

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO E SUAS
APLICAÇÕES NA OBTENÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS**

Jaqueline Campiol dos Santos

Porto Alegre, junho de 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO E SUAS APLICAÇÕES NA
OBTENÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS**

Jaqueline Campiol dos Santos
Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser

Co-orientador: Prof. Dr. Rubem Mário Figueiró Vargas

Porto Alegre, junho de 2011.

SUMÁRIO

Resumo	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
4. PARTE 1: O PROCESSO DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	7
4.1 Características dos fluidos supercríticos	7
4.2 Tipos de fluidos e modificadores (co-solventes).....	9
4.3 Instrumentação	10
4.4 Vantagens da extração com fluido supercrítico	12
4.5 Limitações da extração com fluido supercrítico.....	12
4.6 Parâmetros que influenciam no processo de extração supercrítica	13
5. PARTE 2: APLICAÇÕES DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA NA OBTENÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS	14
5.1 Compostos Fenólicos	15
5.2 Alcalóides	18
5.3 Óleos voláteis e compostos relacionados	23
5.4 Lipídeos	27
6. CONCLUSÃO.....	29
7. REFERÊNCIAS	29

Resumo

Extratos vegetais e produtos naturais isolados são amplamente utilizados como matérias-primas em produtos da indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. A extração com solventes orgânicos e a destilação por arraste a vapor constituem os métodos mais utilizados para a obtenção de extratos. No entanto, a baixa seletividade, a utilização de solventes orgânicos tóxicos, a geração de resíduos e a degradação térmica dos compostos de interesse constituem fatores limitantes destes métodos. A extração com fluido supercrítico é uma técnica relativamente nova que representa uma alternativa aos métodos tradicionais de extração, onde o solvente é empregado em condições de temperatura e pressão acima do ponto crítico. Os fluidos supercríticos possuem propriedades intermediárias entre àquelas de substâncias no estado líquido e no estado gasoso, o que confere características únicas que fazem com que possam ser usados como solventes. O dióxido de carbono (CO_2), por apresentar valores de pressão e temperatura críticos relativamente baixos (73,8 bar e 31,0 °C), ser não tóxico, não inflamável, não tóxico e de baixo custo, é o solvente de escolha em processos de extração supercrítica. O CO_2 no estado supercrítico se mostra adequado para extração de compostos hidrofóbicos ou levemente hidrofílicos, no entanto, a adição de co-solventes polares, como o etanol, pode ser feita visando ao aumento da solubilização de compostos de maior polaridade. Dentre as vantagens da extração supercrítica destacam-se a menor ocorrência de degradação térmica dos compostos extraídos, a ausência de oxigênio e luz durante o processo de extração, a ausência de resíduos de solventes nos extratos e, principalmente, a possibilidade de ajuste das variáveis do processo, podendo assim obter seletividade para as substâncias de interesse. Os objetivos deste trabalho foram realizar uma revisão sobre os fundamentos da técnica de extração supercrítica, bem como apresentar alguns exemplos de aplicações na obtenção de extratos e produtos naturais de origem vegetal.

1. INTRODUÇÃO

As plantas constituem uma das fontes mais importantes de recursos terapêuticos e alimentos para uso humano. Plantas medicinais têm sido utilizadas pelo homem para cura de doenças e manutenção da saúde desde a pré-história. Apesar dos benefícios trazidos pelo surgimento dos fármacos modernos, provenientes de síntese química ou muitas vezes derivados de produtos naturais, o uso de plantas medicinais ainda representa o único recurso terapêutico disponível para cerca de 75% da população mundial (Raskin et al., 2002; Schmidt et al., 2008). Além disso, devido a uma maior preocupação com a saúde e bem estar e a um melhor entendimento da química dos produtos naturais, o interesse da população pelo uso de fitoterápicos e alimentos funcionais tem aumentado, causando assim um aumento na demanda de extratos vegetais e produtos naturais isolados de plantas e fontes de alimento de interesse terapêutico (Zhao, 2006). Uma vez que compostos biologicamente ativos geralmente estão presentes nas plantas em baixas concentrações, métodos de extração eficientes e seletivos são necessários para a obtenção destes a partir dos materiais vegetais (Lang e Wai, 2001).

No contexto do estudo de produtos naturais, o termo extração significa retirar, da forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ou a fração ativa contida no material vegetal (Sonaglio et al., 2007). A extração é o primeiro passo para a obtenção de produtos naturais bioativos a partir de matérias-primas vegetais, sendo influenciada pela natureza química destes, pelo método de extração empregado, pelo solvente, pelo tamanho de partícula do material vegetal, pelo pH do meio extrator, pelo tempo de extração e temperatura utilizados, pelo emprego de agitação, assim como pela presença de substâncias interferentes (Stalikas, 2007).

A extração sólido-líquido empregando solventes orgânicos, tais como etanol, metanol, acetato de etila, clorofórmio e água, constitui o método de extração mais tradicionalmente utilizado na obtenção de substâncias não voláteis. Diversas técnicas podem ser empregadas, como extrações a frio, utilizando-se maceração (estática ou cinética), percolação e turbo extração. As extrações a quente podem ser executadas em sistemas fechados, como é o caso da extração utilizando-se aparelho de Soxhlet, ou em sistemas abertos, como nos métodos de decocção e infusão (Falkenberg et al., 2007).

Existem, no entanto, diversos inconvenientes associados às técnicas clássicas de extração por solventes, dentre os quais pode-se citar a possível necessidade de elevação de temperatura, o que pode prejudicar a integridade de substâncias termolábeis, e a possibilidade de alterações químicas das substâncias de interesse, como reações de hidrólise (quando o solvente é aquoso) ou peroxidação (no caso da utilização de éter). Além disso, a extração sólido-líquido acarreta na utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos, os quais muitas vezes apresentam toxicidade, para o manipulador e para o ambiente. Outras desvantagens incluem a necessidade de eliminação do solvente, o que também pode gerar necessidade no aquecimento do extrato, e a necessidade de tratamento e eliminação de resíduos, bem como a existência de poucos parâmetros que possam ser ajustados a fim de controlar a seletividade do processo de extração (Lang e Wai, 2001; Herrero et al., 2010; Maróstica Junior et al., 2010).

Produtos líquidos e voláteis, como os óleos voláteis, são extraídos por hidrodestilação, em escala laboratorial, e por destilação arraste a vapor, em escala industrial. Estes métodos, apesar de serem largamente empregados, também possuem desvantagens. A elevação de temperatura e o contato do material vegetal com a água podem causar modificações químicas nas substâncias presentes nos óleos voláteis, como degradação catalisada pela temperatura e hidrólise. Além disso, a hidrodestilação pode resultar na perda por evaporação de componentes altamente voláteis e de outros componentes solúveis em água (Oszagyh et al., 1996; Pourmortazavi e Hajimirsadeghi, 2007; Meireles, 2009).

A extração com solventes apolares também é utilizada para a obtenção de óleos voláteis, no entanto, além das desvantagens já citadas para a extração por solventes, outros compostos lipofílicos são extraídos dessa forma. A prensagem mecânica, outro método de obtenção de óleos voláteis, encontra aplicações mais restritas, como na extração de óleos voláteis de frutos cítricos (Maul et al., 1996; Simões e Spitzer, 2007).

A extração com fluido supercrítico consiste em uma forma de extração onde o solvente líquido usual é substituído por um fluido supercrítico, ou seja, uma substância em condições de temperatura e pressão acima do ponto crítico. Devido às vantagens apresentadas por esta técnica em relação aos métodos de extração por solventes na obtenção de extratos vegetais e produtos naturais isolados, diversos trabalhos científicos

abordando aplicações da extração supercrítica nesta área têm sido publicados (Reverchon e De Marco, 2006; Pereira e Meireles, 2010).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo realizar uma pesquisa bibliográfica sobre os fundamentos da técnica de extração com fluido supercrítico, bem como fazer um levantamento de suas aplicações na obtenção de produtos naturais, especialmente os de interesse farmacêutico, buscando compreender como as variáveis do processo influenciam na extração das diferentes classes de produtos naturais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A revisão de literatura foi realizada na base de dados *Scopus* utilizando as seguintes palavras-chave: *supercritical extraction*, *supercritical extraction AND natural products*, *supercritical extraction AND phenolic*, *supercritical extraction AND alkaloid*, *supercritical extraction AND caffeine*, *supercritical extraction AND essential oil* e *supercritical extraction AND lipids*. Foram selecionados os artigos datados a partir de 1995 e de livre acesso. A seleção dos artigos baseou-se, inicialmente, na análise dos títulos. Foi dada preferência aos textos que abordavam aplicações da extração supercrítica de matérias-primas vegetais contendo produtos com atividades biológicas de interesse farmacêutico, mas alguns trabalhos incluindo aplicações de interesse para área alimentícia também foram incluídos. Também foram consultados alguns dos principais livros especializados no assunto. Uma discussão resumida dos resultados obtidos será realizada no decorrer deste trabalho.

De modo a facilitar a comparação dos diferentes resultados apresentados nesta revisão, as unidades de pressão foram padronizadas para a escala bar, enquanto as unidades de temperatura foram padronizadas para a escala Celsius. Os dados levantados permitiram dividir o trabalho em duas partes: na primeira apresentam-se aspectos relacionados aos fundamentos da técnica de extração supercrítica, enquanto na segunda parte apresentam-se algumas das aplicações na obtenção de produtos naturais de origem vegetal.

4. PARTE 1: O PROCESSO DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

4.1 Características dos fluidos supercríticos

Do ponto de vista termodinâmico, o diagrama de fases de uma substância é uma representação gráfica que demonstra as condições de temperatura e pressão em que as diferentes fases de uma determinada substância são termodinamicamente mais estáveis. As curvas que separam as regiões de cada fase, denominadas curvas de equilíbrio, fornecem os valores de pressão e temperatura nos quais as diferentes fases coexistem em equilíbrio, conforme pode ser observado na figura 1 (Atkins, 2001).

Se uma substância no estado líquido é aquecida em um recipiente fechado, e, portanto, submetida a uma determinada pressão, a pressão de vapor da substância eleva-se continuamente com o aumento da temperatura. Assim, ocorre um aumento na densidade do vapor, ao mesmo tempo em que ocorre uma diminuição da densidade do líquido, em consequência do seu aumento de volume. Há um ponto em que a densidade do vapor se iguala à do líquido remanescente e o limite entre as duas fases desaparece. O ponto que limita a região onde não há distinção entre as fases de líquido e vapor é denominado ponto crítico ou estado crítico, sendo caracterizado pela temperatura crítica e pela pressão crítica, as quais são características para cada substância (Atkins, 2003; Netz e Ortega, 2002).

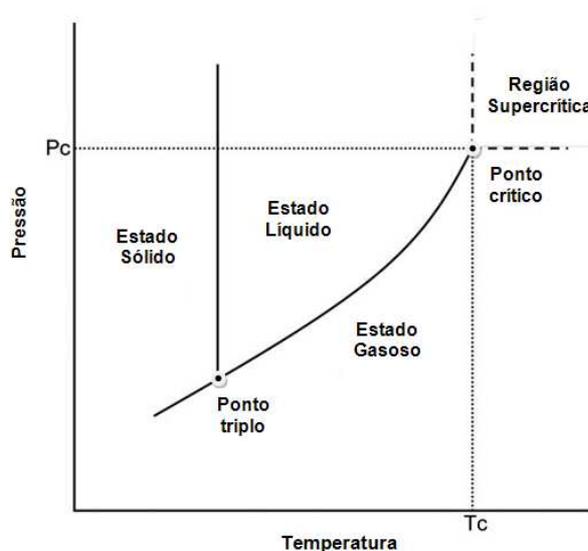


Figura 1. Diagrama de fases típico de uma substância pura (adaptado de Herrero et al., 2010).

A pressão crítica pode ser definida como a pressão mínima requerida para liquefazer um gás a uma determinada temperatura, enquanto a temperatura crítica pode ser definida como a temperatura acima da qual é impossível liquefazer um gás por compressão. Assim, uma substância acima da temperatura crítica ainda se comportará como um gás, independente da pressão aplicada. Uma substância que se encontra em condições de temperatura e pressão críticas é dita estar no estado supercrítico, sendo também denominada fluido supercrítico (Mukhopadhyay, 2000; Sinko, 2006).

No estado supercrítico, as substâncias possuem características intermediárias entre as de um gás e um líquido. Fluidos supercríticos possuem coeficientes de difusão próximos aos de um gás. Sua capacidade de difusão chega a ser de uma a duas ordens de magnitude maior que aquela dos líquidos, o que proporciona uma rápida e eficiente transferência de massa. Outras características dos fluidos supercríticos que remetem às de um gás incluem a sua baixa viscosidade e a ausência de tensão superficial, o que facilita a penetração dos fluidos supercríticos na matriz sólida. Os fluidos supercríticos também apresentam valores de densidade próximos aos de um líquido, o que proporciona um bom poder solvente (Taylor, 1996; Luque de Castro et al., 2004). A tabela 1 apresenta um comparativo de algumas características físico-químicas dos gases, líquidos e fluidos supercríticos.

Tabela 1. Faixas de valores de algumas propriedades físico-químicas de gases, líquidos e fluidos supercríticos (adaptado de Herrero et al., 2010).

Estado da matéria	Densidade (ρ , g/cm ³)	Difusividade (D_{AB} , cm ² /s)	Viscosidade (μ , g/s.cm)
Gás (P = 1 atm, T = 21°C)	10 ⁻³	0,1	10 ⁻⁴
Líquido (P = 1 atm, T = 15-30°C)	1	10 ⁻⁵	10 ⁻²
Supercrítico (P = P _c , T = T _c)	0,1 – 1,0	10 ⁻³ – 10 ⁻⁴	10 ⁻³ – 10 ⁻⁴

P_c: Pressão crítica, T_c: temperatura crítica

Assim, o comportamento ambíguo de substâncias no estado supercrítico permite que estas possam, devido à viscosidade e à difusividade análogas às de um gás, penetrar profundamente no material, e, devido à capacidade de solvatação análoga à de um líquido, extrair as substâncias de interesse presentes na matriz sólida (Mukhopadhyay, 2000).

4.2 Tipos de fluidos e modificadores (co-solventes)

Diversos compostos já foram estudados como solventes em processos de extração supercrítica de produtos naturais. Entretanto, a maioria deles, devido à toxicidade, reatividade, possibilidade de explosão, dano ao meio ambiente, alto custo ou condições supercríticas extremas não chegou a ser adotada como solvente de escolha (Maul et al., 1996; Smith, 1999). A tabela 2 apresenta as propriedades críticas dos principais compostos já analisados como solventes supercríticos.

Tabela 2. Propriedades críticas de algumas substâncias empregadas como solventes em processos de extração supercrítica (adaptado de Lide, 1997).

Substância	Tc (°C)	Pc (bar)
Xenônio	16,6	58,4
Trifluormetano	26,2	48,6
Clorotrifluormetano	28,9	38,7
Dióxido de Carbono	31,0	73,8
Etano	32,2	48,7
Óxido nitroso	36,4	72,6
Hexafluoreto de enxofre	45,5	37,7
Propano	96,7	42,5
Amônia	132,4	113,5
Dióxido de enxofre	157,7	78,8
Triclorofluormetano	198,0	44,7
Metanol	239,4	80,8
Etanol	240,9	61,4
Água	374,0	220,6

Pc: Pressão crítica, Tc: temperatura crítica

O dióxido de carbono ou gás carbônico (CO₂) tem sido até os dias de hoje o solvente de escolha para emprego em processos de extração por fluido supercrítico de produtos naturais. Por possuir temperatura e pressão críticas moderadas (31,04 °C e 72,8 bar, respectivamente) permite que a operação de extração supercrítica ocorra a temperaturas mais brandas, o que é um fator importante a considerar quando se trabalha com produtos naturais, os quais muitas vezes podem sofrer reações de degradação a altas temperaturas. Além disso, o CO₂ é um gás inerte, não inflamável, não explosivo e disponível com alta pureza a baixo custo. Estas características fizeram com que o CO₂ se tornasse o solvente mais empregado em processos de extração supercrítica. Após o término da extração, o CO₂, em condições de temperatura e pressão ambiente, é

facilmente separado dos extratos, não havendo restrições quanto à sua eliminação para meio ambiente (Starmans e Nijhuis, 1996; Reverchon e De Marco, 2006; Abbas et al., 2008; Cassel et al., 2008).

O dióxido de carbono, pelo fato de ser uma molécula com momento dipolo igual a zero, é uma substância apolar. Sua polaridade é semelhante à de outros solventes apolares tipicamente utilizados em processos de extração sólido-líquido, como o hexano (Luque de Castro et al., 2004; Rosa et al., 2009). Em geral, a solubilidade do soluto no CO₂ supercrítico depende da presença de grupos funcionais na molécula, do peso molecular e da polaridade da mesma. Assim, compostos orgânicos apolares ou levemente polares de baixo peso molecular, como monoterpenos e sesquiterpenos, se mostram bem solúveis. Compostos polares e de maior peso molecular, como ácidos fenólicos e flavonóides não glicosilados, em geral são moderadamente solúveis, enquanto compostos altamente polares e de maior peso molecular, como açúcares, polissacarídeos, proteínas e taninos, são dificilmente solúveis no CO₂ supercrítico puro (Taylor, 1996; Mukhopadhyay, 2000; Brunner, 2005).

No entanto, a adição de um solvente auxiliar ao CO₂, denominado co-solvente ou modificador, tem sido proposta com o intuito de aumentar a solubilidade de compostos-alvo polares e também para possibilitar o controle da seletividade do processo de extração, proporcionando a utilização de pressões menos elevadas (Díaz-Reinoso et al., 2006; Sinko, 2006; Pereira e Meireles, 2010). Os co-solventes são selecionados de modo a proporcionar o aumento das interações moleculares do solvente supercrítico com os compostos de interesse. Os solventes mais utilizados como modificadores em processos de extração com fluido supercrítico são o metanol e o etanol, os quais são capazes de realizar interações do tipo dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio com moléculas do soluto contendo grupos funcionais polares (Hamburger et al., 2004; Kopcak e Mohamed, 2005; Azevedo et al., 2008). Diversos estudos abordando aplicações da extração supercrítica empregando co-solventes polares têm sido publicados e alguns destes serão discutidos ao longo do presente trabalho.

4.3 Instrumentação

Um sistema de extração supercrítica consiste basicamente nos seguintes componentes: uma fonte de CO₂, um compressor ou bomba de alta pressão, um vaso extrator, uma válvula de decompressão (ou válvula de expansão) e uma câmara de separação, além de diversos controladores de temperatura e pressão. O CO₂ pressurizado, no estado líquido, é fornecido ao sistema através do compressor, passando então por um pré-aquecedor, onde sua temperatura é elevada, ocorrendo assim a sua passagem do estado líquido para estado supercrítico. O CO₂ supercrítico, à medida que flui no sistema, passa pela matriz sólida localizada na câmara de extração. Após, a mistura soluto-solvente é submetida à expansão ao passar pela válvula de expansão. A pressão e temperatura reduzidas o extrato precipita no frasco coletor. O CO₂, já no estado gasoso, recircula no sistema, passando novamente pelo compressor e pelo trocador de calor antes de chegar ao vaso extrator. Este procedimento é usual em processos de nível industrial. O processo também pode operar sem a recirculação de CO₂, o que é bastante comum em unidades laboratoriais e piloto (Mukhopadhyay, 2000; Jacques, 2005; Cassel et al., 2007; 2008; Rosa et al., 2009).

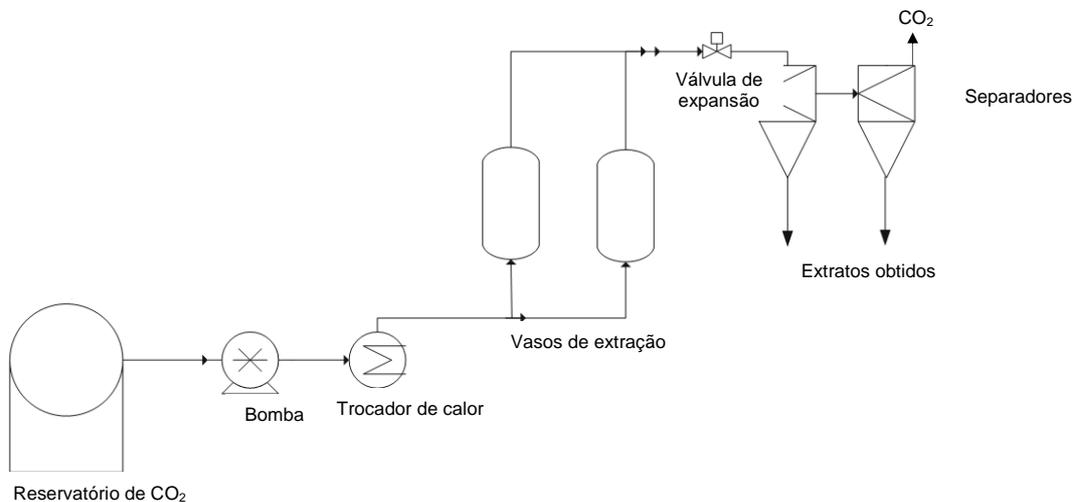


Figura 2. Diagrama esquemático de um processo de extração supercrítica (adaptado de Pereira e Meireles, 2010).

Os processos de extração supercrítica podem ser divididos em três escalas: laboratorial ou analítica, piloto e industrial. Os equipamentos em escala laboratorial, onde se incluem a maioria dos utilizados na pesquisa científica, são empregados diretamente na preparação de amostras para análise química. As unidades de extração em escala piloto em geral são empregadas no desenvolvimento de novas aplicações da extração

supercrítica, visando ao escalonamento para processos industriais, e também na obtenção de produtos de alto valor agregado que necessitam de volumes menores em relação à escala industrial, como na extração de aromas e fragrâncias. Os equipamentos em escala industrial são utilizados em processos de grande escala na indústria farmacêutica e de alimentos. Dentre as principais aplicações industriais da extração supercrítica, destacam-se a descafeinação do café e chá, a extração e processamento de óleos vegetais (lipídeos e óleos essenciais), a produção de lúpulo para cervejarias e a extração da nicotina do fumo. Diversas unidades industriais estão presentes em países da Europa, Ásia e nos Estados Unidos (Mukhopadhyay, 2000; Cassel et al., 2007; 2008).

4.4 Vantagens da extração com fluido supercrítico

A extração em meio supercrítico, além de proporcionar a extração com um solvente de maior poder de solvatação em relação aos solventes líquidos, possui diversas outras vantagens em relação às técnicas convencionais de extração. Talvez a principal delas seja a possibilidade de ajuste das variáveis do processo, a exemplo da temperatura e pressão, o que leva a alterações nas propriedades físico-químicas do solvente utilizado, como densidade, difusividade e viscosidade. Apesar do CO₂ ser um solvente de baixa polaridade, seu poder solvente e sua seletividade variam consideravelmente com a densidade. Assim, a extração supercrítica permite uma adequação das condições de extração de acordo com as necessidades específicas das substâncias a serem extraídas, assim como o fracionamento de extratos (Mukhopadhyay, 2000; Abbas et al., 2008).

Outro aspecto muito explorado quando se trata das vantagens da extração em meio supercrítico é o seu *status* de tecnologia limpa. O solvente mais comumente utilizado, o dióxido de carbono, é uma substância inerte, não inflamável, que não agride o ambiente e geralmente considerado seguro (GRAS – *generally regarded as safe*), que ao término do processo de extração é volatilizado, uma vez que é um gás em condições ambientes (Jarvis e Morgan, 1997; Bhardwaj et al., 2010).

4.5 Limitações da extração com fluido supercrítico

A principal limitação da técnica de extração supercrítica é o alto custo do investimento inicial do equipamento, sendo normalmente apontada como a razão pela

qual ainda não existem plantas industriais na América Latina. A necessidade de desenvolvimento e otimização de métodos também pode ser considerada como um fator limitante. Assim, a utilização da extração supercrítica é indicada apenas quando o produto final possui alto valor agregado (Maul et al., 1996; Prado et al., 2010). Apesar disso, alguns estudos têm revelado a viabilidade econômica da extração supercrítica na obtenção de extratos de plantas medicinais e aromáticas (Pereira e Meireles, 2007; Mezzomo et al., 2011).

4.6 Parâmetros que influenciam no processo de extração supercrítica

A seletividade do processo de extração supercrítica, ou seja, a extração dos compostos de interesse presentes no material vegetal, com um rendimento adequado, sem a co-extração de compostos indesejáveis, depende de diversos fatores. Além do tipo de solvente utilizado no processo e da presença de co-solventes, pode-se destacar:

- a) densidade: é a propriedade responsável pela capacidade solvente dos fluidos supercríticos, sendo alterada por mudanças na pressão e temperatura do sistema, especialmente na região próxima ao ponto crítico (Rosa et al., 2009);
- b) pressão e temperatura: em geral, um aumento na pressão a temperatura constante causa um aumento na densidade do fluido supercrítico, elevando assim o seu poder solvente.

Já o efeito da temperatura na densidade é mais complexo. De maneira geral, pode-se afirmar que, a pressão constante, um aumento na temperatura leva a uma diminuição na densidade do solvente supercrítico. Esse efeito, no entanto, não é linear. Mudanças na temperatura, além de influenciarem na densidade do solvente, também influenciam na pressão de vapor e na energia cinética das moléculas de soluto. Em temperaturas próximas do ponto crítico, o efeito da diminuição da densidade do solvente supercrítico é mais pronunciado. A variação da densidade do CO₂ supercrítico em função da pressão e temperatura pode ser visualizada na figura 3 (Rosa et al., 2009; Pereira e Meireles, 2010);

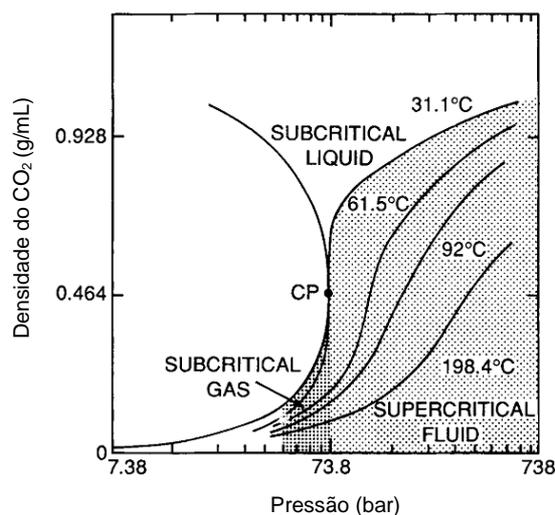


Figura 3. Variação da densidade do CO₂ em condições supercríticas e próximas ao ponto crítico (adaptado de Bevan e Marshal, 1994).

- c) vazão do solvente: geralmente, um aumento na vazão do solvente supercrítico causa um aumento na capacidade de extração. Entretanto, em alguns casos foi observado que, para valores maiores de vazão do solvente, o tempo de contato entre o soluto e o solvente, necessário para que houvesse a saturação do solvente com o soluto, acabou sendo insuficiente (Pereira e Meireles, 2010);
- d) propriedades do soluto: algumas características do soluto influenciam diretamente a sua solubilidade no fluido supercrítico. Em geral, quanto menor o peso molecular, a polaridade e a pressão de vapor do soluto, maior será sua solubilidade no CO₂ supercrítico (Pereira e Meireles, 2010);
- e) tamanho de partícula do material vegetal: em geral, a taxa de extração aumenta com a diminuição do tamanho de partícula da matriz sólida, uma vez que ocorre um aumento da área disponível para transferência de massa (Cassel et al., 2008; Pereira e Meireles, 2010);
- f) umidade do material vegetal: na maioria dos casos, a água presente na matriz vegetal compete com o soluto para interagir com o solvente, diminuindo assim o rendimento do processo. Por esta razão, a secagem do material vegetal é recomendada. No entanto, em alguns casos, a presença de água é necessária para permitir a interação do solvente com o soluto, como na extração de cafeína de grãos de café verde, a qual será discutida adiante (Pereira e Meireles, 2010).

5. PARTE 2: APLICAÇÕES DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA NA OBTENÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

A extração supercrítica de extratos vegetais e produtos naturais representa uma das principais aplicações na área de fluidos supercríticos, sendo também a mais estudada. A obtenção da cafeína a partir dos grãos de café foi a primeira aplicação em larga escala da extração com fluido supercrítico, sendo patenteada pela primeira vez no início dos anos 70 (Ramalakshmi e Raghavan, 1999). A maioria dos trabalhos encontrados na literatura refere-se à extração de metabólitos secundários tais como compostos fenólicos, alcalóides, incluindo as metilxantinas, e óleos essenciais, incluindo essências e aromas. Em relação aos trabalhos abordando a extração de metabólitos primários, somente os lipídeos são compostos de interesse para aplicações de técnicas de extração supercrítica, uma vez que polissacarídeos são moléculas muito polares e com peso molecular muito elevado para serem extraídas com o CO₂ supercrítico.

5.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos constituem uma classe de produtos naturais bastante diversificada, apresentando como característica comum a presença de pelo menos um anel aromático, no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila livre ou outra função derivada, como éster ou heterosídeo. Diversos grupos de metabólitos secundários vegetais, como ácidos fenólicos, cumarinas, xantonas, flavonóides e antocianidinas são classificados como compostos fenólicos, assim como os polímeros taninos e lignanas (Bruneton, 2001; Carvalho et al., 2007). O interesse nessa classe de compostos tem aumentado consideravelmente devido à capacidade antioxidante apresentada por estes (Díaz-Reinoso et al., 2006; Stalikas, 2007).

Compostos fenólicos em geral são moléculas muito instáveis, sendo facilmente oxidáveis e suscetíveis à degradação. Os principais fatores que podem desencadear sua degradação são temperaturas elevadas, valores de pH extremos e a presença de luz e oxigênio. A extração com fluido supercrítico representa uma alternativa para a obtenção de compostos fenólicos, uma vez que proporciona a obtenção de extratos relativamente limpos, ou seja, sem a presença de açúcares, clorofilas e pigmentos, em temperaturas

relativamente baixas, o que garante a estabilidade destes (Stalikas, 2007; Maróstica Júnior et al., 2010).

Para a extração supercrítica de compostos fenólicos, geralmente se faz uso de pressões mais elevadas, faixa de 150 a 450 bar, ou a adição de co-solventes polares. Nesse caso, são empregadas pressões um pouco menores, na faixa de 100 a 350 bar. Entretanto, um aumento na pressão pode resultar em uma menor seletividade. Em relação à temperatura, normalmente são empregadas temperaturas mais amenas, na faixa de 35 a 60 °C, com o objetivo de evitar a degradação térmica destes. Também se tem empregado o uso de co-solventes, como metanol e etanol. (Díaz-Reinoso et al., 2006; Rosa et al., 2009; Maróstica Júnior et al., 2010; Pereira e Meireles, 2010). A extração supercrítica de duas espécies vegetais de interesse farmacêutico, as sementes de uva (*Vitis vinifera*) e a erva-de-São-João (*Hypericum perforatum*), são discutidas seguir.

5.1.1 Extração supercrítica de compostos fenólicos presentes na semente de uva

A extração com fluido supercrítico dos compostos fenólicos presentes nas sementes de uva (*Vitis vinifera*) tem sido estudada. A semente de uva é um subproduto da produção industrial de vinho e suco de uva, sendo muitas vezes utilizada como matéria-prima na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (Molero Gómez et al., 1996; Yilmaz et al., 2011). Em relação à composição química, a semente de uva é uma matriz complexa composta por aproximadamente 40% de fibras, 16% de óleo, 11% de proteínas e 7% de compostos fenólicos (Murga et al., 2000). Os compostos fenólicos presentes na semente de uva, como ácidos fenólicos e proantocianidinas (taninos condensados), têm demonstrado importante atividade antioxidante (Fiori, 2007; Spranger et al., 2008).

A extração supercrítica das sementes de uva utilizando o CO₂ puro como fluido extrator resulta na obtenção dos compostos lipofílicos somente. Para a extração supercrítica dos compostos fenólicos desta mesma matriz, se tem empregado a extração com CO₂ supercrítico puro no pré-tratamento do material, visando à retirada das substâncias lipofílicas, antes da extração com CO₂ contendo assim como a adição de pequenas quantidades de modificador orgânico, uma vez que o uso deste acarreta na extração do óleo concomitantemente com os compostos fenólicos (Maróstica Júnior et al., 2010). Palma e Taylor (1999) realizaram o fracionamento dos compostos de interesse

presentes em sementes de uva. Em um primeiro momento, o material vegetal foi submetido à extração com CO₂ supercrítico puro, a pressão de 450 bar e temperatura de 35 °C, resultando na obtenção de um extrato contendo todos compostos de menor polaridade. A partir do mesmo material vegetal, utilizando CO₂ e metanol a 20%, nas mesmas condições da primeira extração, foi obtido um extrato contendo compostos mais polares, onde foram identificados o ácido fenólico ácido gálico e os monômeros de proantocianidinas catequina e epicatequina.

Murga et al. (2000) aplicaram a extração por fluido supercrítico em sementes de uvas das quais o óleo já havia sido pré-extraído por processo industrial, avaliando os efeitos da variação da concentração de co-solvente e da pressão empregada. Utilizou-se etanol como co-solvente nas concentrações de 5, 10 e 15% (v/v), a pressões de 200 e 300 bar e temperatura de 40°C, onde foram extraídos os ácidos fenólicos ácido gálico e ácido protocatéuico e os monômeros de proantocianidinas catequina e epicatequina.

5.1.2 *Extração supercrítica de compostos fenólicos presentes em espécies do gênero Hypericum*

Fitoterápicos contendo extratos de *Hypericum perforatum* (Guttiferae), uma planta nativa da Europa e Ásia, conhecida como erva-de-São-João, são amplamente utilizados no tratamento da depressão leve a moderada. Apesar da atividade antidepressiva de *H. perforatum* ter sido inicialmente atribuída às naftodiantronas hipericina e pseudo-hipericina, evidências experimentais e clínicas têm demonstrado que esta ação terapêutica dependeria de um sinergismo entre algumas classes de compostos fenólicos presentes na planta, dentre eles os derivados do floroglucinol hiperforina e *ad*-hiperforina, os flavonóides e as xantonas (Heinrich et al., 2004; Mennini e Gobbi, 2004)

A extração supercrítica dos compostos fenólicos de *H. perforatum* tem sido estudada. Dimitrieska-Stojkovic e Zdravkovski (2003) realizaram a extração com CO₂ supercrítico em escala analítica dos flavonóides quercetina e rutina a partir das partes aéreas de *H. perforatum*, empregando pressões na faixa de 93 a 383 bar, temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C, tempo de extração estática de 30 minutos, tempo de extração dinâmica de 60 minutos e utilizando metanol na concentração de 15% como modificador polar. A condição em que se obteve um maior rendimento de extração para estes

flavonóides foram pressão de 332 bar e temperatura de 50 °C, onde o rendimento para a quercetina (96%) foi maior em relação ao rendimento de extração para a rutina (74%). Este resultado pode ser explicado pelo fato da rutina ser heterosídeo, e, portanto, possuir maior polaridade e, conseqüentemente, menor solubilidade no CO₂ supercrítico em relação à quercetina, uma aglicona.

Na espécie *H. perforatum* os derivados do floroglucinol hiperforina e *ad*-hiperforina, representam as substâncias ativas mais abundantes. Nas folhas e flores, por exemplo, o conteúdo de hiperforina na droga vegetal seca pode chegar a 4%. Diferentemente dos ácidos fenólicos e flavonóides, são compostos fenólicos que, por apresentarem uma estrutura composta por um esqueleto floroglucinol substituído por cadeias de isopreno, apresentam caráter lipofílico, mostrando-se assim adequados para a extração com CO₂ supercrítico puro (Römpp et al., 2004). São substâncias facilmente degradáveis, suscetíveis à oxidação por ar e luz e até mesmo instáveis na maioria dos solventes orgânicos, o que também justifica a obtenção destes utilizando técnicas de extração supercrítica (Medina et al., 2006).

Römpp et al. (2004) realizaram a otimização da extração supercrítica de hiperforina a partir das folhas de *H. perforatum* em escala piloto, onde foram testadas as pressões de 90, 120 e 150 bar, temperaturas de 40 e 50 °C e tempo de extração de 1, 3 e 5h. Foi verificado que o maior rendimento de hiperforina, correspondente a uma concentração de 35,5% no extrato obtido, ocorreu na pressão de 90 bar e temperatura de 40 °C. Catchpole et al. (2005) extraíram a hiperforina a partir das folhas de *H. perforatum*, utilizando CO₂ em condições subcríticas (70 bar e 20 °C) e supercríticas (300 bar e 40 e 50 °C). Cui e Ang (2002) realizaram a extração em escala analítica de hiperforina e *ad*-hiperforina a partir das folhas e flores de *H. perforatum* de maneira seletiva, ou seja, sem a co-extração de naftodiantronas e flavonóides. A condição ótima de extração foi determinada para a pressão de 380 bar, a 50 °C, e tempo de extração de 90 minutos. Glisic et al. (2008) também extraíram seletivamente a hiperforina e *ad*-hiperforina a partir das folhas de *H. perforatum*, empregando pressões de 100, 150 e 200 bar e temperaturas de 40 e 50 °C. É interessante notar que, mesmo tratando-se da mesma espécie, diferentes autores empregaram condições de temperatura e pressão muito distintas na extração supercrítica da hiperforina. Diversos fatores podem explicar tais

resultados, como a influência de outros parâmetros da operação e fatores ligados à matriz vegetal, como tamanho de partícula e conteúdo de umidade.

A extração supercrítica de espécies do gênero *Hypericum* nativas do sul do Brasil também tem sido estudada. Cargnin et al. (2010) realizaram a extração com CO₂ supercrítico das partes aéreas de *H. polyanthemum*, visando à recuperação do derivado do floroglucinol uliginosina B e dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3. Utilizaram-se pressões de 90, 120, 150 e 200 bar e temperaturas de 40, 50 e 60 °C, onde se determinou a temperatura de 50 °C como a melhor condição para a extração dos benzopiranos e da uliginosina B. Para a recuperação da uliginosina B a temperaturas mais elevadas foram necessárias pressões mais elevadas, devido ao seu alto peso molecular. Barros et al. (2010) empregou a extração com CO₂ supercrítico nas folhas de *H. carinatum*, extraindo os derivados de benzofenona carifenona A e carifenona B e o derivado do floroglucinol uliginosina B, onde as condições ótimas de extração para a obtenção destes compostos foram determinadas para a pressão de 90 bar e temperatura de 40 °C.

5.2 Alcalóides

Os alcalóides constituem um vasto grupo de metabólitos secundários com grande diversidade estrutural, podendo ser definidos como “compostos orgânicos cíclicos de origem natural contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativo e com distribuição limitada entre os organismos” (Pelletier, 1983). Por possuírem diversas atividades biológicas de interesse farmacêutico, os alcalóides têm sido considerados compostos-alvo para o desenvolvimento de metodologias de extração por fluido supercrítico (Kim et al., 2001). Apesar disso, muitos alcalóides são demasiadamente polares para serem suficientemente extraídos pelo CO₂ supercrítico puro. Além disso, a maioria dos alcalóides está presente nos tecidos vegetais na forma de sal, a qual é mais solúvel em solventes polares (Choi et al., 1999a).

Para contornar as limitações da extração de alcalóides com CO₂ supercrítico, co-solventes polares têm sido empregados no intuito de aumentar a polaridade do CO₂ e, assim, aumentar a solubilidade dos alcalóides na forma de sal no solvente supercrítico. Metanol e etanol são os solventes mais utilizados com esta finalidade. Os alcalóides oxindólicos das raízes de *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato), mitrafilina e rincofilina,

foram isolados através de extração por CO₂ supercrítico por Lopez-Avila et al. (1997), utilizando como co-solvente metanol 10%. Os parâmetros empregados foram 253,3 bar de pressão, temperatura de 60 °C e tempo de extração de 30 minutos.

Colchicina, 3-demetilcolchicina e colchicosídeo foram extraídos das sementes de *Colchicum autumnale* empregando metanol como modificador polar, onde a concentração de 3% resultou em um maior rendimento de extração, além da pressão de 247 bar, temperatura de 35 °C, tempo de extração estática de 25 minutos e tempo de extração dinâmica de 30 minutos. O método de extração por fluido supercrítico foi comparado com o método convencional de extração com solventes orgânicos, onde os dois métodos apresentaram rendimentos semelhantes. No entanto, a extração por fluido supercrítico demonstrou ser mais rápida e apresentou melhor reprodutibilidade (Ellington et al., 2003).

Pereira et al. (2004) extraíram os alcalóides indólicos coronaridina e voacangina das partes aéreas de *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae), utilizando CO₂ supercrítico contendo etanol 4,6%, onde as condições ótimas de extração encontradas foram 45 °C e 250 bar. Os alcalóides quinolizidínicos matrina e oximatrina, presentes nas raízes de *Sophora flavescens* (Leguminosae), uma planta da medicina tradicional chinesa, foram isolados utilizando CO₂ supercrítico com um fluxo de 2,0 L/min e etanol 75% em água com um fluxo de 0,04 mL/min, onde as condições que resultaram em um melhor rendimento de extração foram 250 bar e 50 °C (Ling et al., 2007).

O método de extração de alcalóides por fluido supercrítico utilizando modificadores polares possui, no entanto, alguns inconvenientes, como a limitação da percentagem de modificador adicionada e a possibilidade da presença de solvente orgânico residual no produto final, fato que levou ao desenvolvimento de outros métodos de extração de alcalóides por fluido supercrítico (Kim et al., 2001). Choi e colaboradores (1999a, 1999b, 2002) verificaram que as bases livres de alguns alcalóides se mostraram solúveis no CO₂ supercrítico puro, até mesmo em condições brandas de extração (100 bar e 40 °C). Entretanto, estes mesmos compostos não foram extraídos do material vegetal, o que pode ser atribuído ao fato de que a maioria dos alcalóides existe na forma de sal no material vegetal. Assim, o uso de modificadores polares contendo substâncias com caráter básico foi investigado por este grupo. A extração dos alcalóides tropânicos

hiosciamina e escopolamina das raízes e partes aéreas de *Scopolia japonica* (beladona japonesa) foi realizada com CO₂ puro e CO₂ modificado com metanol, água, dietilamina 10% (v/v) em metanol, dietilamina 10% (v/v) em água, nas conc. de 1, 5 e 10% (v/v). A mistura de dietilamina a 10% em metanol, na concentração de 10%, a uma pressão de 340 bar e temperatura de 60 °C, aumentou consideravelmente o rendimento da extração desses alcalóides, em relação à extração usando somente modificadores polares (Choi et al., 1999b).

Os mesmos modificadores foram testados na extração da efedrina e seus derivados metilefedrina, norefedrina e pseudoefedrina a partir das partes aéreas de *Ephedra sinica*, nas condições de extração de 340 bar e 80 °C. Com exceção da metilefedrina, a adição de água demonstrou não aumentar o rendimento de extração dos alcalóides, o que pôde ser atribuído à baixa miscibilidade da água no CO₂ supercrítico. Já o efeito da adição de metanol resultou em pequenos aumentos na recuperação dos alcalóides. A adição de dietilamina a 10% em metanol ou água resultou em aumentos significantes no rendimento de extração de todos os alcalóides, onde os melhores rendimentos também foram encontrados para a mistura de dietilamina a 10% em metanol na concentração de 10% (Choi et al., 1999a).

Para a extração do alcalóide indólico vimblastina a partir das partes aéreas de *Catharanthus roseus* utilizou-se CO₂ puro e CO₂ modificado com metanol, dietilamina em metanol (10%, v/v) e trietilamina em metanol (10%, v/v), nas concentrações de 1, 5, 10 e 20% (v/v). O rendimento de extração foi maior para a mistura trietilamina em metanol (10%, v/v) na concentração de 20% (Choi et al., 2002).

5.2.1 *Metilxantinas*

As metilxantinas constituem o grupo de alcalóides provavelmente mais conhecido e utilizado popularmente, uma vez que são constituintes de espécies de plantas largamente consumidas como o café (*Coffea arabica*), o chá-da-índia (*Camellia sinensis*) e o guaraná (*Paullinia cupana*) (Heinrich et al., 2004). A extração por fluido supercrítico de alcalóides teve início com a extração da cafeína de sementes de café verde, em processos industriais de descafeinação, onde atualmente ainda é extensamente aplicada (Taylor, 1996; Mukhopadhyay, 2000). As metilxantinas, por serem derivados do

metabolismo de bases púricas, e não dos aminoácidos, como a maioria dos alcalóides, constituem um grupo de alcalóides com algumas peculiaridades, como o caráter anfótero e a solubilidade em água quente e em solventes clorados (Bruneton, 2001).

A cafeína, devido às suas propriedades terapêuticas, como a atividade estimulante do sistema nervoso central e a atividade vasoconstritora cerebral, é o princípio ativo de diversos produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentos funcionais. Teofilina e teobromina, metilxantinas também presentes no café e no chá-da-índia, assim como em outras plantas utilizadas devido à sua ação estimulante, como as folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e as sementes de cacau (*Theobroma cacao*), também são empregadas como matérias-primas em preparações farmacêuticas. Assim, a extração de metilxantinas a partir destas espécies vegetais constitui um processo economicamente atrativo para a obtenção destes compostos. Por outro lado, produtos desprovidos de metilxantinas, como o café descafeinado, atraem interesse dos consumidores que não podem ingerir cafeína, uma vez que seu consumo é contraindicado em casos de doenças cardiovasculares severas, úlceras e insônia (Saldaña et al., 2002; Rates, 2007; Cassel et al., 2010).

A descafeinação do café é realizada tradicionalmente utilizando extração sólido-líquido, na qual os solventes mais utilizados são a água e alguns solventes orgânicos, como acetato de etila e diclorometano. O diclorometano extrai seletivamente a cafeína, preservando no material extraído açúcares, peptídeos e outras substâncias flavorizantes. No entanto, além de possuir propriedades carcinogênicas, este solvente pode causar danos ambientais, como danos à camada de ozônio. A extração com acetato de etila, inadequadamente referida como um processo “natural”, visto que é um composto que ocorre naturalmente em algumas frutas, possui todos os inconvenientes já citados da extração por solventes (Rates, 2007; Ramalakshmi e Raghavan, 1999).

O método mais seletivo para remoção da cafeína dos grãos de café, sem a remoção de substâncias que conferem odor e sabor, é a extração com CO₂ supercrítico. O processo de extração supercrítica da cafeína foi patenteado pela primeira vez no início dos anos 70, sendo desde então utilizado para descafeinação de café a nível industrial. O processo geralmente é precedido por uma etapa de umidificação, onde as sementes de café são misturadas com água, de modo que seu conteúdo de umidade é levado a cerca de 50%. Essa etapa é essencial no processo de extração da cafeína, uma vez que esta se

encontra nos grãos de café complexada com ácido clorogênico e a água atua liberando a cafeína em sua forma livre. Também pode ser empregado como fluido extrator o CO₂ supercrítico saturado com água. Em geral, os parâmetros utilizados são pressão de cerca de 300 bar e temperatura de aproximadamente 70 °C. No separador, a cafeína é removida do CO₂ utilizando água. A água contendo a cafeína extraída ainda passa por um processo de osmose reversa, onde a cafeína é concentrada (Taylor, 1996; Ramalakshmi e Raghavan, 1999).

A extração das metilxantinas presentes na erva-mate tem sido estudada. Saldaña et al. (1999) extraíram a cafeína, teofilina e teobromina das folhas de erva-mate em escala analítica e determinaram a solubilidades destas metilxantinas no CO₂ supercrítico. Os resultados indicaram uma solubilidade da cafeína no CO₂ muito maior em relação às solubilidades da teofilina e teobromina (aproximadamente 1350,0 mg/kg para a cafeína, 9,0 mg/kg para a teofilina e 3,0 mg/kg para a teobromina), o que foi atribuído à presença de um grupamento metila a mais na molécula da cafeína, o que a torna mais apolar e, portanto, mais solúvel no fluido supercrítico. Cassel et al. (2010) realizaram a extração com CO₂ supercrítico em escala piloto das metilxantinas presentes nas folhas de erva-mate, empregando pressões de 120, 150, 170 e 200 bar e temperaturas de 40, 50, 60 e 70 °C. A condição onde se obteve a concentração máxima de cafeína nos extratos foi em 150 bar e 50 °C, onde 33,6% (p/p) da cafeína foi extraída a partir das folhas de *I. paraguariensis*.

Apesar do CO₂ supercrítico ser bastante seletivo para a cafeína, a solubilidade desta neste solvente é mais baixa do que em solventes orgânicos, o que resulta na necessidade de uso de grandes quantidades deste gás e consequente aumento nos custos operacionais. A adição de co-solventes tem sido estudada a fim de aumentar a solubilidade da cafeína no CO₂ supercrítico. Kopcak e Mohamed (2005) determinaram experimentalmente a solubilidade da cafeína no CO₂ supercrítico contendo 5 e 10% de etanol e 5% de isopropanol, a temperaturas de 50 e 70 °C e pressões de 150 a 300 bar, onde verificou-se que a adição de co-solventes contribui substancialmente para o aumento da solubilidade da cafeína, o que pode ser explicado pelo aumento das interações intermoleculares entre soluto e solvente. A presença do etanol proporciona a ocorrência de ligações de hidrogênio entre as moléculas de cafeína e os grupamentos hidroxila do etanol. Assim, a solubilidade da cafeína aumenta com a quantidade de etanol adicionada como co-solvente no processo de extração com CO₂ supercrítico.

Saldaña et al. (2002) observaram que a modificação do solvente supercrítico com diferentes quantidades de etanol resultou em um aumento na concentração de cafeína, presente em extratos de sementes de guaraná e de folhas de erva-mate, e de teobromina, no extrato de sementes de cacau, obtidos por extração supercrítica. A quantidade de cafeína extraída das sementes de guaraná e das folhas de erva-mate utilizando CO₂ supercrítico contendo 10% de etanol foi duas vezes maior em relação à extração utilizando CO₂ saturado com água, enquanto a quantidade de teobromina extraída usando a mesma mistura de solvente foi dez vezes maior em relação à extração com CO₂ saturado com água.

5.3 Óleos voláteis e compostos relacionados

Os óleos voláteis, também denominados óleos essenciais, podem ser definidos como produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico, como destilação por arraste a vapor ou outro método adequado (BRASIL, 2007). O termo óleo volátil é uma definição física, ou seja, define um grupo de substâncias que apresenta volatilidade, diferentemente das definições de grupos de metabólitos vegetais. Em relação à sua composição, os óleos voláteis são misturas complexas de metabólitos secundários de baixo peso molecular, voláteis e lipofílicos (Simões e Spitzer, 2007). Apesar de constituírem apenas uma pequena fração na composição total de uma planta, os compostos presentes nos óleos essenciais são os responsáveis pelo aroma característico de cada material vegetal, o qual geralmente é resultado de complexas interações que ocorrem entre um grande número de compostos (Reverchon, 1997; Pourmortazavi e Hajimirsadeghi, 2007).

As classes de metabólitos secundários mais frequentemente presentes nos óleos voláteis são os terpenóides e os fenilpropanóides. Os terpenóides podem ser definidos como um grupo de substâncias de origem vegetal que são resultado da condensação de um número variável de unidades de isopreno. As unidades isoprênicas são produtos compostos por cinco carbonos e derivados da via do mevalonato. Os compostos terpênicos presentes nos óleos voláteis podem ser monoterpenos, compostos por 10 átomos de carbono, e sesquiterpenos, com 15 átomos de carbono, os quais podem ser

hidrocarbonados ou oxigenados. Reações secundárias originam diversas moléculas funcionalizadas, como álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres e éteres (Bruneton, 2001; Simões e Spitzer, 2007). Já os fenilpropanóides são compostos fenólicos contendo uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligada a um anel aromático, formados a partir do ácido cinâmico. Reações enzimáticas como as de redução, oxidação e ciclização desta cadeia lateral dão origem a compostos como propenilbenzenos, aldeídos aromáticos e cumarinas (Bruneton, 2001; Simões e Spitzer, 2007).

O processo de extração supercrítica de óleos essenciais é uma das aplicações mais largamente discutidas na literatura abordando fluidos supercríticos, sendo considerado um campo promissor para aplicações industriais desta técnica (Reverchon, 1997). A maioria dos inconvenientes encontrados nos processos convencionais de obtenção de óleos voláteis, como degradação térmica e hidrólise, o que resulta na modificação da composição química dos óleos voláteis, é contornada utilizando o processo de extração com CO₂ supercrítico (Cassel et al., 2000; Mukhopadhyay, 2000).

A extração supercrítica de óleos voláteis e compostos relacionados têm sido aplicada na obtenção de óleos voláteis de plantas de interesse farmacêutico e na extração de aromas e fragrâncias para emprego na indústria de alimentos, cosméticos e perfumaria. Alguns trabalhos de revisão abordando o assunto têm sido publicados, onde levantamentos das espécies vegetais estudadas e das condições aplicadas no processo de extração foram realizados (Reverchon e De Marco, 2006; Pourmortazavi e Hajimirsadeghi, 2007; Pereira e Meireles, 2010). Os valores das condições de pressão normalmente empregadas se situam na faixa de 80 a 200 bar, enquanto as temperaturas empregadas estão na faixa de 30 a 50 °C. Os rendimentos das extrações com CO₂ supercrítico de plantas aromáticas geralmente são mais altos em relação aos de métodos de hidrodestilação e destilação por arraste a vapor, resultando na obtenção de um extrato semelhante às oleoresinas (extratos obtidos a partir da extração com solventes orgânicos de plantas contendo óleos essenciais). Isso se deve ao fato de que a extração com CO₂ supercrítico resulta na co-extração de substâncias não voláteis, como compostos terpênicos de alto peso molecular (diterpenos e triterpenos), alguns lipídeos e parafinas (compostos com fórmula geral C_nH_{2n+2}, onde 20 ≤ n ≤ 40), constituintes das ceras epicuticulares localizadas na superfície do material vegetal (Pourmortazavi e Hajimirsadeghi, 2007).

Entretanto, resultados experimentais têm mostrado que o processo de obtenção dos componentes do óleo essencial por extração supercrítica pode ser otimizado de modo a se extrair somente as substâncias voláteis. Os compostos de maior peso molecular possuem maior solubilidade no CO₂ supercrítico quando este possui densidades mais elevadas. Assim, em condições de temperaturas de 40 a 50 °C e pressões menores que 100 bar, o que corresponde a valores de densidade do CO₂ menores que 0,6 g/cm³, os compostos não voláteis, com exceção das parafinas, não são co-extraídos com os componentes voláteis. Os compostos parafínicos, pelo fato de estarem localizados na superfície do material vegetal, e apesar de possuírem uma solubilidade relativamente baixa no CO₂ supercrítico, são co-extraídas com os compostos voláteis em qualquer condição de extração pelo simples mecanismo de “lavagem”. Por outro lado, terpenos e outros componentes voláteis, localizados em estruturas internas do vegetal, como glândulas secretoras, necessitam passar por complexos mecanismos de transferência de massa para serem extraídos (Reverchon, 1997; Reverchon e De Marco, 2006).

Apesar disso, é possível separar as ceras epicuticulares dos extratos pela indução da sua precipitação seletiva em dois ou mais separadores operando em série. Como as parafinas são insolúveis em temperaturas na faixa de -5 a +5 °C, e os compostos voláteis mantêm uma boa solubilidade nestas condições, as condições de operação no primeiro separador podem ser selecionadas de modo a promover a supersaturação e precipitação dos compostos parafínicos, enquanto o óleo essencial é recuperado no segundo separador (Reverchon, 1997; Reverchon e De Marco, 2006). Utilizando esta técnica, diversos estudos foram realizados resultando na separação das ceras epicuticulares do óleo essencial de várias espécies vegetais, como *Salvia officinalis*, *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), *Foeniculum vulgare* (funcho) e *Mentha spicata* (hortelã-verde), entre outras (Reverchon e Marrone, 1997; Reverchon et al. 1999a; 1999b; Marongiu et al., 2001).

Dentre as espécies de interesse farmacêutico para as quais a extração supercrítica dos componentes voláteis tem sido estudada, destaca-se a camomila (*Chamomilla recutita*), cujo óleo essencial apresenta em sua composição alfa-bisabolol e camazuleno, sendo este último formado a partir da matricina durante o processo de destilação por arraste a vapor, em uma reação catalisada pelo calor. Scalia et al. (1999) realizaram a extração supercrítica dos capítulos florais de camomila. A condição de 90 bar e 40 °C

resultou em um maior rendimento de extração, onde o extrato obtido apresentou em sua composição uma percentagem maior de alfa-bisabolol e matricina em relação ao método de destilação por arraste a vapor. Além disso, o extrato apresentou coloração amarela escura, indicando assim que não ocorreu degradação térmica da matricina a camazuleno, o qual é responsável pela coloração azul do óleo essencial de camomila obtido através de destilação por arraste a vapor. No entanto, resultou na co-extração de ceras, as quais representaram cerca de 13% do extrato.

Terpenóides de maior peso molecular, como os diterpenos e triterpenos, compostos de 20 e 30 átomos de carbono, respectivamente, não estão presentes nos óleos voláteis, no entanto, apresentam importantes atividades biológicas (Heinrich et al., 2004; Meireles, 2009). A obtenção destes compostos através de extração supercrítica tem sido estudada. O alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é uma planta tradicionalmente utilizada na medicina popular e como condimento, cujos extratos e óleo essencial têm demonstrado possuir atividade antioxidante e antimicrobiana (Jiang et al., 2011). Os diterpenos fenólicos presentes no alecrim, como o carnosol e o ácido carnosóico, têm sido associados a estas atividades biológicas. Cavero et al. (2005) realizaram a extração com CO₂ supercrítico das folhas de alecrim empregando pressões na faixa de 150 a 300 bar, temperatura de 40 a 60 °C e utilizando o CO₂ puro e CO₂ contendo etanol nas concentrações de 4,0 e 7,0%. Carvalho Jr. et al. (2005), utilizando temperaturas de 30 e 40 °C, pressões de 100 a 300 bar e tempo de extração de 3h, elaboraram curvas globais de extração (*overall extraction curves*) para a extração das folhas de alecrim com CO₂ supercrítico. Os rendimentos globais de extração, bem como a concentração de ácido carnosóico nos extratos, aumentaram juntamente com o aumento da pressão para ambas as temperaturas, uma vez que o aumento na pressão provoca um aumento nas interações soluto-solvente.

Os limonóides, triterpenóides altamente oxigenados presentes em frutos da família Rutaceae, constituem um grupo proeminente de metabólitos secundários, os quais têm demonstrado possuir diversas atividades biológicas, como atividade anticâncer, redutora do colesterol e antiviral. O sabor amargo das frutas cítricas é atribuído a limonóides na forma de agliconas, como a limonina, enquanto as atividades biológicas têm sido atribuídas aos limonóides na forma glicosídica (Hasegawa et al., 2000; Manners, 2007). A extração com CO₂ supercrítico têm sido empregada na remoção desses compostos em

subprodutos da produção industrial de suco de frutas cítricas. Yu et al. (2006; 2007) extraíram a limonina 17- β -D-glicopiranosídeo do óleo de bagaço (*molasse*) e das sementes de *grapefruit* (*Citrus paradisi*), onde o maior rendimento de extração (0,61 e 0,62 mg/g) foi obtido na pressão de 483 e 414 bar, temperatura de 50 e 60 °C, empregando etanol como co-solvente nas concentrações de 10% e 30% e tempo de extração de 40 minutos.

5.4 Lipídeos

Os metabólitos primários constituem um grupo de macromoléculas amplamente utilizadas como fonte de energia por todos os organismos, que incluem os lipídeos, proteínas e açúcares. Os lipídeos constituem uma classe de compostos provenientes do metabolismo celular primário, podendo ser definidos por suas características de insolubilidade em água, solubilidade em solventes orgânicos e não-volatilidade. O conjunto de lipídeos presentes em um material vegetal é denominado óleo fixo, em contraponto aos óleos voláteis (Bruneton, 2001; Moyna e Heinzen, 2007).

Os óleos fixos, os quais geralmente estão localizados nas sementes, são compostos por uma mistura de triglicerídeos e ácidos graxos livres associados com outros constituintes em menor quantidade, como esteróis, ceras, pigmentos, proteínas e alguns compostos voláteis, os quais conferem o sabor e odor dos óleos. Devido à presença dessas outras classes de substâncias, os óleos vegetais em geral passam por processos de refinamento para que se tornem adequados para consumo humano e para aumento do valor nutricional, como no caso do aumento da concentração de ácidos graxos essenciais (Del Valle e Aguillera, 1999; Mukhopadhyay, 2000). O uso da extração com fluido supercrítico é largamente difundido em processos industriais de extração, fracionamento e refinamento de óleos vegetais comestíveis ou para uso em cosméticos. A extração supercrítica constitui uma alternativa promissora em relação às técnicas industriais tradicionais baseadas na extração de óleos vegetais com solventes orgânicos, como o hexano (Sahena et al., 2009).

A extração com CO₂ supercrítico tem sido extensivamente empregada em experimentos de extração do óleo de sementes de diversas espécies. Em relação aos parâmetros do processo, geralmente o CO₂ supercrítico puro é empregado com pressões

na faixa de 200 a 600 bar e temperaturas de 35 a 70 °C. Alguns exemplos de óleos para os quais a extração com CO₂ supercrítico têm sido aplicada incluem o óleo de semente de uva e o óleo de amêndoas doces (*Prunus amygdalus*), os quais encontram aplicações na indústria alimentícia e como matérias-primas em produtos cosméticos. O óleo de amêndoas doces foi obtido Marrone et al. (1998) através de extração supercrítica, onde as condições de extração foram pressão de 350 bar a 40 °C. O rendimento de extração foi de 50% em relação à massa do material vegetal submetido à extração, o qual correspondeu a um rendimento muito próximo do obtido através de extração com aparelho de Soxhlet e hexano. O óleo de semente de uva foi extraído com CO₂ supercrítico por Molero-Gómez et al. (1996), onde as condições de pressão de 200 bar e temperatura de 40 °C resultaram em um rendimento de extração de aproximadamente 7,0%, o qual se mostrou semelhante ao da extração com hexano, na qual rendimento de extração foi de 7,5%.

Experimentos de extração supercrítica de óleos vegetais também são realizados empregando co-solventes. Cocero e Calvo (1996) estudaram o efeito da adição de etanol, na concentração de até 20%, na extração com CO₂ supercrítico do óleo de semente de girassol (*Helianthus annuus*). As condições de pressão e temperaturas empregadas foram 150 a 350 bar e 42 a 80 °C. Os resultados indicaram que a solubilidade do óleo de girassol no CO₂ supercrítico aumentou com a adição de etanol como modificador. Alguns fosfolípidos foram co-extraídos com o óleo, em quantidade diretamente proporcional à concentração de etanol adicionada como co-solvente.

Os frutos de espécies de palmeiras nativas da região amazônica, pertencentes à família Arecaceae, representam uma fonte abundante de óleos vegetais de alto valor nutricional (Prado et al., 2010). O óleo da polpa e casca de buriti (*Mauritia flexuosa*) foi extraído com CO₂ supercrítico com pressões de 200 e 300 bar e temperaturas de 40 e 55 °C, onde obtiveram-se frações de óleo contendo carotenóides e tocoferóis (França et al., 1999). O óleo de pupunha (*Guilielma speciosa*) foi obtido por extração supercrítica das cascas e polpa dos frutos, onde se empregaram as condições de 250 bar e 50 °C e 300 bar e 35 °C. Em comparação ao óleo proveniente de extração com hexano, o óleo obtido por extração supercrítica apresentou menor conteúdo de ácidos graxos saturados (Araújo, 2000).

6. CONCLUSÃO

A extração com fluido supercrítico constitui uma técnica promissora para aplicação em processos de extração, uma vez que proporciona a obtenção de extratos de maior qualidade com um solvente não tóxico, a baixas temperaturas e sem resíduos de solventes orgânicos. Neste trabalho foi realizada uma pesquisa bibliográfica abordando os princípios da técnica de extração com fluido supercrítico e suas aplicações na obtenção de produtos naturais de origem vegetal de interesse para a indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos.

Ao final deste trabalho foi possível compreender como as variáveis do processo, temperatura e pressão, bem como o emprego de co-solventes, podem ser manipuladas de modo a realizar a extração seletiva dos principais grupos de produtos naturais, como compostos fenólicos, alcalóides, óleos voláteis e lipídeos, o que constitui uma importante vantagem desta técnica.

7. REFERÊNCIAS

Abbas, K.A.; Mohamed, A.; Abdulmir, A.S.; Abas, H.A. A review on supercritical fluid extraction as new analytical method. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, v. 4, p. 345-353, 2008.

Atkins, P.W. *Físico-Química – Fundamentos*, 3.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2003.

Atkins, P.W. *Físico-Química*, v. 1, 6.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 1999.

Araújo, M.E; Machado, N.T.; França, L.F.; Meireles, M.A.A. Supercritical extraction of pupunha (*Guilielma speciosa*) oil in a fixed bed using carbon dioxide. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 17, p. 297-306, 2000.

Azevedo, A.B.A.; Mazzafera, P.; Mohamed, R.S.; Vieira de Melo, S.A.B.; Kieckbusch, T.G. Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 25, p. 543-552, 2008.

Barros, F.C.M.; Silva, F.C.; Nunes, J.M.; Vargas, R.M.F.; Cassel, E.; von Poser, G.L. Supercritical extraction of phloroglucinol and benzophenone derivatives from *Hypericum carinatum*: quantification and mathematical modeling. II Encontro do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas UFRGS, Resumos do evento. *Caderno de Farmácia*, v. 26 (supl.), p. 74, 2010.

Bevan, C.D.; Marshall, P.S. The use of supercritical fluids in the isolation of natural products. *Natural Products Reports*, v. 11, p. 451-466, 1994.

Bhardwaj, L.; Sharma, P.K.; Visht, S.; Garg, V.K.; Kumar N. A review on methodology and application of supercritical fluid technology in pharmaceutical industry. *Der Pharmacia Sinica*, v. 1, p. 183-194, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, nº 12, 17 de janeiro de 2007, p. 41.

Bruneton, J. *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales*, 2.ed. Zaragoza: Acribia, 2001.

Brunner, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, v. 67, p. 21-33, 2005.

Cargnin, S.T., Nunes, J.M., Haas, J.S., Baladão, L.F., Cassel, E., Vargas, R.F., Rech, S.B., von Poser, G.L. Supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatographic determination of benzopyrans and phloroglucinol derivative in *Hypericum polyanthemum*. *Journal of Chromatography B*, v. 878, p. 83-87, 2010.

Carvalho Jr., R.N.; Moura, L.S.; Rosa, P.T.V.; Meireles, M.A.A. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 35, p. 197-204, 2005.

Carvalho, J.C.T.; Gosmann, G.; Schenkel, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org.). *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*, 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, p. 519-536, 2007.

Cassel, E.; Frizzo, C.D.; Vanderlinde, R.; Atti-Serafini, L.; Lorenzo, D.; Dellacassa, E. Extraction of *Baccharis* oil by supercritical CO₂. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 39, p. 4803-4805, 2000.

Cassel, E.; Vargas, R.M.F.; Bedinot, C. Unidad piloto de extracción supercrítica automatizada. In: Cassel, E.; Vargas, R.M.F. (Org.). *Aplicaciones Industriales de los Taninos Vegetales*. Porto Alegre: EDIPUCRS, v. 1, p. 95-102, 2007.

Cassel, E.; Vargas, R.M.F.; Brun, G.W. Processos de extração supercrítica aplicados a produtos naturais. In: Cassel, E.; Rocha, L.M. (Org.). *Fundamentos de Tecnologia de Productos Fitoterapéuticos*, 2.ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 213-228, 2008.

Cassel, E.; Vargas, R.M.F.; Brun, G.W.; Almeida, D.E.; Colgoi, L.; Ferraro, G.; Filip, R. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Journal of Food Engineering*, v. 100, p. 656-661, 2010.

Catchpole, O.J., Perry, N.B., da Silva, B.M.T., Grey, J.B., Smallfield, B.M. Supercritical extraction of herbs I: Saw Palmetto, St John's Wort, Kava Root, and Echinacea. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 22, p. 129-138, 2002.

Cavero, S.; Jaime, L.; Martín-Álvarez, P.J.; Señoráns, F.J.; Reglero, G.; Ibañez, E. In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *European Food Research and Technology*, v. 221, p. 478-486, 2005.

Choi, Y.H.; Kim, J.; Kim, Y.C.; Yoo, K.-P. Selective extraction of ephedrine from *Ephedra sinica* using mixtures of CO₂, diethylamine, and methanol. *Chromatographia*, v. 50, p. 673-679, 1999a.

Choi, Y.H.; Chin, Y.-W.; Kim, J.; Jeon, S.H.; Yoo, K.-P. Strategies for supercritical fluid extraction of hyoscyamine and scopolamine salts using basified modifiers. *Journal of Chromatography A*, v. 863, p. 47-55, 1999b.

Choi, Y.H.; Yoo, K.-P.; Kim, J. Supercritical fluid extraction and liquid chromatography-electrospray mass analysis of vinblastine from *Catharanthus roseus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 50, p. 1294-1296, 2002.

Cocero, M.J.; Calvo, L. Supercritical fluid extraction of sunflower seed oil with CO₂-ethanol mixtures. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 73, p. 1573-1578, 1996.

Cui, Y.; Ang, C.Y.W. Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatographic determination of phloroglucinols in St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 2755-2759, 2002.

Del Valle, J.M.; Aguilera, J.M. High pressure CO₂ extraction: fundamentals and applications in the food industry. *Food Science and Technology International*, v. 5, p. 1-24, 1999.

Díaz-Reinoso, B.; Moure, A.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 2441-2469, 2006.

Dimitrieska-Stojkovic, E.; Zdravkovski, Z. Supercritical-fluid extraction of quercetin and rutin from *Hyperici herba*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 26, p. 2517-2533, 2003.

Ellington, E.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. Supercritical carbon dioxide extraction of colchicine and related alkaloids from seeds of *Colchicum autumnale* L. *Phytochemical Analysis*, v. 14, p. 164-169, 2003.

Falkenberg, M.B.; Santos, R.I.; Simões, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org.). *Farmacognosia: Da Planta Ao Medicamento*, 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 229-245, 2007.

Fiori, L. Grape seed oil supercritical extraction kinetic and solubility data: critical approach and modeling. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 43, p. 43-54, 2007.

França, L.F.; Reber, G.; Meireles, M.A.A.; Machado, N.T.; Brunner, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 14, p. 247-256, 1999.

Glisic, S., Smelcerovic, A., Zuehlke, S., Spitteller, M., Skala, D. Extraction of hyperforin and adhyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 45, p. 332-337, 2008.

Hamburger, M.; Baumann, D.; Adler, S. Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants - effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances. *Phytochemical Analysis*, v. 15, p. 46-54, 2004.

Hasegawa, S.; Berhow, M.A.; Manner, G.D. Citrus limonoids research: An overview. In: Berhow, M.A.; Hasegawa, S.; Manner, G.D. (Ed.). *Citrus limonoids: Functional chemicals in agriculture and foods. ACS Symposium Series*, v. 758, p. 1-8, 2000.

Heinrich, M.; Barnes, J.; Gibbons, S; Williamson, E.M. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2004.

Herrero, M.; Mendiola, J.A.; Cifuentes, A.; Ibáñez, E. Supercritical fluid extraction: recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 2495-2511, 2010.

Jacques, R.A. Caracterização química da erva-mate (*Ilex paraguariensis*): aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

Jarvis, A.P.; Morgan, E.D. Isolation of plant products by supercritical-fluid extraction. *Phytochemical analysis*, v. 8, p. 217-222, 1997.

Jiang, Y.; Wu, N.; Fu, Y.-J.; Wang, W.; Luo, M.; Zhao, C.-J.; Zu, Y.-G.; Liu, X.-L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 32, p. 63-68, 2011.

Kim, J.; Choi, Y.M.; Yoo, K.-P. Supercritical fluid extraction of alkaloids. In: Pelletier, S.W. (Ed.). *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. Pergamon Press: Amsterdam, v. 15, p. 415-431, 2001.

Kopcak, U., Mohamed, R.S. Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-solvent mixtures. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 34, p. 209-214, 2005.

Lang, Q.; Wai, C.M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a practical review. *Talanta*, v. 53, p. 771-782, 2001.

Lide, D.R. (Ed.). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 78.ed. Boca Raton: CRC Press, 1997.

Ling, J.Y.; Zhang, G.Y.; Cui, Z.J.; Zhang, C.K. Supercritical fluid extraction of quinolizidine alkaloids from *Sophora flavescens* Ait. and purification by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1145, p. 123-127, 2007.

Lopez-Avila, V.; Benedicto, J.; Robaugh, D. Supercritical fluid extraction of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. *Journal of High Resolution Chromatography*, v. 20, p. 231-236, 1997.

Luque de Castro, M.D.; Jurado-López, A.; Luque-Garcia, J.L. Drug extraction. In: York, P.; Kompella, U.B.; Shekunov, B.Y. *Supercritical Fluid Technology for Drug Product Development*. New York: Marcel Dekker, p. 498-531, 2004.

Manners, G.D. Citrus limonoids: analysis, bioactivity, and biomedical prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 8285-8294, 2007.

Marongiu, B.; Porcedda, S.; Della Porta, G.; Reverchon, E. Extraction and isolation of *Salvia desoleana* and *Mentha spicata* subsp. *insularis* essential oils by supercritical CO₂. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 16, p. 384-388, 2001.

Maróstica Júnior, M.R.; Leite, A.V.; Dragano, N.R.V. Supercritical fluid extraction and stabilization of phenolic compounds from natural sources - review. *Open Chemical Engineering Journal*, v. 4, p. 51-60, 2010.

Marrone, C.; Poletto, M.; Reverchon, E; Stassi A. Almond oil extraction by supercritical CO₂: experiments and modeling. *Chemical Engineering Science*, v. 53, p. 3711-3718, 1998.

Maul, A.A.; Wasicky, R.; Bacchi, E.M. Extração por fluido supercrítico. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 5, p. 185-200, 1996.

Medina, M.A.; Martínez-Poveda, B.; Amores-Sánchez, M.I.; Quesada A.R. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sciences*, v. 79, p. 105-111, 2006.

Meireles, M.A.A. Extraction and purification of bioactive compounds. In: Meireles, M.A.A (Ed.). *Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications*. Boca Raton: CRC Press, p. 1-8, 2009.

Mennini, T.; Gobbi, M. The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. *Life Sciences*, v. 75, p. 1021-1027, 2004.

Mezzomo, N.; Martínez, J.; Ferreira, S.R.S. Economical viability of SFE from peach almond, spearmint and marigold. *Journal of Food Engineering*, v. 103, p. 473-479, 2011.

Molero Gómez, A.; Pereyra López, C.; Martínez de la Ossa, E. Recovery of grape seed oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, v. 61, p. 227- 231, 1996.

Moyna, P.; Heinzen, H. Lípidos: química y productos naturales que los contienen. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org). *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*, 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 435-466, 2007.

Mukhopadhyay, M. *Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide*. Boca Raton: CRC Press, 2000.

Murga, R.; Ruiz, R.; Beltrán, S.; Cabezas, J.L. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 3408-3412, 2000.

Netz, P.A.; Ortega, G.G. *Fundamentos de Físico-Química: Uma Abordagem Conceitual para as Ciências Farmacêuticas*. Porto Alegre: Artmed, 2002.

Oszagyh, M.; Simhdi, B.; Sawinsky, J. Supercritical fluid extraction of volatile compounds from lavender and thyme. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 11, p. 157-165, 1996.

Palma, M.; Taylor, L.T. Fractional extraction of compounds from grape seeds by supercritical fluid extraction and analysis for antimicrobial and agrochemical activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 5044-5048, 1999.

Pelletier, S.W. The nature and definition of an alkaloid. In: Pelletier, S.W. (Ed.). *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. New York: John Wiley & Sons Inc., v. 1, p. 1-31, 1983.

Pereira, C.G.; Marques, M.O.M.; Barreto, A.; Siani, A.C.; Fernandes, E.C.; Meireles, M.A.A. Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO₂ + ethanol: an evaluation of raw material origin and process variables. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 30, p. 51-61, 2004.

Pereira; C.G., Meireles; M.A.A. Economic analysis of rosemary, fennel and anise essential oils obtained by supercritical fluid extraction. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 22, p. 407-413, 2007.

Pereira, C.G.; Meireles, M.A.A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, v. 3, p. 340-372, 2010.

Pourmortazavi, S.M.; Hajimirsadeghi, S.S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1163, p. 2-24, 2007.

Prado, J.M.; Assis, A.R.; Maróstica Júnior, M.R.; Meireles, M.A.A. Manufacturing cost of supercritical-extracted oils and carotenoids from amazonian plants. *Journal of Food Process Engineering*, v. 33, p. 348-369, 2010.

Ramalakshmi, K.; Raghavan, B. Caffeine in coffee: its removal. Why and how? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 39, p. 441-456, 1999.

Raskin, I.; Ribnicky, D.M.; Komarnytsky, S.; Ilic, N.; Poulev, A.; Borisjuk, N.; Brinker, A.; Moreno, D.A.; Ripoll, C.; Yakoby, N.; O'Neal, J.M.; Cornwell, T.; Pastor, I.; Fridlender, B. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology*, v. 20, p. 522-531, 2002.

Rates, S.M.K. Metilxantinas. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org.). *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*, 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, p. 885-901, 2007.

Reverchon, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 10, p. 1-37, 1997.

Reverchon, E.; Daghero, J.; Marrone, C.; Mattea, M.; Poletto, M. Supercritical fractional extraction of fennel seed oil and essential oil: Experiments and mathematical modeling. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 38, p. 3069-3075, 1999.

Reverchon, E.; De Marco, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 38, p. 146-166, 2006.

Reverchon, E.; Marrone, C. Supercritical extraction of clove bud essential oil: isolation and mathematical modeling. *Chemical Engineering Science*, v. 52, p. 3421-3428, 1997.

Reverchon, E.; Taddeo, R. Extraction of sage oil by supercritical CO₂: influence of some process parameters. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 58, p. 302-309, 1999.

Römpp, H.; Seger, C.; Kaiser, C.S.; Haslinger, E.; Schmidt, P.C. Enrichment of hyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) by pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 21, p. 443-451, 2004.

Rosa, P.T.V.; Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Moure, A.; Díaz-Reinoso, B.; Smith Jr., R.L.; Toyomizu, M.; Florusse, L.J.; Peters, C.J.; Goto, M.; Lucas, S.; Meireles, M.A.A. Supercritical and pressurized fluid extraction applied to the food industry. In: Meireles, M.A.A. (Ed.). *Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications*. Boca Raton: CRC Press, p. 269-401, 2009.

Sahena, F.; Zaidul, I.S.M.; Jinap, S.; Karim, A.A.; Abbas, K.A.; Norulaini, N.A.N.; Omar A.K.M. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction - a review. *Journal of Food Engineering*, v. 95, p. 240-253, 2009.

Saldaña, M.D.A.; Mohamed, R.S.; Baer, M.G.; Mazzafera, P. Extraction of purine alkaloids from mate (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 3804-3808, 1999.

Saldaña, M.D.A.; Zetzi, C.; Mohamed, R.S.; Brunner, G. Extraction of methylxanthines from guaraná seeds, maté leaves, and cocoa beans using supercritical carbon dioxide and ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, v. 17, p. 4820-4826, 2002.

Scalia, S.; Giuffreda, L.; Pallado, P. Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 21, p. 549-558, 1999.

Schmidt, B.; Ribnicky, D.M.; Poulev, A.; Logendra, S.; Cefalu, W.T.; Raskin I. A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 57, S3-S9, 2008.

Simões, C.M.O.; Spitzer, V. Óleos Voláteis. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org.). *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*, 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, p. 467-498, 2007.

Sinko, P.J. *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences*, 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

Smith, R.M. Supercritical fluids in separation science – the dreams, the reality and the future. *Journal of Chromatography A*, v. 856, p. 83-115, 1999.

Sonaglio, D.; Ortega, G.G.; Petrovick, P.R. ; Bassani, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org). *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*, 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 289-326, 2007.

Spranger, I.; Sun, B.; Mateus, A.M.; de Freitas, V.; Ricardo-da-Silva, J.M. Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chemistry*, v. 108, p. 519-532, 2008.

Stalikas, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

Starmans, D.A.J.; Nijhuis, H.H. Extraction of secondary metabolites from plant material: a review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 7, p. 191-197, 1996.

Taylor, L.T. *Supercritical Fluid Extraction*. New York: John Wiley & Sons Inc., 1996.

Yilmaz, E.E.; Özvural, E.B.; Vural, H. Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis vinifera*) using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 55, p. 924-928, 2011.

Yu, J.; Dandekar, D.V.; Toledo, R.T.; Singh, R.K.; Patil, B.S. Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) seeds. *Food Chemistry*, v. 105, p. 1026-1031, 2007.

Yu, J.; Dandekar, D.V.; Toledo, R.T.; Singh, R.K.; Patil, B.S. Supercritical fluid extraction of limonoid glucosides from grapefruit molasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 6041-6045, 2006.

Zhao, J. Nutraceuticals, nutritional therapy, phytonutrients, and phytotherapy for improvement of human health: a perspective on plant biotechnology application. *Recent patents on biotechnology*, v. 1, p. 75-97, 2007.