UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA
DAS SEMENTES DO GUARANÁ (*Paullinia cupana* Kunth,
Sapindaceae)**

ALDO ADOLAR MAUL

Tese para obtenção do Grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Tit. João Fernandes Magalhães

São Paulo

2001

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Maul, Aldo Adolar
M449v. Validação de método de extração supercrítica das sementes do
guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) / Aldo Adolar
Maul. -- São Paulo, 2001.
230p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Magalhães, João Fernandes

1. Medicamento : Controle de qualidade 2. Tecnologia
farmacêutica 3. Farmacognosia I. T. II. Magalhães, João
Fernandes, orientador.

615.19015 CDD

ALDO ADOLAR MAUL

**Validação de Método de Extração Supercrítica das Sementes do
Guaraná (*Paullinia Cupana* Kunth, Sapindaceae)**

Comissão julgadora
da
Tese para obtenção do Grau de Doutor

Prof. Tit. João Fernandes Magalhães
Orientador e presidente

Prof. Dr. Renato Najjar

1° examinador

Prof. Dr. Gerson Luiz Vieira Coelho

2° examinador

Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz

3° examinador

Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo

4° examinador

São Paulo, 20 de fevereiro de 2002.

“Doing a through method validation can be tedious, but the consequences of not doing it right are wasted time, money, and resources”. Green, M. J.

“Executar um método de validação completo pode ser cansativo, mas as conseqüências de não fazê-lo direito são desperdício de tempo, dinheiro e recursos”.

Dedico este trabalho:

Á 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 a 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 acertos e 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 de doutor.

Ao Prof. Titular João Fernandes Magalhães, 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 a utilização de solventes orgânicos tóxicos na extração de substâncias ativas, produtos farmacêuticos, alimentícios e cosméticos.

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

Ao Prof. Dr. Gerson Luis Vieira Coelho e ao Dr. Pedro Luiz M. Penedo do Laboratório de Processos de Separação-Departamento de Tecnologia Química (IT/UFRRJ) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, R.J., pelo empréstimo das instalações, equipamentos, reagentes e múltiplas ajudas oferecidas.

À Elisabete Claro de Souza Paiva, secretária do Departamento de Farmácia e ao Luis Carlos Caous, pelo apoio e carinho durante estes anos.

À diretoria da firma White Martins S.A., Rio de Janeiro, pelo empréstimo do aparelho extrator com fluidos supercríticos 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 da Universidade Anhembi Morumbi pelo apoio financeiro, técnico e incentivo recebido.

À diretoria do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas (UniFMU) pelo apoio financeiro, técnico e incentivo recebido.

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

À diretoria das firmas Bayer do Brasil S.A., Petrobrás S.A. e Quest International S.A., pelo suporte analítico, visitas e padrões analíticos.

Aos membros da Secretaria da Pós-Graduação, Benedita Espírito Santo de Oliveira, Elaine Midori Ychico e Jorge Alves de Lima, pelo apoio, pela paciência e múltiplos auxílios prestados.

Aos professores, pós-graduandos e funcionários e colegas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelas oportunas sugestões, pela compreensão, pelos múltiplos auxílios e inestimável apoio, pelo ensinamento que proporcionaram, pela boa receptividade e votos de confiança ao longo dos cinco mandatos consecutivos que exerci como representante junto à Congregação desta Faculdade, pela gentileza e paciência, pelo estímulo e companheirismo com que sempre me trataram.

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

SUMÁRIO

ÍNDICE.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xvii

ÍNDICE

Capítulo	página
1.INTRODUÇÃO-----	19
2.OBJETIVOS-----	32
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	33
3.1-Fundamentos da extração por fluidos supercríticos-----	33
3.1.1-Datas importantes na extração por fluidos supercríticos.....	33
3.1.2-Aplicações industriais.....	34
3.1.3-Exemplos comerciais.....	35
3.1.4.Operações industriais.....	36
3.1.5-Diferenças com os métodos tradicionais.....	37
3.2-Fundamentos da validação de processos farmacêuticos.....	38
3.2.1-Conceitos.....	38
3.2.2-Metodologia citada.....	39

3.2.3-O que é uma validação de método?	45
3.2.4-Estabelecimento de critérios mínimos.	47
3.2.5-Demonstrar especificidade.	48
3.2.6-Demonstrar linearidade.	50
3.2.7-Demonstrar exatidão.	53
3.2.8-Determinar a faixa.	55
3.2.9-Determinar a precisão-etapa 1 ^a .	56
3.2.10-Ampliando o alcance.	57
3.2.11-Estabelecimento do limite de detecção.	58
3.2.12-Estabelecimento do limite de quantificação.	58
3.2.13-Estabelecer estabilidade.	58
3.2.14-Estabelecer precisão-etapa 2 ^a .	61
3.2.15-Ele é robusto?	62
3.2.16-Fazê-lo certo na primeira vez.	63
3.2.17-Validação do método de extração supercrítica.	64
3.2.17.1-Conceitos.	64
3.2.17.2-Tipos de validação de método.	64
3.2.17.3-Exatidão,-considerações oficiais e usuais.	65
3.2.17.4-Precisão,-considerações oficiais e usuais.	66
3.2.17.5-Linearidade.	49
3.2.17.6-Intervalo (amplitude).	68
3.2.17.7-Erros.	68
4.OS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.	70
4.1-Propriedades dos fluidos supercríticos.	78
4.1.1-Densidade.	79
4.1.2-Viscosidade.	80
4.1.3-Difusão.	81
4.1.4-Poder de solvatação.	81
4.2-Modificadores.	85
4.3-Extração por fluido supercrítico.	87
4.3.1-O dióxido de carbono supercrítico.	91

4.3.2-Vantagens e desvantagens da extração por fluidos supercríticos.....	94
4.3.2.1-Vantagens.....	94
4.3.2.2-Desvantagens.....	96
4.3.3-Aparelhagem.....	100
4.3.3.1-A fonte do fluido supercrítico.....	100
4.3.3.2-A bomba de alta pressão.....	101
4.3.3.3-O extrator.....	104
4.3.3.4-O separador.....	105
4.3.3.5-Os acessórios.....	105
4.3.4-Otimização da extração por fluidos supercríticos.....	106
4.3.5-Extração de sólidos.....	109
4.3.6-Extração de líquidos.....	110
5.PARTE EXPERIMENTAL.....	112
5.1-Material.....	112
5.1.1-Equipamento de extração por fluido supercrítico.....	112
5.1.2-Outros materiais e aparelhos.....	114
5.1.3-Matérias primas e reagentes.....	117
5.1.3.1-Matérias primas.....	117
5.1.3.1.1-Sementes de guaraná.....	117
5.1.3.2-Solventes.....	118
5.1.3.3-Reagentes.....	120
5.1.3.4-Gases.....	121
5.1.3.5-Cafeína padrão.....	122
5.2-Métodos.....	122
5.2.1-Preparação das amostras.....	104
5.2.2-Processos de extração.....	124
5.2.2.1-Extração por solventes.....	125
5.2.2.2-Extração por fluido supercrítico.....	127
5.2.3-Extração de amostras e análises efetuadas.....	129
5.2.3.1-Extrato de guaraná.....	129
5.2.3.2-Análises efetuadas.....	130

6-RESULTADOS.....	134
6.1-Extrato de guaraná.....	134
6.2-Análise estatística.....	138
7-DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	154
8-CONCLUSÕES.....	168
9-RESUMO.....	171
10-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	172
11-ANEXOS.....	227
11.1-Procedimento para a extração por fluido supercrítico usando a recirculação do gás dióxido de carbono.....	227
11.2-Procedimento para a extração por fluido supercrítico desligando somente o extrator.....	228
11.3- Procedimento para a extração por fluido supercrítico desligando totalmente o aparelho de extração supercrítica.....	229

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
I-Propriedades físicas de alguns solventes comuns ordenados pela temperatura crítica-----	78
II-Parâmetros de solubilidade de Hildebrand de algumas substâncias-----	85
III-Comparações entre a extração com solventes no aparelho Soxhlet e a extração com fluidos supercríticos -----	91
IV-Comparação da ordem de magnitude das propriedades físicas de gases, líquidos e fluidos supercríticos.-----	94
V-Composição de sementes de guaraná (% base seca)-----	118
VI-Análises granulométricas da amostra de sementes de guaraná inteiras ---	123
VII-Análises granulométricas de uma amostra de sementes de guaraná partidas.-----	123
VIII-Abertura de malha dos tamises, segundo a Farmacopéia Brasileira, 2ª edição, página 666.-----	127
IX-Teores de cafeína recuperados com a extração por fluido supercrítico da cafeína padrão acrescentada-----	135
X-Análise descritiva dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Maués (PA) e de Alta Floresta (MT).-	139
XI-Análise estatística descritiva dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico de sementes de guaraná provenientes de Alta Floresta (MT).-----	139
XII-Análise estatística descritiva dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Alta Floresta (MT).-----	140

XIII-Análise estatística descritiva dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico das sementes de guaraná provenientes de Maués.	141
XIV-Análise estatística descritiva dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Maués.	141
XV-Análise descritiva dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Alta Floresta.	141
XVI-Análise ANOVA dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Alta Floresta.	142
XVII-Análise descritiva dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Maués.	142
XVIII-Análise ANOVA dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Maués.	143
XIX-Análise de REGRESSÃO dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico das sementes de guaraná provenientes de Maués e de Alta Floresta.	143
XX-Análise de regressão dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Maués.	143
XXI-Correlações com os coeficientes da análise de regressão dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico da cafeína adicionada e recuperada.	144
XXII-Coefficientes da análise de regressão dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração supercrítica a partir da cafeína padrão adicionada e recuperada.	146

XXIII-Diagnósticos de colinearidade da análise de regressão dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração supercrítica da cafeína adicionada e recuperada.-----	147
XXIV-Resíduos estatísticos da análise de regressão dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração supercrítica da cafeína padrão adicionada e recuperada.-----	147
XXV-Análise granulométrica de uma amostra de sementes de guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Kunth, Sapindaceae) moída.-----	157
XXVI-Solubilidade da cafeína pura no dióxido de carbono supercrítico a 40°C.-----	158
Quadro 1: Equivalência de valores de pressão de diferentes notações nacionais e internacionais-----	161

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1-Fórmula estrutural da cafeína (1,3,7, trimetil-xantina-----	31
2-Diagrama de fases do bióxido de carbono-----	76
3-Curva de Andrews para o bióxido de carbono-----	76
4-Diagrama de fase, comum a qualquer substância-----	77
5-Variação da densidade do bióxido de carbono com a pressão, a diversas temperaturas-----	84
6-Fluxograma de um sistema de extração com fluido supercrítico-----	88
7-Diagrama de processo de extração por fluido supercrítico-----	88
8-Aparelho de extração por fluido supercrítico, PPI FC modelo ES-204, da White Martins S.A., Rio de Janeiro, RJ-----	97
9-Unidade de extração por fluido supercrítico com capacidade para 450 L, pertencente a firma Messer-Griesheim, Düsseldorf, Alemanha-----	98
10-Unidade de extração supercrítica industrial, pertencente a indústria Flavex, em Rehlingen, Alemanha-----	99
10a-Típica operação intensificadora de estágio simples-----	102
11-Bomba de alta pressão (compressor), em azul, mostrando também, na parte lateral esquerda superior o vaso de mistura do cossolvente-----	103
12-Cromatograma GC obtido da extração com CO ₂ supercrítico de pimenta preta-----	107
13-Aparelho de extração por fluido supercrítico, 1 litro de capacidade, acoplado a cromatógrafo a gás, pertencente ao Laboratório de Processos de Separação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.-----	116
14-Sementes de guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Kunth, Sapindaceae) como se encontram no guaranzeiro, em estado natural-----	119
15-Unidade de fabricação de café descafeinado, em Düsseldorf, na Alemanha-----	120

16-Gráficos sobrepostos das análises dos extratos de guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Kunth, Sapindaceae) obtidos pelos dois processos empregados por derivada primeira no aparelho Ergo Ultra VGA Vectro XM da Hewlett Pachard, modelo 8453-----	136
17-Gráficos sobrepostos das análises dos extratos de guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Kunth, Sapindaceae) obtidos pelos dois processos empregados, avaliados por derivada segunda no aparelho Ergo Ultra VGA Vectro XM da Hewlett Pachard, modelo 8453-----	137
18-Gráfico das médias dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Alta Floresta (MT).-----	140
19-Gráfico das médias dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Maués (PA).-----	144
20-Representação Boxplot dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração supercrítica das sementes de guaraná provenientes do município de Alta Floresta (MT).-----	148
21-Gráfico dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração das sementes de guaraná provenientes dos municípios de Alta Floresta (MT) e Maués (PA).-----	149
22-Representação Boxplot dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração com solventes no aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes do município de Alta Floresta (MT)-----	150
23-Gráfico de médias dos teores de cafeína recuperados, obtidos com o processo de extração supercrítica, da cafeína adicionada de 80, 100 e 120% do valor teórico estimado.-----	151
24-Gráfico Boxplot da porcentagem de teores de cafeína recuperados da matriz, obtidos pela extração supercrítica, considerando os valores recuperados após a adição de 80, 100 e 120% de cafeína padrão sobre o valor teórico estimado.-----	152

25-Representação de um gráfico 'Scatterplot', mostrando os teores de cafeína obtidos com os dois processos de extração, com as sementes de guaraná das duas regiões diferentes testadas.-----	153
26-Solubilidade da cafeína pura (em fração molar/ 20×10^{-4}) no CO ₂ supercrítico a 40, 50 e 60°C e pressões de 150 a 375 bars.-----	156

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

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Os fluidos supercríticos são conhecidos há mais de um século, sendo chamados inicialmente de gases comprimidos.

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 alta pressão (326,334).

Em 1947, Messmore, obteve uma patente para a retirada do asfalto do petróleo usando fluidos supercríticos (96,130,139,243).

As extrações com fluidos supercríticos começaram a ser usadas na década de 1970 em escala industrial. Muitas patentes foram requeridas, principalmente, sobre a descafeinação do café, a extração do lúpulo e condimentos (2,92,110,139,173,245,299,322).

Um desenvolvimento significativo na extração por fluidos supercríticos, veio com a patente de Zosel (242,326), que incentivou estudos posteriores intensivos. Em 1970, ele reportou a descafeinação de sementes de café verdes com CO₂ supercrítico (2, 242, 264). 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 como um modificador ou cossolvente (291).

As técnicas para a extração de componentes ativos de insumos naturais evoluíram significativamente nos últimos anos (242,326,334).

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” ou enfloração, que consiste na absorção de substâncias voláteis de flores e plantas em gorduras (242,326,334).

Mais tarde, no caso de produtos voláteis, predominou a destilação direta e a destilação por arraste de vapor d’água.

Nos últimos anos, o processo de extração de matérias primas vegetais por diversos solventes, como por exemplo, o 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, chamado de oleorresina.

Cada um desses processos pode fornecer ingredientes de aromas e odores de altíssima qualidade a partir de vegetais, entretanto, a temperatura elevada (da destilação) e o uso de solventes, podem levá-los a divergir da qualidade original (145,159,226).

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 (253,254,255).

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 (167,253,254,256).

Muitos dos métodos de extração líquido-líquido e líquido-sólido, atualmente em uso, foram desenvolvidos antes do século vinte ou no início deste.

Igualmente significativa do ponto de vista ambiental é que os extratos líquidos resultantes destas extrações convencionais devem ser severamente reduzidos em volume, geralmente por evaporação, de modo a atender especificações da ordem de partes-por-bilhão (ppb).

Assim, a concentração da amostra não só é antieconômica e demorada, mas pode levar a emissão de gases de solventes venenosos na atmosfera.

O programa voluntário 33-50 da agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA-U.S. Environmental Protection Agency) foi designado para reduzir o uso de solventes orgânicos no futuro.

A meta do programa era a redução do uso em 33% de 17 produtos químicos selecionados até 1992 e de 50% de redução dos mesmos produtos até 1995, calculados e medidos sobre o inventário mundial de emissões tóxicas de 1988.

A partir de 1996, a comunidade científica e especialmente os analistas químicos deveriam encontrar meios solventes mais benignos e substituir todos os organo-clorados, os hidroclorofluorcarbonetos e os demais solventes tóxicos, como os cianetos, o benzeno, o tolueno, os xilenos, os clorados, a metiletilcetona, a metilisobutilcetona, o tetracloroetileno, o tricloroetileno, o tricloroetano, etc.

Os processos de extração supercrítica destacam-se nas seguintes características atuais como sendo 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 obtidos e
- a extração de produtos de alta qualidade, a custos e temperaturas relativamente baixos (14,196,283,326).

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 orgânicos. 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 (93,124,283,326).

O dióxido de carbono é tido como um dos principais gases industriais responsáveis pelo efeito estufa. Este efeito tem causado ao longo dos últimos 50 anos um aquecimento global do planeta.

O desenvolvimento da concentração de dióxido de carbono na atmosfera passou de 325 partes por milhão (ppm) em 1970 para 365 ppm no ano 2000, causando um gradual aumento da temperatura global, passando a ser uma preocupação constante dos membros da comunidade mundial, que através de reuniões da ONU, estabeleceram o protocolo de Kyoto.

Segundo este protocolo, todos os países industriais juntos teriam que reduzir a emissão de gases industriais em 5,2%. O protocolo de Kyoto contém planos de emissão especiais de redução dos gases de efeito estufa para cada país industrial.

No espaço entre 2008 e 2012, a maioria dos países da Europa ocidental deverá reduzir suas emissões em 8% frente ao ano de 1990. Os EUA e o Japão, uma redução de 6%. Países grandes da Europa oriental, como a Rússia e a Ucrânia, podem manter seu nível. Outros países como a Austrália ou a Noruega, podem até mesmo aumentar a sua emissão de gás de efeito estufa.

A conferência sobre o clima de Haia foi um fracasso, porque o presidente Bush, dos Estados Unidos, responsáveis por um terço das emissões dos países industrializados, declarou nulo o protocolo de Kyoto. “Se os cidadãos do seu país tivessem que reduzir seu consumo de energia em mais de um terço, uma tal economia de energia iria reprimir o desenvolvimento econômico do seu país”, afirmou.

Em julho de 2001, em Bonn, na Alemanha, a Comunidade dos Estados chegou a um consenso para salvar o protocolo de Kyoto: todos os países industriais, exceto os EUA, se comprometeram a não ultrapassar as quotas de emissão fixadas anteriormente (Revista Deutschland, Frankfurt: Societaets-Verlag, n. 4, p. 8-11, 2001)

Nossa proposta é a de transformar o dióxido de carbono em solvente industrial de escolha, apropriado para extrações de substâncias ativas e outras aplicações industriais, em substituição aos solventes tóxicos e poluentes, reduzindo em grande escala a sua concentração na atmosfera.

Muitos trabalhos científicos foram desenvolvidos e apresentados nos anos 90, enaltecendo e ampliando as aplicações da extração por fluidos supercríticos nos mais diversos campos de atuação da tecnologia, mas não houve a preocupação correspondente por parte dos pesquisadores à validação do método, isto é, a comprovação se o método é confiável ou não (200,201,204,205,206,207,208).

Atualmente, a sociedade exige, nas diferentes atividades, qualidade, produtividade, custos e preços compatíveis com as leis do mercado. Em razão disso, a validação de métodos e processos ganha importância cada vez maior nas empresas, como um dos fatores determinantes para se alcançar esses objetivos (44,60,148,174).

Este estudo, além de conscientizar os especialistas para a importância do tema da validação de métodos e processos, deverá servir de orientação nos procedimentos a serem adotados, visando a se obter resultados e não simplesmente números, com o uso da extração por fluidos supercríticos (76).

A definição do FDA (Food and Drug Administration), para validação de processo farmacêutico, no "General Principles of Validation Guideline" é a seguinte (122,135): Validação de processo farmacêutico é um programa documentado que fornece um alto grau de garantia de que um processo específico consistentemente produzirá um produto atendendo suas especificações predeterminadas e seus atributos de qualidade.

Na área farmacêutica, a validação de processos, equipamentos, instalações e metodologia analítica está plenamente aceita como atividade necessária e que tem produzido excelentes resultados na melhoria do desempenho industrial e da qualidade dos produtos farmacêuticos fabricados (135,136,174,192).

A validação é definida como o estabelecimento de evidências experimentais documentadas às quais fornecem um alto grau de segurança de que um processo ou método produzirá consistente e sucessivamente um produto que atenderá às características e especificações de qualidade.

Além da validação de métodos analíticos desenvolvidos para o controle de qualidade de medicamentos e de insumos farmacêuticos (1,8,15,31,42,43,56,88,138,146,158,260), merece destaque a validação de processos para uso industrial.

Pode-se dizer que a falta de metodologia adequada para a avaliação da qualidade de produtos farmacêuticos limitará a eficiência do programa de validação.

A validação se constitui numa exigência quando da implantação de um novo processo industrial.

Tratando-se de metodologia, a validação é a etapa essencial e inicial de um programa de fabricação bem estruturado.

Há muitas propostas nesta área descrevendo os parâmetros principais que devem ser considerados para avaliação de desempenho de um método industrial ou de pesquisa, dentro de um programa de validação (118,216,235,260,267,349).

Do ponto de vista oficial, a 24ª edição da Farmacopéia Americana (345) resume de maneira clara os atributos que um método analítico deve apresentar. São eles: exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e intervalo de aceitação.

Todos estes atributos são exigidos para os métodos encontrados no código oficial americano e foram avaliados nos laboratórios destinados para este fim específico.

Mesmo para um processo já validado, em função de alguma alteração que pode ocorrer, há a necessidade de novos estudos e de uma nova validação do processo (106).

Estas alterações podem ser exemplificadas como a mudança na composição dos produtos, a substituição parcial ou total de equipamentos, a variação na escala de produção do lote, a substituição de um fornecedor de matéria prima, reagente e equipamentos, o uso de método por um longo período e por transferência de metodologia de um laboratório para outro (118,147,174,192).

Com relação a transferência de metodologia, deve-se lembrar que na indústria é comum a transferência do método estudado em um laboratório

de desenvolvimento farmacotécnico para um laboratório de produção industrial, em maior escala (106,118,147).

Considerando os fatores que interferem no desempenho dos processos industriais, a adoção de um novo processo ou procedimento revisado envolve a garantia de que além da validação existem evidências claras que justifiquem as vantagens do processo em relação a outros já anteriormente existentes.

É fácil compreender que há discrepâncias no julgamento do mérito de cada caso uma vez que este pode ser influenciado por fatores subjetivos e circunstanciais.

De todos os parâmetros citados, três são obrigatoriamente necessários em qualquer caso de validação, seja ele de metodologia analítica ou de processos de fabricação, que são: a exatidão, a precisão e a linearidade (56,76,147,174,192).

Levando em consideração que o processo da extração usando fluidos supercríticos, embora assumindo cada vez mais importância nos processos extrativos de medicamentos, alimentos e insumos farmacêuticos, não mereceu, ainda um estudo profundo de validação de processo, procurou-se estudar os principais aspectos da validação do processo extrativo por fluidos supercríticos.

Quando se fixou o propósito de estudar a validação do processo de extração supercrítica, optou-se pelo guaraná. Para tanto, foram selecionadas as sementes do guaranazeiro (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) como protótipo.

Levou-se em conta que são sementes de uma planta brasileira de grande interesse comercial e que tem como principal componente químico a 1,3,7-trimetilxantina, substância conhecida entre nós como cafeína (212,294).

Guaraná, nome dado pelos índios às sementes da árvore *Paullinia cupana*, é um importante legado da civilização aborígene ao bem estar da humanidade. Os índios Maués consideravam o guaraná como uma planta sagrada e mastigavam as sementes para aumentar sua vitalidade quando saíam para as lutas, durante as guerras (39,47,65,70).

Pesquisas confirmam que as sementes moídas de guaraná são fonte inigualável de energia, além de ter propriedades terapêuticas (102,115,116,317). O guaraná é um regulador do ritmo cardíaco e preventivo da arteriosclerose, proporcionando uma velhice sadia.

O guaranazeiro cresce naturalmente na Amazônia brasileira, desde a região ocidental do rio Tapajós até a bacia do rio Madeira (317).

O guaraná é conhecido desde 1669 como estimulante e regenerador do organismo. Preparado ainda pôr muitas tribos da mesma forma como ficou conhecido e como consta na Farmacopéia Brasileira, 2ª edição: a de bastões obtidos das amêndoas (90,91,317).

O método tradicional de preparar os bastões de guaraná consiste em retirar as sementes depois de os frutos serem colhidos e descascados. As sementes são limpas e torradas em fogo lento durante 6 horas, em forno de barro.

Tiram-se as películas que as envolvem, antes de reduzi-las a uma pasta, socando em pilões de madeira. Adiciona-se água para formar o “pão” e procede-se à secagem ao sol ou numa estufa pôr 30 dias.

O guaraná, atualmente, é comercializado na forma de pó ou em rama (sementes torradas). O guaraná é amplamente difundido no Brasil e conhecido como poderoso afrodisíaco (276,315,317).

Os constituintes do guaraná são: cafeína, amidos, óleos fixos, ácidos caprotânico, matérias resinosas, aromáticas ou pépticas, fibras, gomas, taninos, saponinas, fosfato, teobromina, fósforo, potássio, etc (39,68,187,231).

As ações do guaraná relatadas são como ação estimulante, energética, estimulante do apetite, adstringente, afrodisíaca e tônica.

As propriedades farmacológicas do guaraná, devido à presença de xantinas, atuam sobre a circulação promovendo vaso dilatação pôr ação direta sobre a musculatura vascular (154).

As metil-xantinas têm um efeito pronunciado sobre o metabolismo celular, estimulando os processos químicos associados sobre a musculatura e ao sistema nervoso central (154,317).

A cafeína tem ação sobre o músculo estriado que promove uma maior produção de ácido láctico, aumentando o consumo de oxigênio e como consequência há uma contração muscular mais forte.

Esses efeitos são associados a uma liberação espontânea prolongada de calor, a qual dura até depois do músculo ficar relaxado. Na

totalidade de suas propriedades torna-se um tônico eficaz, recuperando o organismo da fadiga (286,338,342).

A presença de taninos no guaraná age sobre a secreção intestinal, normalizando-a.

Existem muitos métodos para a quantificação da cafeína em produtos naturais. Esses métodos incluem a cromatografia em fase gasosa, a cromatografia em fase líquida de alta resolução e a cromatografia em camada delgada (6,22,40).

A Farmacopéia Brasileira tem sido ao longo de suas revisões, o único código oficial que apresenta monografia para o guaraná e, em sua penúltima edição (1977) estabelece para as sementes de guaraná, teores de cafeína que variam de 3,25% a 6,98%, obtidos com o método oficial, que adotamos neste nosso trabalho (87,90,91,345,346,347).

A cafeína, também conhecida como teína, guaranina e metil teobromina tem a fórmula molecular $C_8H_{10}N_4O_2$, peso molecular de 194,19 e quimicamente é a 3,7-diidro,1,3,7-trimetil, 1H-purina, 2,6-diona, 1,3,7-trimetilxantina (212,295) ou 1,3,7-trimetil, 2,6-dioxopurina (Figura 1, página 31).

A cafeína é um fármaco de grande aplicação terapêutica e já bastante estudada no aspecto analítico e obtida por outros processos tradicionais de extração, como a extração por solventes no aparelho Soxhlet.

Apesar destas suas inegáveis propriedades terapêuticas, sofre restrições ao uso em alimentos, refrigerantes e confeitados, no mercado Europeu e Norte Americano, por exercer ação maléfica sobre os rins, o fígado e o sistema nervoso (6,40,72).

Para o desenvolvimento deste estudo, foram selecionadas algumas técnicas, obtidas de levantamento bibliográfico, adaptando-as às necessidades do estudo, não descartando a possibilidade de eventuais modificações dos procedimentos e do processo adotado em si (153,154,202,203,240).

Com os resultados obtidos, procurou-se avaliar o desempenho do método de extração por fluido supercrítico, comparando-o com os obtidos pelo método tradicional, a extração por solventes e indicando um processo que poderia ser aplicado nos diferentes equipamentos, com pequenas adaptações, em particular naqueles laboratórios com limitação de equipamentos e instalações mais sofisticados (154,240,285,291).

Figura 1: Fórmula estrutural da cafeína (1,3,7,trimetil-xantina) (212,295).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

O presente trabalho tem por finalidade principal validar o método de extração supercrítica das sementes do guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae), procedentes de duas localidades diferentes: do município de Maués, Pará e do município de Alta Floresta, Mato Grosso, utilizando o dióxido de carbono (CO₂) como solvente e o aparelho de extração supercrítica da firma White Martins S.A. PPI FC, modelo ES-204, Rio de Janeiro, RJ.

O principal parâmetro a ser avaliado será a presença da cafeína (1,3,7, trimetil-xantina) nos extratos obtidos, comparado à padrão autêntico de grau analítico (295).

Este método será comparado a extração por método tradicional, como a extração por solvente hidroalcoólico, utilizando o aparelho extrator de Soxhlet e as sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) das mesmas duas procedências (Maués P.A. e Alta Floresta M.T.).

Faz parte do trabalho, uma revisão bibliográfica sobre a extração por fluidos supercríticos, sobre a validação de métodos analíticos e sobre a validação de processos farmacêuticos.

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – FUNDAMENTOS DA EXTRAÇÃO POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

3.1.1. - DATAS IMPORTANTES NA EXTRAÇÃO POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (121, 209, 264, 326,355)

1822 - Cagniard de la Tour descobriu 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 de estado supercrítico e a lei dos estados correspondentes.

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

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).

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

3.1.2. – APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

Pela extração por fluidos supercríticos (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 (51,53,77,79,84,99,100, 133,142,152,159,221,224,305,310,316,330,332,367);
- * processamento de produtos comestíveis e suplementos alimentícios (9,11,26,38,45,49,50,51,59,74,85,105,161,165,183,225,230,271,324,344);
- * purificação de polímeros (189,190,191);
- * extração e refino de óleos comestíveis (4,33,74,80,105,131, 134,137,167,188,195, 196,198,268,282,362);
- * concentração de óleos cítricos (108,210,220,230,256,322);
- * extração e fracionamento de óleos de sementes e ácidos graxos (71,101,194,214,228,229,292,307,311,312,314,328,362);
- * extração de aromas e insumos para cosméticos (25,41,104,185,223, 257,277,280);

- * extração de inseticidas naturais, pesticidas e contaminantes artificiais (5,53,82,100,103,191,193,239,258,273,281,301,329,331,350,356,361);
- * extração de corantes naturais (75,109,185,263,277);
- * extração de gorduras de amidos (132,263);
- * extração da lecitina pura da lecitina bruta (198,304,309,311);
- * separação do colesterol do ovo, leite e carnes (26,50,137,186,234,321,353,362);
- * extração rápida de produtos naturais (83,136,139,140,150,151,275,279,280,294,300,302,304,309,313,325,425,347);
- * separação de compostos aromáticos de produtos do petróleo (108,237,292,327,340);
- * extração de hidrocarbonetos líquidos do carvão de pedra, da hulha e do solo (113,190,237,243,244,273);
- * obtenção de extratos de condimentos em geral (86,92,211,241,308);
- * extração e fracionamento de óleos essenciais (98,102,125,126,158,201,217,249,251,253,259,262,270,297);
- * extração de produtos farmacêuticos (57,73,112,138,139,150,219);
- * extração de produtos de fermentação microbiana (64,268,364);
- * análises cromatográficas (SFC) (5,10,16,17,18,23,24,30,35,36,37,54,66,78,95,110,141,144,149,151,155,157,163,168,169,172,177,180,181,182,222,227,232,238,244,265,266,274,284,289,318,319,320,343,355,357,358,359,360,363);
- * análises ambientais (27,67,69,73,96,261,281,327,354).

3.1.3. – EXEMPLOS COMERCIAIS

Exemplos comerciais, agora incluem a extração de princípios amargos e aromáticos do lúpulo (12,92,139,173,351) para a indústria da

cervejaria, a descafeinação do café e do mate (2,6,55,61,189,263,264,342), a remoção da nicotina do tabaco (139,242) para a produção dos cigarros com baixo teor de nicotina ("light"), a obtenção comercial de caroteno da cenoura (34,51,199,245,296,348,365), a produção de bases para cosméticos a partir de resíduos e das cervejarias (7,223,252,253,255), a extração de óleos essenciais de plantas (12,52,55,71,94,114,133,181,183,248,267,282,283,333,334,335,336,342,347), a retificação, a desacidificação e a desodorização de óleos em geral (35,123,179,195,303,304,313,329), a extração de princípios ativos e insumos farmacêuticos de plantas medicinais (6,19,21,52,63,94,111,117,159,160,166,282,299,305,308,333,335,336,337,341), o processamento de óleos e gorduras comestíveis e a separação de ácidos graxos, triglicerídios e colesterol (20,26,51,58,59,126,185,188,213,259,353,362).

3.1.4. – OPERAÇÕES INDUSTRIAIS

Operações industriais incluem firmas como a Petrobrás, a 3M, a Agrisana e a Warner-Lambert, no Brasil;

a Flavex, a HAG, a SKW/Trotsberg, a Jacobs Suchard, a Messer Griesheim, a Marbet, a Hermsen e a HVG, na Alemanha;

a Carlton United e a Pfizer Hops, a CEA e a Bioland 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., a Kerr-McGee, a Barth and Co., a Natural Care Byproducts e a Texaco nos Estados Unidos;

a Cal-Pfizer, a Cea-RP e a Cammilli Albert & Louie na França;

a Pauls & White, a Raps and Co., a Ensco, a Agrofarm na Inglaterra;

no Japão as firmas: Mori Oils Mills, Fuji Flavor, Sumitomo Seiko, Yasuma, Hasegawa Koryo, Takasago Foods, a Nippon, a Clean Harbors, a Ensco Inc. e a Takeda Pharmaceuticals (242,257,264,293).

3.1.5. – DIFERENÇAS COM OS MÉTODOS TRADICIONAIS

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 CO₂ 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°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 CO₂ 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 deverá 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 ampliou a faixa de aplicações da SFE, necessitando ainda de maiores estudos na instrumentação necessária e adequada para o uso destes. Em função disso, deve-se estudar as propriedades dos modificadores e sua aplicação na SFE de compostos mais polares, como por exemplo, alguns insumos farmacêuticos (73).

3. 2. – FUNDAMENTOS DA VALIDAÇÃO DE PROCESSOS FARMACÊUTICOS

3. 2. 1. - CONCEITOS

Validação de método é uma parte integrante do desenvolvimento de um método analítico. É o processo de provar que um método analítico é aceitável para os fins a que se propõe (62,118,176,339).

Para métodos de extração por fluidos supercríticos (SFE) envolvendo compostos orgânicos, os dois parâmetros de validação mais importantes, são a exatidão e a precisão (106,216).

A exatidão é determinada pela extração de um material padrão de referência (MPR) e calculando a porcentagem recuperada (e precisa) relativa aos valores certificados (118,216,323,339).

3.2.2. – METODOLOGIA CITADA

Alternativamente, a exatidão de um método é determinada pela comparação dos resultados do método com os resultados caseiros de um método alternativo existente (240), isto é, a extração por solventes ou a extração por aparelho Soxhlet.

Por exemplo, Lopez-Avila et al (193) determinaram a exatidão de seu método de extração por fluidos supercríticos (SFE) para hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) do solo em relação aos valores caseiros obtidos por sonificação.

Por outro lado, Harthorne e Miller (130), determinaram porcentagens recuperadas (de seus métodos SFE para extrair PAHs, cloretos de N- e S-fenóis heterocíclicos e pesticidas de solos), relativos a valores caseiros dos obtidos por extração com aparelho Soxhlet.

Este procedimento é também recomendado pelo método 3561 da U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (Supercritical Fluid Extraction of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons) (216), como uma alternativa ao uso de valores certificados. Uma comparação de SFE e dados caseiros de aparelho Soxhlet usando uma amostra contaminada de PAH ambiental não adicionada é feita para avaliar o desempenho do método SFE.

Na ausência de normas aceitáveis para os parâmetros de validação usados, uma via de avaliação, a aceitabilidade de um novo método é comparar seu desempenho com os resultados de validação de outros novos métodos similares desenvolvidos pela EPA, tal como demonstra o método 3561 (216).

Os dados da validação encontrados pela extração diretamente do MPR, usando as condições requeridas de extração por fluido supercrítico (SFE), sem fazer as etapas de preparações da amostra antes da etapa de SFE. Tais dados, entretanto, validam apenas a etapa da extração por fluido supercrítico, e não o esquema inteiro da extração por fluido supercrítico partindo desde a coleta das amostras.

Entretanto, neste estudo (118), uma importante etapa pré-extração por fluido supercrítico (isto é, etapa de secagem) do esquema extração por fluido supercrítico desenvolvido para sólidos suspensos filtrados, foi também validado, mas usando um sedimento de um material padrão de referência no lugar dos sólidos de um material padrão de referência (MPR) suspensos, uma vez que nenhum MPR específico para sólidos suspensos estava disponível.

Deve ser entendido que o esquema inteiro ou completo da extração por fluido supercrítico para suspensões sólidas filtradas foi desenvolvido em uma série de investigações anteriores (106,175,218,233,278,352), e consiste das três seguintes etapas maiores otimizadas:

1. Filtração de amostra de sólidos suspensos com filtro MSI TCLP (desenvolvido e otimizado na referência 118,218,339),
2. Secagem de sólidos suspensos filtrados usando um método de secagem de vaso fechado (desenvolvido e otimizado na referência 294,325) e
3. Extração de sólidos suspensos filtrados por SFE usando uma combinação pressão/temperatura/modificador ótima (P-T-M) (otimizado na referência 46,48).

Com um sedimento de um material padrão de referência (MPR), o esquema da extração por fluido supercrítico desenvolvido não pode ser

validado partindo da etapa 1. Uma vez que a MPR é misturada com água para simular uma amostra de sedimento suspenso a ser filtrado, os valores certificados não serão mais válidos porque frações dos analitos serão perdidos por compartilhamento na fase aquosa (216).

Assim, a validação do método com um sedimento MPR somente pode ser achado partindo da etapa 2.

O objetivo do estudo de GREEN, M.J. (118) foi avaliar a exatidão e precisão das recuperações do método de isolamento SFE desenvolvido, usando um material padrão de referência (MPR).

Inicialmente, somente a etapa de extração (SFE) foi validada, usando as condições ótimas determinadas de SFE, para estabelecer comparação dos dados resultantes ao método de validação de dados EPA 3561, que eram também baseados somente nas etapas de extração (216).

Entretanto, ao contrário de muitas validações de SFE ou estudos de recuperação que avaliam apenas as condições de SFE, sem submeter as MPR a etapas de preparação antes do SFE (32,46,48,89,118), o estudo vai para uma outra etapa para também avaliar o método de SFE partindo de etapa de secagem pré SFE.

Com um material padrão de referência (MPR) submetido à etapa de secagem antes da SFE, as perdas, se houver, sobem pela secagem ao ponto em que após a SFE possam ser determinadas ou quantificadas, mesmo que no começo da etapa de secagem, os valores certificados ou verdadeiros dos analitos PAH nos MPR permaneceram os mesmos.

Mesmo que o processo de filtração (etapa 1) para os sólidos suspensos usando filtros MSI TCLP não contribua para mudanças na

concentração dos analitos nos sólidos suspensos, como tem sido mostrado em estudos prévios de avaliação de filtros (118), a exatidão e precisão obtidas representariam o método SFE completo para sólidos suspensos filtrados, desde a coleta por filtração até a extração por SFE.

Os autores (89,118,217) estudaram as etapas de: Validação da etapa da extração SFE sozinha; Validação do método SFE desenvolvido (partindo da etapa de secagem); Extração por solventes em aparelho Soxhlet de um material padrão de referência (MPR) e análise dos extratos de MPR.

O estudo de MIEGE (217), validou um método SFE recentemente desenvolvido para o isolamento de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares.

O método completo consiste de três etapas otimizadas: etapa de filtração (usando filtro de fibra de vidro MSI TCLP), etapa de secagem (usando método de secagem em vaso fechado) e a etapa de extração (SFE).

Comparada a resultados do método EPA 3561, as recuperações da etapa SFE sozinha, otimizadas são muito melhores, com uma exatidão média geral de 101% e precisão de 9% R.S.D., versus 74 e 13% para o método 3561, respectivamente (216).

Mais importante, o desempenho geral do método SFE desenvolvido foi também validado partindo da etapa de secagem e os métodos combinados (etapas) mostrando uma exatidão média geral de 91% com uma precisão de 8% R.S.D. (216).

Embora estudos prévios (89,118,178,217,218,287) tenham mostrado que na etapa de filtração a coleta de sólidos suspensos não resultou em

mudanças na concentração de analitos nos sólidos suspensos. Esta exatidão de 91% e a precisão de 9% R.S.D., pode ser considerada uma medida razoável de exatidão no geral, e de precisão do método SFE completo para sólidos suspensos filtrados, de coleção de amostras por filtração até a extração final por SFE. Com tal exatidão e precisão, o método SFE recentemente desenvolvido provou ser aceitável.

No artigo "A PRACTICAL GUIDE TO ANALYTICAL METHOD VALIDATION" (118), Green, afirma que: "Executar um método de validação completo pode ser cansativo, mas as consequências de não fazê-lo direito são desperdício de tempo, dinheiro e recursos" (118).

A habilidade de gerar dados em tempo, exatos e de confiança é fundamental para o desempenho dos analistas químicos é especialmente verdadeiro, para a descoberta, o desenvolvimento e a fabricação de produtos farmacêuticos.

Dados analíticos são usados para selecionar potenciais candidatos a fármacos, ajudar no desenvolvimento de sínteses de drogas, suportar estudos de formulações, monitorar a estabilidade de produtos farmacêuticos a granel, e produtos elaborados e testar produtos finais quanto à liberação e aprovação.

A qualidade dos dados analíticos é um fator chave no sucesso de um programa de desenvolvimento de uma droga (290).

O processo de desenvolvimento do método de fabricação e a sua validação têm um impacto direto sobre a qualidade destes dados.

Embora, uma validação completa não possa eliminar todos os problemas potenciais existentes, os processos de desenvolvimento do

método e a sua validação deveriam relacionar os problemas mais comuns (143,339).

Exemplos de problemas típicos que podem ser minimizados ou evitados são:

- a síntese de impurezas que competem com os picos dos analitos em uma análise de HPLC;

- um tipo particular de coluna que não mais produz a separação necessária porque o fornecedor da coluna mudou o processo de fabricação;

- um método de análise que é transferido para um segundo laboratório onde eles não são capazes de achar o mesmo limite de detecção;

- e uma auditoria de garantia de qualidade de um relatório de validação que não encontra a documentação de como o método foi executado durante a validação (118).

Os problemas aumentam com o pessoal adicional, laboratórios e equipamentos usados para executar o método.

Quando o método é usado no laboratório do pesquisador, um pequeno ajuste pode ser usado normalmente para fazer o método funcionar.

Mas toda esta flexibilidade para modificá-lo é perdida uma vez que o método é transferido para um outro laboratório ou usado para testar um produto oficial.

Isto é especialmente verdadeiro na indústria farmacêutica, onde métodos são submetidos a agências reguladoras e mudanças podem requerer aprovação formal antes que elas possam ser implementadas para testes oficiais (290).

O melhor caminho para minimizar problemas de método é realizar experimentos adequados de validação durante o desenvolvimento.

3.2.3 - O QUE É UMA VALIDAÇÃO DE MÉTODO?

Validação de método é um processo de provar que um método analítico é aceitável para sua finalidade proposta.

Para produtos farmacêuticos, especificações da Farmacopéia dos Estados Unidos (USP-XXIV) (345), International Conference of Harmonisation (ICH) (147) e o Food and Drug Administration (FDA) (147,148,260) fornecem uma estrutura para realizar tais validações.

Em geral, métodos para submissão a reguladores devem incluir estudos de especificidade, linearidade, exatidão, precisão, faixa, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

Embora haja consenso geral acerca de que tipos de estudos deveriam ser realizados, há uma grande diversidade em como eles devam ser realizados (29,32,42,45,46,60,88,148,287,339).

A literatura contém diversos procedimentos para realizar validações (como nas referências 42, 45, 46, 135,136,138,147). Estas apresentam um procedimento de como realizar estudos de validação que incorpora muito da literatura corrente e fornece um guia prático.

Essa aproximação deverá ser vista com o entendimento de que as exigências de validação estão continuamente mudando e variando amplamente, dependendo do tipo de droga que está sendo testada, do

estágio de desenvolvimento da droga e do grupo de fiscalização que virá rever a aplicação da droga.

Para nossas finalidades, iremos discutir estudos de validação como se eles fossem aplicados a métodos cromatográficos, embora os mesmos princípios se apliquem a outras técnicas analíticas e também aos processos de fabricação.

Nos estágios iniciais do desenvolvimento de fármacos, normalmente não é necessário realizar todos os diferentes estudos de validação.

Muitos pesquisadores se fixam em especificidade, linearidade, exatidão e estágios de estudos de precisão para drogas na fase pré-clínica completa II (eficácia preliminar).

Os estudos restantes são realizados quando a droga atinge o estágio da fase III (eficácia) de desenvolvimento e tem uma maior probabilidade de se tornar um produto de mercado (339).

O processo de validação de um método não pode ser separado do atual desenvolvimento das condições do método, porque o pesquisador não conhecerá quais as condições do método serão aceitáveis até a realização dos estudos de validação.

O desenvolvimento e a validação de um novo método analítico podem, entretanto, ser um processo iterativo. Resultados de estudos de validação podem indicar que uma mudança no processo é necessária, que pode então precisar de uma revalidação.

Durante cada estudo de validação são determinados parâmetros chave do método e são então usados para todas as etapas subsequentes de validação (118,339).

Para minimizar estudos repetitivos e garantir que os dados de validação são gerados sob condições equivalentes ao procedimento final, recomenda-se a seguinte sequência de estudos.

3.2.4 - ESTABELECIMENTO DE CRITÉRIOS MÍNIMOS

A primeira etapa no desenvolvimento de método e ciclo de validação deveria ser de fixar necessidades mínimas, que são essencialmente especificações aceitas para o método.

Uma lista completa de critérios deveria ser acordada entre o pesquisador e os consumidores finais antes do método ser desenvolvido de maneira que as expectativas estejam claras.

Por exemplo, é crítico que a precisão do método (RSD) seja $\leq$ 2%. O método necessita ser exato para dentro de 2% da concentração alvo.

É aceitável ter apenas um fornecedor da coluna do HPLC usado na análise? Não, durante os estudos atuais e no relatório final da validação, estes critérios permitirão um julgamento claro sobre a aceitação do método analítico.

Exemplos de critérios mínimos são fornecidos através deste artigo que indicam caminhos práticos para avaliar a aceitabilidade de dados de cada estudo de validação.

Os dados estatísticos gerados para fazer comparações são semelhantes àqueles que os analistas gerarão mais tarde no uso rotineiro do método e assim podem servir como uma ferramenta para avaliar dados questionáveis futuros.

Técnicas de avaliação estatística mais rigorosas estão disponíveis e deveriam ser usadas muitas circunstâncias, mas eles não podem servir para dirigir uma comparação para eliminação, ao acaso, de métodos durante o uso rotineiro.

3.2.5 - DEMONSTRAR ESPECIFICIDADE

Para métodos cromatográficos, desenvolver uma separação envolve demonstrar especificidade, que é a habilidade do método de medir com exatidão a resposta do analito na presença de todos os potenciais componentes da amostra.

A resposta do analito em misturas de teste contendo o analito e todos os componentes potenciais da amostra (formulação placebo, produtos de degradação, impurezas do processo, etc.) é comparado com uma solução contendo somente o analito.

Outros componentes potenciais da amostra são gerados pela exposição do analito a condições de estresse suficientes para degradá-lo a 80-90% de pureza.

Para produtos farmacêuticos a granel, condições de estresse como aquecimento (50°C), iluminação (600 lux), acidez (0,1M HCl), basicidade (0,1N NaOH) e oxidante (3% H₂O₂) são exemplos típicos.

Para produtos formulados, calor, luz, e umidade (85%) são muitas vezes usados.

As misturas resultantes são então analisadas e o pico do analito é avaliado para pureza de pico e resolução a partir do pico eluído mais próximo.

Se uma coluna cromatográfica alternativa for permitida no procedimento final do método, ela deveria ser identificada durante estes estudos.

Uma resolução aceitável é obtida para o analito e componentes potenciais da amostra, os parâmetros cromatográficos, tais como, o tipo de coluna, a composição da fase móvel, a razão de fluxo e modo de detecção, são considerados fixados.

Um exemplo de critério de especificidade para um método de ensaio é que o pico do analito terá resolução cromatográfica de linha base de no mínimo 1,5, comparado à todos os outros componentes da amostra.

Se isto não pode ser achado, os componentes não resolvidos nos seus níveis máximos esperados não afetarão o resultado final do ensaio em mais de 0,5%.

Um exemplo de critério de especificidade para um método de impureza é que todos os picos de impureza que são $\geq 0,1\%$ por área, terão resolução cromatográfica de linha base do pico do componente principal e sejam práticos, terão resolução de todas outras impurezas.

3.2.6 - DEMONSTRAR LINEARIDADE

Um estudo de linearidade verifica que as soluções da amostra estão numa faixa de resolução onde a resposta do analito é linearmente proporcional à concentração.

Para métodos de análise, este estudo é geralmente realizado pela preparação de soluções padrão em cinco níveis de concentração, de 50 a 150% da concentração de analito alvo.

Cinco níveis são requeridos para permitir a detecção de curvatura em dados colocados no gráfico. Os padrões são avaliados usando as condições cromatográficas determinadas durante os estudos de especificidade.

Padrões deveriam ser preparados e analisados no mínimo três vezes. A faixa de 50 a 150% para este estudo é mais ampla do que a exigida pelas normas do FDA (122).

No procedimento final do método, geralmente, é usada uma faixa mais próxima de três padrões, como 80, 100 e 120% do alvo e em muitos momentos, é usada apenas uma concentração do padrão.

Validação sobre uma faixa mais ampla fornece a certeza de que níveis rotineiros de padrão estão bem removidos de concentrações de resposta não lineares, que o método cobre uma faixa suficientemente larga para incorporar os limites do teste de uniformidade de conteúdo e que permite a quantificação de amostras cruas em suporte ao desenvolvimento do processo.

Para métodos de impurezas, a linearidade é determinada pelos resultados da preparação de soluções padrão a cinco níveis de concentração sobre uma faixa tal como, 0,05 a 2,5% em peso.

A aceitabilidade de dados de linearidade é muitas vezes julgada pelo exame do coeficiente de correlação e interseção gama da linha de regressão linear para o gráfico de resposta versos concentração.

Um coeficiente de correlação de 0,999 é geralmente considerado como evidência de ajustamento aceitável dos dados da linha de regressão. A interseção gama deveria ser menos que uns poucos valores percentuais da resposta obtida pelo analito no nível alvo.

Embora esses sejam caminhos muito práticos de avaliar dados de linearidade, não há medidas verdadeiras de linearidade (147,148). Esses parâmetros, por si só, podem ser ilusórios e não deveriam ser usados sem um exame visual do gráfico da resposta versos concentração.

Um exemplo de como o uso do coeficiente de correlação pode enganar, pode ser visto em dados de um método de HPLC para a quantificação do manitol.

Esse método usa um padrão interno, assim os dados são reportados como razões de picos de área (área de manitol/área de padrão interno).

Embora o coeficiente de correlação da regressão linear seja 0,999 (em cima), o gráfico indica pequenos desvios da linearidade a concentrações altas e baixas. Um caminho alternativo de avaliar os dados é o de colocar no gráfico o fator resposta (razão da área de pico-interseção gama/concentração) versos concentração.

Se foi obtida uma resposta equivalente a cada concentração, os pontos dos dados formariam uma linha reta com uma inclinação zero. O fator de resposta varia grandemente sobre a faixa e caem somente com 15% na concentração alvo. Um segundo conjunto de dados do manitol, sobre uma faixa mais estreita de concentração.

Os fatores de resposta para todas as concentrações nesta faixa estão dentro de 1,5% da resposta de concentração rotulada. A inclinação, próxima do zero do fator resposta indica que uma resposta linear é obtida sobre essa faixa de concentração.

Ao completar o estudo de linearidade, deveria ser fixada, para todos os estudos subseqüentes, a faixa apropriada de concentração para os padrões e o volume de injeção.

Um exemplo de um critério de linearidade para um método de análise é que o coeficiente de correlação para cada uma das três curvas (cinco níveis de concentração cada) será $>$ ou $=$ a 0,99 para a faixa de 80-120% da concentração alvo.

A interseção gama será $<$ ou $=$ 2% da resposta da concentração alvo. Um critério alternativo é que um gráfico do fator de resposta versus a concentração mostrará todos os valores com 2,5% do fator resposta do nível rotulado para concentrações entre 80 e 120% da concentração rotulada.

Para um método de impurezas, o coeficiente de correlação para cada uma das três curvas (cinco níveis de concentração cada) deverá ser $>$ ou $=$ 0,98 para a faixa de 0,1-2,5% da concentração do componente principal. A interseção gama deverá ser de $<$ ou $=$ 10% da resposta produzida para uma impureza de 2,5% em peso.

Um critério alternativo é que um gráfico de fator de resposta versus concentração mostrará todos os valores dentro de 5% do fator de resposta principal para concentrações $\geq 0,5\%$ em peso e com 10% do fator de resposta principal para concentrações $< 0,5\%$ em peso.

3.2.7 - DEMONSTRAR EXATIDÃO

A exatidão de um método é a proximidade de um valor medido ao valor verdadeiro para a amostra.

A exatidão é normalmente determinada por um dos de quatro caminhos. Primeiro, a exatidão pode ser avaliada pela análise de uma amostra de concentração conhecida e comparada ao valor medido com o valor verdadeiro.

Os padrões de referência do (NIST), Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia são muitas vezes usados; entretanto, tal amostra bem caracterizada normalmente não está disponível para analitos relacionados a drogas novas.

A segunda maneira, é comparar resultados de testes do método novo com os resultados de um método alternativo existente que é conhecido por ser exato. Adiante, para estudos farmacêuticos; um tal método alternativo normalmente não está disponível.

O terceiro e quarto procedimentos estão baseados na recuperação de quantidades conhecidas do analito introduzidas na amostra matriz. O terceiro procedimento, que é o mais usado em estudos de recuperação, é realizado pela introdução de analitos em matrizes inertes.

Para métodos analíticos, amostras introduzidas são preparadas em triplicatas em três níveis sobre uma faixa de 50-150% da concentração alvo. Se foram isoladas impurezas potenciais, elas deveriam ser adicionadas para imitar amostras impuras.

Para métodos de impurezas, amostras contaminadas são preparadas em triplicatas a três níveis sobre uma faixa que cobre o conteúdo de impurezas da amostra esperadas, tais como, 0,1-2,5% em peso.

Os níveis de analitos nas amostras contaminadas deveriam ser determinados usando o mesmo procedimento de quantificação que serão usados no procedimento final do método (isto é, mesmo número e níveis de padrão, mesmo número de amostras e injeções padrão, etc.). A porcentagem de recuperação deveria então ser calculada.

O quarto procedimento é a técnica da adição de padrões, que, pode também, ser usado para determinar a recuperação de analitos adicionados.

Esse procedimento é usado quando não for possível preparar uma amostra matriz inerte sem a presença do analito. Isso pode ocorrer, por exemplo, com material liofilizado, em que a especificação no material liofilizado é significativamente diferente quando o analito está ausente.

Um exemplo de um critério de exatidão para método de análise é que a recuperação principal será 100 + ou – 2% em cada concentração sobre uma faixa de 80-120% da concentração alvo.

Para um método de impureza, a recuperação principal estará dentro de 0,1% absoluto da concentração teórica ou 10% relativa, que nunca será maior, para impurezas na faixa de 0,1-2,5% em peso.

3.2.8 - DETERMINAR A FAIXA

A faixa de um método analítico é o intervalo de concentração sobre a qual a exatidão, a linearidade e a precisão são obtidas. Na prática, a faixa é determinada usando dados dos estudos de exatidão e linearidade.

Assumindo que foram obtidos resultados aceitáveis de linearidade e exatidão (recuperação) como descrito anteriormente, o único fator remanescente a ser avaliado é a precisão. Os dados de precisão deveriam ser avaliados de análises em triplicata de amostras cravadas no estudo da exatidão.

A precisão pode mudar em função do nível de analito. Os valores % RSD para a quantificação do etanol por CG aumentam significativamente quando a concentração diminui de 1000 ppm para 10 ppm.

Variabilidade maior é esperada quando os níveis de analitos atingem o limite de detecção do método. O pesquisador deve julgar a que concentração a imprecisão torna-se muito grande para o uso intencionado do método.

Um exemplo de critério de faixa para um método analítico é que a faixa aceitável será definida como o intervalo de concentração acima da qual são obtidos: a linearidade e a exatidão por critérios previamente discutidos e que produz uma precisão de $< \text{ou} = 3\% \text{ RSD}$.

Para um método de impureza, a faixa aceitável será definida como o intervalo de concentração sobre o qual a linearidade e a exatidão foram obtidas pelos critérios acima e que, em adição, produz uma precisão de $< \text{ou} = 10\% \text{ RSD}$.

3.2.9 - DETERMINAR A PRECISÃO - Etapa 1ª

A precisão de um método analítico é a quantidade de dispersão nos resultados obtidos de múltiplas análises de uma amostra homogênea. Para ser significativo o estudo de precisão de ser realizado usando o procedimento exato de preparação da amostra e do padrão que serão usados no método final.

O primeiro estudo de precisão é a precisão do instrumento ou repetição da injeção (118,339). Um número mínimo de 10 injeções de uma solução da amostra é feito para testar o funcionamento do instrumento cromatográfico.

O segundo tipo é a repetibilidade ou precisão intra-análise (345).

Dados de precisão intra-análise são obtidos pelas análises repetidas, em um laboratório em um dia, alíquotas de uma amostra homogênea, cada uma das quais foi preparada independentemente de acordo como o procedimento do método.

Destes estudos de precisão, o procedimento da preparação da amostra, o número de amostras em replicata a serem preparadas e o número de injeções requeridas para cada amostra no procedimento final do método será fixado.

Dois tipos de estudos de precisão adicionais são descritos mais tarde no tempo 2.

Um exemplo de critério de precisão para um método analítico é que a precisão de instrumento (RSD) será $<$ ou $= 1\%$ e a precisão intra-análise será $<$ ou $= 2\%$.

Para um método de impurezas, no limite da quantificação, a precisão instrumental será de $<$ ou $= 5\%$ e a precisão intra-análise será $<$ ou $= 10\%$.

3.2.10 - AMPLIANDO O ALCANCE

Uma vez que esses estudos de validação estão completos, o pesquisador do método deveria estar seguro na habilidade do método para realizar uma boa quantificação em seu próprio laboratório.

Esse resultado pode ser suficiente para muitos métodos, especialmente nas primeiras fases do desenvolvimento de drogas.

Os estudos remanescentes deveriam prover maior segurança que o método funcionará melhor em outros laboratórios, onde diferentes operadores, instrumentos e reagentes estão envolvidos e onde ele será usado por períodos de tempo bem maiores.

Este é um bom tempo para começar a acumular dados para dois ou mais sistemas de critérios adequados, que são requeridos antes do uso rotineiro de método para garantir que está funcionando apropriadamente.

Tipicamente, o processo envolve fazer cinco injeções de uma solução padrão e avaliar diversos parâmetros cromatográficos (118,323,339), tais como, resolução, reprodução da % de área, número de placas teóricas e fator de cauda.

3.2.11 - ESTABELECIMENTO DO LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção de um método é a menor concentração do analito que produz uma resposta detectável acima do nível de ruído de um sistema, tipicamente, três vezes o nível de ruído.

O limite de detecção necessita ser determinado somente para métodos de impurezas em que são observados picos cromatográficos perto do limite de detecção.

O limite de detecção deveria ser estimado antes no processo de desenvolvimento/validação do método e deveria ser repetido usando o modo de trabalho específico do procedimento final.

Se alguma mudança tiver sido feita é importante testar o limite de detecção do método de diferentes instrumentos, tais como aqueles usados nos diferentes laboratórios para os quais o método será transferido.

Um limite de um critério de detecção limite aquele, ao nível 0,05%, uma impureza terá $S/N > \text{ou } = 3$.

3.2.12 - ESTABELECIMENTO DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação é o menor nível do analito que pode ser exatamente e precisamente medido.

Esse limite é necessário somente para métodos de impurezas e é determinado pela redução da concentração do analito até um limite em que um nível é atingido onde a precisão do método é inaceitável.

Se não puder ser determinado experimentalmente, o limite de quantificação é muitas vezes calculado como a concentração do analito que dá $S/N=10$.

Um exemplo de critério de limite de quantificação é que o limite será definido como o menor nível de concentração para o qual um $RSD < \text{ou} = 20\%$ for obtido, quando é realizado um estudo de precisão intra-análise.

3.2.13 - ESTABELECEER ESTABILIDADE

Durante os estudos de validação iniciais, o pesquisador do método adquire algumas informações sobre a estabilidade dos reagentes, fases móveis, e soluções de amostras.

Para análises de rotina, em que muitas amostras são preparadas e analisadas em cada dia, muitas vezes é essencial que as soluções sejam estáveis o suficiente para permitir falhas como interrupções do instrumento ou análises noturnas usando injetores de amostras automáticos.

Neste ponto, os limites de estabilidade deveriam ser testados sobre um período de no mínimo 48 horas, e a quantificação de componentes deveria ser determinada pela comparação contra padrões recentemente preparados.

Se as soluções não forem estáveis por mais de 48 horas, devem ser determinadas as condições de estocagem ou quais são os aditivos que podem aumentar a sua estabilidade.

Um exemplo de critério de estabilidade para métodos de ensaio é que as soluções de amostras e padrão e a fase móvel sejam estáveis por 48 horas sob condições definidas de estocagem.

Estabilidade aceitável é mudança na resposta da amostra ou padrão de $< \text{ou} = 2\%$ relativo a padrões recentemente preparados.

A fase móvel é considerada estável se fase móvel envelhecida produzir cromatografias equivalentes (se o fator de capacidade, a resolução ou o fator de cauda e os resultados das análises estiverem dentro de 2% dos valores obtidos com a fase móvel fresca).

Para métodos de impureza, as soluções de amostras e padrão e a fase móvel serão estáveis por 24 horas sob condições definidas de estocagem.

Estabilidade aceitável é a mudanças da resposta do padrão e da amostra $< \text{ou} = 20\%$ no limite de quantificação, relativo aos padrões recentemente preparados.

É considerado que a fase móvel tem estabilidade aceitável se uma fase móvel envelhecida produz cromatografia equivalente e se os resultados das impurezas no limite de quantificação estão dentro de 20% dos valores obtidos com fase móvel fresca.

3.2.14- ESTABELECER PRECISÃO - Etapa 2ª

Os estudos de precisão restantes compreendem muito do que historicamente foi chamado de aspereza. Precisão intermediária (118) é a precisão obtida quando o ensaio é realizado por múltiplos analistas, usando múltiplos instrumentos, em múltiplos dias em um laboratório.

Diferentes fontes de reagentes e múltiplos lotes de colunas deveriam também ser incluídos nesse estudo. Resultados da precisão intermediária são usados para identificar quais dos fatores acima contribuem com variabilidade significativa para o resultado final.

O último tipo de estudo de precisão é a reprodutibilidade (118) que é determinada pelo teste de amostras homogêneas em múltiplos laboratórios muitas vezes como parte de estudos cruzados interlaboratoriais.

A avaliação dos resultados da reprodutibilidade muitas vezes enfoca mais sobre linhas de medidas em resultados do que em determinar diferenças em precisão sozinhas.

A equivalência estatística é muitas vezes usada como uma medida de aceitabilidade de resultados interlaboratoriais.

Um procedimento mais prático, alternativo o uso da “equivalência analítica” em que uma faixa de resultados de aceitabilidade é escolhida antes do estudo e usado para julgar a aceitabilidade dos resultados obtidos de diferentes laboratórios.

Um exemplo de critério de reprodutibilidade para um método de análise poderia ser que os resultados obtidos em laboratórios múltiplos

serão estatisticamente equivalentes ou os resultados principais serão dentro de 2% dos valores obtidos por um laboratório de teste primário.

Para um método de impureza, os resultados obtidos em múltiplos laboratórios serão estatisticamente equivalentes ou os resultados principais estarão entre 10% (relativo) dos valores obtidos pelo laboratório de teste primário para impurezas < 0,1-1,0% em peso, com 25% para impurezas de 0,1-1,0% em peso e dentro de 50% para impurezas < 0,1% em peso.

3.2.15 - ELE É ROBUSTO?

A robustez de um método é a habilidade para permanecer inalterado pôr pequenas mudanças em parâmetros, como conteúdo de impurezas orgânicas e pH da fase móvel, concentração do padrão e volume da injeção.

Esses parâmetros do método podem ser avaliados, um fator de cada vez ou simultaneamente, como parte de um experimento fatorial (118,260).

A obtenção de dados sobre os efeitos desses parâmetros pode permitir uma faixa de valores aceitáveis a serem incluídos no procedimento final do método.

Por exemplo, se o desempenho da coluna muda com o tempo, o ajuste da força da fase móvel para compensar as mudanças na coluna pode ser permitido se tais dados são incluídos na validação.

Um exemplo de critério de robustez é que serão determinados os efeitos das seguintes mudanças nas condições cromatográficas: o conteúdo

de metanol na fase móvel por 2%, o pH da fase móvel ajustado por + ou - 0,1% de unidades de pH, e temperatura da coluna ajustada por + ou - 5°C.

Se essas mudanças estão dentro dos limites que produzem cromatogramas aceitáveis, eles serão incorporados no procedimento do método.

3.2.16 - FAZÊ-LO CERTO NA PRIMEIRA VEZ

Executar um método de validação por completo, pode ser um trabalho tedioso e cansativo, mas, a qualidade dos dados gerados com este método esta diretamente ligada à qualidade desse processo.

A falta de tempo muitas vezes não permite validações de métodos suficientes.

Muitos pesquisadores experimentaram as conseqüências de métodos inválidos e reconheceram que a quantidade de tempo e recursos requeridos para resolver problemas descobertos mais tarde excede em muito, o tempo que teria sido gasto inicialmente caso os estudos de validação tivessem sido realizados de forma adequada.

Nós esperamos com a leitura destes trabalhos ter fornecido um guia para ajudar a chegar a um caminho eficientemente através do labirinto da validação de método e eliminar muitos dos problemas comuns de métodos analíticos validados inadequadamente.

3.2.17 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

3.2.17 1 – CONCEITOS

Demonstrar a funcionalidade do método para o objetivo proposto, obter a evidência documentada do procedimento seguido, o qual deve corresponder a um projeto experimental com tratamento estatístico apropriado e critério de aceitação definido.

3.2.17 2 – TIPOS DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Prospectiva: desenvolvimento de novo produto, processo ou método.

Retrospectiva: o produto ou método está em uso há algum tempo

Não houve alterações

Análise dos dados já existentes

Revalidação: quando há modificação do instrumento de medida, reagentes, materiais empregados, matérias primas, etc.

Validação segundo o FDA-Food and Drug Administration dos Estados Unidos da América (260):

“Validação de processo é o estabelecimento de evidências documentadas, as quais fornecem um alto grau de segurança de que um processo específico (tal como a fabricação de uma forma farmacêutica), produzirá repetidamente um produto que atinge suas especificações predeterminadas e características de qualidade”.

Validação segundo Dux (81):

“É o processo de estabelecimento da adequação e autorização do método para uso no laboratório”.

Estudo da validação é uma série de experimentos efetuados para avaliar a tal adequação do método.

Método analítico necessita de uma grande quantidade de trabalho de validação para ser padronizado.

3.2.17 3 – EXATIDÃO - CONSIDERAÇÕES OFICIAIS E USUAIS

Segundo a USP XXIV (345): Exatidão “é a aproximação dos resultados dos testes obtidos pelo método com o valor verdadeiro”.

- Pode ser expressa em % recuperada pelo ensaio de uma quantidade conhecida e adicionada do analisado.
- É uma medida da severidade (justeza) do método.
- É verdadeira para todos os propósitos práticos.

1. Segundo Pasteelnick (81): “Um método é exato se na média promove a resposta verdadeira”.

A exatidão pode ser definida em termos de SELETIVIDADE ou ESPECIFICIDADE, pois, discrimina o analisado dos precursores da síntese, dos contaminantes do processo e dos produtos de degradação (235,246,260).

Método exato pode ser considerado indicativo da estabilidade.

Método exato implica que não há nenhum ERRO SISTEMÁTICO (BIAS) inerente.

Não há credibilidade para um resultado isolado.

3.2.17 4 – PRECISÃO - CONSIDERAÇÕES OFICIAIS E USUAIS

Segundo a USP XXIV (345): “É o grau de aproximação entre os resultados individuais do teste, quando o procedimento é aplicado repetidamente para múltiplas tomadas de amostra homogênea”.

É usualmente expressa como o desvio padrão ou o desvio padrão relativo (coeficiente de variação).

Pode ser uma medida do grau de REPRODUTIBILIDADE ou do grau de REPETIBILIDADE do método analítico sob as condições normais de operação.

REPRODUTIBILIDADE refere-se ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios. Expressa a variação em dias diferentes, ou com analistas ou equipamentos diferentes, mas de um mesmo laboratório.

REPETIBILIDADE refere-se ao uso do procedimento analítico durante um curto período de tempo, pôr um mesmo analista, com o mesmo equipamento. É o mais usado e de maior interesse na USP (345).

Segundo Pastelnick (81): “O desvio padrão é uma medida da precisão do método”.

É o ERRO CASUAL (random)

Pode determinar quantos testes devem ser realizados para ser confortável que o resultado da média do ensaio está bastante próximo do valor verdadeiro.

REPRODUTIBILIDADE é a variação entre laboratórios. É o principal fator na indústria farmacêutica, como é em muitas indústrias.

REPETIBILIDADE é a variação num dado laboratório, e pode ser afetada pelo analista, condições ambientais ou equipamento. Nenhum fator é constante todo tempo.

3.2.17 5 – LINEARIDADE

Linearidade, segundo a USP XXIV (345): “É a habilidade de elucidar resultados de teste que são diretamente ou por uma bem definida transformação matemática, proporcionais à concentração do analisado nas amostras, dentro de um determinado intervalo estatístico (345).

A linearidade é usualmente expressa em termos da variação em torno da inclinação da linha de regressão calculada de acordo com a relação matemática estabelecida nos resultados do teste obtido pela análise de amostras com diferentes concentrações do analisado.

3.2.17 6 – INTERVALO (AMPLITUDE)

Segundo a USP XXIV (345): “É o espaço entre os níveis maiores e menores do analisado (incluindo estes níveis) em que se demonstrou a

determinação da precisão, exatidão e linearidade, usando-se o método como está descrito”.

É normalmente expresso nas mesmas unidades dos resultados do teste (porcentagem, partes por milhão) obtidos pelo método analítico.

3.2.17 7 – ERROS

1- Conceito: $\text{Erro} = 1/\text{EXATIDÃO}$

2- Tipos:

2.1 Falhas Humanas = “enganos” = “blunders”

São: - piores, intermitentes, grande intervalo.

- digitação errada, interpretação equivocada do método, erro de cálculo, etc.

2.2 Sistemáticos = “tendências” = “bias”

São: - reagentes brancos, instrumentos incorretamente calibrados, extrações incompletas, solubilidade parcial.

- Determináveis: igualdade de sinal

- Podem ser identificados por:

Técnicas de validação

Referências padronizadas

Comparação com método de exatidão conhecida

Considerar no resultado ou eliminar (preferível)

2.3 Casuais = “random”

Não podem ser eliminados

Fogem do controle do operador

Estão nos limites da capacidade das medidas experimentais

Ruídos dos instrumentos, paralaxe, etc.

Erros + e – são igualmente prováveis.

Observação: A frequência do erro é inversamente proporcional ao tamanho do erro

CAPÍTULO 4

OS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

A teoria fundamental e as descobertas experimentais mostraram que as propriedades de extração dos gases são na ordem de duas vezes maiores em estado supercrítico do que sob condições normais.

Que os fluidos supercríticos podem ser usados com grande vantagem como solventes em uma larga faixa de operações de separação de substâncias, possuindo diversas características de processos favoráveis, comparados com destilação, retificação, separação, fracionamento e extração com solventes líquidos os quais atingiram um estágio vantajoso de desenvolvimento tecnológico (355).

As extrações com fluidos supercríticos ganharam importância crescente como um processo de separação térmica de baixa temperatura, com aplicação abrangente.

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

os solventes usados, geralmente, são gasosos à pressão normal e temperatura ambiente. Isto significa que após a extração eles podem ser facilmente eliminados de ambos dos resíduos de extração e dos produtos extraídos e recuperados (326);

a maioria dos produtos usados são fisiologicamente inertes e seguros;

com muitos gases, a separação de materiais é feita a baixas temperaturas, o que é extremamente importante quando se extrai substâncias naturais;

as propriedades solventes dos gases comprimidos podem ser grandemente variadas, tanto pelo ajuste apropriado da temperatura e da pressão, quanto pela introdução de agentes solventes chamados de cossolventes;

em adicional, pela alteração gradual da temperatura e pressão, podem ser feitas a extração multifase e a extração fracionada nos produtos desejados (163,306,326,355).

O processo da separação supercrítica é uma técnica multidisciplinar e permite fazer desenvolvimentos de processo (297,306), para:

1. Setor de engenharia de alimentos:

- a. extração e refino de óleos comestíveis;
- b. extração de corantes de plantas;
- c. separação de colesterol de alimentos;
- d. extração de oleorresinas de condimentos;
- e. extração de certos componentes indesejáveis de produtos naturais, etc.

2. Setor de fármaco e medicamentos:

- a. extração de óleos essenciais;
- b. fracionamento de óleos essenciais;
- c. extração de antioxidantes naturais de plantas medicinais;
- d. extração de insumos farmacêuticos;
- e. extração de princípios ativos para uso farmacêutico;
- f. extração de corantes;
- g. extração de antibióticos de processos fermentativos, etc.

3. Setor de processamento químico:

- a. separação de aromáticos de derivados do petróleo;
- b. remoção de metais do resíduo do petróleo;
- c. extração de derivados da cera de lignite;
- d. extração de hidrocarbonetos líquidos do carvão de pedra, etc.

Naturalmente, são mencionadas apenas algumas técnicas das muitas possibilidades que se oferecem.

Embora o processo da extração supercrítica fosse intensamente estudado nos últimos cinco anos e muitos trabalhos científicos terem sido publicados e apresentados em Congressos, Simpósios, Encontros e Reuniões de profissionais, nas mais diferentes áreas do conhecimento científico, ninguém se preocupou com a validação do processo.

A legislação brasileira, com a criação da Lei dos medicamentos genéricos e a alteração da Lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976, determinou que todos os métodos de obtenção e análise utilizados no país fossem devidamente validados antes de se poder confiar nos resultados por eles obtidos (28,29).

Teremos um fluido supercrítico sempre que uma certa substância estiver acima de sua temperatura e pressão críticas.

A temperatura crítica é definida como a temperatura acima da qual um gás não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto se eleve à pressão.

Acima de sua temperatura crítica o gás não pode condensar ou evaporar para formar um líquido ou um gás, mas torna-se um fluido, com

propriedades físicas variando continuamente das gasosas às líquidas à 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 composto acima dos valores críticos de temperatura e pressão (209,242,325).

O diagrama de fases para o dióxido de carbono (Figura 2, página 76), mostra que acima de 31,04°C e 73,8 bares, atinge-se o ponto em que o CO₂ se encontra na condição de fluido supercrítico (16,121,127,189,264,326).

A curva pressão-volume para o dióxido de carbono (Figura 3, página 76) mostra que os fluidos supercríticos não podem ser liquefeitos (184,188,325,330).

Na curva ABCD, obtida a 13,1°C, temos no trecho A-B um gás sendo comprimido.

Na pressão B, começa a ocorrer 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 (189,325).

A curva a 21,5°C é parecida com a curva ABCD, diminuindo B-C proporcionalmente ao 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.

Essas curvas chamadas de curvas de Andrews (Figura 3, página 76), mostram, portanto, que acima da temperatura crítica o sistema é monofásico (189,325).

Os fluidos supercríticos são freqüentemente 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.

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

Onde:

P_r = pressão reduzida;

V_r^2 = Volume reduzido ao quadrado;

V_r = volume reduzido;

T_r = temperatura reduzida.

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

Onde:

P = pressão;

a = fração molar da substância a ;

b = fração molar da substância b ;

V^2 = volume ao quadrado;

V = volume;

R = constante de Clapeyron;

T = temperatura absoluta (°K).

Com isso, podemos generalizar um diagrama de fases para qualquer substância (Figura 4, página 77).

As áreas realçadas na figura indicam as condições de trabalho que alguns pesquisadores usaram para a extração por fluido supercrítico (112,325,326,355).

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

Figura 3: Curva de Andrews para o dióxido de carbono (189,245,322)

Figura 4: Diagrama de fases, comum a qualquer substância
(96,97,188,326,355)

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, página 78.

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 freqüentemente de considerações práticas.

Tabela I: Propriedades físicas de alguns solventes comuns ordenados pela temperatura crítica (119,127,293,326,334,355).

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 (15,108,251,293,334,355).

Um fluido supercrítico mantido a relativamente alta densidade tem a capacidade de dissolver uma variedade de materiais, exatamente como fazem os líquidos convencionais (19,93,131,242,293,334,355).

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, que 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 (129,184,294, 334,355).

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 facilmente comprimidos, pequenas mudanças na pressão, produzem grandes variações na sua densidade e na sua capacidade de solubilizar compostos químicos (17,95,97,215,355).

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 (103,163,293,355).

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 (110,215,294,326,355).

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 difusividade observada na extração com fluidos supercríticos é devido a sua melhor penetração em materiais sólidos de baixa porosidade e na transferência de massa muito mais rápida (176,236,277,293,355).

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 (215,218,355).

Métodos termodinâmicos foram 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 (107,218,326).

Os mecanismos de solubilidade são encontrados nos livros de McHugh e Krukonis (209) e Charpentier e Sevenants (209,271) e também em artigos de separatas (23,30,162,164,233,303,306,313,363).

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 (17).

Assim, uma das propriedades mais importantes é a sua compressibilidade, que permite variar o parâmetro da solubilidade do fluido supercrítico, pela simples variação da densidade, em função da variação da pressão e da temperatura.

Esse fenômeno permite separações tais que não podem ser feitas com técnicas convencionais como destilação, filtração ou precipitação (326). Entretanto, a capacidade extrativa de um solvente supercrítico não pode ser explicada unicamente pelo aumento de sua densidade (189,197).

Giddings e colaboradores (112), 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, página 84).

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

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

Sendo:

δ é o parâmetro de solubilidade de Hildebrand e é expresso 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 bars (326).

Figura 5: Variação da densidade do dióxido de carbono com a pressão, a diversas temperaturas (245,293,326,355)

O dióxido de carbono supercrítico não tem a força de solvatação necessária na pressão de trabalho prática (80 a 600 bars) para solubilizar solutos muito polares.

Em termos gerais, o dióxido de carbono:

é um excelente solvente para espécies não polares como alcanos e terpenos [$\delta = 6-8$ (cal/cm³)];

é razoável para espécies moderadamente polares, incluindo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, difenil policlorados, aldeídos, ésteres, álcoois, pesticidas organoclorados e gorduras [$\delta = 8-11$ (cal/cm³)] e não é indicado para compostos mais polares (Tabela II, página 85).

Tabela II: Parâmetros de solubilidade de Hildebrand de algumas substâncias (245,326).

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 CO₂ puro, supercrítico, são semelhantes às do hexano líquido, que é um solvente não polar (124,127,189).

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 (127,233,355).

Apesar do metanol ter sido o modificador de escolha, uma grande variedade de substâncias orgânicas tem sido usada, 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 as suas concentrações são feitas 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 (128,150,219,222,243,250).

4.3 - EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

A extração por fluido supercrítico segue o seguinte fluxograma (Figura 6, página 88) e o diagrama (Figura 7, página 88):

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 (13,87,170,171). O dióxido de carbono expandido, em estado gasoso, circula através de um trocador de calor, é refrigerado e novamente liquefeito.

O gás pode ser comprimido novamente ao estado fluido, completado em seu volume e ser usado em novas extrações, uma vez, restabelecidas as condições de temperatura e pressão que o recolocam de volta à região supercrítica (77,150,151,219).

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 à 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, tetracloroetileno, 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 (272,326).

O custo da extração por fluido supercrítico é muito menor que uma extração com solventes líquidos (Tabela III, página 91).

A extração supercrítica 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 (326,334,355).

Tabela III: Comparação entre a extração por solventes no aparelho Soxhlet e a extração por fluidos supercríticos (111,292,334,355).

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

4.3.1 - O DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

As regras gerais para a extração com dióxido de carbono supercrítico podem ser assim resumidas (128,129,189,325):

- * 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 bars. 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 de grau analítico;

- * 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 (325);

- * 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 (17,293).

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 (59,79,112,128, 189,229,261,348).

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 (55,189,242,268,325).

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 (243,325).

O óxido nitroso possui baixas temperatura e pressão crítica, 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 (122,128,189,326).

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, página 94.

Os fluidos supercríticos possuem características de transferência de massa semelhantes às de um gás e de solvatação semelhantes às de um líquido.

Tabela IV: Comparação da ordem de magnitude das propriedades físicas de gases, líquidos e fluidos supercríticos (189,245,326).

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 têm menor viscosidade e maior difusividade, 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 (122,190,326).

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 (17,23,126,192), condimentos (84,92,326) e perfumes (17,30,97,258).

Comparações feitas entre a SFE e os métodos convencionais de extração com solventes líquidos, mostram que a recuperação é sempre maior para a extração por fluido supercrítico (54,55,75,326).

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 (69,97,119,150,218,250).

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 (3,261).

Outra das 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 (21,25,119,120,129,130,142,156,227,236,244,269,343,359).

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 é fisiologicamente seguro e inerte;

- * 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. A unidade de teste, pertencente a firma White Martins S.A., está a venda por R\$ 260.000,00 (Figura 8, página 97).

Uma unidade industrial, com a qual trabalhamos na indústria Messer Griesheim GmbH, em Düsseldorf, na Alemanha, em 1990, custava mais de 4.000.000,00 DM (Figura 9, página 98) e processa 450 litros de cada vez.

Instalações industriais como a da indústria Flavex, em Rehlingen, também na Alemanha, segundo informações do seu diretor industrial, tiveram seu custo amortizado em seis meses de funcionamento extraíndo matérias primas de leveduras de cervejarias da região (Figura 10, página 99).

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 White Martins S.A., Rio de Janeiro, RJ.

Figura 9: Unidade de extração por fluido supercrítico com capacidade para 450 L, pertencente a firma Messer-Griesheim, Düsseldorf, Alemanha.

Figura 10: Unidade de extração supercrítica industrial, pertencente à indústria Flavex, em Rehlingen, Alemanha.

4.3.3 - APARELHAGEM

Um aparelho para extração por fluido supercrítico (Figura 8, página 97) 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 CO₂ 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 CO₂ com um modificador orgânico adicionado, o cossolvente (219,222,334) 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 CO₂ 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.

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

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, página 102).

Nesta bomba, 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 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, página 103), 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.

A pressão do fluido de processamento, na câmara de pistão menor será aumentada 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 do fluxo, do fluido de processamento, é orientada 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.

Figura 11: Bomba de alta pressão (compressor), em azul, mostrando também na parte lateral esquerda superior o vaso de mistura do cossolvente

Figura 11: Bomba de alta pressão (compressor), em azul, mostrando também na parte lateral esquerda superior o vaso de mistura do cossolvente

4.3.3.3 - O EXTRATOR

O extrator ou vaso extrator 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 trabalhar como uma operação semicontínua, os extratores são instalados em paralelo. Neste caso, ao se terminar a extração em um dos extratores, este pode ser substituído por outro, 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.

4.3.3.4 - O SEPARADOR

O separador tem por função a separação do extrato. 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 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, página 103), na parte superior], promovendo a homogeneização entre solvente e cossolvente.

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.

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, freqüentemente, por tentativa e erro (303).

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 (35,36,37,87,162,164,209,227,247,256,261,277,297,363).

A capacidade de controlar a densidade, a temperatura e a composição do fluido, torna a técnica capaz de fracionar o extrato (221,288,292,366).

O fracionamento de classes de compostos através de trocas discretas na força de solvatação, obtido pelo aumento de pressão, é mostrado na Figura 12, página 107. A cada condição corresponde um grupo de compostos a ser separado no extrato (292,293).

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 (220,221,326).

Figura 12: Cromatograma GC obtido da extração com CO₂ supercrítico de pimenta preta (298).

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 (124,326).

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.

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 (108,293,326,355).

Os modificadores de escolha devem manter a seletividade e aumentar a solubilidade (23,326).

A patente da extração da cafeína do café representa um exemplo clássico do uso de modificadores. Embora a cafeína seja muito solúvel em gás carbônico puro, ao extraí-la do grão de café torrado a eficiência é muito baixa.

Por isso, 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 (2,6,250).

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 por várias vezes, até que é, finalmente bombeado para o separador e o extrato coletado.

Não encontramos trabalho que comparasse os três modos de extração, por isso optamos pelo modo dinâmico, porque o fluido é constantemente renovado durante a extração (220).

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 µm, 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 malha 60), 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 contra-corrente, 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 matéria-prima "bombeável" pode ser efetivamente extraída por esse processo.

Como exemplos, podemos citar, a extração e fracionamento dos óleos essenciais, os sucos de frutas concentrados, os sucos vegetais, as extrações de meios de cultura fermentativos, além de ser o processo de escolha para a desodorização de óleos comestíveis na indústria de alimentos.

CAPÍTULO 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, da firma Pressure Products Industries, Incorporated, USA (PPI FC Series Operator) (Figura 8, página 79) de propriedade da firma White Martins S.A., Rio de Janeiro, RJ, seguindo o fluxograma de extração por fluido supercrítico (Figura 6, página 70).

A unidade possuía as seguintes especificações de sistema:

- a) extração - de 815 a 10.000 psi; da temperatura ambiente a 100°C;
- b) separação - de 750 a 5.000 psi; temperatura de 20 a 100°C;
- c) fluxo de gás - de 5 a 50 kg/h;
- d) materiais - todos os componentes em aço inox 316 SS (Still Stain);
- 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 era provido de 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 sobre-pressão 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.

As temperaturas e pressões puderam ser medidas e controladas em todas as etapas da extração supercrítica, por eficientes sistemas indicadores digitais de pares termoeletrônicos e transdutores de pressão.

5.1.2 - OUTROS MATERIAIS E APARELHOS

Aparelhos pertencentes ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Anhembi Morumbi, Rua Dr. Almeida Lima, 1.134, Brás, São Paulo – SP e ao Laboratório de Separações da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ:

alcoômetro de Gay-Lussac;
aparelho misturador em V, capacidade para 10,0 kg;
estufa secadora de bandejas, marca Fabbe, modelo 171;
moinho de facas e martelos, Metalúrgica Roma, tipo MR-320;
destilador por arraste de vapor com gerador de vapor, modelo-P47A-9013;
secador Fabbe de bandejas, modelo 119;
extrator Soxhlet, capacidade 20 litros;
extrator Soxhlet, capacidade 1,0 litro, de vidro, com manta aquecedora elétrica e condensador;
capela química com exaustão;
aparelho Granutest (peneiras);
vidrarias diversas;
destilador de água;

evaporador rotativo Büchi, à vácuo;
Banho maria Aquatemper, Quimis;
Balanças eletrônicas Gehaka 2.000 e 4.000;
Balança analítica Sartorius, com 4 casas decimais;
Polarímetro Jena, pat. 3208;
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, gás auxiliar nitrogênio (N_2) e gás de arraste o hidrogênio (H_2), detector de ionização de chama (FID), pertencente à Bayer do Brasil S.A.

Cromatógrafo à gás Ergo Ultra VGA Vectro XM Hewlett-Packard modelo 8453, Palo Alto, com programa de espectrometria derivativa no ultravioleta, gás auxiliar nitrogênio (N_2) e gás de arraste o hidrogênio (H_2), detector de ionização de chama (FID), pertencente ao Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Aparelho extrator por fluido supercrítico, com 1 litro de capacidade, acoplado a um cromatógrafo à gás Hewlett-Packard 4840, coluna capilar com 50 m de comprimento e diâmetro interno de 0,25 mm, fase estacionária OV 10125M, com programa de temperatura regulável, gás auxiliar nitrogênio (N_2) e gás de arraste o hidrogênio (H_2), detector de ionização de chama (FID), pertencente ao Laboratório de Processos de Separações da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ (Figura 13, página 116):

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

Figura 13: Aparelho de extração por fluido supercrítico, 1 litro de capacidade, acoplado à cromatógrafo a gás, pertencente ao Laboratório de Processos de Separação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ.

5.1.3 - MATÉRIAS PRIMAS E REAGENTES

5.1.3.1 - MATÉRIAS PRIMAS

5.1.3.1.1 - SEMENTES DE GUARANÁ

Utilizamos amostras de sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, *Sapindaceae*) adquirido da firma Caiabí, no mês de junho de 1999, na cidade de São Paulo.

Uma das amostras era proveniente da cidade de Alta Floresta, Mato Grosso e a outra da cidade de Maués, Pará e foram identificadas por comparação com os padrões do Laboratório de Farmacognosia da Universidade Anhembi Morumbi.

As sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, *Sapindaceae*) empregadas, acondicionadas em sacos de ráfia, estavam em bom estado de conservação e foram escolhidas de acordo com o critério de disponibilidade momentânea e interesse dos fornecedores.

As sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, *Sapindaceae*) foram adquiridas para fins de estudo de obtenção de extratos e comparação das sementes de diferentes procedências.

A sua composição aproximada, fornecida pela distribuidora Caiabí, é mostrada na tabela V, página 118. Estes valores variam com o tipo das sementes, lugar de colheita e técnicas de processamento.

A Figura 14, página 119, mostra uma fotografia de sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindáceae) como se encontram no guaranazeiro, em estado natural.

A Figura 15, da página 120, mostra uma unidade de fabricação de café descafeinado, em Düsseldorf, na Alemanha.

Tabela V: Composição de sementes de guaraná (% base seca)

Componentes	Sementes procedentes de Maués (PA)	Sementes procedentes de Alta Floresta (MT)
Minerais	3,0 – 4,2	4,0 – 4,5
Cafeína	4,8 – 6,0	4,2 – 5,0
Lipídios	12,0 – 18,0	9,0 – 13,0
Ácido clorogênico	5,5 – 8,0	7,0 – 10,0
Ácidos alifáticos	1,5 – 2,0	1,5 – 2,1
Oligossacarídeos	6,0 – 8,0	5,0 – 7,0
Polissacarídeos totais	50,0 – 55,0	37,0 – 47,0
Aminoácidos	2,0	2,0
Proteínas	11,0-13,0	11,0 – 13,0

5.1.3.2 - SOLVENTES

Os solventes orgânicos utilizados no preparo, extração e coleta das amostras foram de grau analítico e fornecidos pela firma Merck S.A.: metanol, etanol, clorofórmio, isopropanol, diclorometano, acetona, hexano, e propilenoglicol, hexano.

Figura 14: Sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindáceae) como se encontram no guaranazeiro, em estado natural.

Figura 15: Unidade de fabricação de café descafeinado, em Düsseldorf, na Alemanha.

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., Rio de Janeiro, RJ. Os gases foram fornecidos pela firma White Martins, que também emprestou a unidade de extração, em forma de comodato.

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 bars, 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 kg/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.

5.1.3.5 – CAFEÍNA PADRÃO

A cafeína padrão usada na análise e na extração era de grau reagente importado Merck, 99,5% de pureza, lote 022C 197855, com cinco anos de validade a partir da data de fabricação.

A interpretação do número do lote de produtos Merck é a seguinte:

O - ano de fabricação (2000);

22 - semana de fabricação dentro do ano;

C - seqüência de emissão do lote no mês;

197855 - número real do lote.

5.2 - MÉTODOS

5.2.1 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Antes de carregar o extrator com as sementes de guaraná foram realizadas análises granulométricas e determinações dos teores de umidade.

Para determinar o tamanho médio das sementes de guaraná foi usado o método comum das peneiras padronizadas. Uma quantidade exata de 50 gramas de sementes foi colocada no topo de uma série de peneiras durante 10 minutos, obtendo-se um diâmetro médio de 5,69 mm para as sementes inteiras e 3,30 mm para sementes partidas grosseiramente. Os dados são apresentados na tabela VI e VII, página 123.

Tabela VI: Análises granulométricas da amostra de sementes de guaraná inteiras

Número da peneira. (US standard).	Valor médio das partículas (em mm)	Fração ponderal Retida (em p%)
2 a 3,5	8,10	13,90
3,5 a 4	5,69	82,92
4 a 6	4,01	3,184

Tabela VII: Análises granulométricas de uma amostra de sementes de guaraná partidas

Número da peneira. (US standard).	Valor médio da partícula (mm)	Fração ponderal retida (em p%)
2 a 3,5	8,10	0,50
3,5 a 4	5,70	7,24
4 a 6	4,01	48,06
6 a 8	2,8	31,24
8 a 10	2,0	12,96

As sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) foram secas em estufa a 40°C por 24 horas, para permitir a uniformização do teor de umidade.

As sementes foram homogeneizadas em aparelho misturador em V e depois divididas em 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.

O solvente extrator para a obtenção das oleorresinas de guaraná foi obtido pela mistura de 665 gramas de etanol 96° com 335 gramas de água destilada, de acordo com a tabela indicativa de diluições da Farmacopéia Brasileira II, página 1191 (91) e ajustada para 70°GL, com o auxílio de um alcoômetro de Gay-Lussac.

A umidade foi determinada pelo método de estufa, a uma temperatura de secagem de 105°C, durante 24 horas.

As sementes de guaraná utilizadas neste experimento tiveram seus teores de umidade ajustados para ficarem na ordem de 20% em base úmida, em ambientes de umidade controlada e saturada.

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 convencional (extração por solventes) e extração por fluido supercrítico.

Para a cafeína pura utilizou-se o mesmo extrator e as mesmas condições de extração usadas para as sementes de guaraná.

No extrator foram colocadas esferas de vidro de diâmetro médio de 4 mm misturadas com a quantidade correspondente de cafeína, deixando a substância pura bem distribuída ao redor das esferas, de modo a evitar que o processo de transferência de massa interferisse nas extrações.

5.2.2.1. - EXTRAÇÃO POR SOLVENTES

Os extratos ou oleorresinas foram obtidos pela extração com etanol (álcool etílico) 70° GL, em aparelho extrator Soxhlet, capacidade 1,0 litro, de vidro, com manta aquecedora elétrica e condensador.

Foram pesadas 200 gramas das sementes, adequadamente moídas colocadas no extrator Soxhlet, dentro de um cartucho de papel de filtro.

Considerou-se como adequadamente moídas as sementes de guaraná que atenderam a classificação de pó grosso, pela descrição da Farmacopéia Brasileira (91).

A droga vegetal moída deve ser classificada de acordo com o tamanho de partículas que devem ser adequadas para o processo de extração, considerando o equipamento empregado.

A moagem do material vegetal, independente de sua natureza e do tipo do moinho utilizado, resulta na produção de certa quantidade de partículas muito finas, as quais devem ser afastadas.

Assim, a operação de moagem foi complementada pela tamisação do material obtido e as partículas que excederam o tamanho padrão voltaram ao moinho para serem reduzidas e o pó muito fino foi descartado.

A Farmacopéia Brasileira (91) classifica o pó em grosso, quando este passa em sua totalidade pelo tamis nº 20 e, no máximo, 40% pelo tamis nº 60.

Os números dos tamises são especificados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT e representam uma maneira prática de identificá-los. A Tabela VIII, página 127: relaciona a abertura da malha dos tamises e sua correspondência com a denominação utilizada pela ABNT.

Em seguida o extrator Soxhlet foi acoplado ao balão de boca esmerilhada e adicionou-se a solução hidroalcoólica, 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 18 a 24 horas, ou o suficiente para se obter a exaustão das drogas, em conformidade com o método da AOAC (13), de acordo com o procedimento descrito na Farmacopéia Brasileira, 2ª edição (91).

Os extratos hidroalcoólicos obtidos foram evaporados em rotavapor Büchii, à pressão reduzida e temperatura não superior à temperatura de 50°C.

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

Foram realizadas dez (10) extrações de cada uma das amostras de sementes de guaraná.

Tabela VIII: Abertura de malha dos tamises, segundo a Farmacopéia Brasileira, 2ª edição, página 666.

Nº do tamis	Abertura nominal da malha (μm)
10	2000
20	840
40	420
60	210
80	177
100	149

5.2.2.2 - EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

Foram pesadas 1000 gramas das amostras de sementes de guaraná de tamanho adequado. Em seguida, as amostras foram submetidas à extração em um sistema de extração por fluido supercrítico, PPI FC, ES-204 (Figura 8, página 97), seguindo o procedimento descrito a seguir:

As amostras foram colocadas no extrator e a tampa foi hermeticamente fechada e lacrada.

O dióxido de carbono proveniente do cilindro e o do reciclado no condensador foi transferido para a bomba de alta pressão. A pressão de extração empregada foi de 350 bars.

O líquido a alta pressão permaneceu no pré-aquecedor até atingir a temperatura de extração (aproximadamente 50°C) e o solvente, agora um fluido supercrítico, foi bombeado para o extrator, até atingir um valor um pouco acima da pressão requerida para a extração (aproximadamente 380 bars).

A temperatura foi mantida constante, através da camisa de aquecimento elétrica do extrator. Após atingir a pressão e a temperatura desejadas no extrator, foram iniciados 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, à medida que passou através da válvula de controle de pressão. O soluto, isto é, o dióxido de carbono supercrítico contendo os materiais dissolvidos, foi constantemente transferido para o separador.

Foi usado o método de extração do modo dinâmico, isto é, o dióxido de carbono foi circulado através das amostras até a exaustão das sementes. Considerou-se a exaustão das sementes quando cessou a saída de extrato pela válvula de saída do 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 (anexos 11.1-11.3).

Os procedimentos descritos nos anexos são necessários para a validação do processo de extração supercrítica das sementes do guaraná e ficam fixados na seqüência conforme descritos.

5.2.3 - EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS E ANÁLISES EFETUADAS

5.2.3.1 - EXTRATO DE GUARANÁ

Foram extraídos 200 gramas de cada uma das drogas moídas adequadamente, com 5% de propilenoglicol e etanol (álcool etílico) 70°GL, durante 24 horas, na temperatura de aproximadamente 80°C, no aparelho extrator Soxhlet (vide 5.2.2.1).

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, para facilitar sua aplicação na indústria de refrigerantes e sorvetes.

Foram extraídos 1000 gramas de cada uma das amostras de sementes de guaraná, durante 30 min., à temperatura de 50°C e 350 bars 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 propilenoglicol (PG) e etanol 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 extrator de Soxhlet.

Todas as extrações foram realizadas 10 vezes 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. Este dispositivo permite injetar uma concentração maior da amostra, sendo que parte vai para a coluna e parte vai para o descarte para não prejudicar a coluna.

Esta parte descartada pode servir para uma identificação qualitativa de componentes, em adaptação própria, na saída do gás de arraste. O acompanhamento é feito pelo odor exalado pelo componente eliminado e arrastado pelo gás nitrogênio.

As temperaturas do injetor e detetor foram mantidas a 300°C. Como gás auxiliar foi usado o nitrogênio (N₂), na razão de 20 mL/min e como gás de arraste foi usado o hidrogênio. Foi injetado 1 µL de solução a 1%, em metanol (vide 4.3.3.4).

A presença de cafeína nos extratos foi comprovada extraíndo e diluindo-se os mesmos em clorofórmio, seguindo-se uma análise cromatográfica na faixa do ultravioleta, no aparelho Ergo Ultra VGA Vectro XM HP, modelo 8453, contra padrão de cafeína em duas concentrações diferentes. Como na leitura direta havia muitos interferentes e sobreposição de picos, efetuou-se uma segunda leitura, agora como derivada segunda, nas mesmas condições.

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

As 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 de vapor d'água e pesagem em balança analítica Sartorius.

A parte solúvel em cloreto de metileno foi evaporada a temperatura de 30°C, em evaporador Büchi, a vácuo até que todo o cloreto de metileno se evaporasse.

Foram calculados, o teor de substâncias não voláteis e a quantidade de óleo essencial presente nos extratos (13,25,170,171).

Para a realização das análises organolépticas foi pedida a colaboração de um painel de degustadores treinados das Indústrias Reunidas Jaraguá, composto de 12 analistas sensoriais (2,13,128,170,171).

A cafeína residual nas amostras, após as extrações e a massa esverdeada encontrada nos extratos obtidos, foi estimada conforme os métodos nº 3.138 e 30.020, da AOAC-Official Methods of Analysis e calculados como peso (13).

A cafeína das sementes e dos extratos de guaraná foi determinada por método gravimétrico de acordo com o procedimento descrito na Farmacopéia Brasileira, 2ª edição, página 512 (91) e espectrofotométrico no ultravioleta (91,345).

Pela prescrição da Farmacopéia Brasileira 2ª edição, o guaraná determinado segundo o método de análise da monografia deve conter no mínimo 4% de cafeína (91).

O método oficial usado para o doseamento da cafeína em nosso estudo de validação de processo foi o seguinte:

“Foram introduzidos 5g de guaraná, em pó, (tamis 80), num funil separador de 200 cm³ de capacidade e adicionados 40 cm³ de clorofórmio R e 5 cm³ de hidróxido de amônio diluído SR.

A mistura foi agitada vigorosamente durante 10 minutos e deixada em repouso durante 30 minutos. Separado o clorofórmio e filtrado rapidamente por algodão hidrófilo, repetindo esta extração, mais três vezes com 25 cm³ de clorofórmio R de cada vez.

Reunidos os extratos clorofórmicos em um frasco de Erlenmeyer de 300 cm³ de capacidade e destilado a maior parte do clorofórmio, em aparelho destilador simples. Adicionado ao concentrado 1 cm³ de álcool R e evaporado até secura, em banho-maria.

Juntados ao resíduo 15 cm³ de água destilada, 0,5 cm³ de ácido sulfúrico diluído SR e fervido suavemente durante dois minutos: resfriado e filtrado por papel para um funil separador. Lavado o frasco e o filtro com duas vezes 10 cm³ de água destilada, recolhida a água de lavagem no mesmo funil separador.

Alcalinizado o meio com hidróxido de amônio diluído SR, a cafeína foi extraída com porções sucessivas de 30, 25 e 20 cm³ de clorofórmio R. Recolhidos os extratos clorofórmicos em um frasco de Erlenmeyer de 250 cm³ de capacidade, filtrado através de algodão hidrófilo; eliminado o clorofórmio por destilação em aparelho destilador simples, até cerca de 5 cm³ e transferido o concentrado, com ajuda de várias porções de clorofórmio R, para uma cápsula previamente tarada.

Adicionado 1 cm³ de álcool R e evaporado até a secura, em banho-maria.

Dessecado em estufa a 80°C, durante 2 horas: o peso do resíduo, depois de resfriado, deve ser, no mínimo, de 0,16 g, o que corresponde a um mínimo de 4% de cafeína anidra no guaraná dosado”.

As análises de densidade, teor, rotação ótica, índice de refração, solubilidade e resíduo seco, foram realizadas nos Laboratórios de Farmacognosia da Universidade Anhembí Morumbi e do Centro Universitário da FMU (25,40,87,90,91,345,346,347).

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 - EXTRATO DE GUARANÁ

Foram obtidos extratos de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por extração supercrítica (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 marrom esverdeado, insolúvel em água;

b) Maués (PA) - 5,1% de teor de cafeína, 9,2% de resíduo seco, densidade (25°C) = 0,8980, cor marrom escuro, boa solubilidade em água.

Os extratos de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) obtidos por extração pelo Soxhlet com água, etanol 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 marrom 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.

Na análise dos extratos e oleorresinas obtidos com as sementes de guaraná e empregando o método oficial da Farmacopéia Brasileira, isto é,

pelo método gravimétrico, encontrou-se os teores de cafeína constantes da Tabela VIII e IX, respectivamente (abaixo).

Tabela VIII: Teores de cafeína dos extratos obtidos com a extração por fluido supercrítico e das oleorresinas obtidas com a extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Maués (PA) e de Alta Floresta (MT).

Alta Floresta		Maués	
Soxhlet	Fluido Supercrítico	Soxhlet	Fluido Supercrítico
3,80	4,80	4,30	5,10
3,85	4,81	4,30	5,30
3,64	4,76	4,26	5,10
3,83	4,80	4,25	5,30
3,80	4,79	4,30	5,25
3,85	4,81	4,23	5,20
3,94	4,77	4,27	5,26
3,85	4,78	4,28	5,18
3,81	4,80	4,39	5,26
3,83	4,78	4,36	5,24

Tabela IX: Teores de cafeína recuperados com a extração por fluido supercrítico da cafeína padrão acrescentada.

Acrescentado	%		%		%	
	80,00	4,16	100,00	5,20	120,00	6,24
<u>Recuperado</u>						
	79,23	4,12	100,00	5,20	118,85	6,18
	80,00	4,16	99,81	5,19	119,23	6,20
	79,04	4,11	99,04	5,15	119,42	6,21
	79,23	4,12	98,85	5,14	118,85	6,18
	79,81	4,15	99,62	5,18	119,23	6,20

A análise dos extratos na espectrofotometria no ultravioleta produziu espectros sobrepostos na derivada primeira, quando avaliados na faixa de 240 a 400 nm, como pode ser verificado na Figura 16, na página 136.

O comportamento foi bastante semelhante ao da cafeína padrão, como podemos verificar pela comparação dos espectros das duas diluições da cafeína em clorofórmio com as diluições dos extratos no mesmo solvente.

Já a Figura 17, na página 137, mostra as mesmas amostras e padrões analisados por espectrofotometria no ultravioleta, também na faixa de comprimento de onda de 240 a 400 nm, só que desta vez usou-se a derivada segunda na avaliação.

Os espectros sobrepostos apresentaram uma diferença na leitura da absorbância na região dos 240 nm de comprimento de onda. Se olharmos com mais cuidado, podemos verificar esta diferença também na Figura 16.

Method file : ALDO.M (modified) Last update: Date
09/02/97 Time 12:20:50
Information : Default Method
Data File : C:\ALUNOSPG\ALDO4.SD Created : 9/1/97 16:55:03

Overlaid Spectra:

#	Name	Peaks(nm)	d1(Abs) (AU)	Valleys(nm)	d1(Abs) (AU)
1	Cafeina	260,0	2,0493E-2	287,0	-3,1973E-2
2	Cafeina	259,0	4,0935E-2	287,0	-6,4089E-2
3	Extrato 2	262,0	2,7787E-2	288,0	-5,6092E-2
4	Extrato 3	262,0	3,1967E-2	288,0	-6,4209E-2
5	Extrato 1	262,0	2,5282E-2	288,0	-5,0885E-2

Figura 16: Gráficos sobrepostos das análises dos extratos de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) obtidos pelos dois processos empregados por derivada primeira no aparelho Ergo Ultra VGA Vectro XM da Hewlett Pachard, modelo 8453.

Method file : ALDO.M (modified) Last update: Date
 09/02/97 Time 12:23:02
 Information : Default Method
 Data File : C:\ALUNOSPG\ALDO4.SD Created : 9/1/97 16:55:03

Overlaid Spectra:

#	Name	Peaks (nm)	Abs (AU)
1	Cafeína	273,0	0,531
2	Cafeína	273,0	1,0487
3	Extrato 2	275,0	0,83706
4	Extrato 3	274,0	0,96334
5	Extrato 1	274,0	0,7702

Figura 17: Gráficos sobrepostos das análises dos extratos de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) obtidos pelos dois processos empregados, avaliados por derivada segunda no aparelho Ergo Ultra VGA Vectro XM da Hewlett Pachard, modelo 8453.

A análise dos extratos de guaraná efetuadas no aparelho Ergo Ultra VGA Vectro XM, da Hewlett Pachard, modelo 8453, forneceu teores de cafeína dentro dos limites especificados para extratos comerciais.

A amostra 5 que corresponde a amostra de extrato 1, foi adquirida no mercado em São Paulo e apresentou 4,05% de cafeína; a amostra 3 que corresponde ao extrato 2, foi obtida por extração por solvente hidroalcoólico

e apresentou teor de 4,55% e a amostra 4, que corresponde ao extrato 3, foi obtida por extração supercrítica e apresentou o teor de 5,17% de cafeína.

As sementes de guaraná estudadas, procedentes dos municípios de Maués (PA) e de Alta Floresta (MT), mostraram ser 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 óleo fixo e outros componentes.

Esta diferença conferiu aos seus extratos uma cor esverdeada, diminuindo a sua solubilidade em água.

6.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Numa primeira etapa foram estudados parâmetros como a faixa de variação, a média simples, o erro padrão da média, o desvio padrão e a variância.

Estes parâmetros foram relacionados com os dados obtidos em função da procedência das sementes, comparados com os métodos de extração utilizados. Os resultados encontram-se na Tabela X, na página 139.

Na etapa seguinte foram analisados os dados obtidos de cada um dos processos com as sementes de uma única procedência, lançando-se mão da análise estatística descritiva, cujos resultados foram relacionados na Tabela XI, na página 139.

Esta Tabela mostra os dados obtidos pela extração supercrítica das sementes de guaraná procedentes do município de Alta Floresta, de Estado do Mato Grosso.

Tabela X: Análise descritiva dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Maués (PA) e de Alta Floresta (MT).

	Alta Floresta		Maués	
	Soxhlet	Fluido Supercrítico	Soxhlet	Fluido Supercrítico
N	10	10	10	10
Faixa de Variação	3,64-3,82	4,76-4,81	5,23-4,39	5,10-5,30
Média	3,82000	4,79000	4,29400	5,21900
Erro padrão da média	0,02371	0,00537	0,01551	0,02311
Desvio padrão	0,07498	0,01700	0,04903	0,07310
Variância	0,00562	0,00029	0,00240	0,00534

Tabela XI: Análise estatística descritiva dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico de sementes de guaraná provenientes de Alta Floresta (MT).

Análise estatística descritiva do teor de cafeína, extratos obtidos por fluido supercrítico de sementes de Alta Floresta (MT)

	N	Mínimo	Máximo	Média		Desvio padrão	Variância
	Estatístico	Estatístico	Estatístico	Estatística	Erro padrão	Estatístico	Estatística
EOR	10	4,7600	4,8100	4,7900	5,3748	1,6996	2,8890
ºVálido	10						

Tabela XII: Análise estatística descritiva dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Alta Floresta (MT).

Análise estatística descritiva do teor de cafeína, extratos obtidos por Soxhlet de sementes de Alta Floresta (MT)

	Número	Mínimo	Máximo	Média		Desvio padrão	Variância
	Estatístico	Estatístico	Estatístico	Estatística	Erro padrão	Estatístico	Estatística
TEOR	10	3,6400	3,9400	3,8200	2,3711	7,4981	5,6220
Nº Válido	10						

Média do teor de cafeína extraído em Alta Floresta.

Figura 18: Gráfico das médias dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Alta Floresta (MT).

Tabela XIII: Análise estatística descritiva dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico das sementes de guaraná provenientes de Maués (PA).

	Número	Mínimo	Máximo	Média		Desvio padrão	Variância
				Estatística	Erro padrão	Estatístico	Estatística
TEOR	10	5,100000	5,300000	5,21900000	2,3115651	7,3098108	5,343
Número válido	10						

Tabela XIV Análise estatística descritiva dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Maués (PA).

	Nº	Mínimo	Máximo	Média		Desvio	Variância
				Estatístico	Erro padrão	Estatístico	Estatística
TEOR	10	4,23000	4,39000	4,294000	1,550627	4,90351	2,404 E-03
NºVálido (lista)	10						

Tabela XV: Análise descritiva dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por solventes no aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Alta Floresta (MT).

	Número	Média	Desvio padrão	Erro Padrão	95% Intervalo de confiança p/ Média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Fluído Supercrítico	10	4,79000000	1,6996732	5,3748385	4,77784127	4,80215873	4,760000	4,810000
Soxhlet	10	3,82000000	7,4981479	2,3711226	3,76636148	3,87363852	3,640000	3,940000
Total	20	4,30500000	5,0040510	1,1189398	4,07080320	4,53919680	3,640000	4,810000

Tabela XVI: Análise ANOVA dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Alta Floresta.

	Soma dos quadrados	df	Área média (Mean Square)	F	Significância
Entre grupos	4,704	1	4,704	1591,748	,000
Dentro de grupos	5,320	18	2,956		
Total	4,758	19			

Tabela XVII: Análise descritiva dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Maués (PA).

	Número	Média	Desvio padrão	Erro Padrão	95% Intervalo de confiança p/ Média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Fluido Supercrítico	10	5,21900000	7,3098108	2,3115651	5.16670876	5.27129124	5.100000	5.300000
Soxhlet	10	4,29400000	4,9035135	1,5506271	4.25892238	4.32907762	4.230000	4.390000
Total	20	4,75650000	4,7836646	1,0696599	4.53261760	4.98038240	4.230000	5.300000

Tabela XVIII: Análise ANOVA dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Maués (PA).

	Soma dos quadrados	df	Área média (Mean Square)	F	Significância.
Entre Grupos	4.278	1	4.278	1104.349	.000
Dentro de Grupos	6.973	18	3.874		
Total	4.348	19			

Tabela XIX: Análise de REGRESSÃO dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico das sementes de guaraná provenientes de Maués (PA) e de Alta Floresta (MT).

	Média	Desvio padrão	Número
Extraído	5,16600000	.87158149	15
Adicionado	100,00000000	16.90308509	15

Tabela XX Análise de correlação dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Maués.

	Extraído	Adicionado
Correlação de Pearson		
	Extraído	1.000
	Adicionado	1.000
Significância. (1-tailed)		
	Extraído	.000
	Adicionado	.000
Nº		
	Extraído	15
	Adicionado	15

Média do teor de cafeína extraído das sementes de Maués (PA).

Figura 19: Gráfico das médias dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e extração por aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes de Maués (PA).

Tabela XXI: Correlações com os coeficientes da análise de regressão dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico da cafeína adicionada e recuperada.

CORRELAÇÕES COM COEFICIENTE		
Modelo		Adicionado
1	Correlações	Adicionado
	Covariâncias	Adicionado
a Variável dependente: Extraído		

Na Tabela XXII foram relacionados os coeficientes padronizados e não padronizados obtidos com a extração da cafeína padrão adicionada e foram calculados e relacionados os demais coeficientes a um intervalo de confiança de 95%.

Tabela XXII: Coeficientes da análise de regressão dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração supercrítica a partir da cafeína padrão adicionada e recuperada

COEFICIENTES DA VARIÁVEL DEPENDENTE: EXTRAÍDO											
Modelo	Coeficientes não padronizados		Coeficientes padronizados	t	Significância	95% de intervalo de Confiança para B		Correlações			Estatística de Colinearidade
	B	Erro padrão				Limite inferior	Limite superior	Ordem Zero	Parcial	Part	
1 Constante	1.100	.033		.332	.745	-.061	.083				
Adicionado	5.155	.000	1.000	157.792	.000	.051	.052	1.000	1.000	1.000	1.000

Tabela XXIII: Diagnósticos de colinearidade da análise de regressão dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração supercrítica da cafeína adicionada e recuperada.

DIAGNOSTICOS DE COLINEARIDADE					
		Valor próprio	Índice condicional	Proporções de Variância	
Modelo	Dimensão			(Constante)	Adicionado
1	1	1.987	1.000	.01	.01
	2	1.307E-02	12.329	.99	.99

Variável dependente: EXTRAÍDO

Tabela XXIV: Resíduos estatísticos da análise de regressão dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração supercrítica da cafeína padrão adicionada e recuperada.

RESIDUOS ESTATÍSTICOS					
	Mínimo	Máximo	Médio	Desvio padrão	N
Valor previsto	4,13500023	6,19700003	5,16600000	.87135404	15
Resíduo	-2,60000005	3,40000002	5,9211895	1,9910514	15
Valor padrão previsto	-1.183	1.183	.000	1.000	15
Resíduo padrão	-1.258	1.646	.000	.964	15

Variável dependente: EXTRAÍDO

Boxplot do teor de cafeína extraída, Alta Floresta, extração supercrítica.

Figura 20: Representação Boxplot dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração supercrítica das sementes de guaraná provenientes do município de Alta Floresta (MT)

Figura 21: gráfico dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração das sementes de guaraná provenientes dos municípios de Alta Floresta (MT) e Maués (PA).

Na figura 21, acima, os pontos indicam as médias do teor de cafeína extraído. As barras de erro apresentam o intervalo de confiança de 99% em relação à média.

Teor de cafeína no
extrato.

Figura 22: Representação Boxplot dos teores de cafeína obtidos com os processos de extração com solventes no aparelho Soxhlet das sementes de guaraná provenientes do município de Alta Floresta (MT)

Médias do teor de
caféina recuperada.

Porcentagem de caféina padrão adicionada.

Figura 23: gráfico de médias dos teores de caféina recuperados, obtidos com o processo de extração supercrítica, da caféina adicionada de 80, 100 e 120% do valor teórico estimado.

Na Figura acima, os pontos indicam as médias do teor de caféina extraído. As barras de erro apresentam o intervalo de confiança de 99% em relação à média.

Porcentagem de
caféina recuperada
(escala x 100).

Figura 24: gráfico Boxplot da porcentagem de teores de caféina recuperados da matriz, obtidos pela extração supercrítica, considerando os valores recuperados após a adição de 80, 100 e 120% de caféina padrão sobre o valor teórico estimado.

A Figura 24 mostra os resultados em Boxplot da porcentagem de caféina recuperada da matriz pelo método de Fluido Supercrítico, considerando os valores recuperados obtidos quando foram adicionados 80%, 100% e 120% de caféina.

Figura 25: Representação de um gráfico 'Scatterplot', mostrando os teores de cafeína obtidos com os dois processos de extração, com as sementes de guaraná das duas regiões diferentes testadas.

CAPÍTULO 7

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Comparando-se o extrato de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) obtido pela extração por fluido supercrítico com a oleorresina obtida pela extração com solvente (álcool 70° GL) no aparelho Soxhlet, verifica-se que existe uma diferença muito grande no conteúdo de substâncias não voláteis.

Foram encontrados 9,50% de substâncias não voláteis no extrato, usando o processo de extração por fluido supercrítico (SFE) e 35% no extrato obtido pela extração com o aparelho Soxhlet, usando álcool 70°GL.

Acredita-se que o álcool por ser de uma polaridade superior ao dióxido de carbono supercrítico, solubiliza os componentes não voláteis presentes nas amostras, que aumentam o rendimento quantitativo da oleorresina.

Estes componentes não voláteis em nada contribuem para o aroma e o sabor (90). Na extração por dióxido de carbono supercrítico, esses componentes inertes estão em quantidades menores.

O rendimento do extrato de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) obtido com a extração por fluido supercrítico foi de 7,5% em peso, com um conteúdo de substâncias não voláteis de 9,50%.

Na extração por álcool etílico (etanol) 70° GL, embora o rendimento em peso fosse maior (8,25% de oleorresina em peso), 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 efetivamente superior, maior, em termos reais (6,78% do dióxido de carbono supercrítico contra 5,36% da oleorresina, obtida com a extração por solventes).

Na análise por cromatografia em camada delgada dos extratos foram identificadas as xantinas teobromina (R_f -0,22), teofilina (R_f -0,37) e cafeína (R_f -0,57).

O menor tempo de duração para a extração por fluido supercrítico leve-se a maior penetração do solvente nas partículas das sementes.

Em 30 minutos de extração o conteúdo de óleos fixos (esverdeados) foi consideravelmente mais baixo no extrato por dióxido de carbono supercrítico, o mesmo acontecendo com a cor do extrato, o que diminuiu também o teor de não voláteis.

Isso mostra que a solubilidade da cafeína em dióxido de carbono supercrítico é bastante alta assim, uma quantidade máxima de extrato é obtida das sementes de guaraná, mesmo com uma extração de no máximo 30 minutos.

As solubilidades da cafeína pura em dióxido de carbono supercrítico determinadas a 40°C, 50°C e 60°C, de 150 a 375 bares são apresentadas na figura 26, página 156.

Observa-se que a solubilidade da cafeína aumenta com a pressão em todas as temperaturas investigadas, apresentando um comportamento retrógrado nas pressões baixas (uma diminuição na solubilidade com o aumento da temperatura).

Estes resultados estão em concordância qualitativa com os resultados obtidos por Stahl et al. (306). O comportamento retrógrado é uma característica típica dos processos de extração supercrítica e é atribuído, principalmente, a um compromisso entre os efeitos da pressão de vapor que aumenta com a temperatura e o efeito da densidade do solvente que diminui com a temperatura, o que resulta na redução da solubilidade. Este comportamento retrógrado é uma manifestação da predominância da densidade que é muito sensível a temperatura nestas condições.

Figura 26: Solubilidade da cafeína pura (em fração molar/20x10⁻⁴) no CO₂ supercrítico a 40, 50 e 60°C e pressões de 150 a 375 bar.

A solubilidade da cafeína pura foi determinada em 40, 50 e 60 graus centígrados e pressões de 150 a 375 bares, com a finalidade de calibrar o aparelho, comparando estes valores com os dados da literatura existentes (). O desvio padrão foi da ordem de 2%.

Um modelo termodinâmico que utiliza uma equação de estado de quarta ordem foi usado para correlacionar a solubilidade da cafeína no dióxido de carbono supercrítico. Esta tem a seguinte fórmula:

$$P = \frac{RT}{v - b} - \frac{a' - c - d/v}{v(v - b) + b(v - b)} \quad (1)$$

As sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) moídas foram analisadas quanto a granulometria, fornecendo os resultados constantes na Tabela XXV, sendo classificadas como pó moderadamente grosso.

Tabela XXV: Análise granulométrica de uma amostra de sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) moída.

Tamanho da malha (Peneira Tyler)	X médio (mm)	Fração retida % em peso
16	1,190	0,49
20	0,840	8,01
30	0,590	42,06
40	0,420	32,11
50	0,297	11,27
80	0,177	6,06

A pressões maiores que 290 bars, as solubilidades comportam-se, normalmente, aumentando com a temperatura. Neste caso, o aumento da pressão de vapor é mais que suficiente para compensar a diminuição da solubilidade, devida á redução da densidade.

As solubilidades da cafeína pura a 40°C foram obtidas com o objetivo de compará-las aos dados da literatura (154). A tabela XXVI, abaixo, mostra boa concordância dos dados obtidos neste trabalho a uma temperatura de 40°C com os dados da literatura, com um desvio padrão de apenas 2%.

Um modelo termodinâmico que utiliza uma equação de estado de quarta ordem foi usado para correlacionar a solubilidade da cafeína no dióxido de carbono supercrítico.

Detectou-se a presença de outras substâncias, as quais não foram estudadas mais detalhadamente, frente ao interesse focalizado nos princípios ativos, como a cafeína.

Tabela XXVI: Solubilidade da cafeína pura no dióxido de carbono supercrítico a 40°C.

Pressão (Bares)	Solubilidade (fração molar x10 ⁴)	Solubilidade (fração molar x10 ⁴)
	Este trabalho	Dados de Johannsen e Brunner (136)
285	2,89	2,95
330	3,54	3,29
345	3,87	3,87

As amostras de sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) estudadas, procedentes do município de Maués (PA) e do município de Alta Floresta (MT), se mostraram bastante diferentes, no que diz respeito à composição química e ao teor de cafeína.

Atribuímos esta diferença ao processamento das sementes na origem, o que conferiu aos seus extratos a cor esverdeada mais forte e piorou em muito sua solubilidade em água, fator de primordial importância para a indústria de refrigerantes

As sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) 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 (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae), procedentes do município de Alta Floresta (MT) foram sempre maiores do que os das sementes de guaraná originárias do município de Maués (PA), o que pode ser devido à extração de outros componentes presentes nas sementes de guaraná, como óleos fixos, 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 obtidos por dióxido de carbono supercrítico são mais específicos, extraindo apenas os componentes responsáveis pelo 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 de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) na região de Alta Floresta (MT) e no município de Maués (PA), como comentado anteriormente.

Como a intenção era a de extrair o extrato total do guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae), e utilizar o teor de cafeína para validar o método de extração com o dióxido de carbono supercrítico, foi usada uma pressão de 350 bars, caso se desejasse extrair apenas a cafeína e obter o guaraná descafeinado seriam necessários, apenas 80 bars de pressão, na temperatura de 50°C, mas a extração perderia em eficiência.

As medidas de pressão podem ser transformadas umas nas outras utilizando os valores constantes no quadro I, página 161.

Por questões técnicas foram mantidas as unidades conforme descritas nos respectivos manuais e trabalhos originais. Lembrando que 1 bar corresponde a 10^5 newtons/m² ou 0,98697 atmosferas e 1 atmosfera corresponde a $1,01325 \times 10^5$ newtons/m².

Os códigos oficiais ao apresentarem uma metodologia analítica pressupõem que esta metodologia foi devidamente validada a partir de uma amostra padronizada preparada especificamente para este fim.

No presente trabalho, uma vez selecionado a substância que serviria de suporte para o estudo de validação do processo extrativo, a cafeína, procurou-se usar um método analítico oficial já validado, que é o método de análise da cafeína, constante na Farmacopéia Brasileira (90).

Quadro I: Equivalência de valores de pressão de diferentes notações nacionais e internacionais.

Psi	Bar	Kpa	Atm
1	0,07	7	0,07
2	0,14	14	0,14
5	0,34	34	0,34
10	0,69	69	0,68
100	6,89	689	6,80
1000	68,95	6895	68,05

A escolha pelo método gravimétrico da cafeína considerou além da comprovada eficiência, sua adequação aos laboratórios de controle de qualidade que dispõem de recursos e equipamentos mais modestos.

Reconhece-se o valor incontestável da HPLC, método preconizado pela última edição da Farmacopéia Americana (345) e a análise UV, no aparelho Ergo Ultra VGA Vectro XM da Hewlett Pachard, modelo 8453, utilizando a derivada segunda (Figuras 16, página 136 e 17, página 137), mas não contempla a real condição de trabalho de muitos laboratórios.

Como já mencionado anteriormente, a mudança na tecnologia de extração supercrítica, constitui-se em fator determinante para a revalidação do método.

As amostras das sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) padronizadas preparadas para este trabalho foram provavelmente diferentes daquela amostra utilizada para a validação da metodologia oficial da Farmacopéia Brasileira II (90).

Neste caso, a aplicação do método gravimétrico foi apenas para avaliação preliminar do comportamento deste método e os resultados encontrados para estas amostras foram compatíveis com os limites esperados e aceitos oficialmente.

Como o método de extração das sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por solventes no aparelho Soxhlet é conhecido e aceito para a obtenção de extratos de guaraná hidrossolúveis, este foi utilizado como método comparativo ao método de extração supercrítico proposto.

A preferência pelos métodos supercríticos justifica-se primeiramente pelo bom desempenho em rendimento, pela rapidez na extração e pela exatidão e precisão demonstrados, os atributos mais importantes de qualquer processo.

A maioria dos autores admite que quando estes métodos são bem conduzidos, os valores para a exatidão e precisão, estão compatíveis com os níveis de exigência adotados nos códigos oficiais e laboratórios de medicamentos das indústrias farmacêuticas.

Um outro atributo muito importante na validação de método de extração é o bom desempenho da linearidade obtido pelo método de extração supercrítica das sementes do guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) ao recuperar a cafeína adicionada na proporção de 80, 100 e 120% sobre o valor esperado, como pode ser visualizado na análise estatística dos resultados obtidos.

Todas estas argumentações conduziram à decisão de fixar as condições operacionais do presente trabalho para validar o método de

extração supercrítica das sementes do guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae).

O objetivo foi observar os aspectos operacionais mais importantes dos dois métodos de extração, iniciando-se pela seleção dos aspectos com maior potencial de aplicação, mesmo por aqueles laboratórios de condições mais limitadas.

A exatidão, a precisão e a linearidade entre os muitos itens recomendados para a validação de métodos analíticos, são os que mais se aplicam para a validação de processos extrativos, segundo a maioria dos autores.

Ao mesmo tempo testar todos os itens de validação resultaria em desprendimento exagerado de tempo, custo, dificuldades na aquisição de material necessário e outros encargos não garantindo pleno sucesso no objetivo da validação.

Assim, somente os atributos exatidão, precisão e linearidade foram usados para permitir um julgamento suficientemente claro e criterioso para a validação de método de extração supercrítica das sementes do guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae).

Lembrando que validação de um método é uma parte integral do desenvolvimento deste e que por definição é o processo de provar que um método é aceitável para os fins a que se propõem.

Para métodos de extração por fluidos supercríticos envolvendo compostos orgânicos, os dois parâmetros de validação mais importantes são a exatidão e a precisão.

Normalmente, a exatidão é determinada pela extração de um material padrão de referência (MPR) e calculando a porcentagem recuperada (e precisa) relativa aos valores teóricos esperados.

Alternativamente, a exatidão de um método pode ser determinada pela comparação dos resultados do método com os resultados de um método alternativo já existente e de uso consagrado (118,193,217).

Para este trabalho foi usado como método existente alternativo, o método da extração por solventes no aparelho Soxhlet.

Comparado a resultados do método da extração por solventes com o aparelho Soxhlet, as recuperações do método da extração supercrítica com dióxido de carbono são muito melhores, com uma exatidão média geral de 99,46% de recuperação de cafeína padrão.

Como o critério de exatidão para métodos de análise é que a recuperação principal será 100 + ou – 2% em cada concentração sobre uma faixa de 80 a 120% da concentração alvo, extrapolando-se este critério, podemos aceitar o método da extração supercrítica das sementes do guaraná como tendo a exatidão adequada para ser validado.

Como critério de linearidade para um método é que o coeficiente de correlação para cada uma das três curvas seja $>$ ou $=$ a 0,99 para a faixa de 80 a 120% da concentração alvo.

No trabalho, o valor encontrado foi 1,000, de onde conclui-se que o método da extração supercrítica das sementes do guaraná apresenta-se com a linearidade adequada para ser validado.

Mais importante, o desempenho geral do método supercrítico validado, quando comparado ao método existente da extração por solvente no aparelho Soxhlet, mostrou uma exatidão de 92,3% contra 73,0% para as sementes provenientes do município de Alta Floresta (MT) e 98,0% contra 82,7% para as sementes provenientes do município de Maués (PA).

Os teores de cafeína obtidos com os processos de extração por fluido supercrítico e com a extração com solventes pelo aparelho Soxhlet com as sementes de guaraná provenientes dos municípios de Alta Floresta (MT) e Maués (PA), apresentaram resultados sempre maiores e melhores para os dois processos para as sementes provenientes do município de Maués (MT), como pode ser visto na tabela VIII, na página 135.

Na mesma tabela, analisando comparativamente as faixas de variação estatística em relação à média dos valores obtidos, verificamos valores maiores e mais próximos para os teores de cafeína obtidos pelo método da extração supercrítica das sementes de guaraná de ambas as procedências.

Ainda, analisando os erros padrões da média, observa-se uma maior constância para os resultados obtidos pela extração supercrítica, o mesmo acontecendo com o desvio padrão e a variância.

Ao observarmos a tabela XVI, na página 142, que compara os dados obtidos pelos dois processos de extração pelo método estatístico da ANOVA, das sementes provenientes do município de Alta Floresta (MT), verificamos que a significância obtida é igual a zero.

Isto quer dizer que comparando friamente os resultados, na prática, não existe uma semelhança estatística entre os dois métodos de extração estudados, o que pode ser visualizado na figura 18, página 140, que

compara as médias dos teores de cafeína obtidos pelos dois métodos de extração.

Pela tabela XVII, página 143, pode-se concluir que também com as sementes de guaraná provenientes do município de Maués (PA) o comportamento é semelhante.

A análise estatística ANOVA também apresentou significância estatística igual a zero, mostrando que os dois processos de extração são bastante diferentes entre si. A figura 19, página 145, que compara as médias estatísticas evidencia este fato.

Nas observações sobre os atributos dos métodos extrativos estudados, os atributos exatidão, a precisão e a linearidade foram considerados em todos os casos e nem poderia ser diferente uma vez que eles são os mais importantes em qualquer programa de validação.

Os dados pertinentes a cada processo de extração permitem uma análise crítica dos resultados, podendo se comparar o desempenho entre eles possibilitando a escolha de um método mais adequado para futura aplicação numa amostra específica ou de uma outra procedência.

O planejamento deste trabalho preocupou-se em avaliar estes três atributos. Das alternativas que poderiam ser empregadas para determinar exatidão e precisão, optou-se por trabalhar em cada amostra de sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) com os dois métodos de extração, isto é, o método de extração supercrítica e o método da extração com solventes no aparelho Soxhlet. Esta alternativa forneceu um volume de dados satisfatórios para o objetivo desta pesquisa.

Em relação à linearidade, o usual é determiná-la usando-se um placebo da amostra ao qual são acrescentados três níveis de padrão do fármaco próximos ao teor declarado, englobando também o limite de aceitação.

No trabalho, foi adotado um intervalo de 80 a 120% sobre o valor médio de cafeína obtido pelo processo extrativo a ser validado, acrescentando-se estas quantidades e usando-se as mesmas condições de extração e processamento, para recuperação e melhor observação da proporcionalidade das respostas analíticas.

Na presente pesquisa, não se pretendeu abordar todos os atributos de validação de métodos numa amplitude incompatível com as condições de trabalho existentes, e sim contribuir com a avaliação de alguns aspectos da validação do método da extração supercrítica das sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae).

A leitura deste trabalho, desta maneira, poderá servir de indicador para futuros trabalhos de validação de métodos supercríticos aumentando a conscientização de que os processos de extração supercrítica, a exemplo das exigências de órgãos oficiais para os métodos analíticos, também deverão ser validados antes de ser usados como métodos alternativos ou mesmo substitutivos aos processos extrativos selecionados atualmente em uso.

CAPÍTULO 8

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo e a sua análise estatística permitem chegar as seguintes conclusões: Que o método de extração supercrítica das sementes do guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) procedentes de duas localidades diferentes: do município de Maués, Pará e do município de Alta Floresta, Mato Grosso, no aparelho PPI FC, modelo ES-204, pertencente à firma White Martins S.A., Rio de Janeiro – RJ, usando o dióxido de carbono supercrítico, nas condições estabelecidas, pode ser validado, servindo como um método alternativo para a extração de sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae), 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 extratos obtidos com o método convencional de extração por solventes, usado na análise comparativa e padrão;

Que as indústrias de refrigerantes que necessitam, por força da Lei dos Sucos Brasileira, acrescentar 5% de suco natural aos seus produtos, serão beneficiadas, pela adoção do uso da metodologia proposta, que pode substituir os atuais métodos dispendiosos, pouco eficazes, que utilizam misturas hidroalcoólicas e concentradores sofisticados, aumentando em muito seu custo operacional;

Que o teor de cafeína, importante estimulante presente nas sementes de guaraná, varia com o tipo de guaraná, lugar de plantio e

técnicas de processamento das sementes, geralmente limpas e torradas em fogo lento, durante 6 horas, em forno de barro, retirando-se as películas antes da moagem ou processamento (1), mas que tanto para os extratos obtidos pelo método convencional quanto para os extratos obtidos pelo método da extração por fluido supercrítico, está de acordo com os limites estabelecidos pela Legislação Brasileira;

Que os extratos obtidos e avaliados por turbidimetria (diluição 1:10), análise sensorial e por espectrofotometria derivativa (Default method), no aparelho Ergo Ultra VGA Vectro XM, Hewlett-Packard, mod. 8453, Palo Alto contra padrões de cafeína da Merck, Darmstadt, Alemanha, podem ser comercializados por atender às especificações comerciais em vigor;

Que a extração por fluidos supercríticos, utilizando dióxido de carbono supercrítico, no aparelho e condições especificadas, pode ser uma alternativa rápida e econômica para a extração da cafeína e talvez outros produtos vegetais apolares, podendo ainda, extrair produtos mais polares, pela adição de modificadores, ou cossolventes, 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;

E que o procedimento utilizado pode servir de base para a extração por fluido supercrítico de outras drogas vegetais, notadamente, aquelas que contém a cafeína e outras xantinas na sua composição e permitindo construir um equipamento bem mais simples, seguro e de baixo custo operacional do que o utilizado nos nossos experimentos. Trabalhando-se com a pressão constante em 350 bares e a temperatura em 50°C é possível extrair com sucesso o extrato das sementes do guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae), e que esta condição operacional não é difícil de monitorar numa instalação piloto.

A revisão bibliográfica revelou que o interesse no uso de fluidos supercríticos e suas aplicações, continua 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.

CAPÍTULO 9

RESUMO

Em 1947, Messmore, obteve uma patente para a retirada do asfalto de petróleo usando fluidos supercríticos. Depois surgiram muitas patentes, principalmente, sobre a descafeinação do café, a extração do lúpulo e da nicotina.

Novo estímulo surgiu com o programa da EPA de redução do uso de produtos químicos até 1995, devido às emissões industriais tóxicas. Estas seriam responsáveis pelo aquecimento global do planeta.

Muitos trabalhos publicados até hoje, recomendam o uso do CO₂ e o método da extração supercrítica, para a obtenção de extratos naturais.

Na área farmacêutica, a validação de processos e metodologia analítica está plenamente aceita como atividade necessária e que tem produzido excelentes resultados na melhoria do desempenho industrial e da qualidade dos produtos.

Este trabalho validou o método da extração supercrítica usando as sementes do guaranazeiro, planta que cresce naturalmente na Amazônia.

O guaraná, possuidor de cafeína é conhecido como estimulante e regenerador do organismo e entre os Índios como afrodisíaco.

CAPÍTULO 10

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMOVICS, J.A. **Chromatographic analysis of pharmaceuticals**. New York: Dekker, 1990. 380 p.
2. ADAMS, M. K. **Analysis of coffee**: production and trade. Allentown: Liquid Carbonic Industries Corporation, 1991. p. 1-30.
3. ALBANOZ, M.A. **Medicina tradicional herbaria**. Caracas: Instituto Farmacoterápico Latino, 1995. 564 p.
4. 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.
5. ALTESOR, C., CORBI, P., DOL, I., KNOCHEN, M. Application of experimental design to the development of a multicomponent derivative spectrophotometric method: simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim. **Analyst**, Cambridge, v. 118, p. 1549-53, 1993.

6. ANKLAM, E., MÜLLER, A. Extraction of caffeine and vanillin from drugs by supercritical carbon dioxide. **Pharmazie**, Berlin, v. 50, p. 364-5, 1995.
7. APPELL, L. **Cosmetics, fragrances and flavors**. Whiting:Novox, 1982. Appendix, p. 427-40.
8. ARIM, R.H., AGUINALDO, A.R. TANAKA, T., YOSHIZAWA, T. Optimization and validation of a minicolumn method for determining aflatoxins in copra meal. **JAOAC Int.**, Champaign, v. 82, p. 877-82, 1999.
9. 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.
10. ARPINO, P.A., HAAS, P. Recent developments in supercritical fluid chromatography-mass spectrometry coupling. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 703, p. 479-88, 1995.
11. 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.
12. 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.

13. ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), **Official methods of analysis**. 14. ed. Arlington: Association of Analytical Chemists, 1984. Métodos 30.020 e 3.138.
14. BAILEY, A.E. **Industrial oil and fat products**. New York: John Wiley, 1979. Cap.1, p.3-21.
15. BARI, V.R., DHORDA, U. J., SUNDARESAN, M. Simultaneous estimation of nalidixic acid and metronidazole in dosage forms using packed column supercritical fluid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 376, p. 221-5, 1998.
16. 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.
17. BERGER, T.A. Effects of temperature and density on retention in capillary supercritical fluid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 478, p. 311-24, 1988.
18. 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.
19. 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.

20. 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.
21. 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.
22. BLAUCH, J.L., TARKA, S.M.Jr. Determination of caffeine and theobromine in coffee, tea, and instant hot cocoa mixes. **J. Food Sci.**, Chicago, n. 48, p. 745-50, 1983.
23. 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.
24. 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.
25. BÖHME, H., HARTKE, K. **Deutsches arzneibuch, kommentar**. 7. ed. Frankfurt:Govi-Verlag, 1968.
26. 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.

27. BOWADT, S., HAWTHORNE, S.B. Supercritical fluid extraction in environmental analysis. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 703, p. 549-71, 1995.
28. **BRASIL**. Leis, decretos, etc. Lei nº 9787, de 10 fev. 1999. Diário Oficial da União, Brasília, nº29, 11 de fevereiro 1999. seção 1, p. 1-2. {altera a Lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências}. 1999.
29. **BRASIL**. Leis, decretos, etc. Resolução nº 10, de 2 jan.2001. Diário Oficial da União, Brasília, 9 de janeiro de 2001. Seção 1. {a Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos} 2001.
30. BRENNECKE, J.F., ECKERT, C.A. Phase equilibria for supercritical fluid process design. **AIChE J.**, New York, v. 35, p. 1409- 27, 1989.
31. BRESSOLE, F., BROMET-PETIT, M., AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods—Applications to pharmacokinetics. **J.Chromatog. B**, Amsterdam, v. 686, p. 3-10, 1996.
32. BRITAINS, H.C. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. **Pharm. Technol.**, São Paulo (ed. Port.), Julho, p. 4-9, 1998.

33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.

39. CAGNO, N. Sobre alguns aspectos importantes do guaraná (Paullinia cupava). **R. flora medicinal**, São Paulo, S.I., n. 5, p. 213-48, 1947.
40. CAGNO, N. Sobre alguns aspectos importantes do guaraná. **Rev. Inst. Adolpho Lutz**, São Paulo, n. 42 (1), p. 66-9, 1942.
41. CALVEY, E.M., BLOCK, E. Supercritical fluid extraction of allium species. **ACS Symposium Series**. v. 660, p. 113-24, 1997.
42. CANAVACIOLO, V.L.G, HERNÁNDEZ, J.M. Validation of a gas chromatographic method for determining fatty alcohols that compose policosanol in five-milligram film coated tablets. **JAOAC Int.**, Champaign, v.82, p 834-9, 1999.
43. 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.
44. CAPANGPANGAN, M.B., NOBLET, J.A., SUFFET, I.H. Evaluation of selected filters for collection and subsequent supercritical fluid extraction of suspended solids for trace organic analysis. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 753, p. 279-90, 1996.
45. CAPANGPANGAN, M.B., SUFFET, I.H.M. Validation studies for a new supercritical fluid extraction method for the isolation of hydrophobic organic compounds from filtered suspended solids. **J. Chromatog. A**, Amsterdam, v. 782, p. 247-56, 1997.

46. CARR, G.P., WAHLICH, J.C. Validation of extraction methods for the isolation of organic compounds. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Blacksburg, n. 8, p. 613. 1990.
47. CASTIONI, P., CHRISTEN, P., VEUTHEY, J.L. Supercritical-fluid extraction of compounds from plant-origin. **Analusis**, Paris, v. 23, p. 95-106, 1995.
48. CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis-viewpoint and discussion. **J. Chromatog. B**, Amsterdam, v. 689, p. 175-80, 1997.
49. 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.
50. 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.
51. CHARALAMBOUS, G., INGLETT, G. **Chemistry of foods and beverages**: recent developments. New York:Academic Press, 1982. p. 149-69.
52. 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.

53. CHEN, Y., YU, D.Q. Tonkinecin, a novel bioactive annonaceous acetogenin from *Uvaria tonkinensis*. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v. 59, p. 507-9, 1996.
54. CHESTER, T.L., PINKSTON, J.D., RAYNIE, D.E. Supercritical fluid chromatography and extraction. **Anal. Chem.**, Washington, v. 64, p. 153R-170R, 1992.
55. CHESTER, T.L., PINKSTON, J.D., RAYNIE, D.E. Supercritical fluid chromatography and extraction. **Anal. Chem.**, Washington, v. 68, p. 487R-514R, 1996.
56. CHIAP, P., HUBERT, P., BOULANGER, B., CROMMEN, J. Validation of an automated method for the liquid chromatographic determination of atenolol in plasma: application of a new validation protocol. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 391, p. 227-38, 1999.
57. CHOI, Y.H., KIM, J.W., NOH, F.S., YOO, K.P. Comparison of supercritical carbon dioxide extraction with solvent extraction of nonacosan-10-ol, alpha-amyrin acetate, squalene and stigmasterol from medicinal plants. **Phytochemical analysis**. v 8, p. 233-37, 1997.
58. 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.

59. 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.
60. CLARKE, G.S. Text on validation of production procedures. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Washington, n. 12, p. 643. 1994.
61. CLARKE, R.J., MACRAE, R. **Coffee Chemistry**. London:Elsevier, 1985. v.1, p. 113-8.
62. CLURZAK, E.W. Validação de métodos em espectroscopia para análises farmacêuticas. **Pharm. Technol.** (ed. Port.) São Paulo. Junho 1998, p. 22-8, 1998.
63. 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.
64. 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.
65. COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. Rio de Janeiro:L.C.S.A., 1942. 288 p.

66. COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6. ed., Campinas:Unicamp, 1995. p. 15-9.
67. COMMISSARIAT À L'ENERGIE ATOMIQUE, Spécialiste français CO₂ supercritic. **Parfums Cosmét.**, Paris, v. 119, p. 49-56, 1994.
68. CONCEIÇÃO, M. **As plantas medicinais do ano 2000**, 2 ed. São Paulo:Tao, 1982. 152 p.
69. CORTES, H.J. Developments in multidimensional separation systems **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 626, p. 3-23, 1992.
70. COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1978.
71. 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.
72. CRAVO, A.B. **Frutas e ervas que curam**. São Paulo:Hemus, 1984. 379 p.
73. 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.

74. 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.
75. 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.
76. DESPAUTZ, J.F. **Automation and validation of information in pharmaceutical processing**. New York:Dekker, 1998. 445 p.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. 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.

81. DUX, J.P. Handbook of quality assurance for the analytical chemistry laboratory. New York: Van Nostrand Reinhold, 1986. 123 p.
82. 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.
83. ECO, H. **Como se faz uma tese**. São Paulo: Perspectiva, 1996. 170p.
84. 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.
85. 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.
86. ENDRESS, R. **Plant cell biotechnology**. Berlin: Springer, 1994. p. 172-6.
87. **EUROPEAN** pharmacopea. Sainte-Ruffine: Maisonneuve S. A., 1971. v. 1-3.
88. FABRE, H. Validation dès méthodes d'électrophorèse capillaire appliqués a l'analyse des composés pharmaceutiques. **Analisis**, Paris, v. 27, n.2, p. 155-85, 1999.

89. FAGES, J., PODDEVIN, N., KING, M.W., MAROIS, Y., BRONNER, J., JAKUBIEC, B., ROY, R., MAINARD, D., LAROCHE, G., DELAGOUTTE, J.P., GUIDOIN, R. Use of supercritical fluid extraction as a method of cleaning anterior cruciate ligament prostheses-In vitro and in vivo validation. **Asaio J.**, Philadelphia, v. 44, p. 278-88, 1998.
90. **FARMACOPÉIA** brasileira, 4. ed. São Paulo:Atheneu, 1988.
91. **FARMACOPÉIA** dos Estados Unidos do Brasil. 2 ed. São Paulo:Siqueira, 1959. p. 512-3.
92. FARREL, K.T. **Spices, condiments, and seasonings**. New York: Van Nostrand Reinhold. 1990. p. 83-136.
93. FAUGERON, J., TOURTE, J., GROSS, P., COOPER, J.F. Supercritical fluid extraction of pesticide residues. Development and validation of a method applied to cereals and cereals products. **Analusis**, Paris, v. 25, p.192-6, 1997.
94. 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.
95. 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.
96. FIFIELD, F.W., HAINES, P.J. **Environmental analytical chemistry**. London: Blackie, 1996. p. 102.

97. 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.
98. FONSECA, C.A. et al. Genotoxic and mutagenic effects of guarana (Paullinia cupana) in prokaryotic organisms. **Mutation Research**, S.I., v. 321, n. 3, p. 165-73, 1994.
99. 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.
100. FONTANA, J.D., LANÇAS, F.M., PASSOS, M., CAPPELARO, E., VILEGAS, J., BARON, M., NOSEDA, M., POMÍLIO, A.B., VITALE, A., WEBBER, A.C., MAUL, A.A., PERES, W.A., FOERSTER, L.A. Selective polarity- and Adsorption-guided extraction/purification of annona sp. acetogenins and biological assay against agricultural pests. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Clifton, v. 70-2, p. 67-76, 1998.
101. 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.
102. FOYE, W.O., LEMKE, T.L., WILLIAMS, D.A. **Principles of medicinal chemistry**. 4 ed. Media: Sans Tache, 1995. p. 137, 273-5, 363-4, 721, 949.

103. 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.
104. FREITAS, P.C.D., MARTINS, J.L.S., CORAZZA, S. Aplicações de extratos vegetais como protetores solares. **Aerosol & Cosméticos**, São Paulo, v. 14, n. 80, p. 26-31, 1992.
105. 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.
106. GENERAL Test a 1225. Validation of compendial methods. USP 23, Rockville, M.D., **United States Pharmacopeial Convention**, 1995. p. 1882-4.
107. GENNARO, A.R., ed. **Remington's pharmaceutical sciences**. 17. ed. Easton: Mack , 1985. p.1133-5.
108. GERARD, D. Kontinuierliche deterpenierung ätherischer öle durch gegenstromextraktion mit verdichtetem kohlendioxid. **Chem. Ing. Tech.**, Weinheim, v. 56, p. 794-8, 1984.
109. GERBAULT, P., ROBIC, Y. Un extrait de genièvre pur et puissant. **Parfums Cosmét.**, Paris, v. 118, p. 108, 1994.
110. GERE, D.R. Supercritical fluid chromatography. **Science**, Washington, v. 222, p. 253-9, 1983.

111. 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.
112. 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.
113. 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.
114. 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.
115. GOODMAN, L.S., GILMAN, A., HARDMAN, J.G. **Goodman & Gilman-As bases farmacológicas da terapêutica.** 9 ed. Rio de Janeiro:McGraw-Hill Interamericana, 1996. p. 665-74.
116. GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1987. 621p.
117. GOPALAKRISHNAN, N., NARAYANAN, C.S. Supercritical carbon dioxide extraction of cardamom. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 39, p. 1976-8, 1991.

118. GREEN, M.J. A practical guide to analytical method validation. **Anal. Chem.** News and features, Washington, p. 305a-9A, may, 1996.
119. GREIBROKK, T. Applications of supercritical fluid extraction in multidimensional systems. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 703, p. 523-36, 1995.
120. GREIBROKK, T. Recent developments in the use of supercritical fluids in coupled systems. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 626, p. 33-40, 1992.
121. GROB, R.L. **Modern practice of gas chromatography**. Chichester: Wiley Interscience, 1995. p. 802-5, 817-8, 826-7.
122. GUIDELINE for submitting samples and analytical data for methods validation. **Food and Drug Administration**, 1987.
123. GUNNLAUGSDOTTIR, H., SIVIK, B. Lipase-catalyzed alcoholysis of cod liver oil in supercritical carbon dioxide. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 72, p. 399-405, 1995.
124. GYGER, R.F. **New roles for supercritical**. Allentown: Intra-Corporation Communication, Liquid Carbonic Supercritical, Inc., 1990.
125. HANNON III, J.T., MARKOWSKI, M.J. Novas técnicas para redução de tempo e custo de validação e sistemas. **Pharm. Technol.** (ed. Port.) São Paulo. V. 1, n. 1, abril 1998, p. 4-12, 1997.

126. 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.
127. HAWTHORNE, S.B. Analytical scale supercritical fluid extraction. **Anal. Chem.**, Washington, v. 62, p. 633A- 42A, 1990.
128. 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.
129. HAWTHORNE, S.B., KRIEGER, M.S., MILLER, D.J. Analysis of flavormand fragrance compounds using supercritical fluid extraction coupled with gas chromatography. **Anal. Chem.**, Washington, v. 60, p. 472-7, 1988.
130. 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.
131. 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.

132. 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.
133. 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.
134. 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.
135. HILL, H.M. Bioanalytical methods. A critique of the proposed FDA guidance. **Chromatographia**, Washington, n. 52, p. 565-9, suppl. 5, 2000.
136. HOKANSON, G.C. A practical method validation. **Pharm. Technol.** Edison, New Jersey, n. 18, p. 118, 1994.
137. 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.

138. HUBERT, P., et al. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington conference to the laboratory. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 391, p. 135-148, 1999.
139. 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.
140. HUH, H., STABA, E.J., SING, J. Supercritical fluid chromatographic analysis of polyphenols in *Ginkgo biloba* L. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 600, p. 364-9, 1992.
141. 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.
142. 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.
143. HWANG, R.-C., KOWALSKI, D.L., TRUELOVE, J.E. Definição do processo e análise dos dados para a validação de limpeza. **Pharm. Technol.** (ed. Port.) São Paulo. v. 2, n. 5, outubro 1998, p. 4-8, 1998.

144. 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.
145. IKAN, R. **Natural products: a laboratory guide**. Jerusalem: Israel University Press, 1969.
146. INMAN, E.L., FRISCHMAN, J.K., JIMENEZ, P.J., WINKEL, G.D., PERSINGER, M.L., RUTHERFORD, B.S. **J.Chromatogr. Sci.**, 1987. p. 25 252.
147. INTERNATIONAL conference of harmonization, Draft Guideline on validation of analytical procedures- definitions and terminology; **Federal Register**, v. 60, p. 11260, march, 1995.
148. INTERNATIONAL conference of harmonization: Guideline on validation of analytical procedures- definitions and terminology; availability, U.S Department of Health and Human Services (HHS); **Federal Register**, v. 40, march – 1995, .11260-5.
149. 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.
150. JANDA, V., MIKESOVÁ, M., VEJROSTA, J. Direct supercritical fluid extraction of water-based matrices. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 733, p. 35-40, 1996.

151. 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.

152. JIAN, Z., YU, A.Q. New type of mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from *Goniothalamus donnaiensis*. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v. 60, p. 122-5, 1997.

153. JIMÉNEZ-CARMONA, M.M., UBERA, J.L., LUQUE de CASTRO, M.D. Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of marjoram essential oil. **J. Chromatogr. A**, n. 855, p. 625-32, 1999.

154. JOHANNSEN, M., BRUNNER, G. Solubility's of the xanthines caffeine, theophylline and theobromine in supercritical carbon dioxide. **Fluid phase equilibria**, Amsterdam, v. 95, p. 215-66, 1994.

155. 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.

156. 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.

157. KARLSON, L., GYLLENHAAL, O., KARLSSON, A., GOTTFRIES, J. Packed-column supercritical fluid chromatography of a new dihydropyrene drug based on direct injection of emulsion samples. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 749, p. 193-9, 1996.
158. KARNES, H.T., SHIU, G., SHAW, V.P. Validation of bioanalytical methods. **Pharm. Res.**, San Francisco, v. 8, n. 4, p. 421-6, 1991.
159. 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.
160. 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.
161. 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.
162. KING, J.W. Extração utilizando fluido no estado supercrítico. **Cosmet. Toiletries**, ed. Port., São Paulo, v. 4, p. 34-8, 1992.

163. KING, J.W. Fundamentals and applications as supercritical fluid extractions in chromatographic science. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v. 62, p. 355-63, 1989.
164. 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.
165. KING, J.W., JOHNSON, J.H., ORTON, W.L., McKEITH, F.K., O'CONNOR, P.L., NOVAKOVSKI, J., CARR, T.R. Fat and cholesterol content of beef patties as affected by supercritical CO₂ extraction. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 58, p. 950-8, 1993.
166. KLINK, G., BUCHS, A., GULACAR, F.O. supercritical-fluid extraction of fatty acids and sterols from plant-tissues and sediments. **Organic geochemistry**. v. 437-41, 1994.
167. KNEZ, Z., RIZNER, V., HABULIN, M., BAUMAN, D. Enzymatic synthesis of oleyl oleate in dense fluids. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 72, p. 1345-9, 1995.
168. 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.

169. 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.
170. KRAMER, A., TWIGG, B.A. **Quality for the food industry**. 3. ed. Westport: AVI., 1980. v. 1, cap. 1, p. 15-8.
171. KRAMER, A., TWIGG, B.A. **Quality for the food industry**. 3. ed. Westport: AVI., 1980. v. 2, cap. 8, p. 353-83.
172. LAFOSSE, M., HERBRETEAU, B., MORIN-ALLORY, L. Supercritical fluid chromatography of carbohydrates. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 720, p. 61-73, 1996.
173. 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.
174. LAYLOFF, T., et al. Regulamentação do FDA para o programa de validação de métodos para novas ou abreviadas aplicações de novos medicamentos. **Pharm. Technol.**, São Paulo, abril-2000. p. 18-29.
175. LeBLANC, D.A. Definição de critérios de aceitação cientificamente justificados na validação de produtos farmacêuticos. **Pharm. Technol.** (ed. Port.), São Paulo, Fevereiro 1999, p. 34-8.

176. 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.
177. LEE, M.L., MARKIDES, K.E. High column efficiency in gas liquid chromatography at inlet pressures to 2500 psi. **Science**, Washington, v. 37, p. 1453-7, 1965.
178. LEITE, F. **Validação em análise química**, 3 ed. Campinas:Átomo, 1998. 224 p.
179. LEMBERG, S., HALE, R.B. Supercritical fluid extraction. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ESSENTIAL OILS, 7., Kyoto, 1977. **Abstracts**, Kyoto, 1977. p. 402.
180. 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.
181. LEYENDECKER, D., LORENSCHAT, B., SCHMITZ, F.P., KLESPER, E. Influence of the density on the chromatographic behavior of the lower alkanes as mobile phases in supercritical fluid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 398, p. 89-103, 1987.
182. LEYENDECKER, D., SCHMITZ, F.P., KLESPER, E. Chromatography with sub- and supercritical eluents. The influence of temperature, pressure and flow-rate on the behavior of dimethyl and diethyl ether. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 315, p. 19-30, 1984.

183. 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.
184. LIDE, D.R., ed. **Handbook of chemistry and physics**. 75. ed., London: CRC Press, 1995.
185. 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.
186. 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.
187. LIRA, M.B. Aspectos bromatológicos do guaraná. **R. flora medicinal**, São Paulo, S.I., v. 14, n. 4, p. 181-200, 1947.
188. 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.
189. LIST, P.H., SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical technology**. Boca Raton: CRC Press, 1989. cap. 4, p. 142-159, cap. 5, p. 275-281.
190. 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.

191. LOCKE, M.A. Supercritical CO₂ fluid extraction of fluometuron herbicide from soil. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 41, p. 1081-4, 1993.
192. LOFTUS, B.T. **Pharmaceutical process validation**. New York: Dekker, 1984. 286 p.
193. 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.
194. 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.
195. 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.
196. MANAHAN, S. E. **Fundamentals of environmental chemistry**. Boca Raton: Lewis, 1993.
197. 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.

198. 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.

199. 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.

200. MAUL, A.A. Extração de insumos farmacêuticos por fluido supercrítico. São Paulo, SP, Brasil, 1998. 142p. **Dissertação de Mestrado** (Mestre em Fármaco e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.

201. MAUL, A.A., MANCINI-FILHO, J., OLIVEIRA, M.N. Extraction of wild marjoran origanum (*Origanum vulgare* L., Labiatae) oleoresin using supercritical fluid. Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting Technical Program, Chicago, 83 A-20, p. 241, 1999.

202. MAUL, A.A., OLIVEIRA, M.N. Decaffeination of guarana seeds (*Paulinia cupana* kunth, Sapindaceae) by supercritical fluid extraction. Congress of Food Science & Technology, 10, **Technical Poster Session**. Sidney, Austrália, 1999.

203. MAUL, A.A., POLAKIEWICZ, B., OLIVEIRA, M.N. Obtenção de extrato hidrossolúvel de guaraná (*Paulinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por fluido supercrítico. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 34, supl. 2, p. 31, 1998. [Simpósio 100 Anos de Ensino Farmacêutico no Estado de São Paulo, São Paulo, 1998].
204. MAUL, A.A., WASICHY, Ro., BACCHI, E.M. Extração de insumos farmacêuticos por fluido supercrítico. In: JORNADA FARMACÊUTICA DA UNESP, 44 e SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, 1. Araraquara, 1997. **Anais**. Araraquara, UNESP, 1997. 6.02, p. 40.
205. MAUL, A.A., WASICHY, Ro., BACCHI, E.M. Extração de insumos farmacêuticos por fluidos supercríticos. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 33, supl. 2, p. 43, 1997. [Seminário da Pós-Graduação, 12, São Paulo, 1997].
206. MAUL, A.A., WASICHY, Ro., BACCHI, E.M. Extração de insumos farmacêuticos por fluido supercrítico. **Rev. Farm. Quím.**, São Paulo, v. 29, p. 77, 1998. [Congresso Paulista de Farmacêuticos, 10 e Seminário Internacional de Farmacêuticos, 2, São Paulo, 1997].
207. MAUL, A.A., WASICHY, Ro., BACCHI, E.M. Extração de insumos fitoterápicos por fluido supercrítico. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 3 e ENCONTRO RACINE DE FITOTERAPIA E FITOCOSMÉTICA, 1. Campinas, 1997. **Caderno de resumos**. Campinas, UNICAMP, 1997. Mult 23, p. 260.
208. MAUL, A.A., WASICHY, Ro., BACCHI, E.M. Extração por fluido supercrítico. **Rev Bras. Farmacognosia**, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 185-200, 1996.

209. 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.
210. McNALLY, M.E. P. Method development in supercritical fluid extraction. **J. AOAC Int.**, Washington, v. 79, p. 380-7, 1996.
211. MENDES, R.L., COELHO, J.P., FERNANDES, H.L., MARRUCHO, I.J., CABRAL, J.M.S., NOVAIS, J.M. PALAVRA, A.F. Applications of supercritical CO₂ extraction to microalgae and plants. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 62, p. 53-9, 1995.
212. **MERCK** index. 12. Whitehouse Station: Merck, 1996. p. 1674.
213. 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.
214. 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.
215. MESLEY, R.J. Analytical quality assurance –a review. **Analyst**, Cambridge, october, v. 116, p. 975-90, 1991.

16. METHOD 3561. Supercritical fluid extraction of polynuclear aromatic hydrocarbons. **United States Environmental Protection Agency**, John F. Kennedy Federal Building, Boston, M.A., January, 1995.
17. MIEGE, C., DUGAY, J., HENNION, M.C. Optimization and validation of solvent and supercritical fluid extractions for the trace-determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge's by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 823, p. 219-30, 1998.
18. MITRA, S., WILSON, N.K. An empirical method to predict solubility in supercritical fluids. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v. 29, p. 305-9, 1991.
19. 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.
20. MOORE, S., SAMDANI, S., ONDREY, G., PARKINSON, G. New roles for supercritical. **Chem. Eng.**, Lausanne, p. 32-5, 1994.
21. 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.
22. 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.

223. MOTITSCHKE, L., TRONNIER, H., GÖRING, St., MARBERT, E. Spent grain wax. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v. 105, p. 59-62, 1990.
224. 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.
225. MULVANEY, S.J., RIZVI, S.H. Extrusion processing with supercritical fluids. **Food Technol.**, Chicago, v. 79, n. 12, p. 74-82, 1993.
226. NDIOMU, D.K., SIMPSON, C.F. Some applications of supercritical fluid extraction. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 213, p. 237-43, 1988.
227. 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.
228. 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.

229. NILSSON, W.B., GAUGLITZ, Jr.E.J., HUDSON, J.K. Solubility's of methyl oleate, oleic acid, oleyl glycerol's, and oleyl glycerol mixtures in supercritical carbon dioxide. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 68, p. 87-91, 1991.
230. 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.
231. NOGUER, P.J. **La salud por las plantas**: formulario practico de medicina vegetal. Barcelona:Vision, 1981. 307 p.
232. 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.
233. O'KEEFFE, M.J., O'KEEFFE, M., GLENNON, J.D., LIGHTFIELD, A.R., MAXWELL, R.J. Supercritical fluid, extraction of Clenbuterol from bovine liver tissue. **Analyst**, Cambridge, v. 123, p. 2711-14, 1998.
234. 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.

235. PARDO, P., LOPEZ-SANCHEZ, J.F., RAURET, G. Characterization, validation and comparison of three methods for the extraction of phosphate from sediments. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 376, p. 183-95, 1998.
236. PARKINSON, G., JOHNSON, E. Supercritical process win CPI acceptance. **Chem. Eng.**, Lausanne, n. 7, p. 36-9, 1989.
237. 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.
238. 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.
239. 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.
240. PEKER, H., SRINIVASAN, M.P., SMITH, J.M., McCOY, J.B. Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide. **AIChE J**, New York, v.38, n. 5, p.761-70, 1992
241. PELLERIN, P. Le gingembre: production et analyse. **Parfums Cosmét.**, Paris, v. 117, p. 70-3, 1994.

242. PELLERIN, P. Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavor and perfume industry. **Perfum. Flavor.**, Wheaton, v.16, p. 37-9, 1991.
243. PENNINGER, J.M.L. Extraction of oil from Wyoming 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.
244. 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.
245. PFANDER, H., NIGGLI, U. **Carotenoids: isolation and analysis**. Basel: Birkhäuser, 1995. v. 1A, cap. 6, p. 191-8.
246. PINTO, G.M.F., JARDIM, I.C.S.F. Determination of bentazon residues in water by high-performance liquid chromatography-Validation of the method. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 846, p. 369-74, 1999.
247. 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.

248. POSYNIAK, A, ZMUDZKI, J., ELLIS, R.L., SEMENIUK, S., NIEDZIELSKA, J. Validation study for the determination of tetracycline residues in animal tissues. **JAOAC Int.**, Champaign, v. 82, p. 862-5, 1999.
249. POURCHET-CAMPOS, M.A. **Iniciação à pesquisa científica**: bases da metodologia. São Paulo: SN Publicidade, 1996. 186p.
250. 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.
251. QUECKENBERG, O.R., FRAHM, A.W. Supercritical fluid extraktion und selektivität in der naturstoffanalytik. **Pharmazie**, Berlin, v. 49, p.159-66, 1994.
252. 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.
253. 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.

254. QUIRIN, K.W., GERARD, D., KRAUS, J. Hochdruckextraktion mit kohlendioxid - naturreine produkte umweltfreundlich hergestellt. **Gordian**, Hamburg, v. 86, p. 156-9, 1986.
255. QUIRIN, K.W., GERARD, D., KRAUS, J. Hochdruckextraktion mit kohlendioxid - ein schonendes verfahren zur gewinnung hochwertiger fette öle", **Fett Wiss. Technol.**, Hamburg, v. 89, p. 139- 43, 1987.
256. QUIRIN, K.W., GERARD, D., KRAUS, J. Hochdruckextraktion mit kohlendioxid - gewinnung terpenarmer aromaöle". **Z. Lebensm. Technol.**, Hamburg, v. 87, p. 264-8, 1987.
257. RAYNIE, D.E. **Analytical supercritical fluid extraction**. Cincinnati: Corporate Research Division/The Procter & Gamble Company, 1995. [Relatório].
258. REIGHARD, T.S., OLESIK, S.V. Extraction of phenoxyacid herbicides from house dust using methanol/CO₂ mixtures. **Anal. Chem.**, Washington, v. 69, p. 566-74, 1997.
259. 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.
260. REVIEWER guidance, validation of chromatographic methods. Center for drug evaluation and research, **Food and Drug Administration**.

261. 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.
262. RILEY, C.M. Statistical parameters and analytical figures of merit, chapter 2, IN: **Development and validation of analytical methods**. Riley, C.M., Rosanke, T.W. Oxford:Pergamon, 1996. p. 25-42.
263. 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.
264. ROBEY, R. Emerging applications of supercritical fluid extraction technology. In: **CO₂ Technology Seminar**. OAK Brook Hills, 1991. p.1-13.
265. ROTH, M. Solute retention in gas and supercritical fluid chromatography versus pair wise interactions within the system: a numerical treatment in perturbations of molecular parameters. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 738, p. 101-14, 1996.
266. 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.

267. SADANA, A. Bioseparation of proteins, unfolding/folding and validations. San Diego,:Academic Press.1998. 346 p.
268. 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.
269. 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.
270. SANGUINETTI, E.E. **Plantas que curam e sua influência astral**. Porto Alegre: Riegel, 1989. 85 p.
271. 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.
272. 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.
273. 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.

274. 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 ionization mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 727, p. 139-46.
275. SCHMIDT P.C. Technological aspects of the development and production of plant extracts. **Phamazeutische Industrie**. v. 59, p. 69, 1997.
276. SCHMIDT, F. **O guaraná sua cultura e indústria**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, SAI, 1949. 29 p.
277. SCHULZ, W.G., RANDALL, J.M. Liquid carbon dioxide for selective aroma extraction. **Food Technol.**, Chicago, v. 24, p. 1284-6, 1970.
278. SEMINARO, M., CLAYTON, J. Validação dos sistemas de rotulagem, atingindo conformidade e alta produtividade. **Pharm. Technol.** (ed. Port.) São Paulo. V. 1, n. 1, abril 1998, p. 44-8, 1997.
279. 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.
280. SHALABY, A.S., GENGAIHI, 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.

281. SHARMA, A.K., PROKOPCZYK, B., HOFFMANN, D. Supercritical fluid extraction of moist snuff. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 39, p. 508-10, 1991.
282. 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.
283. 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.
284. 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.
285. SIMS, M. Decaffeinating with carbon dioxide. **Tea and Coffee Trade J.** n. 162, p. 8-10, 1990.
286. SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre, Florianópolis:UFRGS,UFSC, 1999. P. 387-415.
287. SKOUG, J.W., HALSTEAD, G.W., THEÏS, D.L., FREEMAN, J.E., FAGAM, D.T., ROHRS, B.R. Roteiro para desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Pharm. Technol.** (ed. Port.) São Paulo. V. 1, n. 1, abril 1998, p. 34-43, 1997.

288. SMITH, R.D., CHAPMAN, E.G., WRIGHT, B.W. Pressure programming in supercritical fluid chromatography. **Anal. Chem.**, Washington, v. 57, p. 2829-36, 1985.
289. 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.
290. 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.
291. 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.
292. 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.
293. SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH, F.L. **Practical HPLC method development**, 2 ed. New York:Wiley, 1997, p. 103, 145-57.
294. SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH, F.L. **Practical HPLC method development**, 2 ed. New York: Wiley, 1997.765 p.

295. SOLOMONS, T.W. G., FRYHLE, C.B. **Organic Chemistry**. 7. ed. New York: Wiley, 1998. 1258 p.
296. 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.
297. 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.
298. STAHL, E. Extraction of natural products with the means of supercritical gases. **Rev. Latinoam. Quim.**, Monterrey, v. 11, p. 1-7, 1980.
299. STAHL, E., GERARD, D. Hochdruckextraktion von naturstoffen mit überkritischen und verflüssigten gasen. **Parfuem. Kosmet.**, Heidelberg, v. 64, p. 237-40, 1983.
300. STAHL, E., GERARD, D. Hochdruckextraktion von naturstoffen mit überkritischen und verflüssigten gasen. **Parfuem. Kosmet.**, Heidelberg, v. 63, p. 117-9, 1982.
301. 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.

302. 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.
303. 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.
304. STAHL, E., QUIRIN, K.W. Entölung von rohlecithin durch hochdruckdüsenextraktion mit kohlendioxid. **Fette, Seifen, Anstrichm.**, Hamburg, v. 87, p. 219-22, 1985.
305. STAHL, E., QUIRIN, K.W. Extraction of natural substances with dense gases. **Pharm. Res.**, Stuttgart, p. 189-92, 1984.
306. STAHL, E., QUIRIN, K.W. Extraktion von naturstoffen mit verdichteten gasen. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 71, p. 181-3, 1984.
307. 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.
308. 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.

309. 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.
310. STAHL, E., QUIRIN, K.W., MANGOLD, H.K. Extraktion von lupinenöl mit überkritischem kohlendioxid. **Fette, Seifen, Anstrichm.**, Hamburg, v. 83, p. 472-6, 1981.
311. 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.
312. STAHL, E., QUIRIN, K.W., GERARD, D. Solubility's of soybean oil, jojoba oil and cuticular wax in dense carbon dioxide. **Fette, Seifen, Anstrichm.**, Hamburg, v. 85, p. 458-61, 1983.
313. STAHL, E., QUIRIN, K.W., GERARD, D. **Dense gases for extraction and refining**. Ashworth: Springer-Verlag, 1987. p. 66-93.
314. 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.
315. STARK, R. **O livro dos afrodisíacos**. São Paulo: Martins Fontes, 1983. 235 p.

316. 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.
317. STRATEN, M. van. **Guarana**. The energy seeds and herbs of the Amazon Rainforest. Essex: Daniel, 1994. 152 p.
318. 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.
319. 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.
320. 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.
321. 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.

322. 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.
323. SWARTZ, M.E., KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharm. Technol.** (ed. Port.) São Paulo. Junho 1998, p. 4-9, 1998.
324. TAYLOR, D.L., LARICK, D.K. Volatile contend and sensory attributes of supercritical carbon dioxide extracts of cooked chicken fat. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 60, p. 1197-200, 1995.
325. TAYLOR, L.T. Strategies for the analytical SFE. **Anal. Chem.**, Washington, v. 67, p. 364A- 370A, 1995.
326. TAYLOR, L.T. **Supercritical fluid extraction:** techniques in analytical chemistry. New York: Wiley, 1996. a) p. 1-124, b) p. 155-166.
327. TAYLOR, L.T. The supercritical fluid extraction and analysis of aged single-base propellants. **Am. Lab.**, v. 62, n. 2, p. 22-6, 1993.
328. TAYLOR, S.L., KING, J.W., LIST, G.R. Determination of oil contend in oilseeds by analytical supercritical fluid extraction. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, 70, p. 437-9, 1993.

329. 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.
330. TEHRANI, J. Successful supercritical fluid extraction strategies. **Am. Lab.**, v. 62, n. 2, p. 40HH-40MM, 1993.
331. 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.
332. 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.
333. 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.
334. 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.

335. TEMELLI, F., CHEN, C.S., BRADDOCK, R.J. Supercritical fluid extraction in citrus oil processing. **Food Technol.**, Chicago, v. 46, p. 145-50, 1988.
336. 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.
337. TENE, M.T., VALCÁRCEL, 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.
338. TESKE, M., TRENTINI, A.M.M. **Compêndio de fitoterapia**, 3. ed. Curitiba: Herbarium, 1995. P. 166-8.
339. TEXT on validation of analytical procedures, **Federal Register**, Washington, n. 60, v. 40, p. 11260-2, 1995.
340. 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.
341. TONNESEN, H.H., ARRIETA, A.F., LERNER, D. Studies on curcumin and curcuminoids. **Pharmazie**, Berlin, v. 50, p. 689-93, 1995.

342. TREASE, G.E., EVANS, W.C. **Pharmacognosy**. 14. ed., London: Saunders, 1996. 120 p.
343. TRIGG, R.J., KEENAN, G.A., McMULLAN, D., CONNER A.L. Automated SFE combined with GC-MS for the determination of organochlorine compounds in sludge and sediment. **Int. J. of Environmental Analytical Chemistry**, Reading, v. 70, p 47-57, 1998.
344. 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.
345. UNITED States pharmacopeia, 24 ed.. Section "validation of compendial methods" **United States Pharmacopieas convention Ins.** Rockville, MD, 1999.
346. **UNITED** States pharmacopeia. 19. ed. Easton: Mack, 1974.
347. **UNITED** States pharmacopeia. 20. ed. Easton: Mack, 1979.
348. 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.

349. VELASCO, L., GOFFMAN, F.D., BECKER, H.C. Development of calibration equations to predict oil content and fatty acid composition in Brassicaceae germplasm by near-infrared reflectance spectroscopy. **JAOCs**, Champaign, v. 76, p. 25-30, 1999.
350. 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.
351. 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.
352. WEGA, M., McPEHERSON, J.C. Successful control system implementation based on a solid validation methodology. **Pharm. Technol.**, Danvers, n. 19, v. 3, p. 124-34. 1995.
353. 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.
354. 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.**, Washington, v. 67, p. 4577-80, 1995.

355. WESTWOOD, S.A. **Supercritical fluid extraction** and its use in chromatographic sample preparation. Glasgow: Blackie, 1993. 170p.
356. 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.
357. 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.
358. WILLIAMS, K.L., SANDER, L.C., WISE, S.A. Comparison of liquid and supercritical fluid chromatography using naphthylethylcarbamoylated- β -cyclodextrin chiral stationary phases. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 746, p. 91-101, 1996.
359. 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.
360. 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.

361. 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.
362. 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.
363. YONKER, C.Y., SMITH, R.D. Pressure and composition gradients in capillary supercritical fluid chromatography. **Anal. Chem.**, Washington, v. 59, p. 727-31, 1987.
364. 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.
365. YOUNG, L.W. Supercritical fluid extraction. In: ANNUAL MEETING SPEECH, Iowa, 1994. **Abstracts**. Broadcaster, 1994, p.11-5.
366. 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.
367. 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.

CAPÍTULO 11

ANEXOS

11.1-PROCEDIMENTO PARA A EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO USANDO A RECIRCULAÇÃO DO GÁS DIÓXIDO DE CARBONO.

1. Ligar a chave geral na rede de força
2. Acionar os alarmes
3. Lacrar o extrator e o separador
4. Fixar a temperatura do extrator
5. Regular o refrigerador:
 - 5.1-Abrir a válvula do líquido refrigerante para a posição “para” o condensador
 - 5.2-Fechar a válvula do líquido refrigerante da cabeça da bomba
 - 5.3-Ligar e fixar a temperatura entre 5°C e 10°C
6. Abrir completamente as válvulas de regulação de pressão do extrator e do separador (no sentido anti-horário)
7. Fechar as demais válvulas (escapes, de pressão “para” e “do” extrator, no sentido horário e o regulador de pressão do cilindro, no sentido anti-horário)
8. Sistema com ou sem co-solvente.
9. Sistema com gás carbônico:
 - 9.1-Abrir o cilindro de gás carbônico na vazão < 1400mL/min.
 - 9.2-Abrir o regulador de pressão do cilindro até atingir 52 bars (750 psi, pressão de entrada na bomba)

10. Abrir totalmente a válvula “para” o extrator até 52 bars (750 psi, pressão do extrator).
11. Abrir totalmente a válvula “do” extrator até 52 bars (750 psi, pressão do separador).
12. Abrir levemente o escape da pressão baixa por 10 segundos (Purga)
13. Ligar a bomba (liga/desliga) com 80% da potência total. Ajustar, se necessário, o regulador de pressão do cilindro para 52 bars (750 psi).
14. Ajustar a pressão do separador, com o fechamento do regulador de pressão do separador.
15. Ajustar a pressão do extrator até o valor desejado (regulador da pressão do extrator)
16. Iniciar a agitação e regular a velocidade desejada
17. Fixar a temperatura do pré-aquecedor
18. Fixar a temperatura do separador
19. Ajustar a velocidade da bomba para atingir a taxa desejada
20. Em caso de utilizar-se cossolvente, zerar o totalizador de vazão, antes de iniciar a operação.
21. Abrir a válvula do líquido refrigerante para a camisa de refrigeração da cabeça da bomba, atrás do painel.
22. Reajustar alguma condição de operação.

11.2-PROCEDIMENTO PARA A EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO DESLIGANDO SOMENTE O EXTRATOR.

1. Desligar as bombas
2. Marcar os controles de temperatura do pré-aquecedor e do separador para $T < T_{\text{ambiente}}$. Caso não tenha fluxo, desligar os controladores.

3. Desligar o agitador
4. Fechar as válvulas “para” e “do” extrator
5. Abrir lentamente a válvula de escape do extrator
6. Verificar se a pressão está em zero bar de pressão no extrator ($P=0$ psi).
7. Abrir o extrator, na ordem contrária à indicada na tampa.
8. Realimentar com sementes.
9. Fechar a válvula de escape do extrator.
10. Lentamente abrir a válvula “para o extrator e depois a válvula “do” extrator.
11. Abrir a válvula de escape do extrator por 5 segundos, para purgar o ar.
12. Ligar a bomba de gás carbônico.
13. Redefinir a temperatura do separador e do pré-aquecedor.
14. Zerar o totalizador de fluxo.
15. Ligar o agitador.
16. Se usar o cossolvente, iniciar o bombeamento.
17. Quando chegar ao final, repetir o procedimento total.

11.3- PROCEDIMENTO PARA A EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO DESLIGANDO TOTALMENTE O APARELHO DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.

1. Desligar as bombas.
2. Desligar os controles de temperatura do pré-aquecedor, do separador e do extrator.
3. Parar o misturador.
4. Fechar o cilindro do gás carbônico.

5. Anotar o fluxo total de gás consumido (caso se tenha trabalhado com cossolvente, anotar também este consumo).
6. Fechar a válvula da cabeça da bomba/líquido refrigerante.
7. Abrir, gradualmente o regulador da pressão do extrator (sentido anti-horário).
8. Abrir o regulador da pressão do separador, lentamente: até um fluxo < 1400 mL/min.
9. Verificar se os indicadores de pressão estão em zero bar (0 psi).
10. Abrir o regulador de pressão do cilindro de gás.
11. Abrir o extrator, seguindo a ordem contrária indicada na tampa.
12. Abrir o separador, seguindo a ordem contrária indicada na tampa.
13. Desligar o refrigerador
14. Desligar a chave geral de força.

Este processo faz parte integrante da validação e qualquer alteração implica numa revalidação de todo o processo.