdo o "Coolflow" (resfriador do sistema).

4.3.4 - OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

Por ser uma técnica relativamente recente, a escolha das condições de extração por fluidos supercríticos é feita, frequentemente, por tentativa e erro (217).

Muitas variáveis afetam diretamente a eficiência e a reprodutibilidade da extração por fluidos supercríticos, dentre elas, a temperatura, a pressão/densidade, a composição do fluido, a velocidade de fluxo, o tempo de extração, o tamanho das partículas e a composição do produto a ser extraído (26, 27, 28, 61, 113, 115, 145, 159, 174, 182, 186, 197, 211, 272).

A capacidade de controlar a densidade, a temperatura e a composição do fluido, torna a técnica capaz de fracionar o extrato (153, 204, 208, 272).

O fracionamento de classes de compostos através de trocas discretas na força de solvatação, obtido pelo aumento de pressão, é mostrado na Figura 16 (208, 209).

O aumento da densidade resulta em um aumento da capacidade de dissolver outras substâncias. Em muitos casos, uma substância que é relativamente insolúvel em solventes orgânicos líquidos, mostra uma grande solubilidade em fluidos supercríticos com alta densidade.

Assim, podemos fracionar o extrato, retirando seletivamente os solutos em uma ou mais frações, deixando as impurezas no resíduo, dentro do extrator (152, 153, 237).

Figura 16: Cromatograma GC obtido da extração com CO₂ supercrítico de pimenta preta (212).

A força de solvatação é uma função da densidade do fluido supercrítico, que depende da pressão e da temperatura. Muitos dos fluidos supercríticos usados para extração são relativamente fracos na solvatação. Isso aumenta sua seletividade, porém limita as suas aplicações.

Quando é necessário extrair solutos mais polares, ou de alto peso molecular, o dióxido de carbono não tem polaridade suficiente para produzir boas extrações. Em tais casos, um aumento de polaridade do fluido pode aumentar a eficiência de extração e diminuir o tempo gasto na extração (86, 237).

Para isso, a adição de pequenas quantidades de um modificador orgânico ao dióxido de carbono, tem sido a maneira mais usada para alterar a polaridade do fluido supercrítico.

A Figura 17 mostra uma comparação da eficiência de extração usando diferentes fluidos e modificadores.

Figura 17: Comparação da eficiência de extração de um composto orgânico, usando diferentes fluidos supercríticos e a extração com Soxhlet. Os traços nos topos correspondem a desvios experimentais (74).

Os modificadores podem ser introduzidos como mistura de fluidos no sistema de bombeamento, com a ajuda da bomba de cossolvente ou adicionando o modificador diretamente ao produto a ser extraído, antes de se começar a extração (74, 209, 237, 261).

Os modificadores de escolha devem manter a seletividade e aumentar a solubilidade (17, 237).

A patente da extração da cafeína do café, apresentou um exemplo clássico do uso de modificadores. Embora a cafeína seja muito solúvel em gás carbônico puro, ao extrai-la do grão de café torrado a eficiência é muito baixa. Porisso, recomenda a adição de água, o uso de grãos verdes ou de CO₂ com um pouco de umidade, o que facilita a extração, chegando a quase 100% de recuperação (1, 3, 176).

As extrações por fluidos supercríticos podem ser feitas de modo estático, dinâmico ou recirculante. No primeiro caso, o extrator é pressurizado com o fluido e a extração ocorre sem nenhum fluxo de fluido. Após um certo tempo, abre-se a válvula que permite a saída do soluto para o separador, onde é coletado. No modo dinâmico, o fluido é passado através do extrator e o soluto coletado continuamente. No último caso, o mesmo fluido é bombeado através da amostra várias vezes, até que é, finalmente bombeado para o separador e o extrato coletado. Não encontramos trabalho que comparasse os três modos de extração, porisso optamos pelo modo dinâmico, porque o fluido é constantemente renovado durante a extração (152).

4.3.5 - EXTRAÇÃO DE SÓLIDOS

As matérias primas sólidas podem ser reduzidas a pedaços, moídas ou maceradas para facilitar a extração. Esse material é então, colocado dentro do cilindro extrator, que tem em cada extremidade, uma capa de metal poroso que retém partículas menores que $1\ \mu\text{m}$, cuja finalidade é permitir a livre circulação do fluido supercrítico e as substâncias dissolvidas, mantendo o resíduo sólido no seu devido lugar. Para extrair materiais muito finos (menores que 60 mesh), recomenda-se colocar um filtro na saída do extrator para evitar a passagem de partículas, junto com a solução fluida. Uma vez fechado o aparelho, circula-se o dióxido de carbono em estado fluido e supercrítico através do cilindro, dentro do extrator. A quantidade de gás, o fluxo, a temperatura, a pressão, e o número de vezes a recircular, são selecionados e calculados para otimizar a extração e dependem do produto e dos componentes que se quer extrair, variando caso a caso.

Essa diversidade de variações possíveis nas constantes, permite que um grande número de matérias primas sólidas, possa ser efetivamente extraído por esse processo de extração.

4.3.6 - EXTRAÇÃO DE LÍQUIDOS

O processo em si é o mesmo que para a extração de sólidos. O extrator, nesse caso, é uma coluna de extração líquido-líquido clássica, especialmente projetada para uso sob altas pressões. A matéria prima líquida é injetada para dentro da coluna, mantendo-se um fluxo em contracorrente, de dióxido de carbono supercrítico. Do mesmo modo que com a

extração de sólidos, selecionam-se os parâmetros temperatura, pressão, recirculação, fluxo de gás, etc, para otimização do processo extrativo.

A extração líquido-líquido é um processo contínuo, ao contrário da extração de sólidos e apresenta certas vantagens operacionais inerentes sobre os processos por lote, da extração de sólidos. Uma grande variedade de matérias primas “bombeáveis”, pode ser efetivamente extraída por esse processo. Como exemplos, podemos citar, a extração e fracionamento dos óleos essenciais (14, 63, 74, 86, 100, 158, 197, 213, 243), os sucos de frutas concentrados (22, 33, 233), os sucos vegetais (29, 74, 237), as extrações de meios de cultura fermentativos (41, 42, 191, 270), além de ser o processo de escolha para a desodorização de óleos comestíveis na indústria de alimentos (14, 126, 140, 146, 158, 191, 207).

O processo pode ser estendido para extração fracionada e separação, em que o material a ser extraído é sucessivamente compactado sob pressões variadas e o extrato separado em frações, correspondendo a cada pressão de compactação (135).

5 - PARTE EXPERIMENTAL

5.1 - MATERIAL

5.1.1 - EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

Os extratos foram obtidos usando o “Supercritical Fluid Extraction System”, modelo ES-204, fabricado pela Pressure Products Industries, Incorporated, USA (PPI FC Series Operator) (Figura 8, página 34) de propriedade da firma White Martins S.A., seguindo o fluxograma de extração por fluido supercrítico (Figura 6, página 26).

A unidade possuía as seguintes especificações de sistema: a) extração - de 815 a 10000 psi; da temperatura ambiente a 100°C; b) separação - de 750 a 5000 psi; temperatura de 20 a 100°C; c) fluxo de gás - de 10 a 55lb/h; d) materiais - todas as partes úmidas em aço inox 316 SS; e) instalações - energia de 240V, 60Hz, 60A, fase simples, suprimento de dióxido de carbono de cilindros fechados, válvulas de processo e de segurança; f) tamanho - 1,75 m de largura x 1,10 m de profundidade x 1,80 m de altura, peso - aproximadamente 500 kg.

As especificações dos componentes eram: a) extrator - recipiente com capacidade para 4.000 mL e fechamento hermético, 13,5 cm de diâmetro

interno e 32,5 cm de comprimento interno, com mecanismo elevatório e giratório para facilitar o acesso e camisa de aquecimento elétrico, o agitador tinha uma hélice SS de acionamento magnético por motor elétrico de 0,5 HP, corrente contínua com controle de velocidade variável; b) separador - recipiente de capacidade para 1.000 mL e tampa de abertura rápida, equipado com camisa de aquecimento; c) bomba - de acionamento hidráulico, bomba de pistão de dupla ação, motor elétrico de 0,5 HP com controle de velocidade variável, selos não contaminantes; d) instrumentos - medidor de fluxo de massa térmico com indicador digital e totalizador, indicadores de temperatura digitais, indicadores de pressão digitais, banho circulante refrigerado tipo "closed-loop"; e) controles - controles eletrônicos proporcionais para aquecedores do extrator e do separador, controlador auto-ajustável para o pré-aquecedor, válvulas automáticas de controle de pressão para as pressões do extrator e dos recicladores de solvente, controles do fluxo e da agitação por controles eletrônicos de velocidade do motor; f) segurança - bombas hidráulicas com saídas de pressão limite, reguláveis aos valores desejados, dispositivos de saída de pressão no extrator, no separador e na presilha do reciclador de solventes, alarmes sonoros e visuais de sobrepressão e alarmes de sobre-temperatura no pré-aquecedor, no aquecedor do extrator e do separador com controladores de desarme automáticos; g) opções - bomba de adição de cossolvente, estágio de separação adicional, controle de pressão eletrônico e sistema de controle de aquisição de dados. O equipamento era de tecnologia Americana, mas semelhante a uma unidade com que trabalhamos na Alemanha em 1990, nas firmas Messer Griessheim e Flavex (Figuras 9 e 18), onde realizamos um estágio de 5 meses, a pedido da firma Indústrias Reunidas Jaraguá S.A., de Jaraguá do Sul, Santa Catarina.

As temperaturas e pressões puderam ser medidas e controladas em todos os estágios, por eficientes sistemas indicadores digitais de pares termoeletrônicos e transdutores de pressão.

Figura 18: Unidade de extração por fluido supercrítico, com extratores em série, pertencente à firma FLAVEX Naturextrakte durch CO₂ Extraction Technology, Alemanha.

5.1.2 - OUTROS MATERIAIS E APARELHOS

-Aparelhos pertencentes ao Laboratório de Farmacognosia:

- 1 - extrator de Clevenger, modificado por Wasicky (38,184);
- 2 - estufa secadora de bandejas, marca Fabbe, mod. 171;
- 3 - moinho de facas e martelos, Metalúrgica Roma, tipo MR-320;
- 4 - destilador por arraste de vapor com gerador de vapor, modelo-P47A-9013;
- 5 - secador Fabbe de bandejas, modelo 119;
- 6 - moinho de martelos Renard, modelo MLF;
- 7 - extrator Soxhlet, capacidade 20 litros;
- 8 - extrator Soxhlet, capacidade 1,0 litro, de vidro, com manta aquecedora elétrica e condensador;
- 9 - capela química com exaustão;
- 10 - aparelho Granutest (peneiras);
- 11 - vidrarias diversas;
- 12 - destilador de água;
- 13 - evaporador rotativo Büchi, à vácuo;
- 14 - banho maria Aquatemper, Quimis;
- 15 - balanças eletrônicas Gehaka 2.000 e 4.000;
- 16 - balança analítica Sartorius, com 4 casas decimais;
- 17 - polarímetro Jena, pat. 3208;
- 18 - determinador de ponto de fusão Kofler-Reichert;

-cromatógrafo à gás Hewlett-Packard 5840A, com splitter no injetor, coluna capilar com 50 m de comprimento e diâmetro interno de 0,25 mm, fase estacionária OV 10125M, com programa de temperatura regulável e gás de arraste nitrogênio (N₂), pertencente à Bayer do Brasil S.A.

-Painel de avaliação sensorial com 12 membros devidamente treinados e com larga experiência em degustação e avaliação de amostras, da Indústrias Reunidas Jaraguá.

5.1.3 - MATÉRIAS PRIMAS E REAGENTES

5.1.3.1 - AMOSTRAS

Utilizamos amostras de sementes de cardamomo (*Elletaria cardamomum* Maton, *Zingiberaceae*), a mangerona (*Glenchon spathulata* Benham, *Labiatae*), o orégano (*Origanum marjorana* Linné, *Labiatae*), a pimenta preta (*Brassica nigra* Koch, *Cruciferae*), e os frutos de zimbro (*Juniperus communis* Linné, *Pinaceae*) que foram fornecidos pela firma Damm Produtos Alimentícios Ltda.

O guaraná (*Paulinia cupana* Kunth, *Sapindaceae*) foi adquirido da firma Caiabí, sendo uma das amostras proveniente da cidade de Alta Floresta, Mato Grosso e a outra da cidade da cidade de Maués, no Pará.

As sementes de anonas (*Annona muricata* Linné, *Annonaceae*) foram fornecidas pela Dra. Madalena Baron, do Setor de Ciências Biológicas (SCB), Departamento de Bioquímica-Laboratório Químico de Biomassa e Biotecnologia (LQBB) da Universidade Federal do Paraná (UFPr) e são originárias de indústrias de sucos de frutas e sorvetes da Bahia (46, 68,69).

As demais matérias primas testadas como o alecrim (*Rosmarinus officinalis* Linné, *Labiatae*), a pimenta vermelha (*Capsicum frutescens* Linné, *Solanaceae*), o coentro (*Coriandrum sativum* Linné, *Umbelliferae*), a sálvia

(*Salvia splendens* Ker., *Labiatae*), o gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe, *Zingiberaceae*) e a cúrcuma (*Curcuma domestica* Valetton, *Zingiberaceae*) foram adquiridas no mercado em São Paulo e identificadas por comparação com os padrões do Laboratório de Farmacognosia.

O material vegetal empregado, acondicionado em embalagens plásticas, estava em bom estado de conservação, e escolhido de acordo com o critério de disponibilidade momentânea e interesse dos fornecedores, exceto o guaraná que foi adquirido para fins de estudo de obtenção de extratos e comparação das sementes de diferentes procedências.

5.1.3.2 - SOLVENTES

Os solventes orgânicos utilizados no preparo, extração e coleta das amostras foram de grau p.a., procedentes da Merck: metanol, etanol, isopropanol, diclorometano, acetona, hexano, e propilenoglicol.

Os componentes foram identificados usando-se os padrões de referência de óleos essenciais e componentes da firma Quest Internacional, da Fluka e da Basf.

5.1.3.3 - REAGENTES

Todos os reagentes foram de reconhecidos fornecedores (Carlo Erba, Merck, Queel, e Fluka). Foram utilizados: ácido clorídrico, metanol, etanol, sulfato de sódio anidro e hidróxido de sódio, grau p. a.

5.1.3.4 - GASES

Os gases utilizados neste trabalho foram: dióxido de carbono (CO_2), com pureza de 99,9% e nitrogênio (N_2), com 99,9% de pureza, obtidos da White Martins S.A. Os gases foram fornecidos pela firma White Martins, que também emprestou a unidade de extração, em forma de comodato. Em troca, foram treinados por nós, seus técnicos das filiais de São Paulo, Osasco, Campinas, Curitiba e do eng. Pablo Avendano, do Chile.

Começamos trabalhando com um cilindro de dióxido de carbono, tal como fora fornecido pela White Martins. Devido a problemas de cavitação na bomba, levava-se um certo tempo até a pressurização do gás, passamos a usar um cilindro com pescador a pressurização foi rápida, porque assim, utiliza-se diretamente a fase líquida do dióxido de carbono.

A pressão interna do cilindro de gás era insuficiente para atingir a pressurização e foi necessário aumentar a pressão para mais de 75 bar, que já é acima da pressão crítica. A partir desta pressão a bomba não apresentou mais problemas de cavitação e a pressão foi regulada para a pressão de trabalho.

O dióxido de carbono (grau super seco), fornecido pela filial Osasco, da White Martins S.A., tinha a pureza de 99,9%, necessária para a extração num fluxo de 10-55 Lb/h, mesmo assim, foi filtrado na linha por um filtro de 5 mm, para reter partículas sólidas que pudessem estar nas linhas de ligação ou tivessem se desprendido durante a instalação do cilindro de gás ao aparelho.

5.2 - MÉTODOS

5.2.1 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As sementes de cardamomo, as folhas e sumidades floridas de mangerona foram secas em estufa à 40°C por 24 horas. As demais matérias primas foram usadas nas condições em que se encontravam.

As drogas foram moídas em moinho de martelos e depois foram tamisadas em 60 mesh, homogeneizadas e divididas em três porções iguais.

Os materiais foram estocados em sacos plásticos duplos, revestidos externamente com papel Kraft, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, até a análise e extração.

5.2.2 - PROCESSOS DE EXTRAÇÃO

Cada uma das partes preparadas de acordo com o item 5.2.1, foi extraída (sempre que possível) por cada um dos processos de extração convencionais (hidrodestilação e extração por solventes) e extração por fluido supercrítico.

5.2.2.1 - PROCESSOS CONVENCIONAIS

5.2.2.1.1 - HIDRODESTILAÇÃO

Os óleos essenciais foram isolados por destilação por arraste de vapor d'água utilizando um aparelho Clevenger, modificado por Wasicky (258). A droga adequadamente moída foi colocada sobre a peneira do destilador e adicionado água quente até encher o fundo do extrator, abaixo da peneira. Em seguida foi acoplado o aparelho de Clevenger e a parte do tubo graduado e o tubo de retorno foram preenchidos com água fria. O destilador foi aquecido até a fervura da água; a ebulição controlada e a destilação mantida. Foram extraídos entre 400g e 500g de produto em 2000mL de água destilada deionizada, por 4-6 horas, de acordo com o procedimento descrito na Farmacopéia Brasileira, 2ª edição (62). Os óleos essenciais foram separados e secos sobre sulfato de sódio anidro (19), pesados e a quantidade obtida guardada, em frascos de vidro herméticos com tampa de teflon, em geladeira a 8°C.

As destilações foram realizadas em triplicata.

5.2.2.1.2 - EXTRAÇÃO POR SOLVENTES (90, 136)

Os extratos ou oleorresinas foram obtidos pela extração com hexano em aparelho Soxhlet.

Foram pesados entre 100 e 300 gramas das amostras, adequadamente moídas e colocadas no extrator Soxhlet, dentro de um

cartucho de papel de filtro. Foi acoplado o balão de boca esmerilhada e adicionado hexano, de modo a encher o extrator e ocupar um pouco mais da metade do volume do balão. O conjunto foi acoplado a um condensador e a uma manta aquecedora elétrica. A extração foi efetuada durante 12 a 24 horas, até se obter a exaustão das drogas (4).

Os extratos hexânicos obtidos foram evaporados em rotavapor Büchi, à pressão reduzida e temperatura não superior à 50°C.

As oleorresinas foram guardadas da mesma maneira que os destilados obtidos pelo hidrodestilação.

As extrações foram realizadas em triplicata

5.2.2.2 - EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

Foram pesados entre 500 e 2000 gramas das drogas moídas e de tamanho adequado (aproximadamente 60 mesh). Em seguida, as amostras foram submetidas a extração em um sistema de extração por fluido supercrítico, PPI FC, ES-204 (Figura 8, página 34), seguindo o seguinte procedimento:

as amostras foram colocadas no extrator e a tampa hermeticamente lacrada. O dióxido de carbono, do cilindro e do reciclado no condensador, foi transferido para a bomba de alta pressão e a pressão na bomba foi elevada à pressão de extração (80 a 500 bar). O líquido à alta pressão foi aquecido no pré-aquecedor até atingir a temperatura de extração (aproximadamente 40 a 70 °C) e o solvente, agora um fluido supercrítico, foi bombeado para dentro do extrator, até atingir um valor um pouco acima da pressão requerida para a extração. A temperatura foi mantida constante, através da camisa de aquecimento elétrica do extrator. Após atingir a pressão e a temperatura desejadas no extrator, foram iniciadas, a contagem do tempo

de contato e o número de passagens de fluido através das amostras. A pressão do solvente deixando o extrator, seguindo para o separador, foi diminuída, a medida que passou através da válvula de controle de pressão. Os solutos, isto é, o dióxido de carbono supercrítico contendo os materiais dissolvidos, foram constantemente transferidos para o separador. Os extratos, foram coletados, separando-se o gás para reaproveitamento em novas passagens através das amostras, conforme descrito anteriormente. No final, os extratos concentrados desejados foram separados através da válvula de saída do separador. O dióxido de carbono que deixou o separador foi passado através do filtro de duplo estágio, para a remoção de partículas e através de um medidor de fluxo de massa para quantificação, antes de ser reciclado.

Dióxido de carbono adicional foi circulado do cilindro de gás, através da válvula reguladora para refazer o fluxo e a pressão, sempre que necessário.

Os extratos obtidos foram colocados em frascos de vidro herméticos, com tampa de teflon e guardados em geladeira a 8°C.

Além do que já foi descrito anteriormente, desenvolvemos um “modus operandi” próprio para o aparelho, que detalha e especifica cada uma das etapas da operação de extração por fluido supercrítico.

5.2.3 - EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS E ANÁLISES EFETUADAS

5.2.3.1 - EXTRATO DE CARDAMOMO

Foram destilados 400 gramas da droga moída adequadamente, durante 4 horas, no hidrodestilador de Clevenger (vide 5.2.2.1.1).

Foram extraídos 100 gramas da droga moída adequadamente, com hexano, durante 18 horas, no extrator Soxhlet (vide 5.2.2.1.2).

Foram extraídos 2000 gramas da droga moída adequadamente, durante 30 min., à temperatura de 50°C e 350 bar de pressão, no extrator PPI FC ES-204 (vide 5.2.2.2).

Todos os testes foram realizados em triplicata e calculados os valores médios dos resultados obtidos.

5.2.3.2 - EXTRATO DE MANGERONA

Foram destilados 400 gramas da droga moída adequadamente, durante 4 horas, no hidrodestilador de Clevenger (vide 5.2.2.1.1)

Foram extraídos 100 gramas da droga moída adequadamente, com hexano, durante 18 horas, no extrator Soxhlet (vide 5.2.2.1.2).

Foram extraídos 1500 gramas da droga moída adequadamente, durante 30 min., a temperatura de 50°C e 350 bar de pressão, no extrator PPI FC ES-204 (vide 5.2.2.2).

Todos os testes foram realizados em triplicata e calculados os valores médios dos resultados obtidos.

5.2.3.3 - EXTRATO DE GUARANÁ

Foram extraídos 100 gramas de cada uma das drogas moídas adequadamente, com 5% de PG e álcool 70°GL, durante 24 horas, no extrator Soxhlet (vide 5.2.2.1.2).

A concentração do extrato foi padronizada com álcool 70°GL, para reconstituir a concentração 1:1, isto é, que 1 grama de extrato contenha 1 grama de sementes.

Foram extraídos 1500 gramas da droga moída adequadamente, durante 30 min., à temperatura de 50°C e 350 bar de pressão, usando 5% de metanol como cossolvente, no extrator PPI FC ES-204 (vide 5.2.2.2).

A massa semi-sólida assim obtida, foi diluída em 5% de PG e álcool 70°GL, para reconstituir a concentração 1:1, isto é, que 1 grama do extrato corresponda a 1 grama de sementes, do mesmo modo que o efetuado com o extrato obtido pela extração no aparelho Soxhlet. Todos os testes foram realizados em triplicata e calculados os valores médios dos resultados obtidos.

5.2.3.4 - EXTRATO DE ACETOGENINAS DE ANONÁCEAS.

Foram extraídos 1500 gramas da droga moída adequadamente, durante 30 min., à temperatura de 80°C e 500 bar de pressão, no extrator PPI FC ES-204 (vide 5.2.2.2). As quantidades de acetogeninas obtidas por SFE foram comparados com as quantidades obtidas pelos métodos convencionais de extração por solventes.

Foram extraídos 500 gramas da droga moída adequadamente. Foram usadas as seguintes misturas de solventes para a extração por métodos convencionais de extração de lipídios: cloreto de metileno: metanol (1:1). A droga e o solvente foram colocados em um balão de 2 litros e mantidos em contato durante 8 horas, agitando ocasionalmente. A mistura foi levada quase à fervura em banho maria e filtrada por papel de filtro duplo. O resíduo foi lavado por duas vezes com etanol e os extratos reunidos. Os solventes foram removidos em evaporador Büchi. os extratos assim obtidos foram pesados em balança analítica Sartorius. Todos os testes foram realizados em triplicata e calculados os valores médios dos resultados obtidos.

5.2.3.5 - EXTRATO DE PIMENTA PRETA.

Foram destilados 400 gramas da droga moída adequadamente, durante 4 horas, no hidrodestilador de Clevenger (vide 5.2.2.1.1)

Foram extraídos 100 gramas da droga moída adequadamente, com hexano, durante 18 horas, no extrator Soxhlet (vide 5.2.2.1.2).

Foram extraídos 1000 gramas da droga moída adequadamente, durante 30 min., à temperatura de 50°C e 350 bar de pressão, no extrator PPI FC ES-204 (vide 5.2.2.2).

Todos os testes foram realizados em triplicata e calculados os valores médios dos resultados obtidos.

5.2.3.6 - EXTRATO DE PIMENTA VERMELHA.

Foram extraídos 100 gramas da droga moída adequadamente, com hexano, durante 18 horas, no extrator Soxhlet (vide 5.2.2.1.2).

Foram extraídos 1500 gramas da droga moída adequadamente, durante 30 min., à temperatura de 50°C e 350 bar de pressão, no extrator PPI FC ES-204 (vide 5.2.2.2).

Todos os testes foram realizados em triplicata e calculados os valores médios dos resultados obtidos.

5.2.3.7 - EXTRATO DE ORÉGANO.

Foram destilados 300 gramas da droga moída adequadamente, durante 4 horas, no hidrodestilador de Clevenger (vide 5.2.2.1.1)

Foram extraídos 100 gramas da droga moída adequadamente, com hexano, durante 18 horas, no extrator Soxhlet (vide 5.2.2.1.2)

Foram extraídos 1000 gramas da droga moída adequadamente, durante 30 min., à temperatura de 50°C e 350 bar de pressão, no extrator PPI FC ES-204 (vide 5.2.2.2).

Todos os testes foram realizados em triplicata e calculados os valores médios dos resultados obtidos.

5.2.3.8 - EXTRATO DE ZIMBRO

Foram extraídos 200 gramas da droga moída adequadamente, com hexano, durante 18 horas, no extrator Soxhlet (vide 5.2.2.1.2)

Foram extraídos 1000 gramas da droga moída adequadamente, durante 30 min., à temperatura de 50°C e 350 bar de pressão, no extrator PPI FC ES-204 (vide 5.2.2.2).

Todos os testes foram realizados em triplicata e calculados os valores médios dos resultados obtidos.

5.2.3.9 - EXTRATO DE COENTRO.

Foram destilados 400 gramas da droga moída adequadamente, durante 4 horas, no hidrodestilador de Clevenger (vide 5.2.2.1.1)

Foram extraídos 200 gramas da droga moída adequadamente, com hexano, durante 18 horas, no extrator Soxhlet (vide 5.2.2.1.2)

Foram extraídos 500 gramas da droga moída adequadamente, durante 30 min., à temperatura de 50°C e 350 bar de pressão, no extrator PPI FC ES-204 (vide 5.2.2.2).

Todos os testes foram realizados em triplicata e calculados os valores médios dos resultados obtidos.

5.2.3.10 - EXTRATO DE ALECRIM

Foram destilados 300 gramas da droga moída adequadamente, durante 4 horas, no hidrodestilador de Clevenger (vide 5.2.2.1.1)

Foram extraídos 100 gramas da droga moída adequadamente, com hexano, durante 18 horas, no extrator Soxhlet (vide 5.2.2.1.2)

Foram extraídos 500 gramas da droga moída adequadamente, durante 30 min., à temperatura de 50°C e 350 bar de pressão, no extrator PPI FC ES-204 (vide 5.2.2.2).

Todos os testes foram realizados em triplicata e calculados os valores médios dos resultados obtidos.

5.2.3.11 - EXTRATO DE SÁLVIA

Foram destilados 300 gramas da droga moída adequadamente, durante 4 horas, no hidrodestilador de Clevenger (vide 5.2.2.1.1)

Foram extraídos 100 gramas da droga moída adequadamente, com hexano, durante 18 horas, no extrator Soxhlet (vide 5.2.2.1.2)

Foram extraídos 1000 gramas da droga moída adequadamente, durante 30 min., à temperatura de 50°C e 350 bar de pressão, no extrator PPI FC ES-204 (vide 5.2.2.2).

Todos os testes foram realizados em triplicata e calculados os valores médios dos resultados obtidos.

5.2.3.12 - EXTRATO DE GENGIBRE

Foram extraídos 400 gramas da droga moída adequadamente, com hexano, durante 18 horas, no extrator Soxhlet (vide 5.2.2.1.2)

Foram extraídos 2000 gramas da droga moída adequadamente, durante 30 min., à temperatura de 50°C e 350 bar de pressão, no extrator PPI FC ES-204 (vide 5.2.2.2).

Todos os testes foram realizados em triplicata e calculados os valores médios dos resultados obtidos.

5.2.3.13 - EXTRATO DE CÚRCUMA

Foram extraídos 400 gramas da droga moída adequadamente, com hexano, durante 18 horas, no extrator Soxhlet (vide 5.2.2.1.2)

Foram extraídos 2000 gramas da droga moída adequadamente, durante 30 min., à temperatura de 50°C e 350 bar de pressão no extrator PPI FC ES-204 (vide 5.2.2.2).

Todos os testes foram realizados em triplicata e calculados os valores médios dos resultados obtidos.

5.2.4 - ANÁLISE

A composição volátil dos extratos e destilados foi determinada utilizando-se um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5840A, com coluna capilar, fase estacionária OV 10125M com 50 m de comprimento x 0,25 mm d.i. x 0,65 µm de espessura do filme, equipado com programação de temperatura da coluna: 5 min a 80°C, 4°C/min até 140°C e 10°C/min até 280°C e injetor com splitter. As temperaturas do injetor e detetor foram mantidas a 300°C. Como gás de arraste foi usado o nitrogênio (N₂), na razão de 20 mL/min. Foi injetado 1 µL de solução, em metanol (vide 4.3.3.4).

A identificação das amostras foi feita através de comparação com dados da literatura (179, 180, 182).

Aa substâncias não voláteis foram avaliadas pela extração de quantidades conhecidas dos extratos com cloreto de metileno, seguida da evaporação do resíduo até a secura, em banho maria e pesagem em balança analítica Sartorius. A parte solúvel em cloreto de metileno foi evaporada a temperatura de 30°C, em evaporador Büchi, até que todo o cloreto de metileno se separasse. Foram calculados, o teor de substâncias não voláteis e a quantidade de óleo essencial presente nos extratos (4, 19, 120, 121).

O teor de piperina foi determinado pelo método colorimétrico, usando o ácido cromotrópico para obter um complexo colorido e medindo a coloração em espectrofotômetro a 580 mμ (120, 121, 253).

O conteúdo de corante da pimenta vermelha e da cúrcuma foram determinados em "ASTA color value", pelo método colorimétrico, medindo a absorbância dos extratos acetônicos em espectrofotômetro à 460 mμ (120, 121, 254).

O teor de pungência dos extratos de pimenta vermelha e do gengibre foram determinados pelo método sensorial ASTA n° 21.0, e calculado em unidades Scoville (120, 121). O método da pungência de Scoville é um método organoléptico para a determinação da pungência de pimentas e produtos picantes pelo julgamento sensorial de diluições variáveis da amostra, contra um padrão do princípio pungente.

Para a realização destas análises foi pedida a colaboração de um painel de degustadores treinados da Indústrias Reunidas Jaraguá, composto de 12 analistas sensoriais (120, 253).

O óleo residual nas amostras após as extrações e a clorofila nos extratos obtidos, foram estimados conforme os métodos n° 3.138 e 30.020, da AOAC-Official Methods of Analysis e calculados como peso (4).

A cafeína das sementes, do resíduo e dos extratos de guaraná foi determinada por métodos gravimétrico e espectrofotométrico no ultravioleta (62, 254).

As análises de densidade, rotação ótica, índice de refração, solubilidade e resíduo seco, foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia da FCF/USP (19, 62, 73, 253, 254).

6 - RESULTADOS

6.1 - EXTRATO DE CARDAMOMO

O rendimento do extrato de cardamomo com dióxido de carbono supercrítico foi de 7,50%, este continha 9,50% de substâncias não voláteis. Na oleorresina extraída com hexano, foram obtidos 8,25% de rendimento, que continham 35% de substâncias não voláteis. Pela hidrodestilação foram obtidos 5,05% de óleo essencial. O extrato obtido por SFE era de cor levemente esverdeada. Foi obtido um resultado idêntico com a extração com o solvente orgânico, após efetiva extração, porém de cor verde bem mais intensa e aspecto mais denso. O resíduo após as extrações com dióxido de carbono e por solventes continha apenas 0,5% de óleo essencial. Na hidrodestilação este resíduo praticamente não apareceu e obtivemos 5,05% de um óleo essencial de cardamomo amarelo claro, límpido e transparente.

As seguintes constantes foram obtidas com o óleo essencial destilado: densidade à 25°C = 0,922, rotação ótica à 25°C = +28° e índice de refração à 25°C = 1,4635; com o óleo essencial extraído com CO₂ supercrítico: 0,938, +38° e 1,4651, respectivamente.

A análise por cromatografia gasosa forneceu o seguinte cromatograma comparativo entre os óleos essenciais de cardamomo obtidos pela extração

por fluido supercrítico e pela hidrodestilação (Figura 19), identificados como extrato e destilado, respectivamente.

Figura 19: Cromatograma a gás, comparativo entre os óleos essenciais de cardamomo obtidos na extração por CO₂ e os obtidos pela hidrodestilação.

6.2 - EXTRATO DE MANGERONA

O rendimento de extrato de mangerona com CO₂ supercrítico foi de 3,1%, em 30 min. de contato/extração, com teor de substâncias não voláteis de 8%. A extração com solvente (hexano), rendeu 3,4% de oleorresina de

mangerona, com os mesmos problemas de alto teor de não voláteis do extrato de cardamomo: 30% sobre o total de extrato. Na hidrodestilação obtivemos 2,5% de óleo essencial de mangerona, límpido e de cor levemente amarelada.

A análise cromatográfica gasosa forneceu o seguinte cromatograma comparativo entre os óleos essenciais de mangerona obtidos pela extração por fluido supercrítico e pela hidrodestilação (Figura 20), identificados como extrato e destilado, respectivamente.

Na análise organoléptica o extrato obtido por CO₂ supercrítico foi julgado o que mais se aproximou em sabor àquele da planta moída da qual foi isolado, seguido do hidrodestilado e depois o extraído com hexano.

Figura 19: Cromatograma a gás, comparativo entre os óleos essenciais de mangerona obtidos na extração por CO_2 e os obtidos pela hidrodestilação.

6.3 - EXTRATO DE GUARANÁ

Foram obtidos extratos de guaraná por SFE, com as seguintes características:

- a) Alta Floresta (MT) - 4,8% de teor de cafeína, 14,0% de resíduo seco, densidade (25°C) = 0,9920, cor marron esverdeado, insolúvel em água;
- b) Maués (PA) - 5,1% de teor de cafeína, 9,2% de resíduo seco, densidade (25°C) = 0,8980, cor marron escuro, boa solubilidade em água.

Os extratos de guaraná obtidos por extração pelo Soxhlet com água, álcool e propilenoglicol, apresentaram os seguintes resultados:

- a) Alta Floresta - 3,8% de teor de cafeína, 22% de resíduo seco, densidade (25°C) = 0,9965, cor marron esverdeado e insolúvel em água;
- b) Maués - 4,3% de teor de cafeína, 15,2% de resíduo seco, densidade (25°C) = 0,9945, levemente solúvel em água.

6.4 - EXTRATO DE ACETOGENINAS DE ANONÁCEAS.

Foram obtidos 17% de extrato de acetogeninas por SFE e 11% de extrato pelo método convencional. Ambos os extratos deram identificação positiva pelo reativo de Kedde, aplicado sobre o cromatograma em camada delgada (68, 69, 267). O cromatograma dos dois extratos apresentou manchas idênticas nos seguintes pontos Rf 0,39; 0,13; 0,11 e 0,07. Numa comparação cromatográfica com óleo de milho, obtivemos uma mancha idêntica no Rf 0,39, correspondente aos triglicerídeos, principal componente lipídico das sementes de anonáceas.

6. 5 - EXTRATOS DE PIMENTA PRETA E PIMENTA VERMELHA.

A SFE da pimenta preta forneceu uma pasta amarela; a extração com hexano, uma pasta de cor verde oliva; a extração da pimenta vermelha forneceu um líquido vermelho denso, viscoso para ambos os processos de extração, com os resultados constantes da tabela V.

Tabela V - Análise de condimentos extraídos por SFE e extraídos por hexano no aparelho Soxhlet

	material extraído com CO ₂		extraído com CO ₂	grau de extração	extraído com hexano
	antes	depois			
Pimenta preta					
piperina [%]	10,1	0,3	44,0	97,7	41,2
óleo essencial [%]	3,5	<0,1	12,7	81,1	15,0
água [%]	9,3	6,2	7,0	-	0,2
cor	preta	ambar	amarelo	-	verde oliva
Pimenta vermelha					
capsaicina [%]	0,86	0,03	4,9	97,0	4,7
água [%]	3,2	1,8	1,3	-	0,1
cor extraída			vermelha		vermelha
pungência (unid. Scoville)			1.200.000		950.000

6.6 - EXTRATO DE ORÉGANO

O rendimento do extrato de orégano com dióxido de carbono supercrítico foi de 8,50%, este continha 8,25% de substâncias não voláteis e era um líquido de cor amarela clara. Na oleorresina extraída com hexano foram obtidos 9,05% de rendimento, esta continha 19,50% de substâncias não voláteis, líquido denso de cor marron-amarelado. Pela hidrodestilação foram obtidos 7,95% de óleo essencial de cor amarelo claro. As seguintes constantes foram obtidas com o óleo essencial destilado: densidade à 25°C = 0,8705, rotação ótica à 25°C = -34° e índice de refração à 25°C = 1,4635; com o óleo essencial extraído com CO₂ supercrítico: 0,9100, -32° e 1,4651, respectivamente. A análise sensorial deu a seguinte classificação: em primeiro o SFE, em segundo lugar o hidrodestilado e por último a oleorresina extraída com hexano.

6.7 - EXTRATO DE ZIMBRO

O rendimento do extrato de zimbro com dióxido de carbono supercrítico foi de 16,50%, este continha 20,50% de substâncias cerosas, representadas como uma massa esbranquiçada. Na oleorresina extraída com hexano, foram obtidos 18,25% de rendimento, esta continha 43,50% de substâncias cerosas de cor cinza-claro. Pela hidrodestilação obteve-se 0,55% de óleo essencial, de cor levemente marrom clara e com as seguintes características: densidade (25°C) = 0,8600, $n_D = 1,4620$ (25°C) e $\alpha_D = + 13^\circ$ (25°C). O óleo essencial extraído por CO₂ supercrítico, incolor, apresentou os resultados: 0,8614, 1,4679 e + 11°, respectivamente. Para a oleorresina, obtida com hexano, nas mesmas condições, os índices, deram

os seguintes resultados: 0,8540, 1,4607 e +9°. A análise sensorial deu ligeira vantagem ao extrato obtido por CO₂ supercrítico, seguido pela oleorresina extraída com hexano.

6.8 - EXTRATO DE COENTRO

O rendimento do extrato de coentro com dióxido de carbono supercrítico foi de 1,92%, este continha 3,50% de substâncias não voláteis. Na oleorresina extraída com hexano, foram obtidos 1,98% de rendimento, esta continha 13% de substâncias não voláteis. Pela hidrodestilação obteve-se 0,90% de óleo essencial, de cor levemente amarelada e com as seguintes características: densidade (25°C) = 0,8700, $n_D = 1,4650$ (25°C) e $\alpha_D = + 13^\circ$ (25°C). O óleo essencial extraído por CO₂ supercrítico, incolor, apresentou os resultados: 0,8714, 1,4709 e + 11°, respectivamente. Para a oleorresina, obtida com hexano, nas mesmas condições, os índices, deram os seguintes resultados: 0,8640, 1,4637 e +9° e a cor era esverdeada. A análise sensorial deu ligeira vantagem ao extrato obtido por CO₂ supercrítico.

6.9 - EXTRATO DE ALECRIM

O rendimento do extrato de alecrim com dióxido de carbono supercrítico foi de 2,50%, este continha 3,00% de substâncias não voláteis. Na oleorresina extraída com hexano, foram obtidos 3,05% de rendimento, esta continha 13% de substâncias não voláteis. Pela hidrodestilação obteve-se 1,93% de óleo essencial, de cor levemente amarelada e com as

seguintes características: densidade (25°C) = 0,8730, $n_D = 1,4680$ (25°C) e $\alpha_D = + 18^\circ$ (25°C). O óleo essencial extraído por CO₂ supercrítico, incolor, apresentou os resultados: 0,8744, 1,4739 e + 14°, respectivamente. Para a oleorresina, obtida com hexano, nas mesmas condições, os índices, deram os seguintes resultados: 0,8670, 1,4667 e +14° e a cor era esverdeada. Obteve-se a seguinte classificação decrescente, pelo painel de análise organoléptica, considerando-se somente o odor em relação ao alecrim padrão: 1°) hidrodestilado, 2°) SFE e 3°) oleorresina.

6.10 - EXTRATO DE SÁLVIA

O rendimento do extrato de sálvia com dióxido de carbono supercrítico foi de 2,67% de líquido oleoso de cor levemente esverdeada. Na oleorresina extraída com hexano, foram obtidos 2,82% de extrato denso, de cor marron-esverdeada. Pela hidrodestilação obteve-se 1,05% de óleo essencial, de cor verde clara e com as seguintes características: densidade (25°C) = 0,8750, $n_D = 1,4590$ (25°C) e $\alpha_D = - 3^\circ$ (25°C). O óleo essencial extraído por CO₂ supercrítico, incolor, apresentou os resultados: 0,8764, 1,4609 e - 6°, respectivamente. Para a oleorresina, obtida com hexano, nas mesmas condições, os índices, deram os seguintes resultados: 0,8840, 1,4657 e -9° e a cor era amarelada. A análise sensorial de sabor e odor mostrou nítida vantagem para o extrato por SFE, seguido do óleo hidrodestilado e da oleorresina.

6.11 - EXTRATO DE GENGIBRE

O rendimento do extrato de gengibre com dióxido de carbono supercrítico foi de 3,00%, este continha 4,50% de substâncias não voláteis, com densidade = 0,9630, rotação ótica = -20° e índice de refração = 1,5050, tudo determinado a 25°C . Na oleorresina extraída com hexano foram obtidos 2,50% de rendimento, esta continha 25% de substâncias não voláteis e pela hidrodestilação 1,45% de óleo essencial, com densidade = 0,8760, rotação ótica = -36° e índice de refração = 1,4920, determinados a 25°C .

Foram obtidas características degustativas pela determinação do índice de pungência em unidades Scoville:

óleo essencial = zero unidades

oleorresina = 480.000 unidades

extrato por SFE = 1.080.000 unidades

Pela análise organoléptica, considerando sete diferentes variáveis olfativas como cítrico, fresco, aldeídico, terpênico, madeira, balsâmico e cozido, obteve-se a seguinte classificação: 1º) extrato por SFE, 2º) oleorresina e por último, o hidrodestilado.

6.12 - EXTRATO DE CÚRCUMA

O rendimento do extrato de cúrcuma com dióxido de carbono supercrítico foi de 3,00%. Na oleorresina extraída com hexano foram obtidos 2,25% de rendimento. Pela hidrodestilação obteve-se 0,15% de óleo essencial de cúrcuma. Pelo método ASTA color "value", obtivemos o valor de 15 para o SFE e 14 para a oleorresina extraída com hexano. Na

determinação do teor de curcumina, obtivemos os seguintes valores: SFE =6,6%; oleorresina com hexano=5,4% e no hidrodestilado não constatamos a presença de curcumina. Em presença de álcalis os dois extratos apresentaram uma cor marrom avermelhada intensa, mudando para amarelo claro em pH ácido.

7 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

7.1 - CARDAMOMO E MANGERONA

Comparando-se o extrato de cardamomo obtido pela extração por fluido supercrítico com a oleorresina obtida pela extração com solventes (hexano) no Soxhlet, verifica-se que existe uma diferença muito grande no conteúdo de substâncias não voláteis. Achou-se 9,50% no extrato por SFE e 35% no extrato obtido pela extração com hexano. Acredita-se que o hexano solubiliza componentes não voláteis presentes nas amostras, que aumentam o rendimento da oleorresina, mas que em nada contribuem para o aroma e o sabor (81). Na extração por CO₂ supercrítico, esses componentes inertes estão em quantidades menores.

O rendimento do extrato de cardamomo com SFE foi de 7,5%, com um conteúdo de substâncias não voláteis de 9,50%. Na extração por hexano, embora o rendimento em peso fosse maior (8,25% de oleorresina), o conteúdo de substâncias não voláteis também foi mais alto (35%). Descontando-se o material inerte, representado pelas substâncias não voláteis nos dois extratos, podemos concluir que o rendimento na extração por fluido supercrítico foi de fato maior, em termos reais (6,78% contra 5,36% da oleorresina). Pela hidrodestilação obteve-se 5,05% de óleo essencial de cardamomo. Novamente, se calcularmos o rendimento final em óleo essencial, podemos verificar que o rendimento na extração por fluido

supercrítico foi maior (6,78% contra 5,05% do obtido pela hidrodestilação). Essa diferença parece ser devido ao fato de que parte dos componentes de baixo peso molecular se perdem durante a hidrodestilação, talvez devido a ação da água, talvez pela alta temperatura empregada na destilação, como mostrado na figura 19.

O menor tempo de duração para a extração por fluido supercrítico deve-se a maior penetração do solvente nas partículas das sementes. Em 30 minutos de extração o conteúdo de clorofila foi consideravelmente mais baixo no extrato por fluido supercrítico, o mesmo acontecendo com a cor do extrato, o que diminui também o teor de não voláteis. Isso mostra que a solubilidade do óleo de cardamomo em dióxido de carbono supercrítico é bastante alta, assim uma quantidade máxima de extrato é obtido das sementes de cardamomo, mesmo com uma extração de no máximo 30 minutos.

Os extratos de cardamomo e mangerona obtidos por SFE mostraram que os produtos, em bom rendimento e na qualidade desejada podem ser obtidos à pressão de 350 bar e 50°C, com apenas 30 min. de contato com sementes de cardamomo moídas e de folhas e sumidades floridas de mangerona. Esses extratos são verde claros e tem composição química e um aroma natural ligeiramente diferente daqueles obtidos por hidrodestilação (Figuras 19 e 20) e também daqueles obtidos por extração por solventes orgânicos.

Numa comparação analítica entre os extratos e os destilados, notou-se que no extrato, normalmente, o teor de ésteres é mais elevado, enquanto que nas condições hidrolíticas da destilação a vapor, uma parte dessas substâncias se deteriora. Isso pode ser observado no cromatograma a gás do óleo de cardamomo (Figura 19), em relação ao linalool, mais alto no hidrodestilado e o acetato de linalila, mais alto no SFE.. No cromatograma a

gás do óleo de mangerona (Figura 20), verifica-se claramente que no hidrodestilado mal aparecem os sesquiterpenos oxigenados aromáticos, relativamente pouco voláteis e termolábeis, presentes no SFE, aparecendo em seu lugar hidrocarbonetos monoterpênicos indesejáveis, em grande quantidade.

Detectou-se a presença de outras substâncias, as quais não foram estudadas mais detalhadamente, frente ao interesse focalizado nos princípios aromáticos (Figura 21).

Figura 21: Alguns componentes comuns de óleos essenciais e sua curva de pressão em função da temperatura (237, 245, 261)

7.2 - GUARANÁ

As amostras de guaraná estudadas, procedentes de Maués (PA) e de Alta Floresta (MT), se mostraram bastante diferentes, no que diz respeito à composição química e ao teor de cafeína. Parece-nos que existe uma diferença no processamento das sementes e que as sementes procedentes do estado do Mato Grosso, não foram adequadamente torradas e por isso continham uma quantidade maior de clorofila e outros componentes, o que conferiu aos seus extratos a cor esverdeada mais forte e piorou em muito sua solubilidade em água, concluindo-se então que a preparação das sementes é fator essencial antes da extração por qualquer um dos métodos escolhidos.

As sementes de guaraná continham um teor médio de 5,2% de cafeína, os extratos obtidos por SFE apresentaram um teor de cafeína de 4,8% (Alta Floresta) e 5,1% (Maués), o que dá uma eficiência de extração de 92,3% e 98,0%, respectivamente. Estes resultados são bem melhores do que os alcançados pela extração por solventes: 3,8% e 4,3% de rendimento e 73,0% e 82,7% de eficiência de extração. Em ambos os casos, os extratos foram insolúveis em água. No resultado do resíduo seco, podemos observar que os extratos de sementes de guaraná da região de Alta Floresta foram sempre maiores do que os das sementes originárias de Maués, o que pode ser devido a extração de outros componentes presentes nas sementes, como óleos fixos e clorofila, o que pode também explicar a baixa solubilidade dos extratos em água. Comparando apenas os extratos obtidos pelos dois processos de extração entre si, podemos concluir que os por SFE são mais específicos, extraíndo apenas os componentes responsáveis pela sabor e os ativos como a cafeína, o que se confirmou pela melhor avaliação destes pelo painel de degustação e pela determinação do teor de cafeína. Mas acreditamos ser a diferença entre as sementes entre si, unicamente

devido ao preparo das sementes na região de Alta Floresta (MT) e de Maués, como comentado anteriormente.

Como a intenção era de extrair o extrato total do guaraná, foi usado uma pressão de 350 bar, caso se desejasse extrair apenas a cafeína e obter o guaraná descafeinado seriam necessários apenas 80 bar de pressão, na temperatura de 50°C.

7.3 - ACETOGENINAS

O rendimento de acetogeninas da extração por solventes (11%) e por SFE (17%), leva a crer que o maior rendimento obtido pelo CO₂ supercrítico reflete a contribuição da faixa de temperatura no procedimento por SFE. Na análise cromatográfica observa-se uma mancha mais intensa no R_f=0,39, correspondente ao componente lipídico do extrato de acetogeninas que aparece em ambos os extratos e que na comparação com o óleo de milho, leva a crer que se trata de triglicerídios presentes nas sementes de anonáceas. As manchas idênticas e mais intensas, nas duplicatas obtidas com o extrato por fluido supercrítico, sugerem um maior teor de pureza dos extratos assim obtidos. O dióxido de carbono, com temperatura e pressão críticas relativamente baixas (31,04°C e 73 bar) e devidamente aprovado para a extração de gorduras (17, 20, 35, 68, 173, 154, 190), seria uma alternativa ideal, não poluente, para as acetogeninas das sementes de anonáceas. Qualquer que seja a fonte botânica (267), por causa de seu conteúdo extremamente baixo de acetogeninas é gerado um vasto material residual, consistindo de lignocelulose, polissacarídios de reserva e proteínas, situação que é ainda agravada pelo grande volume de solventes

usados e a serem removidos dos extratos. Esta pode ser a melhor contribuição de uma SFE baseada no CO₂.

7.4 - PIMENTAS PRETA E VERMELHA

Os constituintes importantes dos condimentos são seu aroma e paladar. Para uso industrial, os condimentos oferecem muitas desvantagens quando usados em estado natural, principalmente devido a contaminação bacteriana, dificuldades de estocagem e processamento e por isso levaram as indústrias a usar seus extratos e oleorresinas. As vantagens destes, já mencionamos na introdução. O melhor extrato ou oleorresina é a preparação que tem aroma, sabor, pungência, isto é, todos os fatores organolépticos do condimento e que após diluição, reconstituir completamente as características do material de partida. As aplicações se estendem principalmente às indústrias de alimentos e como existem muitos condimentos e a lista de constituintes dos condimentos aumenta dia a dia em função da sofisticação dos métodos analíticos, apenas consideram-se os constituintes mais responsáveis pelo aroma. Nós consideraremos apenas a pimenta preta e a vermelha, o coentro, o orégano, o gengibre e a cúrcuma, que também podem ser extraídas com dióxido de carbono supercrítico. O constituinte principal responsável pela pungência da pimenta preta é a piperina (cerca de 98% dos princípios pungentes e quentes). Outros componentes são a piperetina, a piperolina A e B e a piperanina, que tem estruturas semelhantes (147).

O extrato obtido da pimenta preta moída pela SFE, apresentou-se como uma pasta amarela com um odor muito forte e característico de pimenta preta. O grau de extração da piperina foi de cerca de 98%, isto é, acima do rendimento mínimo de 95%, descrito pela literatura (147). O teor

de piperina no SFE (44%), foi ligeiramente maior do que o extrato obtido pela extração por solventes (41,2%) (vide tabela V, página 78). Numa análise mais profunda, ambos os extratos atendem às especificações da literatura consultada (147).

O constituinte mais importante dos condimentos de capsicum é uma mistura de diversas amidas, os derivados da capsaicina, cujos componentes principais são a capsaicina e a diidrocapsaicina.

A extração por fluido supercrítico da pimenta vermelha moída forneceu um óleo vermelho denso e viscoso, com alto grau de pungência (1.200.000 unidades Scoville) e calculando-se seu grau de extração, como capsaicina, obteve-se 97% de eficiência. O rendimento total, comparado ao extrato obtido com hexano, foi ligeiramente superior (+ 5,6%), mas a pungência desta última foi 26% menor (950.000 unidades Scoville)

Foi detectada a presença de outras substâncias nos extratos, as quais não foram estudadas mais detalhadamente, frente ao interesse focalizado nos princípios pungentes das pimentas.

A extração por fluido supercrítico pode ser uma alternativa ideal para a extração da oleorresina de pimenta vermelha, considerando-se o melhor rendimento de extração, em menor tempo e principalmente por não existirem resíduos de solventes no produto final.

7.5 - ORÉGANO

Avaliação sensorial dos aromas de condimentos: Foram encontradas diferenças distintas na composição dos extratos, mas a importância destas

diferenças no aroma total do condimento não pode ser estimada simplesmente com base nos resultados das análises químicas, físicas e cromatográfica. O impacto do sabor de um condimento ou uma erva consiste, na maioria dos casos, de numerosos compostos que interagem de muitos modos entre si, adicionando, potencializando, ou suprimindo um ao outro e mesmo causando mudanças na qualidade e aceitação do sabor. Análises sensoriais são trabalhosas e demoradas, mas são o único caminho para quantificar e caracterizar o impacto total de sabor de misturas complexas.

O aroma é o fator mais importante do extrato quando se trata de produtos de sabor e fragrâncias e nos estudos de composição dos extratos de condimentos e ervas, utiliza-se a análise sensorial como parâmetro.

A análise sensorial dos extratos e destilados obtidos colocou o SFE em primeiro lugar, seguido do hidrodestilado, que foi 2% superior no rendimento total de destilação. Todos os atributos do odor foram percebidos de ser menos intensos no hidrodestilado e oleorresinas do que na referência. O odor do extrato por SFE foi avaliado de lembrar mais proximamente o aroma do condimento referência, recém-moido do que o hidrodestilado e a oleorresina. Por tudo isso e considerando as constantes físicas obtidas, podemos sugerir a extração por SFE como método alternativo para a obtenção de extratos de orégano.

7.6 - ZIMBRO

As frutos de zimbro produziram uma massa cerosa com sabor e odor característicos, quando extraídos por SFE e por Soxhlet; pela hidrodestilação foram obtidos apenas 0,55% de óleo essencial. Ordenados

em ordem decrescente de aceitação pelo painel de degustação, a preferência foi pelo SFE, seguida pela oleorresina e por último pelo hidrodestilado. O rendimento em extrato de zimbro, descontando-se as substâncias cerosas é nitidamente superior no SFE (13%), contra os 10,32% da oleorresina extraída com hexano. As constantes físicas indicam que os extratos após desceragem se equivalem.

7.7 - COENTRO

Os extratos de coentro forneceram resultados analíticos que os colocam dentro das especificações da literatura consultada. A análise sensorial deu ligeira vantagem ao extrato obtido por CO₂ supercrítico. O valor da densidade e do índice de refração ligeiramente superiores do SFE, podem indicar uma maior presença de componentes de alto peso molecular e uma menor quantidade de monoterpenos que no óleo hidrodestilado. Todos os atributos de odor foram percebidos por ser menos intensos nos hidrodestilados e oleorresinas do que na referência usada. O odor do extrato por SFE foi avaliado de lembrar mais proximamente o aroma do condimento recém-moido do que o hidrodestilado e o extrato hexânico.

7.8 - ALECRIM

O sabor do extrato por SFE foi avaliado de lembrar mais proximamente o aroma do condimento recém-moido do que o hidrodestilado e a oleorresina, mas na classificação geral da análise sensorial, o hidrodestilado levou uma pequena vantagem sobre o SFE e também a oleorresina se aproximou bastante ao sabor do padrão utilizado, o que

poderia ser interpretado como sendo consequência da quase ausência de substâncias não voláteis nos extratos, tornando-os bastante semelhante entre si, apesar da coloração verde do extrato hexânico.

7.9 - SÁLVIA

O rendimento teórico (147) é de 0,4 - 11% de óleo essencial de sálvia. O extrato por SFE rendeu 2,67% de óleo essencial, calculado em relação à planta seca. Na hidrodestilação obteve-se 1,05% de óleo essencial. Na oleorresina com solvente o rendimento foi de 2,82% de extrato. O extrato por SFE foi avaliado como sendo mais terpênico e menos doce que a referência, isto é, que a planta fresca. Nas discussões entre os analistas, descreveu-se os extratos por SFE como os mais terpênicos e picantes, com alguma pungência. O caráter terpênico estava fortemente associado com o extrato do CO₂ supercrítico nas avaliações e o distinguiram dos outros extratos. Todos os atributos do odor foram percebidos de ser menos intensos nos hidrodestilados e oleorresinas do que na referência usada. O odor do extrato por SFE foi avaliado por lembrar mais proximamente o aroma da planta recém-moida do que o hidrodestilado e do extrato com hexano.

7.10 - GENGIBRE

O rendimento teórico (literatura) é de 1,5 - 3,0%. Os constituintes principais identificados nos extratos são os gingeróis, os shogaóis e a gingerona (147, 169). Pelos resultados das características olfativas, o extrato por SFE mostrou ser mais completo que os outros dois e também

mais próximo em pungência ao do próprio rizoma. Os degustadores comentaram e se manifestaram favoravelmente às provas preparadas com o extrato por CO_2 supercrítico. A densidade (peso específico), significativamente mais alta do extrato por SFE, parece referir-se às frações de mais alto peso molecular extraídas pelo CO_2 supercrítico. A rotação ótica de menor valor parece referir-se a menor porcentagem de hidrocarbonetos monoterpênicos opticamente ativos, presentes no extrato por SFE. Como a pungência do gengibre é fator de mais alta importância comercial, pelos estudos realizados, podemos recomendar que na extração do gengibre se utilize o SFE ou se substitua o hexano por um solvente orgânico diferente para se otimizar o processo de extração.

7.11 - CÚRCUMA

O maior interesse nesse extrato é a obtenção de corantes alimentícios e o rendimento mais alto é o decisivo na avaliação, fator que conferiu nítida vantagem ao SFE. O teor de curcumina (6,6%) no SFE é significativamente maior do que o obtido por extração com o hexano e por isso a SFE pode representar um ótimo processo alternativo para a extração de extratos e corante dos rizomas de cúrcuma.

8 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a SFE pode ser um método alternativo para a extração de insumos farmacêuticos, alimentícios ou fitoterápicos, sendo um método mais rápido, econômico e que proporciona extratos de melhor rendimento total e aroma e sabor mais próximos do material de partida do que os métodos convencionais de extração usados na comparação.

O presente estudo pretende demonstrar que a SFE, utilizando dióxido de carbono supercrítico, pode ser uma alternativa rápida e econômica para a extração de produtos vegetais apolares e que para se extrair produtos mais polares, oferece uma grande variedade de modificadores que podem ser adicionados ao processo para permitir a extração e melhorar ainda mais o rendimento e a eficiência da extração de insumos farmacêuticos por fluidos supercríticos.

O procedimento utilizado pode servir de base para a extração por fluido supercrítico de qualquer insumo farmacêutico e fitoterápico e permitir construir um equipamento bem mais simples, seguro e de baixo custo operacional do que o utilizados nos nossos experimentos. Trabalhando-se com a pressão constante em 350 bar e a temperatura em 50°C foi possível extrair com sucesso a maioria dos produtos propostos no presente estudo. Esta condição operacional não é difícil de monitorar numa instalação piloto.

A revisão bibliográfica revelou que o interesse em fluidos supercríticos e suas aplicações está continuando com uma expansão no alcance e na sofisticação. Entre as novas tendências estão a maior pesquisa e uso de fluidos binários e multicomponentes para otimizar e facilitar essas transformações. Aplicações expandiram mais longe que extrações e separações para incluir reações, processamento de polímeros, processamento de alimentos, reparações ambientais e processos com grande grau de complexidade que podem incluir tanto transformações físicas como químicas.

9. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ADAMS, M. K. **Analysis of coffee**: production and trade. Allentown: Liquid Carbonic Industries Corporation, 1991. p. 1-30.
- 2 ALEXANDER, W. S., BRUSEWITZ, G. H., MANESS, N. O. Pecan oil recovery and composition as affected by temperature, pressure, and supercritical CO₂ flow rate. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 62, p. 762-6, 1997.
- 3 ANKLAM, E., MÜLLER, A. Extraction of caffeine and vanillin from drugs by supercritical carbon dioxide. **Pharmazie**, Berlin, v. 50, p. 364-5, 1995.
- 4 ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), **Official methods of analysis**. 14. ed. Arlington: Association of Analytical Chemists, 1984. Métodos 30.020 e 3.138.
- 5 APPELL, L. **Cosmetics, fragrances and flavors**. Whiting: Novox, 1982. Appendix, p. 427-40.

- 6 ARNTFIELD, S. D., BULLEY, N. R., CRERAR, W. J. Supercritical CO₂ extraction of egg yolk: impact of temperature and entrainer on residual protein. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 69, p. 823-5, 1992.
- 7 ARPINO, P. A., HAAS, P. Recent developments in supercritical fluid chromatography-mass spectrometry coupling. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 703, p. 479-88, 1995.
- 8 ARTZ, W. E., MYERS, M. R. Supercritical fluid extraction and chromatography of emulsifiers. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 72, p. 219-24, 1995.
- 9 ASSOCIATION INTERNATIONALE POUR LA PROMOTION DES FLUIDES SUPERCRITIQUES, Produits naturels: extraction au CO₂ supercritique. [Colloque sur les fluides supercritiques, 3]. **Parfums Cosmét.**, Paris, v. 127, p. 57-60, 1996.
- 10 BAILEY, A. E. **Industrial oil and fat products**. New York: John Wiley, 1979. Cap.1, p.3-21.
- 11 BARTLE, K. D., BEVAN, C. D., CLIFFORD, A. A., JAFAR, S. A., MALAK, N., VERRALL, M. S. Preparative-scale supercritical fluid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 697, p. 579-85, 1995.
- 12 BERGER, T. A. Effects of temperature and density on retention in capillary supercritical fluid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 478, p. 311-24, 1988.

- 13 BERGER, T. A., WILSON, W. H. Separation of basic drugs by packed column supercritical fluid chromatography 3. Stimulants. **J. Pharm. Sci.**, Chicago, v. 84, p. 489-492, 1995.
- 14 BEVAN, C. D., MARSHALL, P. S. The use of supercritical fluids in the isolation of natural products. **Nat. Prod. Rep.**, London, v. 57, p. 451-66, 1994.
- 15 BHASKAR, A. R., RIZVI, S. S. H., SHERBON, J. W. Anhydrous milk fat fractionation with continuous countercurrent supercritical carbon dioxide. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 58, p. 748-52, 1993.
- 16 BICCHI, C., RUBIOLO, P., FRATTINI, C. Off-line supercritical fluid extraction and capillary gas chromatography of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio species*. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v. 54, p. 941-5, 1991.
- 17 BLILIE, A. L., GREIBROKK, T. Gradient programming and combined gradient-pressure programming in supercritical fluid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 349, p. 317-22, 1985.
- 18 BLOMBERG, L. G., DEMIRBÜKER, M., ANDERSON, P. E. Argentation supercritical fluid chromatography for quantitative analysis of triacylglycerols. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 70, p. 939-46, 1993.
- 19 BÖHME, H., HARTKE, K. **Deutsches arzneibuch, kommentar**. 7. ed. Frankfurt: Govi-Verlag, 1968.

- 20 BORGES, S. V., MARTUCCI, E. T., MÜLLER, C. O. Optimization of the extraction of cholesterol from dehydrated egg yolk using acetone. **Lebensm. Wiss. Technol.**, Zurich, v. 29, p. 687-90, 1996.
- 21 BOWADT, S., HAWTHORNE, S. B. Supercritical fluid extraction in environmental analysis. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 703, p. 549-71, 1995.
- 22 BRENNECKE, J. F., ECKERT, C. A. Phase equilibria for supercritical fluid process design. **AIChE J.**, New York, v. 35, p. 1409- 27, 1989.
- 23 BROSSARD, S., LAFOSSE, M., DREUX, M., BECART, J., TRANCHANT, J. F. Analyse par CPG et CPS de cires naturelles. **Parfums Cosmét.**, Paris, v. 117, p. 48-53, 1994.
- 24 BRUNETTI, L., DAGHETTA, A., FEDELL, E., KIKIC, I., ZANDERIGHI, L. Deacidification of olive oils by supercritical carbon dioxide. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 66, p. 209-17, 1989.
- 25 BULLEY, N. R., FATTORI, M., MEISEN, A., MOYLS, L. Supercritical fluid extraction of vegetables oil seeds. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 61, p. 1362-5, 1984.

- 26 BURDFORD, M. D., HAWTHORNE, S. B., MILLER, D. J.,
MACOMBER, J. Construction of a robust stainless-steel clad
fused-silica restrictor for use in supercritical fluid extraction. **J.
Chromatogr.**, Amsterdam, v. 648, p. 445-9, 1993.
- 27 BURFORD, M. D., CLIFFORD, A. A., BARTLE, K. D., COWEY, C. M.,
SMART, N. G. Variable flow control and collection device for use
with supercritical fluids. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 738, p.
241-52, 1996.
- 28 BURFORD, M. D., HAWTHORNE, S. B., MILLER, D. J., BRAGGINS,
T. Comparison of methods to prevent restrictor plugging during
off-line supercritical extraction. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.
609, p. 321-32, 1992.
- 29 BYSTROM, C. E., HARTEL, R. W. Evaluation of milk fractionation
and modification techniques for creating cocoa butter replacers.
Lebensm. Wiss. Technol., Zurich, v. 27, p. 142-50, 1994.
- 30 CAPANGPANGAN, M. B., SUFFET, I. H. Optimization of a drying
method for filtered suspended solids from natural waters for
supercritical fluid extraction analysis of hydrophobic organic
compounds. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 738, p. 253-64,
1996.

- 31 CHAO, R. R., MULVANEY, S. J., BAILEI, M. E., FERNANDO, L. N. Supercritical CO₂ conditions affecting extraction of lipid and cholesterol from ground beef. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 56, p. 183-7, 1991.
- 32 CHAO, R. R., MULVANEY, S. J., HUANG, H. Effects of extraction and fractionation pressures on supercritical extraction of cholesterol from beef tallow. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 70, p. 139-43, 1993.
- 33 CHARALAMBOUS, G., INGLETT, G. **Chemistry of foods and beverages: recent developments**. New York: Academic Press, 1982. p. 149-69.
- 34 CHARLES, D. J., SIMON, J. E., WILRLECHNER, M. P. Characterization of essential oil of dill (*Anethum graveolens* L.). **J. Essent. Oil Res.**, Wheaton, v. 7, p. 11-20, 1995.
- 35 CHEN, Y., YU, D. Q. Tonkinecin, a novel bioactive annonaceous acetogenin from *Uvaria tonkinensis*. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v. 59, p. 507-9, 1996.
- 36 CHESTER, T. L., PINKSTON, J. D., RAYNIE, D. E. Supercritical fluid chromatography and extraction. **Anal. Chem.**, Washington, v. 64, p. 153R-170R, 1992.
- 37 CHESTER, T. L., PINKSTON, J. D., RAYNIE, D. E. Supercritical fluid chromatography and extraction. **Anal. Chem.**, Washington, v. 68, p. 487R-514R, 1996.

- 38 CHOO, Y. M., MA, A. M., YAHAYA, H., YAMAUCHI, Y., BOUNOSHITA, M., SAITO, M. Separation of crude palm oil components by semipreparative supercritical fluid chromatography. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 73, p. 523-5, 1996.
- 39 CHRISTIANSON, D. D., FRIEDRICH, J. P., LIST, G. R., WARNER, K., BAGLEY, E. B., STRINGFELLOW, A. C., INGLETT, G. E. Supercritical fluid extraction of dry-milled corn germ with carbon dioxide. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 49, p. 229-32, 272, 1984.
- 40 COCERO, M. J., CALVO, L. Supercritical fluid extraction of sunflower seed oil with CO₂-ethanol mixtures. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 73, p.1573-8, 1996.
- 41 COCKS, S., WRIGLEY, S. K., CHICARELLI-ROBINSON, M. I., SMITH, R. M. High-performance liquid chromatography comparison of supercritical-fluid extraction and solvent extraction of microbial fermentation products. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 697, p. 115-22, 1995.
- 42 COCKS, S., WRIGLEY, S. K., CHICARELLI-ROBINSON, M. I., SMITH, R. M. High-performance liquid chromatography comparison of supercritical-fluid extraction and solvent extraction of microbial fermentation products. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 697, p. 115-22, 1995.

- 43 COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6. Ed., Campinas:Unicamp., 1995. p. 15-9
- 44 COMMISSARIAT À L'ENERGIE ATOMIQUE, Spécialiste français CO₂ supercritic. **Parfums Cosmét.**, Paris, v. 119, p. 49-56, 1994.
- 45 CORTES, H. J. Developments in multidimensional separation systems **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 626, p. 3-23, 1992.
- 46 COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1978.
- 47 COULIBALY, K., JEON, I. J. An overview of solid-phase extraction of food flavor compounds and chemical residues. **Food Rev. Int.**, New York, v. 12, p. 131-51, 1996.
- 48 CROSS, R. F., EZZEL, J. L., RICHTER, B. E. The supercritical fluid extraction of polar drugs (sulphonamides) from inert matrices and meat animal products. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 31, p. 162-9, 1993.
- 49 CYGNAROWICZ-PROVOST, M., KING, J. W., MARMER, P. Extraction of woolgrease with supercritical carbon dioxide. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 72, p. 223-5, 1994.

- 50 DEGNAN, A. J., ELBE, J. H. von, HARTEL, R. W. Extraction of annatto seed pigment by supercritical carbon dioxide. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 56, p. 1655-9, 1991.
- 51 DJARMATI, Z., JANKOV, R. M., SCHWIRTLICH, E., DJULINAC, B., DJORDJEVIC, A. High antioxidant activity of extracts from sage by supercritical CO₂ extraction. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 68, p. 731-4, 1991.
- 52 DREWS, M., LAFOSSE, M. Review of evaporate light scattering detection for packet-column SFC. **LC-GC Int.**, Orleans, v 10, p. 382, 384, 386, 388, 390, 1997.
- 53 DUNFORT, N. T., TEMELLI, F. Extraction of phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 72, p. 1009-15, 1995.
- 54 DUNFORT, N. T., TEMELLI, F. Extraction conditions and moisture contend of canola flakes as related to lipid composition of supercritical CO₂ extracts. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 62, p. 155-9, 1997.
- 55 DUNFORT, N. T., TEMELLI, F., LeBLANC, E. Supercritical CO₂ extraction of oil and residual proteins from atlantic mackerei (*Scomber scombrus*) as affected by moisture contend. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 62, p. 289-94, 1997.

- 56 ECKARD, P. R., TAYLOR, L. T. Feasibility of ion-pair/supercritical-fluid extraction of an ionic compound-pseudoephedrine hydrochloride. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Blacksburg, v. 15, p. 613-9, 1997.
- 57 ECO, H. **Como se faz uma tese**. São Paulo: Perspectiva, 1996. 170p.
- 58 EISSLER, R. L., FRIEDRICH, J. P. Estimation of supercritical fluid-liquid solubility parameter differences for vegetable oils and other liquids from data taken with a stirred autoclave. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 65, p. 764-7, 1988.
- 59 ELDRIDGE, A. C., FRIEDRICH, J. P., WARNER, K., KWOLEK, W. F. Preparation and evaluation of supercritical carbon defatted soybean flakes. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 51, p. 584-7, 1986.
- 60 ENDRESS, R. **Plant cell biotechnology**. Berlin: Springer, 1994. p. 172-6.
- 61 EUROPEAN pharmacopea. Sainte-Ruffine: Maisonneuve S. A., 1971. v. 1-3.
- 62 FARMACOPÉIA brasileira, 2. ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1959.

- 63 FARREL, K. T. **Spices, condiments, and seasonings**. New York: Van Nostrand Reinhold. 1990. p. 83-136.
- 64 FAVATI, P., KING, J. W., MANZZANTI, M. Supercritical carbon dioxide extraction of evening primrose oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 68, p. 422-7, 1991.
- 65 FIELDS, S. M., LEE, M. L. Effects of density and temperature on efficiency in capillary supercritical fluid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 349, p. 305-16, 1985.
- 66 FIFIELD, F. W., HAINES, P. J. **Environmental analytical chemistry**. London: Blackie, 1996. p. 102.
- 67 FJELDSTED, J. C., JACKSON, W. P., PEADEN, P. A., LEE, M. L. Density programming in capillary supercritical fluid chromatography. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v. 21, p. 222-5, 1983.
- 68 FONTANA, J. D., ALMEIDA, E. R. A., BARON, M., GUIMARÃES, M. F., DESCHAMPS, F. C., SCHWARTSMANN, G., CERVI, A. C., ZANETTE, F., VILEGAS, J., LANÇAS, F. M. Screening of acetogenin-producing plants in Brazilian flora. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Washington, v. 45/46, p. 295-313, 1994.

- 69 FONTANA, J. D., BARON, M., PASSOS, M., NOSEDA, M., POMILIO, A. B., VITALE, A., MAUL, A. A., WEBER, A. C., PERES, W. A., FOERSTER, L. A. Selective polarity and absorption-guided extraction/purification of *Annona* sp. polar acetogenins and biological assay against agricultural pests. In: SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, 19., Colorado Springs, 1997. **Program and Abstracts**, Colorado Springs, Antlers Doubletree, 1997. P. 42.
- 70 FORS, S. M., ERIKSSON, C. E. Characterization of oils extracted from oats by supercritical carbon dioxide. **Lebensm. Wiss. Technol.**, Zurich, v. 23, p. 390-5, 1990.
- 71 FRANCE, J. E., KING, J. W., SNYDER, J. M. Supercritical fluid-based cleanup technique for the separation of organochlorine pesticides from fats. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 39, p. 1871-4, 1991.
- 72 FRIEDERICH, J. P., LIST, G. R. Characterization of soybean oil extracted by supercritical carbon dioxide and hexane. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 39, p. 192-3, 1982.
- 73 GENNARO, A. R., ed. **Remington's pharmaceutical sciences**. 17. ed. Easton: Mack , 1985.

- 74 GERARD, D. Kontinuierliche deterpenierung ätherischer öle durch gegenstromextraktion mit verdichtetem kohlendioxid. **Chem. Ing. Tech.**, Weinheim, v. 56, p. 794-8, 1984.
- 75 GERBAULT, P., ROBIC, Y. Un extrait de genièvre pur et puissant. **Parfums Cosmét.**, Paris, v. 118, p. 108, 1994.
- 76 GERE, D. R. Supercritical fluid chromatography. **Science**, Washington, v. 222, p. 253-9, 1983.
- 77 GERMER, S. P. M., PETENATE, M. A. A. M. Extração de óleo essencial de cravo com dióxido de carbono subcrítico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 8., São Paulo, 1988. **Anais**. São Paulo, 1988., v. 2, p. 541-4.
- 78 GIDDINGS, J. C., MYERS, M. M., McLAREN, L., KELLER, R. A.. High pressure gas chromatography of nonvolatile species. **Science**, Washington, v. 162, p. 67-71, 1968.
- 79 GLENNON, J. D., HUTCHINSON, S., WALKER, A., HARRIS, S. J., McSWEENEY, C. C. New fluorinated hydroxamic acid reagents for the extraction of metal ions with supercritical carbon. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 770, p. 85-91, 1997.

- 80 GONÇALVES, M., VASCONCELOS, A. M. P., GOMES DE AZEVEDO, E. J. S., CHAVES DAS NEVES, H. J., NUNES DA PONTE, M. On the application of supercritical fluid extraction to the deacidification of olive oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 68, p. 474-80, 1991.
- 81 GOPALAKRISHNAN, N., NARAYANAN, C. S. Supercritical carbon dioxide extraction of cardamom. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 39, p. 1976-8, 1991.
- 82 GREIBROKK, T. Applications of supercritical fluid extraction in multidimensional systems. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 703, p. 523-36, 1995.
- 83 GREIBROKK, T. Recent developments in the use of supercritical fluids in coupled systems. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 626, p. 33-40, 1992.
- 84 GROB, R. L. **Modern practice of gas chromatography**. Chichester: Wiley Interscience, 1995. p. 802-5, 817-8, 826-7.
- 85 GUNNLAUGSDOTTIR, H., SIVIK, B. Lipase-catalysed alcoholysis of cod liver oil in supercritical carbon dioxide. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 72, p. 399-405, 1995.

- 86 GYGER, R. F. **New roles for supercritical**. Allentown: Intra-Corporation Communication, Liquid Carbonic Supercritical, Inc., 1990.
- 87 HARDARDOTTIR, I., KINSELLA, J. E. Extraction of lipid and cholesterol from fish muscle with supercritical fluids. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 53, p. 1656-8, 1988.
- 88 HAWTHORNE, S. B. Analytical scale supercritical fluid extraction. **Anal. Chem.**, Washington, v. 62, p. 633A- 42A, 1990.
- 89 HAWTHORNE, S. B. Quantitative extraction of linear alkylbenzenesulphonates using supercritical carbon dioxide and a single device for adding modifiers. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 541, p. 185-94, 1991.
- 90 HAWTHORNE, S. B., KRIEGER, M. S., MILLER, D. J. Analysis of flavor and fragrance compounds using supercritical fluid extraction coupled with gas chromatography. **Anal. Chem.**, Washington, v. 60, p. 472-7, 1988.
- 91 HAWTHORNE, S. B., MILLER, D. J., KRIEGER, M. S. Coupled SFE-GC: a rapid and simple technique for extracting, identifying, and quantitating organic analytes from solids and sorbent resins. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v. 27, p. 347- 54, 1989.
- 92 HAYES, D. G., KLEIMAN, R. Supercritical fluid chromatographic analysis of new crop seed oils and their reactions. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 73, p. 1691- 7, 1996.

- 93 HEIKES, D. L. Procedure for supercritical fluid extraction and gas chromatographic determination of chlorinated fatty acid bleaching adducts in flour and flour-containing food items utilizing acid hydrolysis-methylation and florisil column cleanup techniques. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 41, p. 2034-7, 1993.
- 94 HENER, U., FAULHABER, S., KREIS, P., MOSANDL, A. On the authenticity evaluation of balsam oil (*Melissa officinalis* L.). **Pharmazie**, Berlin, v. 50, p. 60-2, 1995.
- 95 HIGASHIDATE, S., YAMAUCHI, Y., SAITO, M. Enrichment of eicosapentaenoic acid esters from esterified fish oil by programmed extraction-elution with supercritical carbon dioxide. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 515, p. 295-303, 1990.
- 96 HUBER, W., MOLERO, A., PEREYRA, C., MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. Determination of cholesterol in milk fat by supercritical fluid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 715, p. 333-6, 1995.
- 97 HUBERT, P., VITZTHUM, O. G. Fluid extraction of hops, spices, and tobacco with supercritical gases. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, Weinheim, v. 17, p. 710-5, 1978.

- 98 HUH, H., STABA, E. J., SING, J. Supercritical fluid chromatographic analysis of polyprenols in Ginkgo biloba L. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 600, p. 364-9, 1992.
- 99 HÜSERS, N., KLEIBÖHMER, W. Studies on trapping efficiencies of various collection devices for off-line supercritical fluid extraction. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 697, p.107-24, 1995.
- 100 HUSTON, C. K., JI, H. Optimization of the analytical supercritical fluid extraction of cloves via an on-column interface to an ion trap GC/MS system. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 39, p. 1229-33, 1991.
- 101 IBÁÑEZ, E., TABERA, J., HERRAIZ, M., REGLERO, G. Effect of temperature on the performance of micropacked columns in supercritical fluid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 667, p. 249-55, 1994.
- 102 IKAN, R. **Natural products: a laboratory guide**. Jerusalem: Israel University Press, 1969.
- 103 JAGOTA, N. K., NAIR, J. B., KLEE, M., WANG, M. Z. Supercritical fluid chromatography of paclitaxel. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 721, p. 315-22, 1996.

- 104 JANDA, V., MIKESOVÁ, M., VEJROSTA, J. Direct supercritical fluid extraction of water-based matrices. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 733, p. 35-40, 1996.
- 105 JEDRZEJEWSKI, P. T., TAYLOR, L. T. Packed column supercritical fluid chromatography-mass spectrometry with particle beam interface aided with particle forming solvent. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 703, p. 489-501, 1995.
- 106 JIAN, Z., YU, A. Q. New type of mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from *Goniiothalamus donnaiensis*. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v. 60, p. 122-5, 1997.
- 107 JOHNSON, A. E., GEISLER, P. R., TALLEY, L. D. Determination of relative ethoxylation rate constants from supercritical fluid chromatographic analysis of ethoxylated alcohols. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 67. P. 123-31, 1990.
- 108 KARLOSSON, L., TORSTENSSON, A., TAYLOR, L. T. The use of supercritical-fluid extraction for sample preparation of pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Blacksburg, v. 15, p. 601-11, 1997.

- 109 KARLSON, L., GYLLENHAAL, O., KARLSSON, A., GOTTFRIES, J.
Packed-column supercritical fluid chromatography of a new dihydropyrene drug based on direct infection of emulsion samples. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 749, p. 193-9, 1996.
- 110 KERROLA, K. Literature review: isolation of essential oils and flavor compounds by dense carbon dioxide. **Food Rev. Int.**, New York, v. 11, p. 547-73, 1995.
- 111 KERROLA, K., KALLIO, H. Volatile compounds and odor characteristics of carbon dioxide extracts of coriander (*Coriander sativum* L.) fruits. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 41, p. 785-90, 1993.
- 112 KHORASSANI, M. A., TAYLOR, L. Comparison of supercritical CHF_3 and CO_2 for extraction of sulfonamides from chicken liver. **J. AOAC Int.**, Washington, v. 79, p. 1043-9, 1996.
- 113 KING, J. W. Extração utilizando fluido no estado supercrítico. **Cosmet. Toiletries**, Ed. Port., São Paulo, v. 4, p. 34-8, 1992.
- 114 KING, J. W. Fundamentals and applications as supercritical fluid extractions in chromatographic science. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v. 62, p. 355-63, 1989.

- 115 KING, J. W., JOHNSON, J. H., FRIEDRICH, J. P. Extraction of fat tissue from meat products with supercritical carbon dioxide. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 37, p. 951-4, 1989.
- 116 KING, J. W., JOHNSON, J. H., ORTON, W. L., McKEITH, F. K., O'CONNOR, P. L., NOVAKOVSKI, J., CARR, T. R. Fat and cholesterol contend of beef patties as affected by supercritical CO₂ extraction. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 58, p. 950-8, 1993.
- 117 KNEZ, Z., RIZNER, V., HABULIN, M., BAUMAN, D. Enzymatic syntesis of oleyl oleate in dense fluids. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 72, p. 1345-9, 1995.
- 118 KNOWLES, D. E., RICHTER, B. E., WYGANT, M. B., NIXON, L., ANDERSEN, M. R. Supercritical fluid chromatography: a new technique for AOAC. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v. 71, p. 451-7, 1988.
- 119 KOHLER, M., HAERDI, W., CHRISTEN, P., VEUTHEY, J. L. Determination of artemisinin and artemisinic acid by capillary and packed supercritical-fluid chromatography. **J. High Resolut. Chromatogr.**, Geneva, v. 20, p. 62-6, 1997.
- 120 KRAMER, A., TWIGG, B. A. **Quality for the food industry**. 3. ed. Westport: AVI., 1980. v. 1, cap. 1, p. 15-8.
- 121 KRAMER, A., TWIGG, B. A. **Quality for the food industry**. 3. ed. Westport: AVI., 1980. v. 2, cap. 8, p. 353-83.

- 122 LAFOSSE, M., HERBRETEAU, B., MORIN-ALLORY, L. Supercritical fluid chromatography of carbohydrates. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 720, p. 61-73, 1996.
- 123 LAWS, D. R., BATH, N. A., PICKETT, J. A., ENNIS, C. S., WHELDON, A. G. Preparation of hop extracts without using organic solvents. **J. Inst. Brew.**, London, v. 83, p. 39-40, 1977.
- 124 LEE, H., CHUNG, B. H., PARK, Y. H. Concentration of tocopherols from soybean sludge by supercritical dioxide. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 68, p. 571-3, 1991.
- 125 LEE, M. L. , MARKIDES , K. E. High column efficiency in gas liquid chromatography at inlet pressures to 2500 pis. **Science**, Washington, v. 37, p. 1453-7, 1965.
- 126 LEMBERG, S., HALE, R. B. Supercritical fluid extraction. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ESSENTIAL OILS, 7., Kyoto, 1977. **Abstracts**, Kyoto, 1977. p. 402.
- 127 LESELLIER, E., TCHAPLA, A., MARTY, C., LEBERT, A. Analysis of carotenoids by high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 633, p. 9-23, 1993.

- 128 LEYENDECKER, D., LORENSCHAT, B., SCHMITZ, F. P., KLESPER, E. Influence of the density on the chromatographic behaviour of the lower alkanes as mobile phases in supercritical fluid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 398, p. 89-103, 1987.
- 129 LEYENDECKER, D., SCHMITZ, F. P., KLESPER, E. Chromatography with sub- and supercritical eluents. The influence of temperature, pressure and flow-rate on the behaviour of dimethyl and diethyl ether. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 315, p.19-30, 1984.
- 130 LIANG, J. H., YEH, AN-I. Process conditions for separating fatty acid esters by supercritical CO₂. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 68, p. 687-92, 1991.
- 131 LIDE, D. R., ed. **Handbook of chemistry and physics**. 75. ed., London: CRC Press, 1995.
- 132 LIM, S., HARTLAND, S. A new industrial process for extracting cocoa butter and xanthines with supercritical carbon dioxide. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 73, p. 423-9, 1996.
- 133 LIM, S., RIZVI, S. S. H. Continuous supercritical fluid processing of anhydrous milk fat in a packed column. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 60, p. 889-93, 1995.

- 134 LIST, G. R., JOHNSON, J. H., WARMER, K., MOUNTS, T. L. Supercritical CO₂ degumming and physical refining of soybean oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 70, p. 473-6, 1993.
- 135 LIST, P. H., SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. Boca Raton: CRC Press, 1989. cap. 4, p. 142-159, cap. 5, p. 275-281.
- 136 LLOMPART, M. P., LORENZO, R. A., CELA, R. Optimization of supercritical fluid extraction of phenol and cresols in soil samples. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 723, p. 123-34, 1996.
- 137 LOCKE, M. A. Supercritical CO₂ fluid extraction of fluometuron herbicide from soil. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 41, p. 1081-4, 1993.
- 138 LOPEZ-AVILA, V., DODHIWALA, N. S. Developments in the supercritical fluid extraction of chlorophenoxy acid herbicides from soil samples. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 41, p. 2038-44, 1993.
- 139 MAHESHWARI, P., NIKOLOV, Z. L., WHITE, T. M., HARTEL, R. Solubility of fatty acids in supercritical carbon dioxide. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 69, p. 1069-76, 1992.

- 140 MAHESHWARI, P., OOI, E. T., NIKOLOV, Z. L. Off-flavor removal from soy-protein isolate by using liquid and supercritical carbon dioxide. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 72, p. 1107-15, 1995.
- 141 MANAHAN, S. E. **Fundamentals of environmental chemistry**. Boca Raton: Lewis, 1993.
- 142 MANESS, N. O., CHRZ, D., PIERCE, T., BRUSEWITZ, G. H. Quantitative extraction of pecan oil from small samples with supercritical carbon dioxide. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 72, p. 665-9, 1995.
- 143 MANOHAR, B., BEGAN, G., SANKAR, K. U. Response surface methodology applied to fractionation of de-oiled soya lecithin obtained by supercritical carbon dioxide extraction. **Lebensm. Wiss. Technol.**, Zurich, v. 28, p. 218-21, 1995.
- 144 MARSILI, R., CALLAHAN, D. Comparison of a liquid solvent extraction technique and supercritical fluid extraction for the determination of α and β -carotene in vegetables. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v. 31, p. 422-8, 1993.
- 145 McHUGH, M. A., KRUKONIS, V. J. **Supercritical fluid extraction: principles and practice**. London: Butterworths, 1986. a) p. 130, b) 148, c) 173, d) 182, e) 189, f) 199.

- 146 McNALLY, M. E. P. Method development in supercritical fluid extraction. **J. AOAC Int.**, Washington, v. 79, p. 380-7, 1996.
- 147 MERCK index. 12. Whitehouse Station: Merck, 1996.
- 148 MERKLE, J. A., LARICK, D. K. Conditions for extraction and concentration of beef fat volatiles with supercritical carbon dioxide. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 59, p. 478-83, 1994.
- 149 MERKLE, J. A., LARICK, D. K. Triglyceride content of supercritical carbon dioxide extracted fractions of beef fat. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 58, p. 1237-40, 1993.
- 150 MITRA, S., WILSON, N. K. An empirical method to predict solubility in supercritical fluids. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v. 29, p. 305-9, 1991.
- 151 MONTANARI, L., KING, J. W., LIST, G. R., RENNICK, K. A. Selective extraction of phospholipid mixtures by supercritical carbon dioxide and cosolvents. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 61, p. 1230-3, 1996.
- 152 MOORE, S., SAMDANI, S., ONDREY, G., PARKINSON, G. New roles for supercritical. **Chem. Eng.**, Lausanne, p. 32-5, 1994.

- 153 MOORE, W. N., TAYLOR, L. T. Extraction and quantitation of digoxin and acetyldigoxin from the digitalis lanata leaf via near-supercritical methanol-modified carbon dioxide. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v. 59, p. 690-93, 1993.
- 154 MORRISEY, M. A., GIORGETTI, A., POLASEK, M., PERICLES, N., WIDMER, H. M. Pressure and modifier programming in packed-column supercritical fluid chromatography. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v. 29, p. 237-42, 1991.
- 155 MOTITSCHKE, L., TRONNIER, H., GÖRING, St., MARBERT, E. Spent grain wax. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v. 105, p. 59-62, 1990.
- 156 MOYLER, D. A., HEATH, H. B. Liquid carbon dioxide extraction of essential oils. In: LAWRENCE, B. M., MOOKHERJEE, B. D., WILLIS, B. J., **Flavors and fragrances: a world perspective**, v. 18, Washington, 1986. p. 41-63.
- 157 MULVANEY, S. J., RIZVI, S. H. Extrusion processing with supercritical fluids. **Food Technol.**, Chicago, v. 79, n. 12, p. 74-82, 1993.
- 158 NDIOMU, D. K., SIMPSON, C. F. Some applications of supercritical fluid extraction. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 213, p. 237-43, 1988.

- 159 NIELSEN, T. J., JÄGERSTAD, I. M., ÖSTE, R. E., SIVIK, B. T. G. Supercritical fluid extraction coupled with gas chromatography for the analysis of aroma compounds absorbed by low-density polyethylene. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 39, p. 1234-7, 1991.
- 160 NILSSON, W. B., GAUGLITZ, E. J. Jr., HUDSON, J. K., STOUT, V. F., SPINELLI, J. Fractionation of menhaden oil ethyl esters using supercritical fluid CO₂. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 65, p. 109-17, 1988.
- 161 NILSSON, W. B., GAUGLITZ, Jr. E. J., HUDSON, J. K. Solubilities of methyl oleate, oleic acid, oleyl glycerols, and oleyl glycerol mixtures in supercritical carbon dioxide. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 68, p. 87-91, 1991.
- 162 NILSSON, W. B., HUDSON, J. K. Solubility of simple and mixed triacylglycerols in supercritical CO₂. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 70, p. 749-54, 1993.
- 163 NORTON, K. L., GRIFFITHS, P. R. Performance characteristics of a real-time direct deposition supercritical fluid chromatography-Fourier transform infrared spectrophotometry system. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 703, p. 503-22, 1995.

- 164 PARASKEVOPOULOU, A., KIOSSEOGLOU, V. Cholesterol and other lipid extraction from egg yolk using organic solvents: effects on functional properties of yolk. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 59, p. 766-8, 1994.
- 165 PARKINSON, G., JOHNSON, E. Supercritical process win CPI acceptance. **Chem. Eng.**, Lausanne, n. 7, p. 36-9, 1989.
- 166 PASCHKE, T., HAWTHORNE, S. B., MILLER, D. J., WENCLAWIAK, B. Supercritical fluid extraction of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons from diesel exhaust particulate matter. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 609, p. 333-40, 1992.
- 167 PEADEN, P. A., LEE, M. L. Theoretical treatment of resolving power in open tubular column supercritical fluid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 259, p. 1-16, 1983.
- 168 PEARCE, K. L., TRENERRY, V. C., WERE, S. Supercritical fluid extraction of pesticides from strawberries. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 45, p. 153-7, 1997.
- 169 PELLERIN, P. Le gingembre: production et analyse. **Parfums Cosmét.**, Paris, v. 117, p. 70-3, 1994.
- 170 PELLERIN, P. Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavor and perfume industry. **Perfum. Flavor.**, Wheaton, v.16, p. 37-9, 1991.

- 171 PENNINGER, J. M. L. Extraction of oil from wioming coal with aqueous solvents at elevated pressure. In: PENNINGER, J. M. L., RADOSZ, M., McHUGH, M. A., KRUKONIS, V. J., eds. **Supercritical fluid technology**, Amsterdam: Elsevier Science. 1985. p. 309-329.
- 172 PETERSSON, U., MARKIDES, K. E. Stability and purity of low-polarity adsorbents for coupled supercritical fluid extraction-supercritical chromatography-flame ionization detection. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 734, p. 311-8, 1996.
- 173 PFANDER, H., NIGGLI, U. **Carotenoids: isolation and analysis**. Basel: Birkhäuser, 1995. v. 1A, cap. 6, p. 191-8.
- 174 PIRKLE, W. H., BRICE, L. J., TERFLOTH, G. J. Liquid and subcritical CO₂ separations of enantiomers on a broadly applicable polysiloxane chiral stationary phase. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 753, p. 109-19, 1996.
- 175 POURCHET-CAMPOS, M. A. **Iniciação à pesquisa científica: bases da metodologia**. São Paulo: SN Publicidade., 1996. 186p.

- 176 PYO, D., LI, W., LEE, M. L., WECKWERTH, J. D., CARR, P. W.
Addition of methanol to the mobile phase in packed capillary column supercritical fluid chromatography. Retention mechanisms from linear solvation energy relationships. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 753, p. 291-8, 1996.
- 177 QUECKENBERG, O. R., FRAHM, A. W. Supercritical fluid extraktion und selektivität in der naturstoffanalytik. **Pharmazie**, Berlin, v. 49, p.159-66, 1994.
- 178 QUIRIN, K. W. Löslichkeitsverhalten von fetten ölen in komprimiertem kohlendioxid im druckbereich bis 2600 bar. **Fette, Seifen, Anstrichm.**, Hamburg, v. 84, p. 460-5, 1982.
- 179 QUIRIN, K. W., GERARD, D., GRAU, H., GRAU, G. Hochdruckextraktion mit kohlendioxid - eine ideale methode zur gewinnung hochwertige ätherischer öle. **Seifen, Öle, Fette, Wachse**, Augsburg, v. 113, p. 539-42, 1987.
- 180 QUIRIN, K. W., GERARD, D., KRAUS, J. Hochdruckextraktion mit kohlendioxid - naturreine produkte umweltfreundlich hergestellt. **Gordian**, Hamburg, v. 86, p. 156-9, 1986.
- 181 QUIRIN, K. W., GERARD, D., KRAUS, J. Hochdruckextraktion mit kohlendioxid - ein schonendes verfahren zur gewinnung hochwertiger fetter öle", **Fett Wiss. Technol.**, Hamburg, v. 89, p. 139- 43, 1987.

- 182 QUIRIN, K. W., GERARD, D., KRAUS, J. Hochdruckextraktion mit kohlendioxid - gewinnung terpenarmer aromaöle". **Z. Lebensm. Technol.**, Hamburg, v. 87, p. 264-8, 1987.
- 183 RAYNIE, D. E. **Analytical supercritical fluid extraction**. Cincinnati: Corporate Research Division/The Procter & Gamble Company, 1995. [Relatório].
- 184 REIGHARD, T. S., OLESIK, S. V. Extraction of phenoxyacid herbicides from house dust using methanol/CO₂ mixtures. **Anal. Chem.**, Washigton, v. 69, p. 566-74, 1997.
- 185 REVERCHON, E., OSSÉO, S. Comparison of processes for the supercritical carbon dioxide extraction of oil from soybean seeds. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 71, p. 1007-12, 1994.
- 186 RICE, K. J., NIEMEYER, E. D., BRIGHT, F. V. Evidence for density-dependent changes in solute molar absorptivities in supercritical CO₂: impact on solubility determination practices. **Anal. Chem.**, Washington, v. 67, p. 4354-7, 1995.
- 187 RIZVI, S. S. H., DANIELS, J. A., BENADO, A. L., ZOLLWEG, J. A. Supercritical fluid extraction: operating principles and food applications. **Food Technol.**, Chicago, v. 40, n. 7, p. 57-61, 1986.

- 188 ROBEY, R. Emerging applications of supercritical fluid extraction technology. In: **CO₂ Technology Seminar**. OAK Brook Hills, 1991. p.1-13.
- 189 ROTH, M. Solute retention in gas and supercritical fluid chromatography versus pairwise interactions within the system: a numerical treatment in perturbations of molecular parameters. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 738, p. 101-14, 1996.
- 190 ROTH, M. Thermodynamic background of selectivity shifts in temperature-programmed, constant-density supercritical fluid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 718, p. 147-52, 1995.
- 191 SAKAKI, K., YOKOCHI, T., SUZUKI, O., HAKUTA, T. Supercritical fluid extraction of fungal oil using CO₂, N₂O, CHF₃ and SF₆. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 67, p. 553-7, 1990.
- 192 SANDRA, P., KOT, A., MEDVEDOVICI, A., DAVID, F. Selected applications of the use of supercritical fluids in coupled systems. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 703, p. 467-78, 1995.
- 193 SANTERRE, C. R., GOODRUM, J. W., KEE, J. M. Roasted peanuts and peanut butter quality are affected by supercritical fluid extraction. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 59, p. 382-6, 1994.

- 194 SARGENTI, S. R., LANÇAS, F. M. Design and construction of a simple supercritical fluid extraction system with semi-preparative and preparative capabilities for application to natural products. **J. Chromatogr. A.**, Amsterdam, v. 667, p. 213-8, 1994.
- 195 SCHANTZ, M. M., CHESLER, S. N. Supercritical fluid extraction procedure for the removal of trace organic species from solid samples. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 363, p. 397-401, 1986.
- 196 SCHMEER, K., NICHOLSON, G., ZHANG, S., BAYER, E., BOHNING-GAESE, K. Identification of the lipids and the ant attractant 1,2-dioleoylglycerol in the arils of *Commiphora guillaumini* Perr. (Burseraceae) by supercritical fluid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 727, p. 139-46.
- 197 SCHULZ, W. G., RANDALL, J. M. Liquid carbon dioxide for selective aroma extraction. **Food Technol.**, Chicago, v. 24, p. 1284-6, 1970.
- 198 SHAHIDI, F. Flavor of meat and meat products. In: WORLD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 8., Toronto, 1991. Abstract Toronto: Blackie, 1991. p. 237.
- 199 SHALABY, A. S., GENGAHI, S., KHATTAB, M. Oil of *Melissa officinalis* L., as affected by storage and herb drying. **J. Essent. Oil Res.**, Wheaton, v. 7, p. 667-9, 1995.

- 200 SHARMA, A. K., PROKOPCZYK, B., HOFFMANN, D. Supercritical fluid extraction of moist snuff. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 39, p. 508-10, 1991.
- 201 SILVA, E. L. M. Coriaheptocins A and B, the first heptahydroxylated acetogenins, isolated from the roots of *Annona coriaceae*. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v. 60, p. 162-7, 1997.
- 202 SILVA, J. B. Novo método de extração de óleo essencial para fins analíticos. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 8, p. 183-6, 1970.
- 203 SILVER, A. H., KALINOSKI, H. T. Comparison of high-temperature gas chromatography and CO₂ supercritical fluid chromatography for the analysis of alcohol ethoxylates. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 69, p. 599-608, 1992.
- 204 SMITH, R. D., CHAPMAN, E. G., WRIGHT, B. W. Pressure programming in supercritical fluid chromatography. **Anal. Chem.**, Washington, v. 57, p. 2829-36, 1985.
- 205 SMITH, R. J., TAYLOR, D. R., WILKINS, S. M. Temperature dependence of chiral discrimination in supercritical fluid chromatography and high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 697, p. 591-6, 1995.

- 206 SMITH, R. M., BURFORD, M. D. Optimization of supercritical fluid extraction of volatile constituents from a model plant matrix. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 600, p. 175-81, 1992.
- 207 SNYDER, J. M., FRIEDERICH, J. P., CHRISTIANSON, D. D. Effect of moisture and particle size on the extractability of seeds with supercritical carbon oxide. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 61, p. 1851-6, 1984.
- 208 SNYDER, J. M., KING, J. W. Oilseed volatile analysis by fluid and thermal desorption methods. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 71, p. 261-5, 1995.
- 209 SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., GLAJCH, F. L. **Practical HPLC method development**. New York: Wiley, 1997, p. 103, 145-57.
- 210 SPANOS, G. A., CHEN, H., SCHWARTZ, S. J. Supercritical CO₂ extraction of β -carotene from sweet potatoes. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 58, p. 817-20, 1993.
- 211 STABY, A., MOLLERUP, J. Solubility of fish oil fatty acid ethyl esters in supercritical carbon dioxide. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 70, p. 583-8, 1993.
- 212 STAHL, E. Extraction of natural products with the means of supercritical gases. **Rev. Latinoam. Quim.**, Monterrey, v. 11, p. 1-7, 1980.

- 213 STAHL, E., GERARD, D. Solubility behaviour and fractionation of essential oils in dense carbon dioxide. **Perfum. Flavor.**, Wheaton, v. 10, n. 2, p. 29-33, 1985.
- 214 STAHL, E., GERARD, D. Hochdruckextraktion von naturstoffen mit überkritischen und verflüssigten gasen. **Parfuem. Kosmet.**, Heidelberg, v. 64, p. 237-40, 1983.
- 215 STAHL, E., GERARD, D. Hochdruckextraktion von naturstoffen mit überkritischen und verflüssigten gasen. **Parfuem. Kosmet.**, Heidelberg, v. 63, p. 117-9, 1982.
- 216 STAHL, E., GERARD, D. Hochdruckextraktion von naturstoffen mit überkritischen und verflüssigten gasen: entgiftung von wermutkraut. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, Berlin, v. 176, p. 1-12, 1983.
- 217 STAHL, E., QUIRIN, K. W. Dense gas extraction on a laboratory scale: a survey of some recent results. **Fluid Phase Equilib.**, Amsterdam, v. 10, p. 269- 72, 1983.
- 218 STAHL, E., QUIRIN, K. W. Entölung von rohlecithin durch hochdruck-düsenextraktion mit kohlendioxid. **Fette, Seifen, Anstrichm.**, Hamburg, v. 87, p. 219-22, 1985.
- 219 STAHL, E., QUIRIN, K. W. Extraction of natural substances with dense gases. **Pharm. Res.**, Stuttgart, p. 189-92, 1984.

- 220 STAHL, E., QUIRIN, K. W. Extraktion von naturstoffen mit verdichteten gasen. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 71, p. 181-3, 1984.
- 221 STAHL, E., QUIRIN, K. W., BLAGROVE, R. J. Extraction of seed oils with supercritical carbon dioxide: effect on residual proteins. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 32, p. 938-40, 1984.
- 222 STAHL, E., QUIRIN, K. W., GERARD, D. Solubilities of soybean oil, jojoba oil and cuticular wax in dense carbon dioxid. **Fette, Seifen, Anstrichm.**, Hamburg, v. 85, p. 458-61, 1983.
- 223 STAHL, E., QUIRIN, K. W., GERARD, D. **Dense gases for extraction and refining**. Ashworth: Springer-Verlag, 1987. p. 66-93.
- 224 STAHL, E., QUIRIN, K. W., GLATZ, A., GERARD, D., RAU, G. New developments in the field of high-pressure extraction of natural products with dense gases. **Ber. Bunsenges. Phys. Chem.**, Weinheim, v. 88, p. 900-7, 1984.
- 225 STAHL, E., QUIRIN, K. W., MANGOLD, H. K. Extraction and fractionation of complex lipid mixtures on a micro scale with dense carbon dioxide. **Chem. Phys. Lipids**, Shannon, v. 31, p. 313-7, 1982.

- 226 STAHL, E., QUIRIN, K. W., MANGOLD, H. K. Extraktion von lupinenöl mit überkritischem kohlendioxid. **Fette, Seifen, Anstrichm.**, Hamburg, v. 83, p. 472-6, 1981.
- 227 STAHL, E., QUIRIN, K. W., TOTANI, N. Extraction et fractionnement de lipides et d'autres produits naturels à l'aide de gaz supercritiques et liquéfiés. **Rev. Fr. Corps Gras**, Paris, v. 29, p. 259-63, 1982.
- 228 STAHL, E., SCHULTZ, E., MANGOLD, E. Extraction of seed oils with liquid and supercritical carbon dioxide. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 28, p. 1153-7, 1980.
- 229 STASHENKO, E. E., PUERTAS, M. A., COMBARIZA, M. Y. Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 752, p. 223-32, 1996.
- 230 STRINGHAM, R. W., BLACKWELL, J. A. Factors that control successful entropically driven chiral separations in SFC and HPLC. **Anal. Chem.**, Washington, v. 69, p 1414-20, 1997.

- 231 STRODE, J. T. B., TAYLOR, L. T. Optimization of electron-capture detector when using packed-column supercritical fluid chromatography with modified carbon dioxide. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 723, p. 361-9, 1996.
- 232 STRODE, J. T. B., TAYLOR, L. T., van BEEK, T. A. Supercritical fluid chromatography of ginkgolides A, B, C and J and bilobalide. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 738, p. 115-22, 1996.
- 233 SUN, R., SIVIK, B., LARSSON, K. The fractional extraction of lipids and cholesterol from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide. **Fat. Sci. Technol.**, Leinfelden-Echterdingen, v. 97, p. 214-9, 1995.
- 234 SUTTER, L. E. D. N., SILVA, M. F. F., CASSEL, E. Extração supercrítica, uma nova tecnologia industrial. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 14 Supl, p. 3-10, 1994.
- 235 TAYLOR, D. L., LARICK, D. K. Volatile content and sensory attributes of supercritical carbon dioxide extracts of cooked chicken fat. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 60, p. 1197-200, 1995.
- 236 TAYLOR, L. T. Strategies for the analytical SFE. **Anal. Chem.**, Washington, v. 67, p. 364A- 370A, 1995.

- 237 TAYLOR, L. T. **Supercritical fluid extraction: techniques in analytical chemistry**. New York: John Wiley, 1996. a) p. 1-124, b) p. 155-166.
- 238 TAYLOR, L. T. The supercritical fluid extraction and analysis of aged single-base propellants. **Am. Lab.**, v. 62, n. 2, p. 22-6, 1993.
- 239 TAYLOR, S. L., KING, J. W., LIST, G. R. Determination of oil content in oilseeds by analytical supercritical fluid extraction. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, 70, p. 437-9, 1993.
- 240 TAYLOR, S. L., KING, J. W., RICHARD, J. L., GREER, J. I. Analytical-scale supercritical fluid extraction of aflatoxin B1 from field-inoculated corn. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 41, p. 910-3, 1993.
- 241 TEHRANI, J. Successful supercritical fluid extraction strategies. **Am. Lab.**, v. 62, n. 2, p. 40HH-40MM, 1993.
- 242 TEKEL, J., VAVEKOVA, S., KOVACICOVA, M. H., HAVRANEK, E. A screening method for the determination of the residues of uracil herbicides in *Melissa officinalis* L. **Pharmazie**, Berlin, v. 49, p. 899, 1994.
- 243 TEKELOVA, D., FELKLOVA, M., MARTONFI, P., CERNAJ, P. Salvia officinalis L., schwankungen des gehaltes an komponenten im ätherischen öl einzelner krautteile. **Pharmazie**, Berlin, v. 49, p. 299-300, 1994.

- 244 TEMELLI, F. Extraction of triglycerides and Phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 57, p. 440-57, 1992.
- 245 TEMELLI, F., BRADDOCK, R. J., CHEN, C. S., NAGY, S. In: CHARPENTIER, B, A., SEVENANTS, M. R., eds. **Supercritical fluid extraction and chromatography: techniques and applications**. Washington: American Chemical Society, 1988. p. 109.
- 246 TEMELLI, F., CHEN, C. S., BRADDOCK, R. J. Supercritical fluid extraction in citrus oil processing. **Food Technol.**, Chicago, v. 46, p. 145-50, 1988.
- 247 TEMELLI, F., LeBLANC, E., FU, L. Supercritical CO₂ extraction of oil from atlantic mackerei (*Scomber scombrus*) and protein functionality. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 60, p. 703-6, 1995.
- 248 TENE, M. T., VALCÀRCEL, M., HIDALGO, P. J., UBERA, J. L. Supercritical fluid extraction of natural antioxidants from rosemary: comparison with liquid solvent sonification. **Anal. Chem.**, Washington, v. 69, p. 521-6, 1997.

- 249 TOEWS, K. L., SHROLL, R. M., WAI, C. M. pH-defining equilibrium between water and supercritical CO₂. Influence on supercritical fluid extraction of organics and metal chelates. **Anal. Chem.**, Washington, v. 67, p. 4040-3, 1995.
- 250 TONNESEN, H. H., ARRIETA, A. F., LERNER, D. Studies on curcumin and curcuminoids. **Pharmazie**, Berlin, v. 50, p. 689-93, 1995.
- 251 TREASE, G. E., EVANS, W. C. **Pharmacognosy**. 14. ed., London: W. B. Saunders, 1996. P. 120.
- 252 UM, K. W., BAILEY, M. E., CLARKE, A. D., CHAO, R. R. Concentration and identification of volatile compounds from heated beef fat using supercritical CO₂ extraction-gas liquid chromatography/mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 40, p. 1641-6, 1992.
- 253 UNITED States pharmacopeia. 19. ed. Easton: Mack, 1974.
- 254 UNITED States pharmacopeia. 20. ed. Easton: Mack, 1979.
- 255 VEGA, P. J., BALABAN, M. O., SIMS, C. A., O'KEEFE, S. F., CORNELL, J. A. Supercritical carbon dioxide extraction efficiency for carotenes from carrots by RSM. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 61, p. 757-9, 765, 1996.

- 256 VELDE, E. G., HAAN, W., LIEM, A. K. D. Supercritical fluid extraction of polychlorinated biphenyls and pesticides from soil. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 626, p. 135-43, 1992.
- 257 VERSCHUERE, M., SANDRA, P. Fractionation by SFE and microcolumn analysis of the essential oil and the bitter principles of hops. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v. 30, p 388-91, 1992.
- 258 WASICKY, Ro. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 1, p. 63-9, 1963.
- 259 WEHLING, R. L., FRONING, G. W., CUPPETT, S. L., NIEMANN, L. Extraction of cholesterol and other lipids from dehydrated beef using supercritical carbon dioxide. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 40, p. 1204-7, 1992.
- 260 WENCLAWIAK, B. W., HEEMKEN, O. P., STERZENBACH, D., SCHIPKE, J., THEOBALD, N., WEIGELT, V. Device for efficient solvent collection of environmentally relevant compounds in off-line supercritical fluid extraction. **Anal. Chem.**, Washignton, v. 67, p. 4577-80, 1995.
- 261 WESTWOOD, S. A. **Supercritical fluid extraction** and its use in chromatographic sample preparation. Glasgow: Blackie, 1993. 170p.

- 262 WIGFIELD, Y. Y., LANOUEITE, M. Supercritical fluid extraction of the fortified residues of fluazifop- P- butyl (fusilade II) and its major metabolite, fluazifop-P, in onions. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 41, p. 84-8, 1993.
- 263 WILKINS, S. M., TAYLOR, D. R., SMITH, R. J. Enantiomer separations by supercritical fluid chromatography on chiral stationary phase physically anchored to porous graphitic carbon. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 697, p. 587-90, 1995.
- 264 WILLIAMS, K. L., SANDER, L. C., WISE, S. A. Comparison of liquid and supercritical fluid chromatography using naphthylethylcarbamoyleated- β -cyclodextrin chiral stationary phases. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 746, p. 91-101, 1996.
- 265 XIE, Q. L., MARKIDES, K. E., LEE, M. L. Supercritical fluid extraction/supercritical fluid chromatography with fraction collection for sensitive analytes. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v. 27, p. 365-70, 1989.
- 266 YAMADA, A., EZAKI, Y., MATSUO, K., YARITA, T., NOMURA, A. Supercritical fluid chromatography of free resin acids on an ODS-silica gel column. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 709, p. 345-9, 1995.

- 267 YE, Q., SHI, G., HE, K., McLAUGHLIN, J. L. Chlorinated annonaceous acetogenins and their bioactivities. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v. 59, p. 994-6, 1996.
- 268 YEH, AN-I., LIANG, J. H., HWANG, L. S. Separation of fatty acid esters from cholesterol in esterified natural and synthetic mixtures by supercritical carbon dioxide. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 68, p. 224-9, 1991.
- 269 YONKER, C. Y., SMITH, R. D. Pressure and composition gradients in capillary supercritical fluid chromatography. **Anal. Chem.**, Washington, v. 59, p. 727-31, 1987.
- 270 YOUNG, J. C., GAMES, D. E. Supercritical fluid extraction and supercritical fluid chromatography of the fungal metabolite ergosterol. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 41, p. 577-81, 1993.
- 271 YOUNG, L. W. Supercritical fluid extraction. In: ANNUAL MEETING SPEECH, Iowa, 1994. **Abstracts**. Broadacaster, 1994, p.11-5.
- 272 YOUNG, T. M., WEBER Jr., W. J. Equilibrium and rate study of analyte-matrix interactions in supercritical-fluid extraction. **Anal. Chem.**, Washington, v. 69, p.1612-9, 1997.

- 273 ZHE-MING, G., ZHOU, D., WU, J., SHI, G., ZENG, L., McLAUGHLIN, J. L. Screening for annonaceous acetogenins in bioactive plant extracts by liquid chromatography/mass spectrometry. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v. 60, p. 242-8, 1997.