

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO DE *STEVIA REBAUDIANA*
BERTONI ATRAVÉS DE MEMBRANAS MICROPOROSAS

Silvânia Regina Mendes Moreschi

Eng^a Química, UEM, 1984

Orientador: Prof^a Dr^a Rosângela Bergamasco

Co-orientador: Prof. Dr. Makoto Matsushita

Dissertação de Mestrado
submetida à Universidade Estadual
de Maringá, como parte dos
requisitos necessários à obtenção
do Grau de Mestre em Engenharia
Química, área de Desenvolvimento
de Processos.

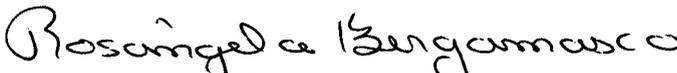
Maringá – PR – Brasil

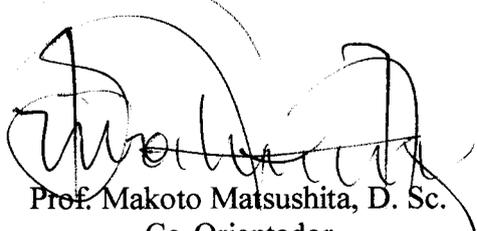
Agosto de 1999

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PRIGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

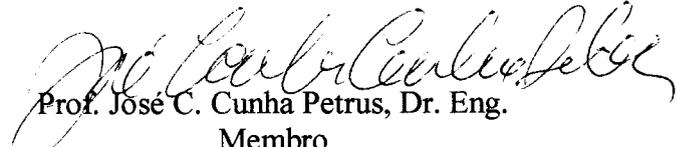
Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por Silvânia Regina Mendes Moreschi perante a Comissão Julgadora de Mestrado em Engenharia Química em 20 de agosto de 1999.

COMISSÃO JULGADORA


Profª Rosângela Bergamasco, Dr. Eng.
Orientador


Prof. Makoto Matsushita, D. Sc.
Co-Orientador


Profª Elisabete Scolin Mendes, Dr. Eng.
Membro


Prof. José C. Cunha Petrus, Dr. Eng.
Membro

MORESCHI, SILVÂNIA REGINA MENDES

Purificação e Concentração do Extrato de

Stevia rebaudiana Bertoni através

de Membranas Microporosas Paraná 1999

XX, 127 p. 29,7 cm (PEQ/UEM, M.Sc., Engenharia

Química, 1999)

Dissertação - Universidade Estadual de Maringá - PEQ

1. Esteviosídeo/Membranas

I. PEQ/UEM II. Título (série)

Esta tese é dedicada:

Aos meus pais Alice e Francisco, que com muita dedicação e amor, permitiram que eu chegasse até aqui.

Ao meu querido esposo, Eddie
Que sempre esteve ao meu lado.

Aos meus filhos Vítor e Bianca que sentiram a minha ausência e, muitas vezes, falta de paciência.

A Vocês, o meu amor e agradecimento!

AGRADECIMENTOS

À Deus

À prof. Dr^a Rosângela Bergamasco, pela orientação deste trabalho, e pelo incentivo recebido.

Ao Prof. Dr. Makoto Matsushita, pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Marcelino Luis Gimenes, pela colaboração e atenção.

Ao Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus, pela colaboração e atenção

À Steviafarma, pela doação das folhas de estévia, e pela colaboração.

Ao Eng^o Químico Airton Goto, pela colaboração e atenção.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Olivo, pelo seu incentivo e amizade.

Ao Químico Edson Marques dos Reis, pela sua grande ajuda e amizade.

Ao Eng^o Químico Lauro Mitsuaki Kambara, pela colaboração e ajuda.

Às alunas do Curso de Engenharia Química, Míria e Angélica, pela grande colaboração.

À todos os amigos do Mestrado, que sempre me ajudaram no que eu precisei.

Aos professores e funcionários do PEQ e DEQ.

À CAPES, CNPq, PADCT pelo apoio financeiro.

À todos, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Obrigada !

**PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO *DE STEVIA*
REBAUDIANA BERTONI ATRAVÉS DE MEMBRANAS
MICROPOROSAS**

AUTOR: SILVÂNIA REGINA MENDES MORESCHI

ORIENTADOR: PROF^a DR^a ROSÂNGELA BERGAMASCO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MAKOTO MATSUSHITA

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química;

Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, Bl. E46 - 09;

CEP: 87020-900 - Maringá – PR, Brasil, defendida em 20 de agosto de 1999, 127 p.

RESUMO

Neste trabalho foi investigada a utilização dos processos de separação com membranas, ultrafiltração (UF) e diafiltração (DF), para a purificação e concentração do extrato das folhas da *Stevia rebaudiana* Bertoni. Os testes foram efetuadas, à temperatura ambiente, num módulo de filtração tangencial (“cross-flow”).

Foram testadas três diferentes pontos de corte de membrana: 10.000 Daltons (acetato de celulose), 30.000 Daltons (polissulfona) e 100.000 Daltons (polissulfona). Para as membranas de pontos de corte 10.000 e 30.000 Daltons testou-se as pressões de entrada de 8, 10 e 12 Psi e para a membrana de ponto de corte 100.000 Daltons foi testada a pressão de entrada de 8 Psi.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: fluxo permeado, teor de pureza, percentagem de retirada de cor e de turbidez, do extrato cru e dos permeados/retentados.

Os valores iniciais de fluxo permeado foram proporcionais à abertura da membrana, sendo que a membrana de 10.000 Daltons foi a que apresentou um comportamento mais estável de fluxo permeado ao longo do tempo de filtração.

De um modo geral, os melhores resultados de pureza e retirada efetiva de turbidez foram obtidos com a membrana de 30.000 Daltons à 10 Psi, enquanto que a melhor remoção de cor foi obtida com a membrana de 10.000 Daltons à 8 Psi.

A diafiltração foi realizada com a membrana 30.000 Daltons, à 10 Psi, e fez com que os valores de pureza em torno de 34% (UF) se elevassem para valores próximos à 55% (DF).

**PURIFICATION AND CONCENTRATION OF *STEVIA REBAUDIANA*
BERTONI BY MICROPOROUS MEMBRANES**

AUTHOR: SILVÂNIA REGINA MENDES MORESCHI

SUPERVISOR: DR. ROSÂNGELA BERGAMASCO

CO-SUPERVISOR: DR. MAKOTO MATSUSHITA

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; State University of Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46-09; ZIP CODE: 87020-900-Maringá-PR, Brazil, presented on 20th August , 1999. 127 p.

ABSTRACT

In this work it was investigated the use of membrane separation processes, ultrafiltration (UF) and diafiltration (DF), to purify and concentrate extract of *Stevia Rebaudiana* Bertoni leaves. Experiments were carried out in a cross-flow filtration equipment under ambient temperature.

It was used three different membrane cut-offs: 10,000 Daltons (cellulose acetate), 30,000 Daltons (polysulphone) and 100,000 Daltons (polysulphone). The first and the second membranes were tested under 8, 10 and 12 Psi inlet pressure and that of 100,000 Daltons was tested under 8 Psi inlet pressure.

The following parameters were evaluated: permeate flux, purity and percentage of colour and turbidity removals of crude extract, permeate and retentate.

Initial values of permeate flux were proportional to the membrane aperture (cut-off). The 10,000 Daltons cut-off membrane presented a more stable flux along the filtration time than the two other membranes.

The best results of purity and effective turbidity removals were obtained with the membrane of 30,000 Daltons under 10 Psi, while best results of colour removal were obtained with 10,000 Daltons membrane under 8 Psi.

Diafiltration was carried out with the 30,000 Daltons membrane under 10 Psi. This has made it possible to increase the purity from 34% (in the Ultrafiltration) to values around 55%.

ÍNDICE DO TEXTO

1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Adoçantes.....	3
2.1.1 Os glicóforos.....	4
2.1.2 Adoçantes Naturais.....	5
2.1.2.1 Adoçantes Calóricos (Nutritivos).....	6
2.1.2.2 Adoçantes Naturais Não Calóricos.....	7
2.1.3 Adoçantes Artificiais ou Sintéticos (Não Calóricos).....	8
2.2 <i>Stevia rebaudiana</i> (Bert.) Bertoni.....	9
2.2.1.Natureza Química do Princípio Edulcorante da <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	13
2.2.1.1 Carboidratos.....	13
2.2.1.2 Glicosídeos.....	14
2.2.1.2.1 Os Glicosídeos da <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	15
2.2.2 Características Toxicológicas da <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	17
2.2.3 Caracterização Química dos Princípios Adoçantes.....	18
2.2.4 Processos Analíticos para Determinação dos Princípios Adoçantes.....	23
2.2.4.1 Quantificação por Extração Exaustiva.....	23
2.2.4.2 Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	24
2.2.4.3 Cromatografia Gás-Líquido (GLC).....	25
2.2.4.4 Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAP ou HPLC).....	25
2.2.4.5 Métodos Colorimétricos.....	29
2.2.4.6 Métodos Enzimáticos.....	29

2.2.4.7 Método de Espectrometria de Reflectância no Infravermelho Próximo (ERIP).....	29
2.2.5 Processos de Extração dos Princípios Adoçantes.....	30
2.2.6 Processos de Purificação dos Princípios Adoçantes.....	33
2.3 Processos de Separação com Membranas (PSM).....	37
2.3.1 Membranas.....	38
2.3.2 Morfologia de Membranas, Força Motriz e Transporte.....	40
2.3.3 Materiais.....	41
2.3.4 Caracterização de Membranas.....	42
2.3.5 Fenômenos Envolvidos nos Processos de Separação com Membranas – PSM....	43
2.3.6 Processos cuja Força Motriz é o Gradiente de Pressão.....	46
2.3.7 Filtração Convencional e em Fluxo Cruzado.....	48
2.3.8 Ultrafiltração	49
2.3.9 Diafiltração.....	54
2.3.10 Parâmetros Operacionais dos Processos com Membranas.....	55
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1 Matéria Prima.....	57
3.2 Preparo do Extrato das Folhas da <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	57
3.3 Membranas.....	57
3.4 Módulo de Filtração.....	58
3.5 Determinação das Pressões de Operação.....	60
3.6 Métodos de Quantificação dos Adoçantes da <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	61
3.6.1 Cromatografia de Papel.....	61
3.6.2 Cromatografia de Camada Delgada.....	61
3.6.3 Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAP).....	62
3.7 Análises.....	64

3.7.1 Teor de Adoçantes.....	64
3.7.2 Sólidos Totais.....	64
3.7.3 Pureza.....	64
3.7.4 Despigmentação.....	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1 Quantificação dos Adoçantes do Extrato de Estévia.....	67
4.2 Ultrafiltração Tangencial.....	67
4.2.1 Determinação das Pressões de Operação.....	67
4.2.2 Comparação entre as Pressões Utilizadas.....	69
4.2.3 Comparação entre as Diferentes Membranas Utilizadas.....	83
4.2.6 Diafiltração (DF).....	91
5. CONCLUSÕES.....	93
6. SUGESTÕES.....	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
8. ANEXOS.....	114
8.1 ANEXO I - Metodologia de Quantificação dos Adoçantes da <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni por Cromatografia de Papel.....	114
8.1.1 Cromatografia de Papel.....	114
8.2 ANEXO II - Limpeza das Membranas.....	116
8.3 ANEXO III - Curvas Padrão.....	117
8.4 ANEXO IV - Curvas de Concentração de Adoçantes e Teor de Sólidos Totais.....	118
8.5 ANEXO V - Análise das Resistências ao Fluxo Permeado Envolvidas no Processo de UF.....	123
8.6 ANEXO VI – Cromatogramas.....	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Conformação Química do Gosto Doce e Não Doce (ALVAREZ,1984).....	5
Figura 2.2 - Esquema de Transformação de Hemiacetais em Cetais (ALLINGER, 1978).....	14
Figura 2.3 - Estrutura Química dos Glicosídeos da <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni(CRAMMER, 1984).....	21
Figura 2.4 - Representação Esquemática de Duas Fases Separadas por uma Membrana (MULDER, 1990).....	39
Figura 2.5 - Representação dos Diferentes Tipos de Resistências ao Transporte de Massa em Processos com Membranas (NÓBREGA et al, 1997).....	45
Figura 2.6 - Principais Características dos Processos que Utilizam Diferença de Pressão como Força Motriz (NÓBREGA et al, 1997).....	47
Figura 2.7 - Faixa de Diâmetro de Poros das Membranas de MF, UF, NF e OI (NÓBREGA et al, 1997).....	48
Figura 2.8 - Filtração Convencional (“Dead-End”) x Filtração Tangencial ou em Fluxo Cruzado (NÓBREGA et al, 1997).....	49
Figura 2.9 - Características de Curvas de Corte Estreita e Espalhada – UF (NÓBREGA et al, 1997).....	51
Figura 2.10 - Operação de Sistemas com Membranas – Diafiltração (NÓBREGA et al, 1997).....	55
Figura 3.1 - Esquema Geral da Instalação Experimental para a Filtração Tangencial e Detalhe da Bomba Peristáltica e Módulo de membranas (MILLIPORE, 1995).....	58
Figura 4.1 - Representação das Curvas de Pressão Transmembrana para as Membranas de Ponto de Corte de 10.000, 30.000 e 100.000 Daltons no Módulo de Filtração Tangencial Operando em Sistema Batelada.....	68

Figura 4.2 - Fluxo de Água e de Extrato na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons, em Relação ao tempo de Filtração, na Pressão de Entrada de 8 Psi (PT = 6,6).....	69
Figura 4.3 - Fluxo de Água e de Extrato na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons, em Relação ao Tempo de Filtração, na Pressão de Entrada de 10 Psi (PT = 8,7 Psi).....	70
Figura 4.4 - Fluxo de Água e de Extrato na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons, em Relação ao Tempo de Filtração, na Pressão de Entrada de 12 Psi (PT = 10,8 Psi).....	70
Figura 4.5 - Fluxo Permeado do Extrato na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons, em Função da Taxa de Concentração de Volume, nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi	71
Figura 4.6 - Pureza do Permeado da Membrana de Ponto de Corte 10.000 Daltons em Relação à Taxa de Concentração de Volume nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi - Pureza do extrato Cru = 24,2% (8 Psi); 23% (10 Psi) e 26,5% (12 Psi).....	72
Figura 4.7 -Retirada de Cor no Permeado da Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons em relação a Taxa de Concentração de Volume nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi.....	73
Figura 4.8 - Retirada de Turbidez no Permeado da Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons em relação a Taxa de Concentração de Volume nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi.....	73
Figura 4.9 - Fluxo de Água e de Extrato na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons, em Relação ao Tempo de Filtração, na Pressão de Entrada de 8 Psi (PT = 6,7).....	75
Figura 4.10 - Fluxo de Água e de Permeado na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons, em Relação ao tempo de Filtração, na Pressão de Entrada de 10 Psi (PT = 8,7 Psi).....	75
Figura 4.11 - Fluxo de Água e de Permeado na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons, em Relação ao tempo de Filtração, Numa Pressão de Entrada de 12 Psi (PT = 11 Psi).....	76

Figura 4.12 - Fluxo Permeado na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons, em Função da Taxa de Concentração de Volume, nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi	77
Figura 4.13 - Pureza do Permeado da Membrana de Ponto de Corte 30.000 Daltons em Relação a Taxa de Concentração de Volume nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi.....	78
Figura 4.14 - Remoção de Cor no Permeado da Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons em relação a Taxa de Concentração de Volume nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi.....	79
Figura 4.15 - Remoção de Turbidez no Permeado da Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons em relação a Taxa de Concentração de Volume nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi.....	79
Figura 4.16 - Fluxo de Água e de Extrato na Membrana de Ponto de Corte de 100.000 Daltons, em Relação ao tempo de Filtração, na Pressão de Entrada de 8 Psi (PT = 7,5).....	81
Figura 4.17 - Fluxo Permeado na Membrana de Ponto de Corte de 100.000 Daltons, em Relação à Taxa de Concentração de Volume, Numa Pressão de Entrada de 8 Psi (PT = 7,5 Psi).....	81
Figura 4.18 - Pureza do Permeado da Membrana de Ponto de Corte 100.000 Daltons em Relação a Taxa de Concentração de Volume nas Pressões de Entrada de 8 Psi (PT = 7,5 Psi).....	82
Figura 4.19 - Remoção de Cor e Turbidez no Permeado da Membrana de Ponto de Corte de 100.000 Daltons em relação a Taxa de Concentração de Volume na Pressão de Entrada de 8 Psi (PT = 7,5 Psi).....	83
Figura 4.20 - Fluxo Permeado de Extrato de Estévia nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000, 30.000 e 100.000 Daltons, a 8 Psi.....	84
Figura 4.21 - Pureza do Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000, 30.000 e 100.000 Daltons, a 8 Psi.....	85
Figura 4.22 - Retirada de Cor no Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000, 30.000 e 100.000 Daltons, a 8 Psi.....	85

Figura 4.23 - Retirada de Turbidez no Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000, 30.000 e 100.000 Daltons, a 8 Psi.....	86
Figura 4.24 - Fluxo Permeado de Extrato de Estévia nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, a 10 Psi.....	87
Figura 4.25 - Fluxo Permeado de Extrato de Estévia nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, a 12 Psi.....	87
Figura 4.26 - Pureza do Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, a 10 Psi.....	88
Figura 4.27 - Pureza do Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, a 12 Psi.....	88
Figura 4.28 - Retirada de Cor no Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, a 10 Psi.....	89
Figura 4.29 - Retirada de Cor no Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, a 12 Psi.....	89
Figura 4.30 - Retirada de Turbidez no Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, a 10 Psi.....	90
Figura 4.31 - Retirada de Turbidez no Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, a 12 Psi.....	90
Figura 4.32 - Fluxo Permeado durante o Processo de UF e DF com a Membrana de Ponto de Corte 30.000 Daltons, a 10 Psi (Pressão de Entrada).....	91
Figura 4.33 - Pureza do Permeado no Processo de UF/DF com a Membrana de Ponto de Corte 30.000 Daltons à 10 Psi.....	92
Figura 8.3.1 - Curva Padrão de Adoçantes -Esteviosídeo (St) e Rebaudiosídeo A (Rb A).....	118
Figura 8.3.2 - Curva Padrão de Absorbância Ótica a 420 nm e a 670 nm.....	118
Figura 8.4.1 - Concentração de Adoçantes ($\mu\text{g}/\text{mL}$) no Permeado e no Retentado em Função da Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons à 8 Psi (PT = 6,6 Psi) - (Extrato Cru – St - 2603 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Rb A - 1564 $\mu\text{g}/\text{mL}$).....	119

- Figura 8.4.2 - Concentração de Adoçantes ($\mu\text{g/mL}$) no Permeado e no Retentado em Função Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons à 10 Psi (PT = 8,7 Psi) - (Extrato Cru – St - 2342 $\mu\text{g/mL}$; Rb A - 1561 $\mu\text{g/mL}$).....119
- Figura 8.4.3 - Concentração de Adoçantes ($\mu\text{g/mL}$) no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons à 12 Psi (PT = 10,8 Psi) - (Extrato Cru – St – 2730,7 $\mu\text{g/mL}$; Rb A - 1506 $\mu\text{g/mL}$).....119
- Figura 8.4.4 - Percentagem de Sólidos Totais no Permeado e no Retentado em Função da Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons à 8 Psi (PT = 6,6 Psi) - (Sólidos Totais Extrato Cru = 1,72%).....120
- Figura 8.4.5 - Percentagem de Sólidos Totais no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons à 10 Psi (PT = 8,7 Psi) - (Sólidos Totais Extrato Cru = 1,70%).....120
- Figura 8.4.6 - Percentagem de Sólidos Totais no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons à 12 Psi (PT = 10,8 Psi) - (Sólidos Totais Extrato Cru = 1,60%).....120
- Figura 8.4.7 - Concentração de Adoçantes ($\mu\text{g/mL}$) no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons à 8 Psi (PT = 6,7 Psi) – (Cru – St = 2076 $\mu\text{g/mL}$ e Rb A = 1487 $\mu\text{g/mL}$).....121
- Figura 8.4.8 - Concentração de Adoçantes ($\mu\text{g/mL}$) no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons à 10 Psi (PT = 8,7 Psi) - (Cru – St = 2990 $\mu\text{g/mL}$ e Rb A = 1712 $\mu\text{g/mL}$).....121
- Figura 8.4.9 - Concentração de Adoçantes ($\mu\text{g/mL}$) no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons à 12 Psi (PT = 11 Psi) - (Cru – St = 2076 $\mu\text{g/mL}$ e Rb A = 1487 $\mu\text{g/mL}$).....121

- Figura 8.4.10 - Percentagem de Sólidos Totais no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons à 8 Psi (PT = 6,7 Psi) – (Sólidos Totais no Extrato Cru = 1,51%).....122
- Figura 8.4.11 - Percentagem de Sólidos Totais no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons à 10 Psi (PT = 8,7 Psi) - (Sólidos Totais no Extrato Cru = 1,70%).....122
- Figura 8.4.12 - Percentagem de Sólidos Totais no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons à 12 Psi (PT = 11 Psi) - (Sólidos Totais no Extrato Cru = 1,50%).....122
- Figura 8.4.13 - Concentração de Adoçantes ($\mu\text{g/mL}$) no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 100.000 Daltons à 8 Psi (PT = 7,5 Psi) – (Cru – St = 2342 $\mu\text{g/mL}$ e Rb A = 1553 $\mu\text{g/mL}$).....123
- Figura 8.4.14 - Percentagem de Sólidos Totais no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 100.000 Daltons à 8 Psi (PT = 7,5 Psi) – (Sólidos Totais no Extrato Cru = 1,43%).....123

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Dulçor Relativo dos Açúcares (ALVAREZ,1984).....	6
Tabela 2.2 - Edulcorantes Naturais Não Calóricos (ALVAREZ,1984).....	7
Tabela 2.3 - Propriedades Comparativas de Esteviosídeo e Rebaudiosídeos (CRAMMER, 1987).....	31
Tabela.2.4 - Dimensões Aparentes de Pequenas Partículas Moléculas e Íons (NÓBREGA, 1997).....	43
Tabela 8.5.1 - Resistências ao Fluxo Permeado das Membranas de Ponto de Corte 10.000, 30.000 e 100.000 Daltons.....	124

1. INTRODUÇÃO

As primeiras notícias da estévia para o mundo se deu através dos conquistadores da América do Sul para a Espanha através de relatos em documentos informativos. Tais documentos davam notícia de que a planta era conhecida dos indígenas desde tempos remotos e que eles a usavam para adoçar bebidas medicamentosas e especialmente para adoçar o mate cozido (ALVAREZ, 1984). Somente em 1887 o Kaá-Hê-ê, nome indígena da estévia, teve uma abordagem científica dada pelo Naturalista Moisés S. Bertoni, suíço de nascimento e radicado no Paraguai, que a descobriu durante suas excursões de estudos pelas extensas florestas do Paraguai Oriental. Bertoni teve as primeiras notícias através de ervateiros do Norte e índios de Mondaih, que a conheciam das regiões próximas da cordilheira do Amambay que faz fronteira com o Brasil.

No começo do século, também no Brasil, a estévia teve destaque científico e tecnológico. A planta tinha ampla distribuição nativa no território brasileiro, talvez uma área maior do que no próprio Paraguai, sendo encontrada nos estados do sul e sudeste: Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Dos estudos que partiram da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Sul do Brasil, originou um projeto industrial financiado pelo Banco do Brasil, e administrado por um consórcio de empresas, hoje intitulado Steviafarma Industrial S.A., a única empresa produtora do adoçante no Brasil.

As folhas de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Compositae), contém uma mistura complexa de diterpenos labdanos, triterpenos, stigmasterol, taninos, óleos voláteis e oito glicosídeos diterpenos adoçantes (CRAMMER, 1987), sendo estes adoçantes não nutritivos, estáveis à luz (SASAKI, 1983), calor e pH (ABE e SONO, 1977). Estes adoçantes são 40-250 vezes mais doces que a sacarose. Devido à estas características estes adoçantes estão sendo muito utilizados em bebidas e produtos alimentícios. O consumo de esteviosídeo no Japão já é maior que 40% do total dos adoçantes de baixa caloria consumidos no país, e o interesse pelo esteviosídeo está aumentando em outras regiões do mundo.

O esteviosídeo encontra-se nas folhas da estévia numa proporção de 5-10 % do peso seco e o rebaudiosídeo A numa proporção de 3-6 % de peso seco nas folhas. Os outros constituintes estão presentes em mínimas quantidades, portanto, neste trabalho, a

quantificação dos adoçantes do extrato de estévia foi feita somente em relação aos dois maiores constituintes: esteviosídeo e rebaudiosídeo A.

A extração desses adoçantes das folhas da estévia é normalmente efetuada com água quente (50–70°C),(IGOSHI e KATO, 1976). O extrato cru resultante, entretanto, tem um sabor residual amargo, “foul-smelling”, e cor marrom escuro, resultado da presença de partículas coloidais, pigmentos foliares, polissacarídios solúveis e outras impurezas, necessitando assim de uma purificação subsequente para que se apresente comercialmente aceitável.

A purificação pode ser feita com solventes orgânicos, sais inorgânicos, íons metálicos, troca iônica, eletrólise, polieletrólitos e outros processos onde se consomem muito tempo e trabalho (ALVAREZ, 1984).

Os processos de purificação com membranas, que separam componentes de uma solução baseado nos diferentes pesos moleculares, de ultrafiltração e osmose reversa reduzem, substancialmente, os níveis de impurezas (pigmentos foliares complexos) e os volumes a serem manipulados, dando, provavelmente, uma economicidade bastante grande aos processos de purificação.

Na literatura, o número de informações sobre o comportamento do extrato de estévia, processado por tecnologia de membrana, é bastante reduzido, visto que toda a tecnologia desenvolvida até hoje visa interesse comercial, e consta como patentes, principalmente japonesas, as quais são de difícil obtenção, além do que pode se dizer que a tecnologia de membranas é um processo relativamente novo. Sendo assim, este se constitui num vasto campo a ser pesquisado.

Com base no exposto, este trabalho teve como objetivo geral estudar a utilização do processo de ultrafiltração para purificação e concentração do extrato de estévia. Os principais objetivos foram:

- (i) Estudar o efeito do ponto de corte da membrana no processo de purificação.
- (ii) Verificar a influência da pressão transmembrana no desenvolvimento do processo.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Adoçantes

O gosto doce é uma qualidade de algumas substâncias que a raça humana tem associado com o sentimento de prazer e é preferido pela maioria das pessoas. O mel e as frutas maduras têm sido apreciados, através da história, pelas suas propriedades adoçantes. O açúcar tem sido refinado desde quatro séculos antes de Cristo e era considerado como uma fina e rara iguaria.

A base da percepção do gosto doce reside na habilidade de determinadas moléculas de interagir com certos receptores localizados nas membranas das células das papilas gustativas. Esses receptores provavelmente são proteínas localizadas nas membranas daquelas células, que mudam de configuração quando em contato com algo doce. Com a reconfiguração da proteína há um início de uma alteração da polaridade da membrana que se propaga até as enervações cerebrais indicando o gosto doce.

O desejo do homem por substâncias doces é geralmente satisfeito pelas bebidas, confeitaria e outros alimentos, de um modo geral, adoçados com adoçantes calóricos ou não calóricos.

Os edulcorantes ou adoçantes são produtos capazes de adoçar um alimento em substituição ou em adição ao açúcar naturalmente presente ou adicionado a este alimento. Os edulcorantes podem ser classificados em naturais, obtidos sem reações químicas, de plantas ou animais; e sintéticos, quando obtidos de produtos naturais ou não, através de reações químicas apropriadas. Um bom edulcorante deve ser normalmente solúvel em água, ser mais doce que a sacarose, resistir ao aquecimento (pasteurização, esterilização) e ter estabilidade nos valores de pH entre 3 e 7.

2.1.1 Os glicóforos

A característica chave para que uma substância seja doce, parece ser a estrutura das moléculas, aproximadamente arranjada no espaço tridimensional, numa ordem tal que é capaz de sensibilizar quimicamente o sistema receptor do gosto doce.

Estes fatores moleculares começaram a ser observados já na segunda década deste século, quando alguns pesquisadores relacionaram pela primeira vez a estrutura química e o gosto. Notaram que compostos hidroxilados como os açúcares e compostos nitrogenados como os aminoácidos e nitroanilinas em cujos isômeros pequenas variações estruturais promovem profundas alterações do dulçor. Portanto, contêm grupos intramoleculares capazes de sensibilizar tal sabor. Reconheceu-se também que esses grupos saborosos ocorrem aos pares nas moléculas.

Partindo dessas observações foi dado o nome de “glicóforo” ao grupo de átomos com a capacidade de ministrar o gosto doce a um composto.

Muitas teorias foram desenvolvidas para explicar a conformação atômica, mas foi somente em 1963 que Shallenberger, pesquisador norte americano, iniciou uma hipótese mais consistente para explicar o dulçor dos açúcares. Ele procurou explicar as pequenas diferenças na estrutura dos monossacarídeos relacionadas ao dulçor, a intensidade do dulçor varia inversamente com o grau em que os grupos hidroxila glicólicos estão ligados intramolecularmente por pontes de hidrogênio. As pontes de hidrogênio internas inibem o gosto doce. Portanto a estrutura tridimensional dos açúcares é de relevante importância neste caso. Grupos glicólicos cujo ângulo projetado é de 60 graus (conformação gauche ou escalonado) transmitem gosto doce, os que têm ângulos de zero graus (eclipsado) ou 180 graus (anticlinal) não transmitem dulçor (Figura. 2.1.). Isto acontece porque nas conformações eclipsadas as hidroxilas do grupo glicol estão muito próximas e formam uma forte ponte de hidrogênio entre si, inibindo ligações extramoleculares e, conseqüentemente, inibindo o gosto doce. Na conformação anticlinal a distância entre as hidroxilas é muito grande, fugindo da melhor conformação para produzir dulçor. Portanto a estrutura ótima que configura a unidade doce é a conformação gauche ou a conformação escalonada. Destas observações SHALLENBERGER e ACREE (1967), retiraram um modelo estrutural mais definido para a unidade saborosa dos açúcares (glicóforo) . Estabeleceram eles que o mecanismo primário do glicóforo é feito pela unidade glicol que pode ser vista

como uma unidade bifuncional, com um sistema de componentes do tipo AH, B, sendo que AH é um componente doador de prótons e B um receptor de prótons, podendo formar pontes de hidrogênio com o possível sítio receptor do gosto doce localizado nas papilas gustativas que teria uma unidade bifuncional semelhante, onde haveria uma interação combinada de maneira a formar-se duas pontes de hidrogênio simultâneas, desencadeando o mecanismo fisiológico da sensação doce. A distância entre os componentes AH, B, para um efetivo glicóforo, deve estar ao redor de 3,0 Angstroms.

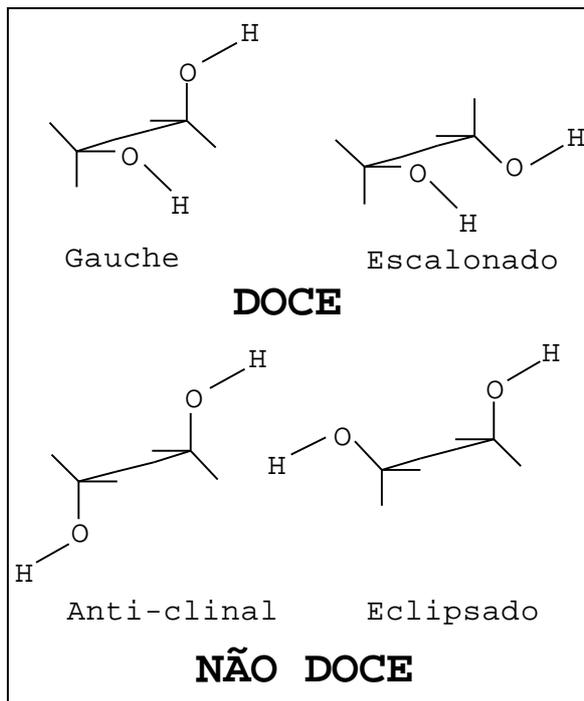


Figura.2.1 - Conformação Química do Gosto Doce e Não Doce (ALVAREZ,1984).

2.1.2 Adoçantes Naturais

São aqueles obtidos sem reações químicas de plantas ou animais. Podem ser calóricos ou não.

2.1.2.1 Adoçantes Calóricos (Nutritivos)

Os adoçantes considerados calóricos são aqueles mais comumente utilizados pelo homem que, além de ser bastante doces, são ainda nutritivos. Na sua maioria, administram, quando ingeridos, em torno de 4,0 Kcal/G. São denominados genericamente de “açúcar”, sendo a sacarose o parâmetro base de comparação. A **Tabela 2.1** relaciona os principais adoçantes calóricos e os seus poderes adoçantes.

Tabela 2.1 - Dulçor Relativo dos Açúcares (ALVAREZ, 1984).

Substância	Dulçor
Lactose	0,16
Rafinose	0,22
Galactose	0,32
Ramnose	0,32
Maltose	0,32
Xilose	0,40
Sorbitol	0,54
Manitol	0,57
Açúcar de Milho(ED=70	0,73
Glucose (Dextrose)	0,74
Sacarose (de cana ou beterraba)	1,00
Xilitol	1,00
Glicerol	1,08
Açúcar Invertido (Glucose + Frutose)	1,30
Etileno Glicol	1,30
Xarope de Milho (alto %Frutose)	1,40
Frutose	1,73

2.1.2.2 Adoçantes Naturais Não Calóricos

Entende-se por adoçante não-calórico aquela substância que quando ingerida, não é metabolizada, portanto não administra calorias, ou tem ingestão tão pequena que o teor calórico adquirido pelo seu metabolismo pode ser negligenciado. Diversas são as substâncias deste tipo. A **Tabela 2.2** mostra uma relação destes edulcorantes e os seus índices de dulçor relativos à sacarose (Sacarose = 1,0 gust.).

Tabela 2.2 - Edulcorantes Naturais Não Calóricos (ALVAREZ, 1984).

Substância	Dulçor
Glicilrrizina (Alcaçuz)	50
Esteviosídeo	300
Rebaudiosídeo A	400
Rebaudiosídeo C	400
Filodulcina (Hernandulcina)	700
Talina (Thaumatina)	1600
Monelina	500

O ácido glicilrrizínico existe nas raízes do alcaçuz na forma de sais de cálcio e potássio e em associação com outros componentes. Extratos contendo glicilrrizina são utilizados para flavorizar e adoçar fumo para cachimbo, gomas de mascar, pílulas refrescantes bucais e na confecção de confeitos. O glicilrrizinato de amônia é a forma utilizada comercialmente, e é 50 vezes mais doce do que a sacarose.

Esteviosídeo e os rebaudiosídeos são Glicosídeos diterpênicos encontrados nas folhas da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Uma descrição detalhada da planta e dos seus edulcorantes será feita posteriormente.

Um chá muito doce denominado amacha, é servido no Hanamatsuri, festival das flores em comemoração ao nascimento de Buda na Índia. O amacha é preparado das folhas secas da *Hydrangea macrophylla* Seringe var. *Thubergii* Makino. O princípio edulcorante, a filodulcina, foi isolada e sua configuração absoluta sobre o centro assimétrico C₃ foi determinada pela identificação do ácido D-málico proveniente da filodulcina ozonizada.

INGLETT e MAY (1968), em estudos sistemáticos de substâncias naturais modificadoras do gosto doce descreveram outra planta africana contendo um intenso dulçor: A milogrosa fruta do Sudão, a *Taumatococcus danielli*, também conhecida como Katenfe. Os adoçantes purificados do Katenfe são 1600 vezes mais doces do que a sacarose. A empresa Tate and Lyle na Inglaterra, está comercializando a Taumatina com o nome de Talina.

INGLETT (1984), relata suas descobertas sobre uma planta tropical, originária da África, que apresentava um intenso dulçor. A fruta dessa árvore era chamada pelos nativos de morango da serenidade, também conhecida como Monelina. A planta foi identificada como sendo a *Dioscoreofilum cumminsii* Diel (INGLETT e MAY, 1969).

Também se conhece a Osladina, um composto com gosto doce, extraído dos rizomas de um tipo de samambaia (*Polipodium vulgare*, L.) e a Miraculina, que possui a capacidade de modificar o gosto doce de substâncias azedas. A Miraculina tem peso molecular entre 42.000 e 44.000, sendo que apresenta um gosto próprio, não doce, na ausência de substâncias azedas (BROWER *et al.*, 1968).

2.1.3 Adoçantes Artificiais ou Sintéticos (Não Calóricos)

São aqueles que não podem ser encontrados em organismos vivos e são produzidos por síntese química a partir de elementos ligados ou não a sistemas vivos. A toxidez dos edulcorantes, especialmente dos sintéticos está também relacionada com a presença de impurezas provenientes da sua extração ou da sua síntese. Atualmente estão autorizados em diferentes países os seguintes edulcorantes sintéticos: a sacarina, o ciclamato, e o aspartame, acessulfame, perilartina e xilitol.

Em 1972, a FDA (Food and Drug Administration – EUA), um Instituto que regulamenta o uso de alimentos e medicamentos, estabeleceu limites ao uso da sacarina (1g/dia para uma pessoa de cerca de 13 Kg), citando a evidência de que ratos podiam desenvolver tumores de bexiga, quando alimentados com níveis muito elevados da mesma. Também na Europa a sacarina tem um limite de 2,5 mg/Kg/dia de consumo.

O ciclamato também apresenta ação toxicológica, e desde 1970 está proibido seu uso nos Estados Unidos. A ação inicial foi tomada pela mais importante legislação dos Estados Unidos – A chamada “Cláusula Delaney” do ato sobre Alimentos, Drogas e Cosméticos. Esse ato exige que qualquer aditivo alimentício que se mostra causador de câncer no homem ou qualquer animal, em qualquer nível de uso, não pode ser comercializado para uso geral.

Apesar do ciclamato e da sacarina terem estado implicados na carcinogênese animal, há pouca evidência ligando estes agentes com doenças humanas.

O aspartame é estável em forma líquida até pH 3, mas é instável com variações extremas de pH. Esta instabilidade se manifesta através de uma perda de dulçor durante o armazenamento. E não pode ser usado para cozinhar ou assar, pois temperaturas prolongadas de cozimento, como as encontradas em frituras e assados, podem causar uma degradação significativa do aspartame em dicetopiperazina com uma perda conseqüente do dulçor. Deve se ter uma preocupação com o seu uso, devido ao seu conteúdo de fenilalanina e de aspartato, porém o FDA aprovou seu uso em 1981, sendo que sua ingestão diária aceitável (IDA) foi de 40 mg/Kg.

2.2 *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni

Na época da colonização da América do Sul pelos Espanhóis e Portugueses, no território Paraguaio e regiões limítrofes do Brasil, Argentina e Bolívia, habitavam com predominância os índios nativos Tupi-guaranis. Estes indígenas se dividiam em dezenas de nações ou tribos. Essa população nativa foi avaliada, na época, em cerca de 400.000 indivíduos. Integrados à floresta e cultivando plantas especiais que utilizavam como alimentos e remédios. Os índios da América demonstraram o valor de plantas como a mandioca, a batata-doce, o algodão, o milho, a baunilha, o mate, a borracha, e muitas outras que hoje são universalmente conhecidas e cultivadas. Descobriram e ensinaram também as propriedades da coca, da vanila, da quina, da salsaparrilha e dezenas de outras espécies medicinais. Com tudo isto, o vasto estoque do seu conhecimento botânico ainda apresenta diversas coisas surpreendentes.

Os Tupi-guaranis utilizavam e utilizam as folhas de uma pequena planta que denominaram Kaá-Hê-ê, que em guarani, significa erva doce. Eles a conheciam também pelos diversos nomes de Caá-jhe-hê, Ca-á-yupe (doce), Azucá-caá (erva de açúcar) e Eira-Caá (erva de mel). Esta planta, pelas diversas propriedades extremamente doces de suas folhas, era utilizada para adoçar diversas preparações medicinais dos indígenas.

As primeiras notícias do Kaá-Hê-ê para o mundo civilizado foram dadas através de relatos contidos em documentos informativos, enviados pelos conquistadores à Espanha. Cópias desses relatos se conservam no Arquivo Nacional de La Assuncion. Tais documentos davam notícia de a planta era conhecida dos indígenas desde tempos remotos e que eles a usavam para edulcorar bebidas medicamentosas e especialmente para adoçar o mate cozido (SAMANIEGO, 1946).

Somente em 1887 foi que, pela primeira vez, o Kaá-Hê-ê teve uma abordagem científica dada pelo Naturalista Moisés S. Bertoni, suíço de nascimento e radicado no Paraguai, que a descobriu durante suas excursões de estudos pelas extensas florestas do Paraguai Oriental. Bertoni teve as primeiras notícias da planta através de ervateiros do Norte e índios e Mondaih. Estes últimos a conheciam de campos próximos de Mbaceverá e Kaá Guasú, regiões próximas da Cordilheira do Amambbay que faz fronteira com o Brasil. Depois de muitas dificuldades para conseguir uma planta viva, Bertoni conseguiu fazer um estudo completo e pôde comprovar, então, que efetivamente se tratava de uma *Eupatoriae* porém do gênero *estévia* e como tal ele a publicou em 1905, com minuciosa descrição em Latim, denominando-a *Stevia rebaudiana* e, mais tarde, a Sociedade Botânica, em homenagem a Bertoni, denominou-a *Stevia rebaudiana* Bertoni (ALVAREZ, 1984).

No começo do século, também no Brasil, a *estévia* teve destaque científico e tecnológico. A planta tinha ampla distribuição nativa no nosso território e já atraía o interesse de pesquisadores e agricultores. O texto abaixo revela tal interesse.

CA-EHÉ = *Stevia collina* Gard. (*S. Rystfolia* Gardn., *S. pállida* M.) da família das compostas. Subarbustos erecto de 1 m de altura; caule pardo, pubescente e folioso até o ápice; folhas oppostas, subsésseis, ovado-oblongas, obtusas, cuneiformes na base, 3 nervadas membranosas, tomentosas na página inferior, até 6 cm de comprimento; flores pállidas com escamas pardo-esverdeadas, agudas e pubescentes, reunidas em capítulos corymbiformes de 4-5 e estes dispostos em panículas frouxas; fructo achenio pequeno e com ângulos pilosos. É planta saccharina e estomacchica, recomendada como edulcorante; encerra a glucoside glycyrrhizina, que é o seu princípio activo, porém acha-

se combinado com soda e uma resina aromática amarga, de cor amarelo ambar, cuja densidade é de 1,070. Tem se aconselhado repetidas vezes a cultura desta planta, como sucedanea da Glycyrrhiza glaba L. (Alcaçuz verdadeiro), para a exploração industrial da as Glycyrrhizina, mas não consta que alguém haja abraçado a idéia. – Há a variedade rebaudiana (Eupatoriun rebaudianum, S. rebaudiana Bert.). – É planta campestre, sendo a espécie typo frequente em Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso e há variedade apenas neste último Estado. Esta é a descrição textual, do grande botânico brasileiro MANUEL PIO CORREA (1874-1934), no primeiro volume de seu Dicionário de Plantas Úteis do Brasil, editado em 1926 e cuja extraordinária obra teve seu início em São Paulo em 1906. Esta talvez seja a primeira descrição detalhada da estévia feita no Brasil.

Como Pio observou, a *Stevia rebaudiana*, no Brasil, ocupava uma vasta área nativa, talvez uma área maior do que no próprio Paraguai. Hoje sabemos que a planta é encontrada nativa também no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

A primeira tentativa de extração do princípio adoçante no Brasil foi feita pelo Dr. Raymond Zelnik, cujos trabalhos se iniciaram em 1960-61 em São Paulo. Em 1964 Zelnik depositou um pedido de patente no Brasil sobre o processo de extração, e parece ser o primeiro pedido de patente sobre estévia que se tem notícia no mundo (ALVAREZ, 1984).

Seguindo aos estudos de Zelnik, sob orientação do Prof. Jaime Regalo Pereira, no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina da USP, em São Paulo, a Dr^a Gila do Amaral Von Schemeling iniciou estudos pioneiros sobre a planta, publicando os resultados em 1967, publicou outros trabalhos também em 1976 e 1979 (ALVAREZ, 1984).

Estudos botânicos vêm sendo realizados desde 1971, pela equipe do Prof. Dr. Gil Martins Fellipe no Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade de Campinas. Estudos estes que contribuíram e contribuem sobremaneira para o embasamento dos estudos agrônômicos para o cultivo da estévia em nosso País e outros países interessados (ALVAREZ, 1984).

Em 1979, representando um marco na pesquisa sobre estévia no Brasil, Idiomar Angelucci publicou uma tese de doutoramento, realizada e defendida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, onde relata suas pesquisas sobre processos de extração, processos analíticos e processos de aplicação dos princípios adoçantes da estévia (ALVAREZ, 1984).

Em 1980 outra tese foi publicada por Reinaldo Monteiro, tese de mestrado apresentada à Universidade Estadual de Campinas. Este trabalho trata da Taxonomia e Biologia de reprodução da estévia e propõe que a planta seja denominada *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni em lugar de simplesmente *Stevia rebaudiana* Bertoni (ALVAREZ, 1984).

Neste contexto a estévia, em 1979, foi trazida para a Universidade Estadual de Maringá e do trabalho resultou o domínio da tecnologia para a exploração racional da planta. Foi dominada a tecnologia de cultivo em condições econômicas; demonstraram-se os efeitos dos princípios ativos e seus derivados sobre o metabolismo celular e subcelular e ainda foi desenvolvida uma metodologia simples e econômica para o fracionamento dos princípios ativos da estévia. Este processo culminou, em 1984, com o pedido de privilégio junto ao INPI sob nº 8402752 (ALVAREZ, 1984).

Contam os nossos pais e avós, que na divisa de São Paulo com Minas Gerais e com o Mato Grosso (regiões que na época eram grandes produtoras de café), durante a revolução de 1932, houve um grande racionamento de açúcar e que, muitas vezes, as famílias utilizavam para adoçar alimentos e bebidas, uma pequena planta que os fazendeiros de café denominavam praga do picão doce. Esta planta que nascia entre os cafeeiros, hoje se sabe, era a *Stevia rebaudiana* Bertoni. Tem-se notícia, que os gaúchos do Rio Grande adoçavam e adoçam ainda hoje o mate, com folhas moídas de estévia. O gênero estévia, fundado por CANAVILES (1797), da família das compostas, apresenta muitas espécies distribuídas pelo mundo, principalmente nas Américas e especialmente na América do Sul, cujo clima tropical favorece o seu desenvolvimento. No Brasil, em estudos fitogeográficos sobre a *Stevia rebaudiana*, JABUR e THOMAS (1984), num trabalho realizado na Universidade Estadual de Maringá, encontraram a espécie nativa em focos isolados no arenito Caiuá, região com solo e clima muito semelhantes à região de origem da planta, situadas sobre a mesma latitude sul e na faixa de 53° a 54° de latitude oeste, no norte e oeste do Paraná, na bacia do rio Ivaí e parte da bacia do rio Paranapanema no Estado de São Paulo. Segundo estes pesquisadores, esta é uma região potencialmente nativa da planta, pois apresenta todos os requisitos para o seu desenvolvimento. A invasão da *Stevia rebaudiana* nesta região é recente, pelo fato de que há pouco houve o seu completo desmatamento, transformando-a em campo arenoso. Há ainda nessa região, um fator importante para a implantação da espécie, que é o maior nível de umidade do solo devido à densa rede fluvial que corre por todo o arenito de Caiuá (ALVAREZ, 1984).

2.2.1. Natureza Química do Princípio Edulcorante da *Stevia rebaudiana* Bertoni

2.2.1.1 Carboidratos

Praticamente todo alimento contém carboidratos naturais, ou adicionados por causa do seu efeito sobre a atividade da água e sabor do alimento. Recebem este nome por causa de observações anteriores de que eles geralmente apresentavam a fórmula $C_x(H_2O)_y$, isto é, eles pareciam ser hidratos de carbono (MEISLICH, 1981).

Os carboidratos (sacarídeos) são polihidroxi aldeídos (aldoses), polihidroxi cetonas (cetoses), ou substâncias que podem ser hidrolisadas até eles. O sufixo **-ose** caracteriza esta classe. A atração da água pelos carboidratos é uma de suas básicas e mais importantes propriedades físicas. A hidrofiliabilidade é esperada devido à sua numerosa quantidade de grupos hidroxila (MEISLICH, 1981).

O monossacarídeo D(+)-glicose, uma aldohexose, é formado nas plantas pela fotossíntese e é convertido nos polissacarídeos celulose e amido. Sacarídeos simples são chamados açúcares (MEISLICH, 1981).

Os carboidratos mais simples, aqueles que não podem ser fragmentados em carboidratos menores por hidrólise são chamados monossacarídeos. Os carboidratos que sofrem hidrólise para produzir somente duas moléculas de um monossacarídeo são chamados dissacarídeos, e assim por diante. Os carboidratos que fornecem, na hidrólise, mais que dez monossacarídeos são conhecidos como polissacarídeos. O gliceraldeído é o monossacarídeo mais simples. Alguns exemplos de dissacarídeos são a celubiose, a maltose, a sacarose, e a lactose. O guaraná, a pectina e a celulose são exemplos de polissacarídeos.

2.2.1.2 Glicosídios

Os álcoois adicionam-se a grupos carbonilas de aldeídos e cetonas formando hemiacetal e hemiacetais, respectivamente. Estes quando reagem novamente com um álcool resultam, respectivamente, um acetal ou um cetar (**Figura 2.2**).

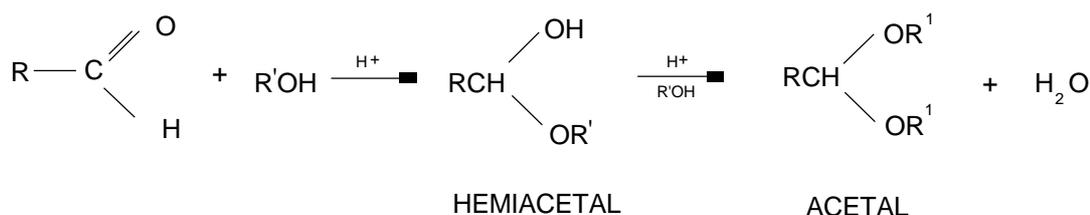


Figura 2.2 - Esquema de Transformação de Hemiacetais em Cetais (ALLINGER, 1978).

Os acetais dos carboidratos, geralmente, são chamados de Glicosídios. O acetal da glicose é chamado de glicosídeo. Os da manose são manosídios, os da frutose são frutosídios, etc...(SOLOMONS, 1983).

Alguns Glicosídios têm grande importância para o uso humano como os oligo e polissacarídios, os Glicosídios cardíacos digitalin e digitoxin, as saponinas (triterpenos ou Glicosídios esteróides) que são fortes formadores de espuma e estabilizantes, ao Glicosídios flavonóides que conferem o gosto amargo e outros aromas assim como cor nos alimentos.

Porém poucos Glicosídios complexos são excepcionalmente doces, tais como o esteviosídeo, a osladina e o ácido glicilrrizínico. A maioria dos Glicosídios, especialmente quando a metade aglicona é maior que o grupo metil, são adstringentes, de gosto amargo que pode variar de leve até o extremo.

2.2.1.2.1 Os Glicosídeos da *Stevia rebaudiana* Bertoni

A grande divulgação promovida em torno da estévia a nível mundial, atraiu a atenção dos pesquisadores para estudar a natureza química de tão poderoso edulcorante natural.

Desde os primeiros estudos químicos feitos por Rebaudi, estudos sistemáticos vêm sendo realizados em todo o mundo a fim de se ter um melhor aproveitamento das propriedades edulcorantes e medicinais da *Stevia rebaudiana* Bertoni, assim como, na determinação de suas natureza e estrutura químicas.

O princípio edulcorante, um glicosídeo, foi isolado pela primeira vez, por RASENACK (1908), na forma cristalina, como citado por VON SCHMELING (1967), que obteve um extrato alcoólico das folhas, precipitou este extrato com éter e o produto foi cristalizado em metanol.

O isolamento do glicosídeo foi também descrito, independentemente, por DIETERICH (1909), que obteve duas formas do mesmo, denominando-as Eupatorina e Rebaudina.

Entretanto BERTONI (1918) contestou a nomenclatura dada por DIETERICH (1909) em função da nomenclatura da planta que em 1905 passou a denominar-se estévia. Bertoni estabeleceu então, que a Eupatorina deveria denominar-se estevina e que a Rebaudina, como o próprio Dieterich determinara, era um sal de sódio e potássio da estevina (Rebaudina).

Em 1924, pela decisão da Union Internacionale de Chimie em Copenhagen, o nome de esteviosídeo foi atribuído ao princípio adoçante conforme BRIDEL e LAVIEILLE (1931a).

BRIDEL e LAVIEILLE (1931a,b), fizeram um detalhado exame da *Stevia rebaudiana*. Eles mostraram que a extração das folhas secas com etanol a 70°C produz esteviosídeo (60 g a cada Kg de folhas) como um pó branco e muito leve, consistindo de microcristais alongados.

Na segunda metade da década de 50 e início da década de 60, partindo dos trabalhos realizados por BRIDEL e LAVIEILLE (1931) e THOMAS (1937), uma equipe de químicos do National Institute of Health em Bethesda, nos Estados Unidos, inicialmente

liderada por Hewitt G. Fletcher (WOOD *et al.* (1955); WOOD e FLETCHER (1956); VIS e FLETCHER (1956)) e posteriormente por Erich Mosettig (MOSETTIG e NESS (1956); DOLDER *et al.* (1960); MOSETTIG *et al.* (1961); DJERASSI *et al.* (1961); WATERS *et al.* (1962); MOSETTIG *et al.* (1963)) e o excelente trabalho de ARYA (1962) no Instituto de Química Orgânica de Stocholm e publicado na Índia, foi possível elucidar completamente a estrutura do esteviosídeo.

Juntamente com estes estudos, pode-se analisar o poder edulcorante da estévia. Baseado numa análise de um laboratório de Hamburgo, BERTONI (1913) anunciou o poder edulcorante da substância doce extraída das folhas da estévia, como sendo mais ou menos cento e oitenta vezes mais doce do que o açúcar de cana. Em 1931, após o isolamento e identificação do esteviosídeo, componente principal do princípio edulcorante da estévia, BRIDEL e LAVIEILLE (1931) anunciaram um poder edulcorante deste composto como sendo 300 vezes maior do que o da sacarose. LAWRENCE e FERGUSON (1959) publicaram dados obtidos sobre o poder edulcorante do esteviosídeo, que ficou estabelecido em cerca de 280 a 300 vezes o poder edulcorante da sacarose.

Sendo assim, os estudos para a determinação da composição química dos princípios ativos da *Stevia rebaudiana* Bertoni e dos processos de extração desenvolvidos para a obtenção dos mesmos, podem ser divididos em três períodos distintos. São eles correspondentes ao período desde a sua descoberta por Bertoni em 1899 até os trabalhos de BRIDEL e LAVIEILLE (1931), na primeira fase, que compreendem estudos sobre o isolamento, caracterização química e nomenclatura do principal princípio adoçante. Na segunda fase, que compreendendo o período de 1931 a 1970, com o seu auge entre 1955 e 1967, época esta onde os estudos químicos permitiram a completa elucidação da estrutura química do princípio ativo adoçante. E finalmente de 1970, quando a estévia foi levada para o Japão até os dias de hoje, grande impulso foi dado tanto no que se refere a aspectos químicos, com a descoberta de novos princípios ativos edulcorantes, elaboração de processos de extração e produção de derivados, como aspectos farmacológicos para demonstrar a segurança de utilização dos adoçantes, culminando com a industrialização da planta.

Os adoçantes das folhas da *Stevia rebaudiana* Bertoni são utilizados como edulcorantes alimentícios em muitos países do mundo. Desde 1970 o esteviosídeo é utilizado no Japão como edulcorante e em bebidas, dominando hoje cerca de 40% deste mercado com um consumo acima de 85 toneladas anuais. Foi aprovado no Brasil em

meados de 1987 como agente flavorizante edulcorante em várias classes de alimentos. E nos Estados Unidos em 1996 para ser utilizado como ingrediente para suplemento dietético (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996).

2.2.2 Características Toxicológicas da *Stevia rebaudiana* Bertoni

Desde o princípio dos estudos de utilização da estévia como fonte de adoçantes para uso populacional, houve uma preocupação com as suas características toxicológicas e farmacológicas.

REBAUDI (1900), em seus estudos químicos sobre a planta, isolou dois extratos químicos: um princípio extremamente doce e outro amargo, com características de aperitivo digestivo.

KORBERT (1915) extraiu duas substâncias das folhas da estévia,: uma ácida e outra neutra, que considerou como sendo saponinas. A saponina ácida não era doce e possuía propriedades hemolíticas. Em doses de 1:500, esta substância hemolisava completamente os glóbulos sangüíneos. A saponina neutra, ele considerou como sendo a eupatorina de Dieterich, possuindo a característica doce daquele princípio. Suas propriedades hemolíticas, segundo o autor, eram igualmente claras.

Após os trabalhos de BRIDEL e LAVIEILLE (1931), que isolaram quimicamente o esteviosídeo, POMARET (1931) e LAVIEILLE (1931), estudaram algumas propriedades fisiológicas do princípio purificado.

POMARET e LAVIEILLE (1931), estudaram também os aspectos toxicológicos do esteviosídeo. Injeções subcutâneas em cobaias, em doses de 60 mg a 1250 mg por Kg de peso em suspensão oleosa, não determinaram nenhuma reação primária ou secundária e não houve emagrecimento ou qualquer tipo de manifestação tóxica posterior. Também dosagens via intravenosa foram testadas, e em dosagens intraperitoneais de até 2.200 mg, a única alteração observada foi um emagrecimento transitório. Dois meses depois os animais foram sacrificados apresentando completa integridade orgânica. Os autores também testaram dosagens, via oral ,de 1,2 g por Kg de peso que demonstrou nenhuma alteração nos animais testados.

POMARET e LAVIEILLE (1931) investigaram também o processo de absorção do esteviosídeo pelo organismo dos animais. Determinaram então, que após injeção subcutânea, há uma eliminação, pelas vias urinárias, de cerca de 50% do esteviosídeo injetado, na sua forma intacta, em 24 horas. O exame do excremento de galos que receberam, via oral, 4 g de esteviosídeo, mostrou que cerca de 25 a 30% passa pelo trato gastrointestinal sem sofrer alterações.

Portanto, os experimentos de POMARET e LAVIEILLE (1931) demonstraram, para a época, que o esteviosídeo, apresentava muito baixo nível de toxicidade aguda.

Atualmente, sabe-se que a *Stevia rebaudiana* é uma fonte de adoçantes naturais dietéticos, não-cariogênicos, não-carcinogênicos e praticamente inócuo à saúde. Por isso no Japão, diversos países do sudoeste da Ásia (TANAKA, 1982) e mais recentemente no Brasil, está se plantando, para fins industriais, a *Stevia rebaudiana* em larga escala (ALVAREZ e KUSUMOTO, 1987).

2.2.3 Caracterização Química dos Princípios Adoçantes

Os primeiros trabalhos sobre os princípios adoçantes da *Stevia rebaudiana* Bertonii foram realizados por REBAUDI (1900), Mais tarde, CORRÊA (1926), baseado nos dados preliminares de REBAUDI (1900) ,fez sua descrição do princípio ativo da estévia no seu dicionário publicado em 1926.

BRIDEL e LAVIEILLE (1931), executaram uma série de análises sobre os produtos da hidrólise enzimática, comparando os resultados com os produtos da hidrólise ácida. Com isto, eles verificaram que o açúcar liberado em ambas as hidrólises tratava-se da D-glucose, sendo que as partes aglicônicas liberadas em cada caso eram o steviol, na hidrólise ácida e o isosteviol, na hidrólise enzimática, isômeros, de fórmula $C_{20}H_{30}O_3$. Ambas as moléculas apresentavam características ácidas , contendo uma provável carboxila.

A configuração das ligações glicosídicas no esteviosídeo foi determinada em 1976, por TANAKA (1976). KOHDA *et al.* (1976) e YAMASAKI (1976) que determinaram que estas ligações eram todas β -glicosídicas.

Com a ida da estévia para o Japão, levada por Sumida em 1969, iniciou-se um novo ciclo de estudos sobre a planta que, devido ao extraordinário pragmatismo japonês, conduziu a mesma e os seus produtos para uma promissora agroindústria naquele país (ALVAREZ, 1984).

Com os modernos recursos da química e da agricultura, rapidamente diversos trabalhos começaram a ser publicados, inicialmente sobre aspectos agrícolas e de utilização da estévia em alimentos, e em seguida sobre aspectos químicos e de extração dos princípios ativos (YAMAMOTO (1970); MORITA (1973); KAWATANI *et al.* (1973); HAYASHI e NODA (1973); MYASAKI *et al.* (1974); MATSUMI (1974)). Muitas empresas e instituições governamentais do Japão participaram desde logo na pesquisa sobre a estévia. AKASHI *et al.* (1973), da Tama Biochemical Research Co. Ltd., solicitaram em 1973 uma das primeiras patentes sobre a extração do esteviosídeo seguidos por ASANO *et al.* (1973) da Takasago Perfumery Co. Ltd., quase na mesma época.

No Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Hiroshima, a equipe de pesquisadores liderada por Osamo Tanaka, desenvolveu uma série de estudos químicos sobre Glicosídios de plantas, incluindo os Glicosídios da *Stevia rebaudiana* (ALVAREZ, 1984)

SAKAMOTO *et al.* (1975) e KOHDA e TANAKA (1975) verificaram que enzimas do veneno de cobras e pectinase impura, além das enzimas do suco digestivo do Scargot (BRIDEL e LAVIEILLE, 1931) eram capazes de hidrolisar o esteviosídeo, produzindo a genuína aglicona correspondente, o esteviol. Estes autores demonstraram que uma preparação impura de enzimas do *Aspergillus niger*, usado na indústria de alimentos para hidrolisar a hesperidina, por isso denominada hesperidinase, é capaz de hidrolisar quantitativamente o esteviosídeo em glucose e esteviol.

TANAKA *et al.* (1980) observaram que o extrato bruto das folhas da *Stevia rebaudiana* tinha um paladar muito mais doce e muito mais agradável do que o esteviosídeo purificado. Então, analisaram o extrato por cromatografia de camada delgada, verificando a presença de numerosos outros Glicosídios. Isolaram estes novos Glicosídios em colunas cromatográficas, dando-lhes a designação de rebaudiosídeos A, B, C, D e E.

KOHDA *et al.* (1976) apresentaram os resultados dos estudos sobre os rebaudiosídeos A e B. Estes pesquisadores extraíram as folhas da estévia com metanol a quente e a solução metanólica foi concentrada até secar. A massa residual foi dissolvida

em água e extraída em butanol. A solução butanólica foi concentrada sob vácuo e o resíduo foi cristalizado em metanol, produzindo cristais de esteviosídeo. A água mãe foi concentrada até secar e o resíduo foi cromatografado em coluna obtendo, além do esteviosídeo contaminante, os rebaudiosídeos A (1,4%), como cristais incolores em forma de agulha (cristalizados em metanol) com P.F. = 242 - 244° C e $[\alpha]_D = -20,8$ graus (C = 0,84 em MeOH); rebaudiosídeo B (0,04%), como cristais incolores em forma de agulha (cristalizado em metanol) com P.F. = 193 - 195°C e $[\alpha]_D = -45,4$ graus (C = 0,96 em MeOH). O rebaudiosídeo A apresentou a fórmula elementar $C_{44}H_{70}O_{23} \cdot H_2O$ e uma banda de absorção no espectro infravermelho aos 1728 cm^{-1} características de ligação éster-glicosídica. O rebaudiosídeo B apresentou a fórmula elementar $C_{38}H_{60}O_{18} \cdot 2H_2O$ com banda de absorção no infravermelho aos 1700 cm^{-1} , característico de grupo carboxílico livre.

Repetidas cromatografias em coluna de sílica gel, com diversos eluentes, do extrato metanólico das folhas de estévia, produziram 3 outros novos Glicosídios que foram denominados rebaudiosídeos C (rend. 0,4%); D (0,03%) e E (0,03%). Estes compostos encontrados em menor concentração, foram estudados por SAKAMOTO *et al.* (1977 a,b). Estes autores isolaram e cristalizaram os compostos em metanol, obtendo para o rebaudiosídeo C, cristais em forma de agulhas incolores com P.F. = 215 - 217°C e $[\alpha]_D = 29,9$ graus (MeOH); para o rebaudiosídeo D também cristais em formas de agulhas incolores com P.F. = 283 - 286°C e $[\alpha]_D = -22,7$ graus (MeOH), e para o rebaudiosídeo E, cristais em forma de agulhas incolores com P. F. = 205 - 207°C e $[\alpha]_D = -34,2$ graus (MeOH).

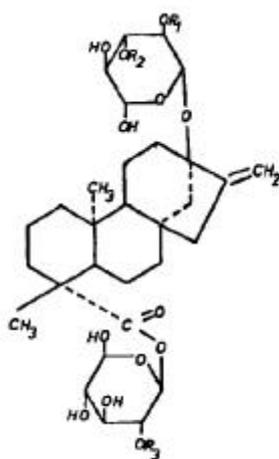
Através de sistemas analíticos semelhantes aos usados com os rebaudiosídeos A e B, SAKAMOTO *et al.* (1977a, b) propuseram a formulação dos compostos como da fig. 5., sendo o rebaudiosídeo C designado como 19-O- β -glucopiranosil-13-O{ $[\alpha$ -rhamnopiranosil(1,2)- β -glucopiranosil(1,3)- β -glucopiranosil]-esteviol}; o rebaudiosídeo D como 19-O[β -glucopiranosil(1,2)- β -glucopiranosil(1,2)- β -glucopiranosil]-esteviol; e o rebaudiosídeo oficialmente designado como 19-O-[β -glucopiranosil-13-O-[β -glucopiranosil(1,2)- β -glucopiranosil]-esteviol.

KOBAYASHI *et al.* (1977), simultaneamente, isolaram e caracterizaram dois outros novos Glicosídios adoçantes extraídos da estévia, aos quais denominaram de dulcosídeo A e dulcosídeo B. O isolamento foi feito a partir do extrato aquoso de folhas de

Stevia rebaudiana que, após a evaporação da água, foi feita a redissolução do resíduo em MeOH – EtOH no qual houve cristalização do esteviosídeo. A água mãe foi concentrada até secar e o resíduo foi novamente dissolvido em dioxano, misturado com sílica gel e evaporado até secar. A mistura foi colocada numa coluna e eluída com solventes obtendo diversas frações entre as quais o dulcosídeo A, que por cristalização em metanol produziu cristais incolores em forma de agulhas com P.F. = 193–195°C e $[\alpha]_D = -46,7$ graus (C = 0,45 em MeOH) e fórmula elementar $C_{38}H_{60}O_{17} \cdot 2H_2O$ e o dulcosídeo B com cristais nas mesmas condições com P.F. = 235–238°C e $[\alpha]_D = -28,7$ graus (C = 3,55 em metanol), com fórmula elementar $C_{44}H_{70}O_{22} \cdot 3H_2O$. Análises espectrométricas no infravermelho, ressonância nuclear magnética de prótons dos Glicosídios metilados e acetilados e dos respectivos produtos de hidrólise, por comparação com os Glicosídios já conhecidos, KOBAYASHI *et al.* (1977) propuseram a estrutura do dulcosídeo A como 10-O- β -glucopiranosil-14-O-[α -rhamnopiranosil(1,2)- β -glucopiranosil]-esteviol e o dulcosídeo B 19-O- β -glucopiranosil-13-O- $\{[\alpha$ -rhamnopiranosil(1,2)- β -glucopiranosil-1,3]- β -glucopiranosil}-esteviol.

Pode-se notar portanto, que o dulcosídeo B proposto por KOBAYASHI *et al.* (1977) é idêntico ao rebaudiosídeo C descrito por SAKAMOTO *et al.* (1977).

Assim, os Glicosídios edulcorantes componentes das folhas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, conhecidos hoje, são os constantes da **Figura 2.3**.



COMPOSTOS	RADICAIS			OBSERVAÇÕES
	R ₁	R ₂	R ₃	
I - STEVIOSÍDEO	GLUC.	H	H	-
II - STEVIOLBIOSÍDEO	GLUC.	H	H	C/CARBOXILA LIVRE
III - REBAUDIOSÍDEO A	GLUC.	GLUC.	-	-
IV - REBAUDIOSÍDEO B	GLUC.	GLUC.	-	C/CARBOXILA LIVRE
V - REBAUDIOSÍDEO D	GLUC.	GLUC.	GLUC.	-
VI - REBAUDIOSÍDEO E	GLUC.	H	GLUC.	-
VII - DULCOSÍDEO A	RHAM.	H	H	-
VIII - DULCOSÍDEO B (REBAUDIOSÍDEO C)	RHAM.	GLUC.	H	-

Figura. 2.3 - Estrutura Química dos Glicosídios da *Stevia rebaudiana* Bertoni (CRAMMER, 1987).

Segundo TANAKA (1980) o esteviosídeo é composto de maior teor nas folhas da estévia (5 a 20% em peso seco) seguido do rebaudiosídeo A (3 a 6% em peso seco), sendo que a concentração de rebaudiosídeo A nas folhas secas variam de 25 a 54% em relação à concentração de esteviosídeo.

As folhas da *Stevia rebaudiana* Bertoni contêm cerca de 42% de seu peso seco como material solúvel em água, dos quais os Glicosídeos diterpênicos não constituem mais que 20% e tipicamente, no Japão, constituem somente 12-15%. Além do que, muitos dos outros componentes presentes afetam o perfil do sabor, e entretanto precisam ser removidos (GRENBY, 1987).

O rebaudiosídeo E é tão doce quanto o esteviosídeo, enquanto que o rebaudiosídeo A e D são 30% mais doces que o esteviosídeo. O rebaudiosídeo C e o dulcosídeo A são quase a metade tão doces quanto o rebaudiosídeo E. Tem sido recentemente observado que o rebaudiosídeo B é um artefato formado do rebaudiosídeo A durante o processo de separação (GRENBY, 1987).

Os demais Glicosídeos descobertos estão em quantidades mínimas, o rendimento total dos menores rebaudiosídeos (B, C, D e E) é menor que 1% do peso seco nas folhas. Entretanto, devido ao fato dos rebaudiosídeos serem mais doces do que o esteviosídeo (1,2 a 1,5 vezes mais doces) e por apresentarem um paladar mais agradável, é que o extrato bruto das folhas tem um paladar doce melhor do que o esteviosídeo quando purificado (KANEDA *et al.*, 1977a).

A descoberta dos novos Glicosídeos edulcorantes da estévia gerou, simultaneamente, o registro de diversas patentes, privilegiando processos de extração e purificação dos mesmos, principalmente do rebaudiosídeo A. Assim, TANAKA *et al.* (1977) da Ajinomoto Co. Inc.; MORITA *et al.* (1977a,b,c) da Morita Kagaku Kogyo Co. Ltd.; KOBAYASHI *et al.* (1978) e KANEDA *et al.* (1977, b), ambos da Nikken Chemicals Co. Ltd; registraram os seus processos.

2.2.4 Processos Analíticos para Determinação dos Princípios Adoçantes

Com o rápido aumento do consumo dos adoçantes da estévia no mundo, houve a necessidade de se desenvolver métodos de análise qualitativos e quantitativos, dos princípios adoçantes. Estes métodos devem ser fáceis de executar precisos e rápidos, para o controle industrial, tanto para o controle de qualidade na indústria extrativa das folhas, quanto para os produtos acabados, e também para análises químicas em pesquisas e desenvolvimentos de novas variedades de planta e novos produtos.

Vários são os processos de quantificação dos princípios adoçantes da *Stevia rebaudiana* Bertoni .

2.2.4.1 Quantificação por Extração Exaustiva

A quantificação dos princípios adoçantes da estévia vem sendo feita desde as primeiras experiências de isolamento e caracterização dos mesmos (REBAUDI, 1900). Os primeiros dados quantitativos mais precisos foram fornecidos por RASENACK (1908) que obteve, por extração exaustiva, 2,5 a 3% do princípio adoçante purificado. BRIDEL e LAVIEILLE (1931), também por extração exaustiva, após experimentarem vários processos, obtiveram um teor de esteviosídeo puro de 60 a 65 g por Kg de folhas secas. WOOD *et al.* (1955) isolaram o esteviosídeo com rendimento de 7% utilizando resinas trocadoras de íons para a purificação. Estes sistemas são trabalhosos e imprecisos devido às possíveis perdas que ocorrem nas diversas etapas da extração, sendo úteis somente para uma avaliação prévia dos conteúdos.

GAO *et al.* (1986) fizeram uma determinação quantitativa dos Glicosídeos totais do extrato de estévia, utilizando um método gravimétrico, através do tratamento do extrato com solução de ácido sulfúrico a 5% sob fervura, promovendo completa hidrólise dos Glicosídeos. A solução foi tratada com 2,4-dinitrofenilhidrazina que reage com o isosteviol formado, produzindo um precipitado de fenilhidrazona. O precipitado foi recuperado por

filtração, lavado, seco e pesado. A massa do precipitado formado foi correlacionada com o teor de Glicosídeos totais com um erro relativo de 2,49 a 3,15%.

2.2.4.2 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Foi, possivelmente, o primeiro método qualitativo cromatográfico elaborado para avaliar o esteviosídeo no extrato da estévia (GLÓRIA, 1966). A cromatografia de camada delgada foi efetuada em sílica gel-G, sobre lâminas de vidro de microscópio, reveladas com iodo. Foram utilizadas quatro tipos de fase móvel, benzeno:etanol (3:1), dando R_f para o esteviosídeo de 0,38, etanol puro ($R_f = 0,74$), metanol puro ($R_f = 0,80$), e a mistura butanol:metanol:água (8:1:1) ($R_f = 0,56$).

SAKAMOTO *et al.* (1975) elaboraram um sistema para cromatografia em camada delgada bastante eficiente, utilizando placas de sílica gel como fase fixa e clorofórmio, metanol e água (30:20:4) ou (90:65:9) como fase móvel, revelando com ácido sulfúrico a 10% em metanol e aquecimento a 120°C por 10 minutos, obtendo boa separação das manchas.

Também MITSUHASHI *et al.* (1975), através de tincrografia, um processo cromatográfico de camada no qual as manchas são quantificadas densitometricamente, determinaram o teor de esteviosídeo de 24 variedades de *Stevia rebaudiana*, encontrando teores de 2,07 a 8,34% de esteviosídeo.

METIVIER e VIANA (1979a) descreveram um método de determinação do esteviosídeo das folhas frescas de estévia por cromatografia de camada delgada bidimensional, usando placas de sílica gel não ativadas, impregnadas com ácido bórico como fase fixa e n-butanol, acetato de etila, isopropanol, água (35:100:60:30) como primeira fase móvel e acetato de etila, ácido acético, água (8:4:1) como segunda fase móvel. O sistema promove boa separação das manchas, utilizando-se esteviosídeo puro como padrão. Outros açúcares podem ser determinados por este método. METIVIER e VIANA (1979b), também utilizaram glucose como padrão.

Um método complexo de cromatografia de camada delgada bidimensional foi desenvolvido por YOSHIDA (1986) para detectar e quantificar 6 Glicosídeos derivados da *Stevia rebaudiana*.

Muitos outros métodos de cromatografia de camada delgada foram desenvolvidos, sendo este um método bastante útil para fins qualitativo de detecção e avaliação, porém, é muito impreciso e demorado em análise quantitativas, mesmo quando se utiliza o sistema densitométrico para tanto.

2.2.4.3 Cromatografia Gás-Líquido (GLC)

O sistema de cromatografia gás-líquido (GLC) pelas suas próprias características exige que a amostra a ser analisada tenha seus componentes bastante voláteis. Componentes não voláteis não são analisáveis por este método. Assim, o esteviosídeo e os demais Glicosídeos da estévia têm, por este fato, sua análise dificultada em GLC. Para tanto, alguns autores realizam este tipo de análise provocando uma hidrólise ácida do esteviosídeo em isosteviol, que é um composto volátil. Mas a hidrólise ácida é inespecífica, produzindo isosteviol a partir de outros Glicosídeos ,além do esteviosídeo, superestimando os valores deste último. Assim, SAKAMOTO *et al.* (1975) desenvolveram um método no qual a hidrólise é feita enzimaticamente, com hesperidianase, produzindo esteviol, que é tão volátil quanto o isosteviol, como aglicona autêntica do esteviosídeo, não havendo hidrólise total dos rebaudiosídeos que ficam ainda na forma glicosídica não volátil. Este método permitiu excelente reprodutibilidade.

2.2.4.4 Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAP ou HPLC)

O número de componentes glicosídicos diterpênicos que podem estar contidos em extratos da *Stevia rebaudiana* é, como se sabe hoje, de oito compostos contidos na **Figura**

2.4. Portanto um processo analítico que quantifique satisfatoriamente estes compostos em uma única análise é o ideal para os processos de controle de qualidade. A cromatografia líquida de alta performance (CLAP), ou do inglês HPLC, ou também chamada de cromatografia líquida de alta resolução, é umas das técnicas que pode realizar este trabalho, além de ser uma técnica extremamente rápida.

HASHIMOTO *et al.* (1978) desenvolveram um método de análise por CLAP para separação e quantificação dos componentes da *Stevia rebaudiana*, esteviosídeo, rebaudiosídeo A, assim como glucose e sacarose. Utilizaram uma coluna hidrofílica, Shodex-OH-pak M-414 (Showa Denko, Japan), com dimensões de 50 cm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno (D.I.). A fase móvel consistiu de acetonitrila:água (4:1), com fluxo de 0,5 mL/min, detectando os compostos através da variação do índice de refração. A capacidade de detecção foi de 1,0 µg e apresentou uma relação linear entre a área dos picos (e também a altura) e as quantidades de adoçantes, fornecendo uma curva de calibração linear e bastante reprodutível.

HASHIMOTO e MORIYASU (1978) utilizaram uma coluna Lichrosorb NH₂ (10µ, 25 cm, 2 mm D.I.), usando como fase móvel acetonitrila:água (85:15) com um fluxo de 1,5 mL/min. A detecção foi efetuada pela absorção ao ultravioleta em 210 nm, obtendo excelentes resultados.

Outro método foi desenvolvido por AHMED *et al.* (1980) para analisar os glicosídeos da estévia, através de CLAP, usando os derivados dos grupos carboxílicos do esteviolbiosídeo e do rebaudiosídeo-B com brometo de p-bromofenacil. Estes derivados apresentam a vantagem de aumentar a capacidade de detecção ao ultravioleta em comprimento de onda fora da faixa de absorção dos solventes. A coluna utilizada para a separação dos derivados foi de µ-bondapac C₁₈, e acetonitrila:água (3:2) como fase móvel, num fluxo de 0,5 mL/min e detector de ultravioleta (UV) à 258 nm. Porém, este processo é trabalhoso e apresenta o inconveniente da interferência de outros glicosídeos como os rebaudiosídeos D e E que também produzem, por hidrólise alcalina, o esteviosídeo e o rebaudiosídeo B.

Desta forma, AHMED e DOBBERSTEIN (1982b) desenvolveram um método de CLAP, no qual a análise foi feita diretamente com o extrato aquoso da planta e conseguiram boa separação dos oito glicosídeos da estévia. Esses autores utilizaram duas colunas de proteínas I-125, em série (30x0,78 cm), como fase fixa e 1-propanol como fase

móvel, com fluxo de 1,0 mL/min. A detecção foi feita em espectrofotômetro UV em 210 nm. Assim, todos os glicosídeos deram respostas linear na detecção quando aplicadas amostras entre 0,2 e 100 µg, produzindo curvas padrão bastante lineares.

AHMED e DOBBERSTEIN (1982a) estudaram também a melhor forma de extração das folhas de estévia para otimização da análise por CLAP. O extrato aquoso apresentou baixa resolução quando aplicada na coluna de proteína I-125. O extrato butanólico simples mostrou-se não quantitativo e de baixa reprodutibilidade. A extração das impurezas da solução aquosa com clorofórmio-metanol (9:1) não melhorou a resolução. Tratamento da solução aquosa com carvão ativo, hidróxido de cálcio, hidróxido de bário ou acetato de chumbo remove as impurezas do extrato, mas resulta em parcial absorção ou precipitação dos glicosídeos diterpênicos. Uma extração satisfatória foi feita tratando-se as folhas, previamente, com clorofórmio em “sohxlet”, para desengorduramento, seguido de extração com metanol. O extrato metanólico contém, quantitativamente, os glicosídeos da planta, pois tanto o extrato clorofórmico prévio como o extrato aquoso feito após a extração com metanol, apresentaram-se destituídos dos princípios adoçantes. Estes autores verificaram ainda que o processo de extração, proposta por HASHIMOTO *et al.* (1978), extrai somente 52,78 % do esteviosídeo, 43,32 % do rebaudiosídeo C e 48,61 % do rebaudiosídeo A. AHMED e DOBBERSTEIN (1982a) concluíram ainda que estes resultados, provavelmente, foram devido à pequena quantidade de água utilizada na extração.

GUIMARÃES *et al.* (1983) trabalhando com a técnica de AHMED e DOBBERSTEIN (1982b) não tiveram sucesso utilizando 1-propanol como fase móvel, e para obterem resultados satisfatórios, usaram simplesmente água destilada como fase móvel.

A empresa japonesa SHIMADZU CO. (1983) que fabrica equipamentos analíticos, patenteou um processo analítico de cromatografia por CLAP, no qual efetua-se uma extração dos princípios edulcorantes da estévia com acetonitrila:água em presença de fosfato. A análise de CLAP foi efetuada com uma coluna de sílica-NH₂ e uma fase móvel de acetonitrila:água:fosfato. A detecção foi feita pela absorção de luz UV ou pela variação de índice de refração, e assim, quantificaram simultaneamente esteviosídeo, rebaudiosídeo A e esteviolbiosídeo.

MAKAPUGAY *et al.* (1984) apresentaram um sistema para CLAP para os glicosídeos da estévia, utilizando uma coluna Zorbax NH₂ com dimensões de 24 cm de comprimento e 0,4 cm de diâmetro interno. O eluente utilizado foi acetonitrila:água (84:70) em pH 5,0 e detecção em UV a 210 nm. Os oito glicosídeos derivados da estévia foram assim separados, detectados e quantificados simultaneamente, sem haver necessidade de derivatizações.

NIE *et al.* (1985), AHMAD e WONG (1985) e STRIEDNER *et al.* (1991) utilizaram o mesmo método de MAKAPUGAY *et al.* (1984), diferenciando apenas na preparação da amostra, comprimento da coluna ou sistema de detecção.

Outro método utilizado em CLAP consiste num sistema que utiliza uma coluna de fase reversa (sílica- C₁₈ ou octadecilsilano ODS). Os primeiros a usarem esta técnica foram os chineses PENG *et al.* (1985), que usaram metanol:água como fase móvel e detecção em UV a 205 nm. O método apresentou um limite de detecção, para o esteviosídeo de 0,2 µg e a recuperação foi em torno de 100%. Também GALIARDI *et al.* (1986) utilizaram a CLAP em fase reversa.

KASAI *et al.* (1988) desenvolveram um sistema de CLAP preparativo utilizando uma coluna de partículas esféricas de hidroxapatita como fase fixa e solução aquosa de acetonitrila como fase móvel. Este sistema se mostrou, segundo os autores, mais eficiente em separar os glicosídeos da estévia do que os sistemas de coluna de sílica gel. YUAN *et al.* (1988) utilizaram a CLAP para quantificar esteviosídeo e rebaudiosídeo A em soro, urina e fezes humanas, enquanto que STRIEDNER *et al.* (1991) usaram este método para analisar quantitativamente o esteviosídeo em culturas de células de estévia.

KIM *et al.* (1983) compararam os métodos analíticos de quantificação dos glicosídeos da estévia, quanto à reprodutibilidade e recuperação. Os métodos analisados foram: CLAP, CCD e CCD-DIC (detector de ionização de chama) e observaram que a CLAP apresentou os maiores níveis de recuperação do esteviosídeo e do rebaudiosídeo A. A comparação mostrou uma nítida vantagem analítica para os métodos de CLAP.

2.2.4.5 Métodos Colorimétricos

A análise colorimétrica seletiva para quantificar os glicosídeos diterpênicos da estévia é muito difícil devido à interferência que esses glicosídeos exercem entre si e com outros compostos que existem no extrato da planta. Desta forma, há sempre a necessidade de uma purificação prévia do composto a ser analisado. Este método apresenta também a inconveniência de ser inespecífico, sofrendo a interferência de outros glicosídeos existentes nas folhas.

2.2.4.6 Métodos Enzimáticos

Também pode ser realizada a quantificação do esteviosídeo através de hidrólise enzimática, porém alguns cuidados devem ser tomados em sua aplicação, tais como a fonte de enzima impura. Além disso, a dosagem pode sofrer interferência de outros glicosídeos, como os rebaudiosídeos e os flavonóides existentes nas folhas de estévia.

2.2.4.7 Método de Espectrometria de Reflectância no Infravermelho Próximo (ERIP)

O sistema de ERIP (WETZEL, 1983) mostrou ser uma técnica muito útil para a medição da percentagem de esteviosídeo diretamente nas folhas moídas de estévia, num tempo bastante reduzido (menos de 1 minuto) com menos de 10 gramas de material, conforme desenvolveu NISHIYAMA *et al.* (1992). O método analisa a quantidade de esteviosídeo, que pode ser correlacionada com o teor de carboidratos solúveis presentes nas folhas. É bastante recomendado para análises imediatas da matéria prima nas indústrias de extração, e nos campos de cultivo.

Dentre todos os métodos citados, parece que o mais apropriado seria o da cromatografia líquida de alta pressão (CLAP), desde que se tenha uma forma eficiente de extração das folhas da planta. O método espectrométrico (ERIP) pode ser de grande ajuda, uma vez que pode ser calibrado para qualquer um dos componentes glicosídicos da estévia, podendo-se obter, com um programa adequado de computador, parâmetros analíticos múltiplos com uma única medida direta (ALVAREZ, 1984).

2.2.5 Processos de Extração dos Princípios Adoçantes

No decorrer dos estudos da estévia, desenvolveram-se vários processos de extração e purificação dos princípios ativos da planta visando a produção industrial. Todos os processos apresentados na literatura seguem, aproximadamente, a mesma metodologia. Na essência, os processos conhecidos isolam os princípios adoçantes usando um solvente altamente polar como a água. Pode-se observar na **Tabela 2.3** algumas propriedades físico-químicas dos glicosídeos edulcorantes da estévia.

Tabela 2.3 - Propriedades Comparativas de Esteviosídeo e Rebaudiosídeos (CRAMMER, 1987).

Propriedades	Esteviosídeo	Reb. A ⁽¹⁾	Reb. B ⁽²⁾	Reb.C ^(3b)	Reb.D ^(3a)	Reb.E ⁽²⁾
Peso Molecular	805	966	805	950	1128	966
Teor aproximado nas folhas secas	5-22	1.5-10	0.4	0.4	0.03	0.03
Ponto de Fusão	196-198	242-244 ^a 248-250 ^b	193-195	215-217	283-286	205-207
Rotação Específica [α] _D ²⁵ (graus)	39.3 e=5.7(água)	-20.8 e=1(MeOH)	-45.4 e=0.96(MeOH)	-29.9 e=1(MeOH)	-22.7 e=1(MeOH)	-34.2 e=1(MeOH)
Característica de Solubilidade	0.13%-água Levemente solúvel em EtOH Solúvel em dioxano	Solúvel em água, MeOH, EtOH Insolúvel em acetona, CHCl ₃ ou éter	Levemente solúvel em MeOH			

Referências: (1) KANEDA *et al.* (1977); (2) KOHDA *et al.* (1976); (3)b SAKAMOTO *et al.* (1977); (3)a SAKAMOTO *et al.* (1977); (a) KOHDA *et al.* (1976); (b) MORITA *et al.* (1977a).

Numa primeira fase, as folhas de estévia são extraídas com água ou álcoois (etanol ou metanol) a quente, por infusão ou percolação, obtendo-se um nível máximo de extração em torno de 50% do peso da folha, na forma de uma solução carregado de partículas coloidais de cor marrom escuro, contendo todos os princípios ativos, pigmentos foliares, polissacarídeos solúveis e outras impurezas. Alguns processos fazem o desengorduramento prévio das folhas com solventes apolares como clorofórmio ou hexano (TANAKA *et al.*, 1977; MASUYAMA, 1980; KINGHORN *et al.*, 1982) para a eliminação preliminar de óleos essenciais, lipídios, clorofila e outros princípios apolares.

O extrato cru das folhas da estévia tem um gosto mais doce e menos amargo que o esteviosídeo purificado. Isto porque se sabe que os rebaudiosídeos e dulcosídeos contém mais princípios adoçantes que o esteviosídeo. O mais importante glicosídeo diterpênico e o de doçura mais intensa é o rebaudiosídeo A. As folhas da *Stevia rebaudiana* Bertoni não contém somente os oito glicosídeos adoçantes, mas também sete glicosídeos flavonóides tais como a centauridina e a quercitrina; diterpenos labdanos tais como o janol e a austroinulina; triterpenos tal como o lupiol e taninos ao quais não foram ainda identificados (CRAMMER, 1987).

Os rebaudiosídeos, como o esteviosídeo, são somente encontrados nas folhas e flores da *Stevia rebaudiana* Bertoni. A aglicona conhecida como esteviol é uma porção encontrada tanto no esteviosídeo quanto nos rebaudiosídeos. O esteviol tem sido sintetizado por vários grupos, porém um baixo rendimento total mostra que caminhos sintéticos para a produção dos rebaudiosídeos são, ainda, antieconômicos (CRAMMER, 1987).

O esteviosídeo não é encontrado somente na *Stevia rebaudiana* Bertoni. Podemos, entretanto, encontrar esteviosídeo na natureza em três espécies de dois gêneros de duas famílias distintas de estévia, a *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (BERTONI, 1909) e a *Stevia aristata* (BRÜCHER, 1974) da família das compostas e a *Rubus suavissimus*, da família das rosáceas, além do seu similar rubosídeo, extraído da *Rubus chingi* (XU *et al.*, 1982).

Além dos princípios adoçantes existentes nas folhas da *Stevia rebaudiana* Bertoni, muitos outros compostos têm sido isolados desta planta. ALVES (1975) extraiu giberilina A-20 de raízes (1.2 – 2.0 µg de GA₂₀ por Kg de raízes frescas), um fito hormônio da *Stevia rebaudiana*. SUSUKI *et al.* (1976) , isolaram e identificaram a rutina, um pigmento flavonóide de cor amarela, em culturas de calos de folhas de estévia. Este flavonóide tem aplicações terapêuticas como fortalecedor de vasos capilares e tem, também propriedades cardiotônicas. Provavelmente, dado à coloração amarelada dos extratos, as folhas da *Stevia rebaudiana* devem conter também quantidades apreciáveis de rutina (SUSUKI *et al.*, 1976). NABETA *et al.* (1976) , também trabalhando com cultivo de calos de folhas de estévia, isolaram destas células estigmasterol (0.9 mg%) e fitosteróis(53 mg%).

DARISE *et al.* (1983) isolaram das flores de *Stevia rebaudiana* esteviosídeo (0.92%) e rebaudiosídeo A (015%), quantidades estas insuficientes para uma extração economicamente viáveis.

CHANG *et al.* (1983) fizeram uma análise completa do extrato aquoso das folhas de estévia no intuito de determinar a sua composição não glicosídica. Esses autores mostraram que 30% dos sólidos totais da estévia são glicosídios esteviosídicos, permanecendo 70% de impurezas de natureza orgânica e inorgânica. Os pigmentos encontrados no extrato foram as clorofilas α e β, xantofilas, β carotenos e outros dois pigmentos não identificados. O conteúdo de gomas foi de aproximadamente 7 a 15 % do total de sólidos, sendo que a principal goma contida foi a goma arábica, e traços da goma

Karaya. O conteúdo de matéria orgânica, como íons alcalinos, especialmente o K^+ , e ácidos orgânicos como o ácido tartárico (mais abundante), o ácido fórmico e o ácido cítrico, foi de aproximadamente 13 % dos sólidos.

2.2.6 Processos de Purificação dos Princípios Adoçantes

Vários métodos são utilizados para a purificação do extrato da estévia, a clarificação do extrato, isto é, a remoção do máximo de impurezas, a fim de tornar o xarope claro, contendo praticamente o conteúdo integral dos princípios adoçantes. Podemos separar os métodos existentes para os processos de clarificação em seis grupos:

O primeiro grupo de processos utiliza $Ca(OH)_2$, CaO_2 , $CaCO_3$ ou sais de Al, Fe e Mg (KIKUCHI, 1977; WOKAI, 1979; ISHIZONE, 1979; FUJI, 1980; TAMA, 1980; YAMADA, 1980; TOYO, 1980; SEKISUI, 1983; LI *et al.*, 1984 e GIOVANETTO, 1989) como agentes precipitantes das impurezas do extrato seguido de deionização através de resinas trocadoras de íons de natureza catiônica e aniônica (KIKUCHI *et al.* 1977; FIJI, 1980; KUBOMURA *et al.*, 1976; TAMA, 1982 e GIOVANETTO, 1989), resinas não apolares (TOYO, 1980; SAWAGUSHI *et al.*, 1977; OKANE, 1977; ISHIZONE, 1979; MIWA, 1979 e CHANG *et al.*, 1985) obtendo vários graus de clarificação e purificação do extrato.

O segundo grupo utiliza somente íons metálicos como coagulantes na clarificação do extrato aquoso. O $CaCO_3$ em H_2O_2 (MASUYAMA, 1980); em meio alcalino (CHISSO, 1980); $CaCl_2$; $AlCl_3$; $FeCl_2$; $Ca(OH)_2+CO_2$ ou $Fe_2(SO_4)_3 /Ca(OH)_2$ (TAKAMURA *et al.*, 1977 e 1978; SATO, 1980; WAKABAYASHI, 1981; MITSUBISHI, 1983; ZI *et al.*, 1984 e 1986) e $MgCO_3$ ou $Mg(OH)_2$ com aeração (TAKAMURA *et al.*, 1977), $Mg(OH)_2$ calcinado como adsorvente (YOKOYAMA e SUGIYAMA, 1990) ou ainda $Ca(OH)_2/CaCO_3$ (CARNADAS e PRYLUKA, 1985) são os mais usados para o processo de clarificação do extrato.

O terceiro grupo de processos utiliza somente resinas trocadoras de íons ou resinas adsorventes para descolorização do extrato. Estes processos utilizam a HP-20 (copolímero divinilbenzeno-estireno) como resina adsorvente (OHE *et al.*, 1977) ou diaion HP-10,

diaion HW, duolite S-37 e amberlite IRA-93 como resinas porosas, aniônicas fracas, levemente básicas (MARUZEM, 1980; TOYO, 1981; HAGA *et al.*, 1976) ou sistemas de resinas trocadoras de íons (mistura de IR-120, IRA-68, IR-120-B, IRA 411) (OHE *et al.*, 1977). Utilizaram ainda amberlite XE-275, amberlite XAD-7 e amberlite IR-120 (KIUNI *et al.*, 1977; PERSINOS, 1970; AQUINO *et al.*, 1985), resinas ligadas à celulose (SEKISUI, 1984) e resinas macrorreticulares (BIAN *et al.*, 1986), sendo que, também, alguns pesquisadores utilizam carvão ativo como adsorvente de impurezas (MIZUFUME *et al.*, 1987), produzindo um bom nível de clarificação e edulcorantes com paladar mais agradável.

O quarto grupo de processos se utiliza da purificação por eletrólise, com eletrodos de alumínio, em meio contendo NaCl (MIWA *et al.*, 1979a) ou meio com $\text{Al}(\text{SO}_4)_3$ ou AlCl_3 como condutores (MIWA *et al.*, 1977b e 1978) ou ainda uma composição de eletrólise, eletrodialise e tratamento com resinas trocadoras de íons (MIWA, 1979; ADUCCI *et al.*, 1987).

O quinto grupo destes processos reside no tratamento do extrato aquoso das folhas de estévia com solventes orgânicos como os álcoois de 4 a 8 carbonos e cristalizados em metanol (WOSHIRO *et al.*, 1980; ASANO *et al.*, 1975) ou o fracionamento com sistema de solventes (ALVAREZ *et al.*, 1984), ou cristalizações fracionadas em álcoois (AJINOMOTO *et al.*, 1981a e 1981b; HUANG, 1982) e ainda com um sistema metanol-clorofórmio extraído com água (MOCHIDA *et al.*, 1977) obtendo de imediato o esteviosídeo cristalino e outros produtos. Alguns utilizam, ainda, uma seqüência de tratamentos com sais complexos como $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ e CaCO_3 procedendo extrações sucessivas com solventes como éter, acetona e etanol (LI *et al.*, 1983; TAKAHASHI *et al.*, 1987) ou com o composto $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{Ca}(\text{OH})_2$ (ARASHI, 1987).

O sexto grupo trata-se de processos que envolvem o clareamento do extrato aquoso da estévia com polieletrólitos que fazem a coagulação e decantação das impurezas. Desta forma, o tratamento do extrato aquoso com cloreto de benzalcônio (MOCHIDA *et al.*, 1977) ou com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou $\text{Al}(\text{SO}_4)$ seguido de agregação com uma amida poliacrílica ou outro polímero floculante (MITSUBISHI *et al.*, 1983b e NOKADA, 1977) consegue remover boa parte das impurezas do extrato, tornando-o bastante clarificado.

Com a clarificação do extrato das folhas de estévia, que é parte da extração que diferencia os métodos, esta é processada a seguir, praticamente, da mesma maneira em todos os sistemas. A solução é concentrada e redissolvida em metanol para proceder a

crystalização do esteviosídeo. A recristalização é feita no mesmo solvente, obtendo-se esteviosídeo praticamente puro.

Outro método de extração é o fracionamento dos princípios ativos para fins analíticos desenvolvido por KINGHORN *et al.* (1982), no qual o extrato aquoso é extraído com butanol e a solução concentrada. O resíduo é cromatografado em um sistema de contracorrente conseguindo boa separação do esteviosídeo, rebaudiosídeo A e dulcosídeo A.

Interessante método foi desenvolvido, também, por KATO *et al.* (1977) para extração do esteviosídeo, no qual após a extração, os autores purificaram o extrato aquoso ou aquoso-alcoólico pelo uso de membranas semi-permeáveis de acetato de celulose e por ultrafiltração o líquido foi filtrado em membrana de poliacrilonitrilo fornecendo um permeado, que ao ser concentrado, produz esteviosídeo com aproximadamente 80% de pureza. Semelhante sistema foi usado por FUH *et al.* (1990), na Universidade de Taiwan, os quais utilizaram um sistema de ultrafiltração por membrana para remover acima de 96% da pigmentação do extrato aquoso das folhas de estévia e posterior concentração do extrato por osmose reversa. A clarificação final foi feita com troca iônica em resinas aniônicas e catiônicas.

Na última década, novos processos usando tecnologia avançada vêm sendo experimentados. TANAKA *et al.* (1988) desenvolveram um processo de extração de folhas de estévia através de CO₂ super crítico em presença de metanol, extraíndo esteviosídeo e rebaudiosídeo A com 17,5% de rendimento. Trabalho semelhante foi feito por KIENLE (1989), na Europa, o qual extraiu previamente as graxas e pigmentação contaminantes das folhas da estévia com CO₂ super crítico, extraíndo posteriormente, de maneira convencional os princípios adoçantes.

Existe um interesse particular para a extração, além do esteviosídeo, também dos rebaudiosídeos, que têm um sabor menos amargo e mais doce que o esteviosídeo, principalmente o rebaudiosídeo A, por ser o rebaudiosídeo que está em maior quantidade no extrato e o mais doce (GRENBY, 1987). Para tanto, foi desenvolvido um processo de separação do esteviosídeo e rebaudiosídeos a partir de um extrato de folhas de estévia clarificado por MARUZEN *et al.* (1982). A mistura foi tratada com álcoois de 3 a 6 carbonos, solubilizando o esteviosídeo e permanecendo na fração insolúvel o rebaudiosídeo A.

A TOYO SUGAR REFINING CO. LTD. (1981) desenvolveu um outro processo com a finalidade de se fazer a separação do esteviosídeo dos rebaudiosídeos. Utilizou para tanto uma resina adsorvente moderadamente polar, com um valor de saturação menor que o conteúdo de rebaudiosídeo e esteviosídeo, porém maior do que o teor de esteviosídeo. A corrente que deixa a coluna de resinas contém o rebaudiosídeo e o esteviosídeo fica adsorvido na resina, separando, pois, os dois componentes.

Os processos que utilizam somente íons metálicos para clarificação são bastante simples e econômicos, entretanto, apresentam o inconveniente de deixarem resíduos dos sais aplicados, que muitas vezes podem afetar a saúde dos consumidores dos produtos. Sob este aspecto, leva grande vantagem os processos com íons metálicos onde, posteriormente, os extratos clarificados são deionizados por resinas trocadoras de íons que praticamente eliminam aquele tipo de impureza. Estas resinas, no entanto, tornam os processos menos econômicos pois deve-se considerar que o seu custo é bastante alto, o que implica na sua recuperação a cada operação, além disso, as resinas deixam resíduos macromoleculares como solutos que muitas vezes podem ser danosos à saúde, sendo proibidos em alguns países como o Japão. Esta recuperação, por sua vez, envolve toda uma tecnologia operacional que consome reagentes e mão-de-obra, além disso, as resinas não são perenes, tornando-as ainda mais dispendiosas (ALVAREZ,1984).

Os processos de eletrólise implicam também em deionização. Portanto, os processos que utilizam solventes voláteis na extração parecem ser os mais práticos pois apresentam um baixo custo, além de serem quase totalmente recuperáveis e recicláveis, além de bastante seletivos quanto à polaridade dos solutos a serem extraídos, permitindo uma operacionalidade mais simples e menos onerosa. Há, entretanto, a necessidade de remoção completa dos resíduos de solventes, pois os mesmos podem ser danosos à saúde.

Sendo assim, torna-se muito importante os processos que utilizam os sistemas de membranas de ultrafiltração/diafiltração e osmose reversa, que separam os componentes de acordo com os diferentes pesos moleculares, e reduzem substancialmente os níveis de impurezas e os volumes a serem manipulados dando, provavelmente, uma economicidade bastante grande aos processos de purificação.

2.3 Processos de Separação com Membranas (PSM)

Historicamente, a tecnologia de membrana deixou de ser uma técnica de laboratório ao final dos anos 60, depois da descoberta fundamental das membranas assimétricas. Essas membranas têm permeabilidade à água cem vezes maior que a das membranas assimétricas (MAUBOIS, 1991).

A tecnologia de membranas é uma tecnologia emergente porque tem uma característica multidisciplinar e pode ser usada num grande número de processos de separação. Os benefícios da tecnologia de membranas podem ser resumidos em:

- **Economia de energia**

Os processos de separação por membranas, em sua grande maioria, promovem a separação sem que ocorra uma mudança de fase, o que significa uma economia energética. Isto explica porque houve um grande impulso desta tecnologia durante os anos 70, quando houve uma grande crise energética, devido os altos preços do petróleo.

- **Seletividade**

É uma característica importante nos processos de separação. E nos processos híbridos, que envolvem processos clássicos e processos com membranas, cada qual atuando onde é mais eficiente, tem se mostrado como opção mais econômica e eficiente de separação. Em algumas aplicações estes processos se apresentam como a única alternativa técnica de separação.

- **Separação de Termolábeis**

Normalmente, as separações com membranas são operadas à temperatura ambiente, assim, eles podem ser aplicados no fracionamento de misturas envolvendo substâncias termo sensíveis. Por isso eles têm sido largamente empregados na indústria farmacêutica e de alimentos e, mais recentemente, como uma alternativa de “Down Stream Processes” em biotecnologia.

- **Simplicidade de Operação e “Scale-up”**

Ao contrário da maioria dos processos de separação, os processos com membranas apresentam ainda, a vantagem de serem extremamente simples do ponto de vista

operacional, pois na maioria das vezes o processo de separação ocorre continuamente; e em termos de “scale-up”. Os sistemas são modulares e os dados para o dimensionamento de uma planta podem ser obtidos a partir de equipamentos pilotos operando com módulos de membranas de mesma dimensão daqueles utilizados industrialmente. Além de ser um processo de simples operação, é não intensivo em mão de obra e não requerem aditivos (NÓBREGA *et al.*, 1997).

E os seguintes obstáculos podem ser mencionados:

- Concentração, polarização “fouling”
- Tempo de vida útil relativamente baixo
- Geralmente baixa seletividade

2.3.1 Membranas

As membranas sintéticas surgem como uma tentativa de se imitar as membranas naturais, em particular quanto as suas características únicas de seletividade e permeabilidade.

É difícil encontrar a definição exata de membrana. Uma definição geral poderia ser: uma barreira que separa duas fases e que restringe, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes nas fases. Deve-se notar que esta é uma definição macroscópica enquanto que a separação deve ser considerada em nível microscópico (NÓBREGA *et al.*, 1997). A representação esquemática de um processo com membranas é mostrado na **Figura 2.4**.

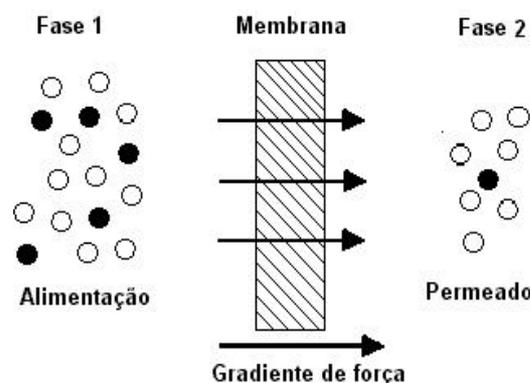


Figura 2.4 - Representação Esquemática de Duas Fases Separadas por uma Membrana (MULDER, 1990).

As membranas podem ser classificadas de acordo com sua evolução tecnológica em; primeira geração – membranas de acetato de celulose; segunda geração: polímeros sintéticos, principalmente derivados de polissulfona e poliolefina, e terceira geração: membranas cerâmicas ou minerais.

As primeiras membranas foram desenvolvidas por LOEB e SOURIRAJAN (citado por MELLO, 1989) para dessalinização da água do mar e apresentaram restrições relação à temperatura ($T < 50^{\circ}\text{C}$) e pH (3 a 8), além da sensibilidade à microorganismo e agentes sanitizantes (MAUBOIS, 1980).

As membranas de segunda geração apresentam uma resistência maior à temperatura ($T < 75^{\circ}\text{C}$) e pH (2 a 12); boa resistência a compostos clorados (até 200 ppm) e uma baixa resistência à compactação mecânica (GLOVER, 1986).

As membranas de terceira geração têm suporte de grafite e são de óxido de zircônio. Apresentam a vantagem de serem quimicamente inertes, possuem alta resistência mecânica, suportando altas pressões (20 bar) sem perder as propriedades de permeação. Além disso, toleram todo o intervalo de pH (0 a 14) e temperaturas superiores a 400°C (SUTHERLAND e FREE, 1991). Podem ser usadas para altos níveis de concentração, o que não ocorre com as membranas de primeira e segunda geração que não resistem à solicitação mecânica devido à compactação (MAUBOIS, 1980).

Comercialmente foram desenvolvidas quatro configurações diferentes: de placas, tubular, espiral e fibras ocas ou capilares. As diversas configurações contém e dão suporte

às membranas. Cada tipo tem vantagens e desvantagens com relação ao desempenho, custos de investimento e operação, volume morto e consumo de energia.

A configuração espiral e a de fibras capilares, por serem estruturas mais densamente empacotadas, ocupam menor espaço de instalação e apresentam menor consumo de energia em relação à configuração tubular. Por outro lado, a estrutura tubular para o uso de fluidos mais viscosos ou altamente concentrados e também é mais vantajosa em relação à limpeza. Já a configuração de placas apresenta baixo volume morto e consumo de energia (GLOVER, 1986).

2.3.2 Morfologia de Membranas, Força Motriz e Transporte

As membranas sintéticas comerciais, em sua grande maioria, são preparadas à partir de materiais poliméricos com características químicas e físicas as mais variadas. Membranas de materiais inorgânicos são produzidas a mais de 20 anos, mas só recentemente começam a disputar o mercado com as membranas poliméricas. As membranas inorgânicas apresentam uma vida útil maior mas são bem mais caras que as poliméricas.

Em função das aplicações a que se destinam, as membranas apresentam diferentes estruturas. De uma maneira geral as membranas podem ser classificadas em duas grandes categorias: densas e porosas. As características da superfície da membrana que está em contato com a solução problema é que vão definir tratar-se de uma membrana porosa ou densa. Tanto as membranas densas como as porosas podem ser isotrópicas ou anisotrópicas, ou seja, podem ou não apresentar as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura. As membranas anisotrópicas se caracterizam por uma região superior muito fina ($\approx 1\mu\text{m}$), mais fechada (com poros ou não), chamada de “pele”, suportada em uma estrutura porosa. Quando ambas as regiões são constituídas por um único material, a membrana é do tipo anisotrópica integral. Caso materiais diferentes sejam empregados no preparo de cada região, a membrana será do tipo anisotrópica composta (NÓBREGA *et al.*, 1997).

Os principais processos de separação com membranas utilizam como força motriz o gradiente de potencial químico e/ou o gradiente de potencial elétrico. Como os processos com membranas são, em sua grande maioria, atérmicos, o gradiente de potencial químico é expresso em termos do gradiente de pressão, concentração ou pressão parcial. Em função do tipo de morfologia da membrana e do tipo de força motriz empregada o transporte das diferentes espécies através da membrana pode ocorrer pelo mecanismo convectivo ou difusivo. Para membranas porosas, em função do tipo de força motriz aplicada, o transporte das espécies através da membranas pode ser tanto convectivo como difusivo. Quando a força motriz é o gradiente de pressão, o fluxo permeado é fundamentalmente convectivo (NÓBREGA *et al.*, 1997).

2.3.3 Materiais

As membranas sintéticas comerciais são produzidas a partir de duas classes distintas de material: os polímeros, na sua grande maioria materiais orgânicos, e os inorgânicos, como metais e cerâmicos.

Membranas para processos que utilizam gradiente de pressão estão disponíveis num número de diferentes materiais incluindo polímeros, cerâmicas, vidros e metais. Nem todos os materiais podem ser utilizados em todos os processos, por exemplo, todas as membranas de osmose inversa são feitas geralmente a partir de polímeros, enquanto o vidro é limitado à faixa de ultrafiltração (SCOTT e HUGHES, 1996).

Entre os polímeros mais utilizados para a preparação de membranas de ultrafiltração estão: poliamida, polissulfona, polietersulfona, polieterimida, acetato de celulose celulose regenerada e, mais recentemente, polifluoreto de vinilideno (PVDF) (KESTING, 1985, *apud* PETRUS, 1997).

❖ Polissulfona

Este é um polímero de engenharia que pode ser usado para membranas de micro e ultrafiltração. Para ultrafiltração está disponível em curvas de corte de peso molecular nominal na faixa de 2 – 1000 kDa. As membranas de polissulfona têm boa estabilidade

química e de temperatura, permitindo operações até 80 °C, e toleram um pH a partir de 1,5 até 12 para limpeza. Além disso, apresentam alguma tolerância a agentes de oxidação tais como o cloro. A exposição prolongada, ou contato com altas concentrações, pode causar fissuras na membrana (SCOTT e HUGHES, 1996).

❖ **Polietersulfona**

Este material tem limites térmicos e químicos similares à polissulfona, assim como um similar ponto de corte. Entretanto, pode apresentar uma performance diferente quando em contato com o fluido em processo (SCOTT e HUGHES, 1996).

❖ **Celulose Regenerada**

A celulose é um polissacarídeo obtido das plantas. É formada por segmentos de glicose e seu peso molecular varia de 500.000 a 1.500.000. Os segmentos de glicose contém três grupos hidroxilas, os quais são muito susceptíveis à reações químicas, formando ésters (acetato de celulose e nitrato de celulose) e éters (etil celulose). Devido à sua cadeia linear , a celulose ou celulose regenerada é totalmente cristalina, muito hidrofílica e não solúvel em água.

Apesar de suas excelentes propriedades, ésters de celulose são muito sensíveis ao calor e degradações química e biológica. A respeito de tais degradações, o pH deve ser mantido entre 4 e 6,5, e a temperatura ambiente. Em condições alcalinas, a hidrólise ocorre muito rapidamente (SCOTT e HUGHES, 1996).

2.3.4 Caracterização de Membranas

Os processos de separação com membranas têm sido aplicados no fracionamento de misturas, soluções e suspensões envolvendo espécies de tamanho e natureza química diferentes. Assim, estas aplicações requerem a utilização de membranas com características específicas. O conhecimento da estrutura das membranas e sua relação com as propriedades de transporte é importante para uma melhor compreensão dos fenômenos envolvidos nos problemas de separação.

No caso de membranas porosas, utilizadas em micro e ultrafiltração, o tamanho dos poros e sua distribuição de tamanho irão determinar quais moléculas ou partículas serão retidas pela membrana e quais poderão passar através de seus poros. Via de regra, para este tipo de membrana, o material de que é feita a membrana pouca, ou nenhuma, influência tem na sua capacidade seletiva. Já no caso de membranas densas, como as utilizadas em separação de gases e pervaporação, a não existência de poros faz com que as características físico-químicas do material que constitui a membrana seja determinante em sua performance (NÓBREGA *et al.*, 1997). Na **Tabela 2.4** podemos verificar dimensões de algumas partículas, moléculas e íons.

Tabela.2.4 - Dimensões Aparentes de Pequenas Partículas Moléculas e Íons (NÓBREGA, 1997).

Espécies	Faixa de Tamanho (nm)
Fungos e Leveduras	1.000 – 10.000
Bactérias	300 – 10.000
Emulsões de Óleo	100 – 10.000
Sólidos Coloidais	100 – 1.000
Vírus	30 - 300
Proteínas/Polissacarídeos(PM:10 ⁴ –10 ⁶)	2 - 10
Enzimas (PM: 10 ⁴ – 10 ⁵)	2 - 5
Antibióticos (PM: 300 – 1.000)	0,6 – 1,2
Moléculas Orgânicas (PM: 10 – 100)	0,3 – 0,8
Íons Inorgânicos (PM: 10 – 100)	0,2 – 0,4
Água (PM: 18)	0,2

2.3.5 Fenômenos Envolvidos nos Processos de Separação com Membranas - PSM

Um dos grandes problemas que ocorrem na operação de sistemas de separação com membranas, cuja força motriz é a diferença de pressão, é a redução do fluxo permeado com o tempo. Este fenômeno é transiente e acompanhado por um decréscimo na rejeição de

solutos e a sua estabilização, caso ocorra, pode demorar alguns minutos e até vários dias. O grau com que ocorre este fenômeno depende fortemente do tipo de problema de separação envolvido. Em particular, na micro e ultrafiltração o declínio do fluxo é muito grande, chegando a 5% do fluxo da água pura.

Este declínio do fluxo com o tempo pode ser causado por vários fatores, tais como polarização da concentração, adsorção, formação de camada gel e bloqueio dos poros. Todos estes fatores formam resistências adicionais, pelo lado da alimentação, ao transporte através da membrana. Portanto a equação do fluxo através da membrana pode ser escrita através da Lei de Darcy como:

$$Fluxo = \frac{ForçaMotriz}{Viscosidade \times ResistênciaTotal} \quad (2.1)$$

(NÓBREGA *et al.*, 1997)

No caso de micro, ultra e nanofiltração esta relação pode ser expressa da seguinte maneira:

$$J = \frac{\Delta P}{h \cdot R_{Total}} \quad (2.2)$$

(NÓBREGA *et al.*, 1997)

Em que $R_{total} = R_m + R_a + R_b + R_g + R_{pc}$

Sendo: η = viscosidade do permeado

R_m = resistência intrínseca da membrana

R_a = resistência devido à adsorção

R_b = resistência devido ao bloqueio dos poros

R_g = resistência devido a camada gel

R_{pc} = resistência devido ao fenômeno de polarização da concentração

As várias resistências descritas na **Figura 2.5** contribuem, em diferentes, níveis para a resistência total. No caso ideal somente a resistência (R_m) está envolvida. Como a membrana tem a capacidade de ser seletiva, haverá um acúmulo de moléculas retidas próximas a superfície da membrana. Isto resulta numa região (ou camada) altamente concentrada próxima a membrana, que resultará uma resistência adicional ao transporte de massa, conhecida como resistência devido à polarização da concentração, R_{pc} . Deve-se salientar que o fenômeno de polarização da concentração sempre ocorrerá e é inerente aos processos de separação com membranas.

A concentração de moléculas de soluto acumuladas pode tornar-se tão alta que uma camada gel pode ser formada por precipitação de macromoléculas sobre a membrana, o que acarreta uma resistência adicional, R_g , que provoca uma perturbação no funcionamento hidrodinâmico do sistema. Isto acontece principalmente quando as soluções de alimentação contém proteínas. Esta camada gel atinge, sob condições operacionais constantes, um estado de equilíbrio dinâmico onde as partículas são agregadas e desagregadas à mesma taxa. Pela alteração das condições operacionais, principalmente pelo aumento da velocidade tangencial, parte desta camada de gel pode se deslocar junto com a solução circulante. Por este motivo, o gel parece ser formado, segundo teorias mais recentes, por uma parte móvel e outra estacionária fortemente aderida à superfície da membrana (TARLETON & WAKEMAN, 1993 *apud* PETRUS, 1997).

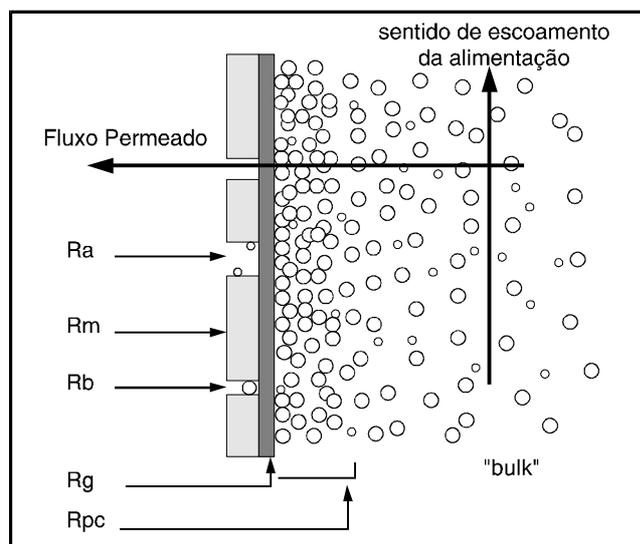


Figura 2.5 - Representação dos Diferentes Tipos de Resistências ao Transporte de Massa em Processos com Membranas (NÓBREGA *et al.*, 1997).

No que diz respeito à macromoléculas, não é possível evitar a formação da camada gel, que passa a ter o efeito de uma segunda membrana aderida à primeira. O controle desta camada pode ser feito, assim como na polarização da concentração, através de baixa pressão e turbulência ou ainda no material que constitui a membrana.

Em função das propriedades físico-químicas tanto da membrana como dos solutos em contato com esta, pode ocorrer um fenômeno de adsorção sobre a superfície da membrana assim como dentro de seus poros. Além disso, o grau de adsorção é função direta da concentração de soluto na interface membrana/solução, ou seja, quanto maior o fenômeno de polarização da concentração, maior será a adsorção. Novamente a consequência será um aumento na resistência ao transporte de massa, alterando as características de transporte da membrana. Pode-se imaginar que a membrana original foi trocada por outra mais fechada, ou de maior resistência. Esta resistência adicional é representada por R_a (PETRUS, 1997).

2.3.6 Processos cuja Força Motriz é o Gradiente de Pressão

Processos para os quais a diferença de pressão é a força motriz têm sido utilizados para concentrar, fracionar e purificar soluções diluídas, em particular soluções aquosas. Em função da natureza e do tipo de solutos e da presença ou não de partículas em suspensão, membranas com diferentes tamanhos e distribuição de poros ou mesmo densas são empregadas, caracterizando os processos conhecidos como Microfiltração (MF), Ultrafiltração (UF) e Osmose Inversa (OI), também chamada de Hiperfiltração. A Nanofiltração (NF) é nome de utilização recente, e define um processo com membranas capaz de efetuar separações de moléculas de peso molecular médio (entre 500 e 2000 Daltons), situando-se, portanto, entre o limite inferior da osmose inversa. Trata-se, portanto, de um processo de ultrafiltração que utiliza uma membrana “fechada” ou de osmose inversa utilizando uma membrana “aberta”.

Os processos de MF, UF, NF e OI podem ser entendidos como uma extensão dos processos de filtração clássica que utilizam, nesta seqüência, meios filtrantes (membranas) cada vez mais fechados, ou seja, com poros cada vez menores. Na **Figura 2.6** são

apresentadas as principais características dos processos com membranas que utilizam a diferença de pressão transmembrana como força motriz (NÓBREGA *et al.*, 1997).

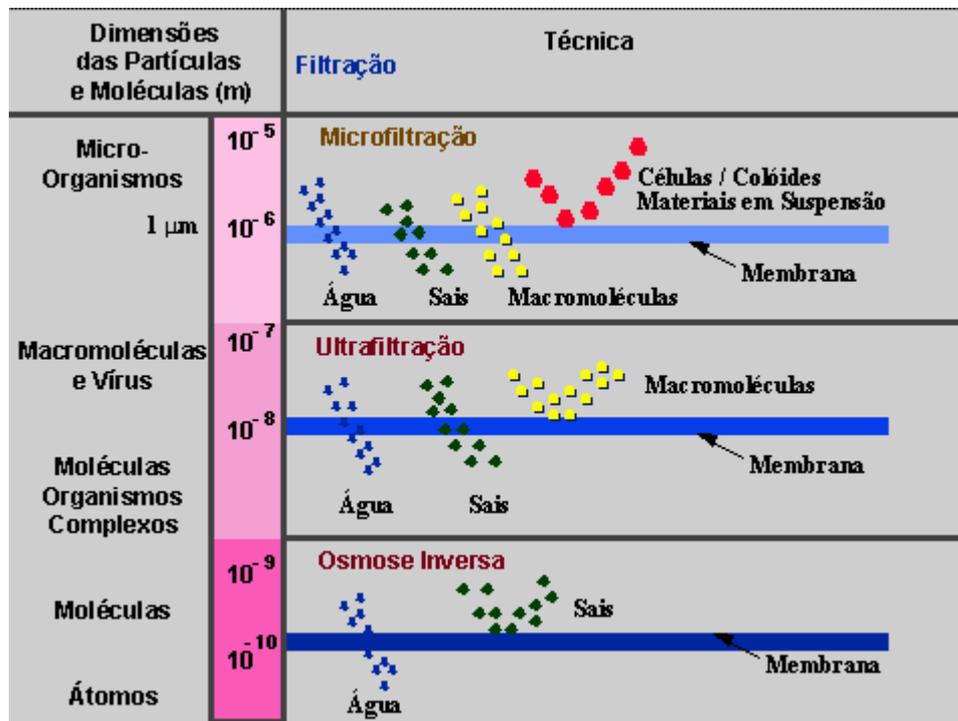


Figura 2.6 - Principais Características dos Processos que Utilizam Diferença de Pressão como Força Motriz (NÓBREGA *et al.*, 1997).

Também são mostradas na **Figura 2.7** as faixas de tamanho dos poros das membranas utilizadas nos processos de Microfiltração, Ultrafiltração, Nanofiltração e Osmose Inversa.

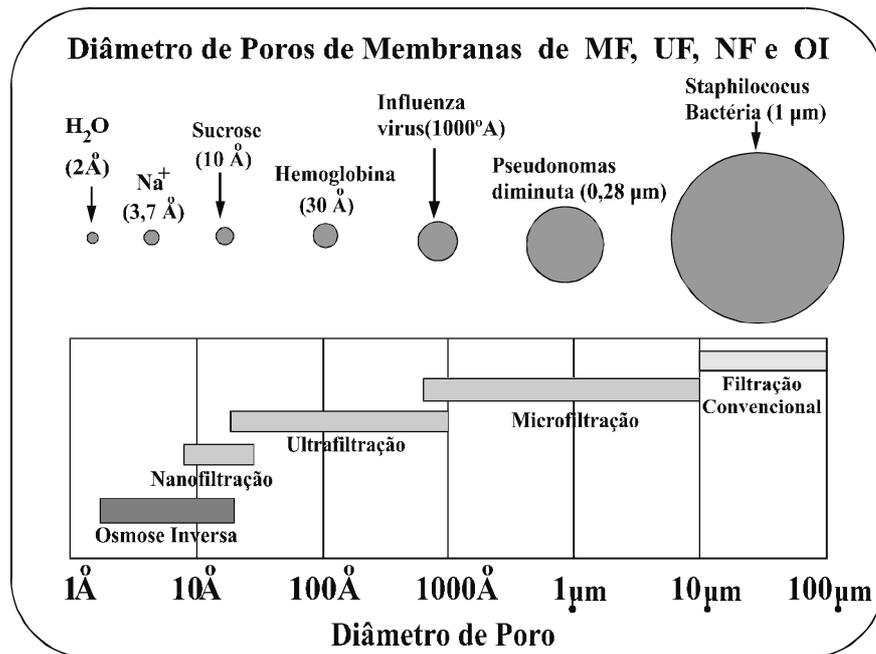


Figura 2.7 - Faixa de Diâmetro de Poros das Membranas de MF, UF, NF e OI (NÓBREGA *et al.*, 1997).

2.3.7 Filtração Convencional e em Fluxo Cruzado

Uma das principais características dos PSMs é que eles podem ser operados em fluxo cruzado ou também chamado de tangencial (“cross flow filtration”) além da operação clássica do tipo “dead end filtration”, ou filtração perpendicular. Na operação do tipo “dead end” uma solução ou suspensão é pressionada contra a membrana. O permeado passa pela membrana e o soluto ou materiais em suspensão são retidos, acumulando-se na interface membrana/solução, no fenômeno chamado polarização de concentração. Na filtração de fluxo cruzado a solução escoia paralelamente a superfície da membrana enquanto o permeado é transportado transversalmente à mesma. Neste caso é possível operar o sistema nas condições de regime estabelecido de transferência de massa. A polarização de concentração continua presente mas, neste caso, é possível minimizar o seu efeito, em particular alterando-se a hidrodinâmica do escoamento da corrente de alimentação. Na **Figura 2.8** são apresentadas esquematicamente os dois modos de

operação, assim como curvas típicas de fluxo permeado em função do tempo, em cada caso (NÓBREGA *et al.*, 1997).

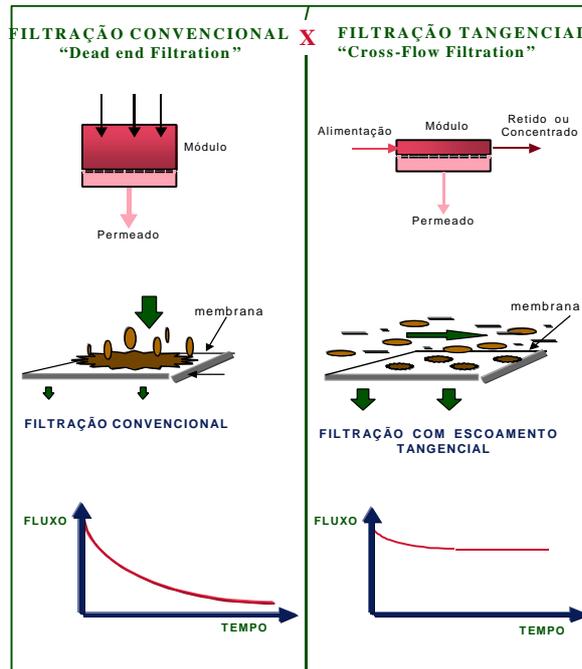


Figura 2.8 - Filtração Convencional (“Dead-End”) x Filtração Tangencial ou em Fluxo Cruzado (“Cross Flow”) (NÓBREGA *et al.*, 1997).

2.3.8 Ultrafiltração

A ultrafiltração (UF) é um processo de separação por membranas utilizado quando se deseja purificar e fracionar soluções contendo macromoléculas. As membranas de UF apresentam poros na faixa entre 1 e 100 nm, portanto mais fechadas do que as membranas de microfiltração. Soluções contendo solutos numa ampla faixa de peso molecular (10^3 - 10^6 Daltons) podem ser tratadas por UF. Como os poros das membranas de UF são muito menores, é necessário uma maior força motriz para se obter fluxos permeados elevados o suficiente para que o processo possa ser utilizado industrialmente.

Ultrafiltração é a separação soluto-solvente através de uma membrana seletiva adequada, por aplicação de uma pressão hidrostática, relativamente baixa, pois o sistema pode operar com pressões menores que 5 atmosferas (BEATON, 1979).

A separação de partículas maiores que 10 μm é feita por filtração convencional, enquanto que partículas menores do que este valor são separadas por filtração de membrana (CHERYAN, 1986; RENNER, 1990).

O desenvolvimento da técnica de UF em escala comercial só foi possível devido às pesquisas de melhoria do material usado na construção e na configuração das membranas (VIOTTO, 1993).

Alguns fatores que distinguem os três processos de membrana; osmose reversa, microfiltração e ultrafiltração são: aplicação de pressão, velocidade de transporte da solução, capacidade de retenção e o intervalo de separação determinado pelo peso molecular ou diâmetro das partículas. A osmose reversa retém íons metálicos, sais, açúcares e outros solutos com peso molecular maior que 150 Daltons, sendo uma técnica de concentração e de purificação de água (FERGUSON, 1989). A osmose reversa requer pressões maiores que 100 atmosferas para vencer a pressão osmótica através da membrana, permitindo, assim, o escoamento em direção contrária ao que ocorreria no processo de osmose. Já a microfiltração é normalmente utilizada para remover partículas em suspensão de células em processos fermentativos e na clarificação de líquidos. Intermediário a estes dois processos encontra-se a ultrafiltração que pode ser localizada como um método simultâneo de fracionamento, concentração e purificação de soluções com solutos de diferentes tamanhos e pesos moleculares (DZIEZAK, 1990).

Tendo em vista que as membranas de UF apresentam uma distribuição de tamanho de poros, elas podem reter de maneira distinta, solutos de peso molecular diferentes. O coeficiente de rejeição, R , de uma membrana para um dado soluto é definido pela relação:

$$R=1-(C_p/C_0) \quad (2.3)$$

Nos quais C_p e C_0 representam a concentração do soluto no permeado e na alimentação, respectivamente. Por este motivo as diferenças de pressão transmembrana variam na faixa de 2 a 10 bar. As membranas de UF são caracterizadas através da chamada curva de corte, que relaciona o coeficiente de rejeição em função do peso molecular do soluto. A **Figura.2.9** apresenta curvas de corte típicas de membranas de ultrafiltração (NÓBREGA *et al.*, 1997).

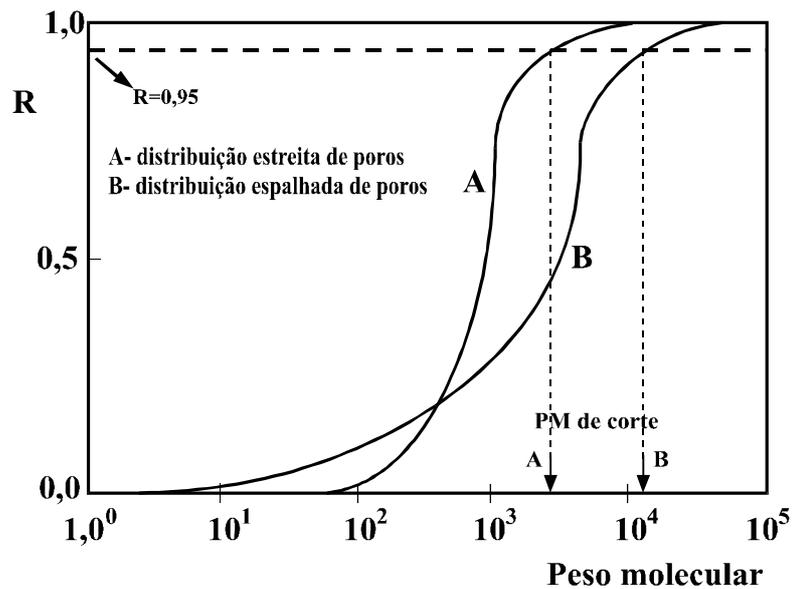


Figura 2.9 - Características de Curvas de Corte Estreita e Espalhada – UF (NÓBREGA *et al.*, 1997).

As membranas de UF normalmente são especificadas através de seu peso molecular de corte ou “cutt-off”. O “cutt-off” de uma membrana é definido como sendo o valor do peso molecular para o qual a membrana apresenta um coeficiente de rejeição de 95%.

Os fluxos de permeados em UF estão, em geral, na faixa de 150 a 250 L/h.m². Fluxos permeados bem menores podem ser obtidos em função do nível de polarização de concentração e de “fouling” a que fica submetida a membrana, em função da natureza da solução a ser tratada e das condições de operação do sistema.

-Aplicações da Ultrafiltração

As principais aplicações da UF são a clarificação, concentração de solutos e fracionamento de solutos. A separação é eficiente quando existe pelo menos uma diferença de 10 vezes no tamanho das espécies.

A UF é largamente utilizada na indústria de alimentos (concentração de gelatinas), bebidas e laticínios, (recuperação do soro do leite, produção do queijo) assim como em aplicações na biotecnologia e na área médica. É também utilizada para recuperação de

tintas coloidais utilizadas na pintura de veículos, recuperação de óleos em indústrias mecânicas, recuperação da goma na indústria têxtil (NÓBREGA *et al.*,1997).

Um dos problemas no mecanismo de ultrafiltração é o declínio do fluxo através da superfície porosa (fluxo transmembrana) com o tempo por causa dos efeitos de incrustação “fouling” de macromoléculas (proteínas, microorganismos, etc.) na superfície da membrana, e da formação da camada do gel polarizado, que trata da acomodação de macromoléculas junto aos poros da membrana.

CHERYAN e KUO (1983) estudaram o efeito de alguns parâmetros tais como: declínio do fluxo transmembrana na ultrafiltração do soro do leite, a taxa de fluxo, tensão de cisalhamento na parede e a pressão transmembrana na ultrafiltração do soro de leite. Esses parâmetros estudados são particularmente importantes no controle do efeito de incrustação da membrana. A partir de uma análise experimental, os autores demonstraram que em geral, altas taxas de fluxo paralelo à membrana reduzem esse efeito. Quanto ao efeito da pressão transmembrana (PT), nota-se uma maior complexidade. Para baixas taxas de fluxo (3L/min) a pressão transmembrana tem pouco efeito; no entanto para altas taxas de fluxo (10L/min), o fluxo aumenta com a pressão quando (PT) for menor que 345 Kpa, e diminui acentuadamente quando (PT) for maior que 485 Kpa.

Em outros trabalhos MERYN e CHERYAN (1980) propuseram um modelo matemático dado por:

$$J = J_0 V^{-b} \quad (2.4)$$

no qual J é o fluxo de permeado, J_0 , o fluxo no tempo zero, V, o volume e b, constante do modelo dada pela incrustação da membrana. Essa equação descreve o declínio do fluxo transmembrana durante a UF do soro de ricota.

EATIN *et al.* (1978) desenvolveram uma técnica de extração de proteína do suco de folhas frescas de alfafa a partir de uma unidade de ultrafiltração. O sistema composto de membranas planas investiga a separação de duas proteínas presentes na alfafa. Parâmetros controladores da eficiência do sistema como: pressão, concentração e velocidade de alimentação são analisados. Observou-se que a pressão transmembrana controla sensivelmente o fluxo e a formação da camada limite de concentração próximo à superfície da membrana. Os autores compararam a proposta com outras técnicas de separação.

O mesmo problema foi estudado por ROBERTSON e ZYDNEY (1990). Os autores estudaram experimentalmente, o efeito da adsorção de proteínas nos poros de membranas presentes em sistema de UF. O fenômeno é direcionado por propriedades químicas e físicas das proteínas como solubilidade, pH, estrutura molecular, etc., e da composição da membrana. Foram desenvolvidos experimentos com suspensão de albumina bovina em membranas poliméricas. Resultados experimentais de permeabilidade hidráulica foram analisados; foi proposto um modelo matemático, função da geometria dos poros, que reduz a permeabilidade associada ao fenômeno. A camada proteica formada sobre a membrana é estimada através das medidas de permeabilidade, e resultados de outros pesquisadores.

CAMPANELLI *et al.* (1992) estudaram a qualidade do suco de laranja e limão concentrados, obtidos pela introdução da UF no processamento desenvolvido por uma indústria, na Itália. Foram feitas análises físico-químicas dos fluxos de permeado e concentrado, a fim de determinar quais os componentes presentes no suco clarificado. Verificaram também a influência do tamanho dos poros da membrana e do tempo no fluxo de permeado. Além disso, constataram através de exames microscópicos da membrana, uma camada fibrosa (camada de gel polarizada), que provavelmente seria responsável pela mudança nas características hidrodinâmicas da membrana e, conseqüentemente, pela queda de fluxo de permeado. CAMPANELLI *et al.* (1992) afirmaram que os fluxos permeados foram fortemente dependentes da velocidade tangencial e quase independente da pressão transmembrana depois de um valor de 0,2 Mpa (30 Psi).

KIRK *et al.* (1983) estudaram a aplicação de UF na clarificação de suco de pêra, observaram a influência dos parâmetros de operação (pressão transmembrana, velocidade linear, temperatura e concentração de alimentação) sobre o fluxo de permeado. Através dos experimentos realizados, eles concluíram que o fluxo de permeado aumentava com o aumento da velocidade linear e da temperatura. No caso da pressão transmembrana, o fluxo de permeado chegou a um valor máximo em 157 Kpa, e para valores superiores a este, o fluxo declinou.

BAKER *et al.* (1970) estudaram a influência da pressão transmembrana, agitação e temperatura no fluxo de permeado para diferentes soluções macromoleculares, em batelada, com recirculação do concentrado. Verificaram que a baixas pressões, os solutos são retidos e o fluxo de permeado é praticamente o fluxo do solvente puro. Já para valores altos de pressão transmembrana foi constatado que o valor de fluxo declinou e,

posteriormente manteve-se constante. Concluíram que nesta região, o fluxo de permeado é influenciado pela temperatura, agitação, concentração de alimentação e tempo de operação.

FANE *et al.* (1981) modificaram o modelo da resistência, para explicar regiões de diferentes permeabilidades. Através de experimentos de UF com solução de proteína e com água. Verificaram que o fluxo de permeado depende da permeabilidade da camada de gel polarizado e da membrana, correlacionando um fator de área livre efetiva da membrana com o declínio do fluxo.

AIMAR *et al.* (1986) estudaram a variação da resistência hidrodinâmica como função do tempo, concentração de proteína e pH, na ausência de alguns íons, para solução de soro de albumina e membranas IRIS 3038. A partir dos resultados obtidos nas corridas experimentais foi possível estimar a importância do efeito de adsorção no fluxo de permeado.

HERNANDEZ *et al.* (1992a) ultrafiltraram suco de laranja fresco em membrana Romicon, fibra-oca com peso molecular de corte de 500.000 Daltons e analisaram o permeado e o concentrado quanto aos seus constituintes. Observaram que os sólidos suspensos e o maior parte da pectina foram removidos do suco através da membrana; não foi detectada atividade da pectinesterase (PME) no permeado; os sólidos solúveis e os compostos responsáveis pelo aroma (álcoois, ésteres, aldeídos) atravessaram a membrana.

HERNANDEZ *et al.* (1992b) avaliaram, em escala piloto, o processo de tecnologia combinada: ultrafiltração e coluna de resina para retirar compostos amargos do suco secundário cítrico. O fluxo através da membrana aumentou com o aumento da pressão transmembrana até o valor de 137,8 Kpa. A coluna de resina se saturava primeiro com a naringina e, posteriormente com o limoneno. Na análise sensorial feita para o suco submetido a este processo constataram um aumento na aceitabilidade do “flavour” do produto.

2.3.9 Diafiltração

A diafiltração (DF) é na verdade uma maneira diferente de operar processos com membranas que utilizam o gradiente de pressão como força motriz. Consiste em operar

uma micro ou ultrafiltração com uma alimentação contínua de solvente numa vazão igual à vazão do permeado (**Figura 2.10**). Trata-se, na verdade de uma operação de “lavagem” da solução problema. A diafiltração é utilizada quando se deseja purificar um determinado soluto no qual os contaminantes são compostos de dimensões menores do que as do soluto de interesse. Assim, os contaminantes vão sendo eliminados no permeado, enquanto a membrana retém o soluto de interesse. Uma vez alcançada a pureza desejada, interrompe-se a adição de solventes, se necessário, pode-se efetuar a concentração do soluto purificado. A diafiltração pode ser operada em regime semi contínuo (batelada), com o solvente sendo adicionado por etapas.

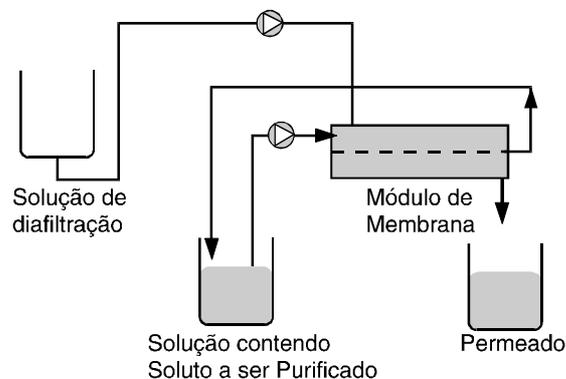


Figura 2.10 - Operação de Sistemas com Membranas – Diafiltração (NÓBREGA *et al.*, 1997).

2.3.10 Parâmetros Operacionais dos Processos de Membranas

Na literatura encontra-se uma série de tentativas de modelagem do fluxo em função dos parâmetros operacionais (pressão, concentração, temperatura, velocidade de escoamento), propriedades físicas do fluido (viscosidade, difusividade e densidade) e características da membrana (distribuição e tortuosidade dos poros, natureza química, interação membrana-solução e interações entre os próprios constituintes do fluido a ser filtrado) (CHIANG e CHERYAN, 1987; KULKARNI *et al.*, 1992).

Durante a UF há um aumento do fator de concentração, da viscosidade e um decréscimo da difusividade, causando uma queda no fluxo de permeado. Geralmente, o fluxo diminui com o aumento do fator de concentração (RENNER e SALAM, 1991).

Existe uma relação linear quando grafica-se fluxo de permeado em função de log fator de concentração. Teoricamente, o fluxo será zero, quando a concentração de alimentação for igual a concentração da camada de gel formada durante o processo (CHERYAN, 1986c).

O aumento da velocidade tangencial aumenta a taxa de permeação por provocar turbulência. A agitação da mistura do fluido próximo à superfície da membrana, arrasta os sólidos acumulados reduzindo a espessura da camada limite (VIOTTO, 1993).

Quando utiliza-se de temperaturas mais altas tem-se um maior fluxo de permeado. O aumento da temperatura promove uma redução da viscosidade da solução, um aumento da velocidade de difusão do soluto e, muda as interações membrana-soluto (RENNER e SALAM, 1991).

O aumento da temperatura deve respeitar o limite de estabilidade térmica da membrana e do produto. A faixa de 5 a 45 °C não é recomendável pelo risco de crescimento microbiano e temperaturas maiores que 60 °C causam desnaturação proteica e perdas de compostos voláteis responsáveis pelo aroma do suco. Portanto, a faixa de 50 a 55 °C tem sido a mais utilizada com a finalidade de manter as propriedades funcionais do produto final e o valor de fluxo elevado (FENTON-MAY e HILL, 1971).

Inicialmente, um aumento de pressão produzirá um aumento de permeação, e conseqüentemente, um aumento na concentração de soluto na superfície da membrana, o que promoverá a formação da camada gel. Nas condições de concentração polarizada, um aumento da pressão pode promover uma redução do fluxo de permeação (CHERYAN, 1977).

As mudanças nas propriedades da membrana podem ocorrer como conseqüência da deterioração química ou física. A deterioração química está associada ao pH, a temperatura e a outros fatores que forem incompatíveis com o material da membrana. Procedimentos de limpeza muito drásticos, podem levar à deterioração química da membrana e diminuição significativa de sua vida útil. A deterioração física da membrana pode estar relacionada ao uso de altas pressões, o que pode mudar a permeabilidade da membrana devido ao fenômeno de compactação. Isto acontece mais comumente em membranas poliméricas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Matéria Prima

As folhas de *Stevia rebaudiana* Bertoni utilizadas neste trabalho foram, gentilmente, doadas pela empresa Steviafarma Industrial S/A. As folhas utilizadas estavam secas com uma umidade residual de 10%.

3.2 Preparo do Extrato das Folhas da *Stevia rebaudiana* Bertoni

A extração dos princípios adoçantes das folhas secas da *Stevia rebaudiana* Bertoni foi efetuada conforme FUH e CHIANG (1990). Foram efetuadas duas extrações sucessivas: na primeira extração as folhas (400 g) ficaram em contato com 6,4 L de água quente (55°C), em banho-maria, por 1 hora. A seguir, o extrato foi decantado, e os sólidos lixiviados foram extraídos novamente com outra batelada de água quente numa taxa de 400g de folhas secas por 3,2 L de água, a 55°C, por 30 minutos. Os dois extratos foram combinados e filtrados à vácuo com papel de filtro quantitativo.

3.3 Membranas

Para se verificar a influência do ponto de corte da membrana no processo de purificação e concentração do extrato de estévia foram utilizadas nos ensaios de ultrafiltração (UF) as membranas de Celulose Regenerada (Millipore PLGC – 10.000 Daltons, área de filtração: 600 cm²) e Polissulfona (Millipore PTTK, 30.000 Daltons, área de filtração: 600 cm² e PTHK, 100.000 Daltons, área de filtração: 240 cm²) para o módulo de filtração tangencial. A limpeza das membranas de UF era realizada antes e depois do

processamento de purificação e concentração do extrato de estévia, seguindo a metodologia do fabricante, que encontra-se no **Anexo II**.

3.4 Módulo de Filtração

O esquema geral de instalação experimental utilizado para a filtração tangencial é mostrado na **Figura 3.1**. O sistema era equipado com um módulo de filtração Millipore Minitan II, com membranas Millipore e uma bomba peristáltica que controlava a vazão de entrada da solução para o sistema de filtração. A rotação da bomba foi fixada em 600 rpm. O sistema era equipado com manômetros na entrada e na saída. O volume inicial do extrato cru de estévia no tanque de alimentação era em torno de 9 litros.

A UF foi iniciada e o retentado retornava ao tanque de alimentação, numa vazão suficiente, controlada por uma válvula de estrangulamento, para que a pressão de entrada no módulo de filtração permanecesse constante. O permeado foi recolhido num recipiente, e o processo realizado até finalizar o extrato no tanque de alimentação.

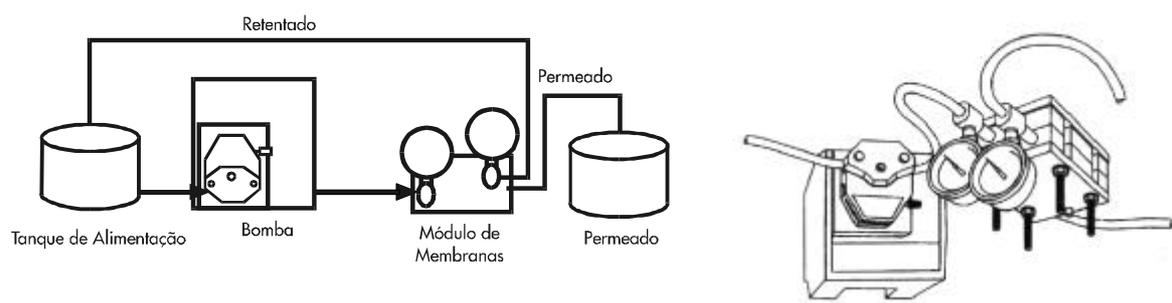


Figura 3.1 - Esquema Geral da Instalação Experimental para a Filtração Tangencial e Detalhe da Bomba Peristáltica e Módulo de membranas (MILLIPORE, 1995).

Durante os testes de UF foram retiradas amostras do permeado e do retentado para análises de sólidos totais, absorvância e a quantificação dos adoçantes por Cromatografia

Líquida. Também foi controlada a taxa de concentração por volume (TCV) que foi calculada pela **Equação 3.1**:

$$TCV = \frac{V_i}{V_f} \quad (3.1)$$

sendo que V_i = Volume inicial

V_f = Volume final

E através da análise deste valor pode-se calcular a percentagem de volume inicial recuperado no permeado, usando-se a seguinte relação:

$$R = \left[\frac{(TCV - 1)}{TCV} \right] \times 100 \quad (3.2)$$

A ultrafiltração sozinha efetua uma separação limitada. Quando a concentração de sólidos retidos no retentado torna-se muito alta e prejudica a taxa de permeação, ainda contém uma quantidade significativa de adoçantes no retentado. Então, a diafiltração pode ser utilizada para “lavar” os adoçantes remanescentes do retentado e aumentar a recuperação destes adoçantes.

Após os testes de UF com as membranas de 10.000 e 30.000 Daltons, nas pressões de entrada de 8, 10 e 12 Psi, e 100.000 Daltons na pressão de entrada de 8 Psi, escolheu-se a membrana de 30.000 Daltons numa pressão intermediária (10 Psi) para se efetuar a diafiltração (DF), com o objetivo de se recuperar os adoçantes que permaneceram no concentrado do tanque de alimentação no final da UF.

A escolha desta membrana para os testes de diafiltração se deu devido ao fato de que com ela foram produzidos permeados com maior pureza, numa mesma taxa de concentração de volume, quando comparada com as membranas de 10.000 e 100.000 Daltons. E a escolha da pressão de operação de 10 Psi para a DF se deu porque não ocorreram grandes variações nas três pressões avaliadas, então optou-se por trabalhar numa pressão intermediária.

A diafiltração foi realizada, em etapas, para a membrana 30.000 Daltons numa pressão de 10 Psi, à temperatura ambiente. Ao volume de concentrado do extrato

remanescente no tanque de alimentação (em torno de 1,8 L) foi adicionado o mesmo volume de água e efetuada a ultrafiltração até que o volume novamente retornasse ao seu valor mínimo. Foram efetuadas quatro diafiltrações sucessivas. Os teores de adoçantes, sólidos totais e despigmentação (420 e 670 nm) foram analisados ao longo da diafiltração.

3.5 Determinação das Pressões de Operação

Para conhecer a faixa de pressão adequada para se trabalhar com cada membrana, efetuou-se, inicialmente, um estudo do comportamento do fluxo permeado com o aumento da pressão transmembrana.

A pressão transmembrana é a diferença entre a pressão do lado do concentrado e aquela do lado do permeado, ou seja, é a força motriz para a separação. Como a pressão no lado do permeado era a pressão atmosférica, a pressão média transmembrana foi calculada pela seguinte equação:

$$PT = \frac{(P_{en} + P_{sai})}{2} \quad (3.3)$$

Sendo que PT = Pressão Transmembrana

P_{en} = Pressão de Entrada do Módulo de Membranas

P_{sai} = Pressão de Saída do Módulo de Membranas

Para o teste da pressão de operação no módulo de filtração tangencial, colocou-se um certo volume de extrato cru das folhas da estévia num becker (tanque de alimentação), e iniciou-se uma ultrafiltração de modo que tanto o permeado quanto o retentado voltavam ao tanque de alimentação (este é o modo de reciclo total). Ajustou-se a rotação da bomba em 600 rpm, e com a válvula de contra-pressão totalmente aberta. Nestas condições, foram feitas medida de fluxo permeado, e com os valores das pressões de entrada e saída calculou-se a pressão transmembrana conforme **equação (3.3)**. Estrangulou-se a válvula de retorno do

retentado a fim de se aumentar a pressão de entrada no sistema de filtração, e conseqüentemente a PT. Após 2 minutos, efetuou-se uma segunda medida de fluxo permeado e da PT. Aumentando-se a PT em pequenos intervalos, obteve-se o comportamento da membrana em termos de fluxo permeado para cada pressão testada. O aumento da PT foi interrompido tão logo observou-se uma não linearidade da curva obtida no gráfico de fluxo permeado em função da PT. Assim, foi observada a faixa de pressão adequada para se efetuar a UF para que não ocorresse um rápido entupimento (“fouling”) na membrana.

3.6 Métodos de Quantificação dos Adoçantes da *Stevia rebaudiana* Bertoni

Os adoçantes da *Stevia rebaudiana* Bertoni foram quantificados em relação ao esteviosídeo e ao rebaudiosídeo A, os dois maiores constituintes do extrato da estévia. Para a quantificação dos adoçantes da estévia no extrato aquoso cru, nos permeados e retentados, foram testados três métodos:

3.6.1 Cromatografia de Papel

A cromatografia de papel foi uma das metodologias iniciais adotadas neste trabalho para realizar os ensaios de quantificação dos adoçantes, esteviosídeo e rebaudiosídeo A. Esta metodologia encontra-se no **Anexo I**.

3.6.2 Cromatografia de Camada Delgada

A cromatografia de camada delgada também foi um método utilizado, inicialmente, para a quantificação dos adoçantes das folhas da *Stevia rebaudiana* Bertoni, o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A.

O extrato cru obtido a partir das folhas da *Stevia rebaudiana* Bertoni utilizado nos ensaios realizados na cromatografia de camada delgada foi preparado conforme citado no item 8.1.1 do **Anexo I**.

Foram preparadas placas de vidro de 20 x 20 cm e espessura de 0,25 mm com sílica-gel-G que foram inicialmente ativadas em estufa a 110°C por 1 hora.

As placas foram impregnadas com as amostras de D-glucose, D-maltose, malto-dextrina, solução de esteviosídeo padrão a 10% e extrato de estévia e a seguir as placas foram acondicionadas em recipiente adequado de maneira que ficassem na posição vertical.

A fase móvel utilizada foi: clorofórmio:metanol:água (30:20:1) e a solução reveladora foi uma mistura de ácido sulfúrico (2,5 mL), anisaldeído (1,25 mL) e ácido acético (125 mL), que era preparada imediatamente antes do uso. Após 48 horas de contato, fez-se a revelação das placas.

3.6.3 Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAP)

Na cromatografia líquida de alta performance foi utilizado inicialmente, uma coluna Merck NH₂ Lichrosorb (125 x 4mm D.I.) com detector ultravioleta (UV), à 210 nm e um detector de índice de refração (IR). Utilizou-se acetonitrila:água (80:20; %v:v) como fase móvel, numa vazão de 0,5 a 1,5 mL/min. As determinações por CLAP foram realizadas à temperatura ambiente.

Nestas mesmas condições também foi testada, para estes ensaios, um outro tipo de coluna Brownlee - NH₂ - Spheri-5 (220 x 4,6 mm D.I.) que resultou numa melhor separação dos picos dos adoçantes de interesse neste trabalho. Deste modo, esta foi a coluna utilizada na quantificação destes adoçantes.

(i) Preparo da Curva Padrão: Esteviosídeo e Rebaudiosídeo A

Os padrões de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, gentilmente cedidos pela empresa Steviafarma Industrial S. A., foram secos por 2 horas em estufa à 120°C e esfriados em

dessecador. Pesou-se 50 mg de esteviosídeo e 50 mg de rebaudiosídeo A, colocando-se num balão volumétrico de 25mL. Completou-se com água ultrapurificada, preparando-se, assim, uma solução padrão de 2000 ppm em termos de esteviosídeo e rebaudiosídeo A. Da solução padrão inicial (2000 ppm) efetuaram-se diluições com a fase móvel (acetonitrila:água – 80:20; %v:v) para concentrações de 100, 200, 300, 500, 700, 1000, 1500 e 2000 ppm. A curva padrão encontra-se no **Anexo III**.

(ii) Limpeza e Regeneração da Coluna NH₂

Para efetuar a limpeza da coluna NH₂ utilizaram-se os seguintes solventes de polaridade crescente: n-heptano, acetato de etila, acetona e metanol, cada um sendo percolado através da coluna numa vazão de 1,0 mL/min, durante 25-30 minutos.

Para a regeneração foram percolados pela coluna os mesmos solventes, só que em ordem decrescente de polaridade: metanol, acetona, acetato de etila e n-heptano, numa vazão de 1,0 mL/min, durante 35-40 minutos.

(iii) Preparo da Fase Móvel

Para o preparo da fase móvel foram colocados num balão volumétrico de 1000 mL, aproximadamente, 350 mL de acetonitrila. Logo em seguida, foram adicionados 200 mL de água ultrapurificada. Agitou-se bem. Deixou-se a mistura em repouso até que atigisse a temperatura ambiente. Após, completou-se o menisco com acetonitrila. Antes do uso da fase móvel através da coluna, desgaseificou-se a solução através de ultrassom por, aproximadamente, 10 minutos.

3.7 Análises

3.7.1 Teor de Adoçantes

Esteviosídeo e rebaudiosídeo-A, os dois maiores constituintes do extrato de estévia, foram analisados por cromatografia líquida de alta performance (CLAP), conforme já citado no **item 3.6.3**, utilizando-se a coluna Brownlee - NH₂ - Spheri-5 (220 x 4,6 mm D.I.).

3.7.2 Sólidos Totais

O teor de sólidos totais nas amostras do extrato, do permeado e do retentado, foram analisados segundo o método da AOAC (1984). Um volume conhecido de amostra foi colocado para secar em estufa, a 120°C, até peso constante. Após, calculava-se a quantidade de sólidos totais por 100 mL, o que equivale considerar % de sólidos totais.

3.7.3 Pureza

A percentagem de pureza, em relação aos adoçantes, do extrato cru e do permeado foi calculada por meio da **equação (3.4)**: (FUH e CHIANG, 1990).

$$\% \text{ Pureza} = \left[\frac{g(\text{St} + \text{Rb A})/100\text{mL}}{g(\text{Sólidos Totais})/100\text{mL}} \right] \times 100 \quad (3.4)$$

Sendo **St** o valor, em grama,s de esteviosídeo e **Rb A** o valor, em gramas, do rebaudiosídeo A.

3.7.4 Despigmentação

Os pigmentos no extrato cru e no permeado foram analisados através de medida da absorvância ótica à 420 nm, para análise da cor, e à 670 nm, para análise da turbidez, visto que estes são os comprimentos de onda de absorvância máxima dos pigmentos. Efetuou-se, inicialmente uma curva padrão de diluição do extrato, para se obter valores dentro de uma faixa linear que obedeça a Lei de Beer (CHENG et al, 1985). Utilizou-se água destilada como branco. A curva padrão de absorvância está no **Anexo III**.

Assim, a taxa de despigmentação foi calculada pela **equação (3.5)** (FUH e CHIANG, 1990):

$$\% \text{Despigmentação} = \left[1 - \left(\frac{(A_{420} \text{ ou } A_{670})_{\text{antes da purificação}}}{(A_{420} \text{ ou } A_{670})_{\text{depois da purificação}}} \right) \right] \times 100 \quad (3.5)$$

Onde $(A_{420})_{\text{antes}}$ corresponde ao valor da absorvância, à 420 nm (cor), do extrato cru, e $(A_{420})_{\text{depois}}$ corresponde ao valor da absorvância, à 420 nm (cor), depois do processo com membranas, ou seja, do permeado. E $(A_{670})_{\text{antes}}$ corresponde ao valor da absorvância, à 670 nm (turbidez), do extrato cru, e $(A_{670})_{\text{depois}}$ corresponde ao valor da absorvância, à 670 nm (turbidez), depois do processo com membranas, ou seja, do permeado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos nos testes de ultrafiltração e diafiltração para purificação e concentração do extrato de estévia.

Os resultados obtidos no processo de UF tangencial, com as membranas de ponto de corte 10.000, 30.000 Daltons, nas pressões de entrada de 8, 10 e 12 Psi, e na membrana de ponto de corte de 100.000 Daltons, na pressão de entrada de 8 Psi, são apresentados e discutidos neste capítulo. É realizada uma comparação entre as três membranas utilizadas neste trabalho, e para cada uma é analisada a influência das diferentes pressões sobre o fluxo permeado, o teor de pureza e a despigmentação.

Também são apresentados os resultados da diafiltração (DF), no módulo de filtração tangencial, com a membrana de ponto de corte 30.000 Daltons, na pressão de entrada de 10 Psi.

4.1. Quantificação dos Adoçantes do Extrato de Estévia

A quantificação dos adoçantes no extrato das folhas da *Stevia rebaudiana* Bertoni foi feita através de cromatografia líquida de alta performance (CLAP), visto que esta técnica tem se mostrado extremamente eficiente, rápida e prática para separar e quantificar os adoçantes na planta, em alimentos e em bebidas (CRAMMER, 1987). Esta técnica de quantificação dos adoçantes da estévia é considerada, atualmente, uma técnica padrão (GRENBY, 1987).

4.2 Ultrafiltração Tangencial

Para cada ponto de corte de membrana (10.000, 30.000 e 100.000 Daltons) serão apresentados e discutidos os valores de fluxos permeados de água e extrato, a concentração de adoçantes e teor de sólidos totais no permeado e no retentado, a retirada de cor e turbidez e a pureza no permeado.

4.2.1 Determinação das Pressões de Operação

Inicialmente determinou-se uma faixa ótima de pressão de operação do sistema para cada ponto de corte de membrana testada, a fim de se obter melhores resultados no processo de ultrafiltração. Trabalhando nesta faixa determinada poderemos ter melhores taxas de escoamento e filtração. Pois, se a pressão transmembrana (PT) é muito baixa resulta numa taxa mais baixa de filtração e se a PT é muito alta resulta numa polarização e “fouling” precoce da membrana além de diminuir a sua vida útil.

Assim, a **Figura 4.1** mostra as curvas de pressão transmembrana e o fluxo permeado para os três pontos de corte utilizados neste trabalho.

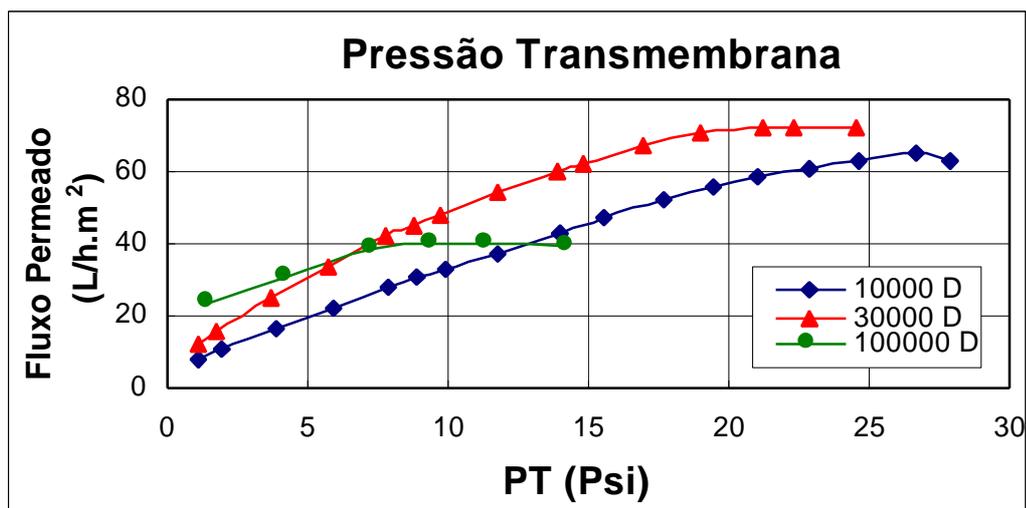


Figura 4.1 - Pressão Transmembrana em relação ao Fluxo Permeado de Extrato de Estévia para as Membranas de Ponto de Corte de 10.000, 30.000 e 100.000 Daltons no Módulo de Filtração Tangencial Operando em Sistema Batelada.

Observou-se que, com o aumento da PT, temos inicialmente um aumento de fluxo permeado, nos três tipos de membranas utilizadas neste experimento, até um valor máximo, e então, a taxa de fluxo começa a decrescer com o aumento da PT. Nesta faixa de PT onde ocorre o decréscimo do fluxo de permeado indica um rápido “fouling” na membrana, ocasionando além na diminuição do fluxo uma redução da vida útil da membrana.

Para as membranas de ponto de corte de 10.000 e 30.000 Daltons obteve-se um valor máximo de PT na faixa de 20-25 Psi.

KIRK *et al.* (1983), que obtiveram valores máximos de PT em torno de 22,8 Psi, quando trabalharam com suco de pêra em membrana de fibra oca com o mesmo ponto de corte da membrana utilizada no presente experimento.

A partir da curva de pressão transmembrana foram escolhidas três pressões de entrada: 8, 10 e 12 Psi para as membranas de 10.000 e 30.000 Daltons, o que equivalem a PTs dentro da faixa linear para estas membranas. Para a membrana de 100.000 Daltons trabalhou-se, apenas, com a pressão de entrada de 8 Psi (PT = 7,5 Psi), visto que em pressões de entrada mais altas estaríamos fora da faixa linear da PT, o que acarretaria todos os inconvenientes citados anteriormente.

4.2.2 Comparação entre as Pressões Utilizadas

Neste item são apresentados e discutidos os valores de fluxo permeado, pureza e despigmentação em cada ponto de corte, para cada pressão testada, efetuando-se comparações entre elas.

- Membrana 10.000 Daltons (PCPM)

Na membrana de ponto de corte de 10.000 Daltons (PCPM – Ponto de Corte por Peso Molecular) testaram-se as pressões de entrada no módulo de filtração de 8 Psi, 10 e 12 Psi, que equívaleram a pressões transmembranas médias de 6,6; 8,7 e 10,8 Psi, respectivamente. Nas **Figuras 4.2, 4.3 e 4.4** apresentam-se os valores de fluxo permeado de água e de extrato, em função do tempo, nas três pressões testadas.

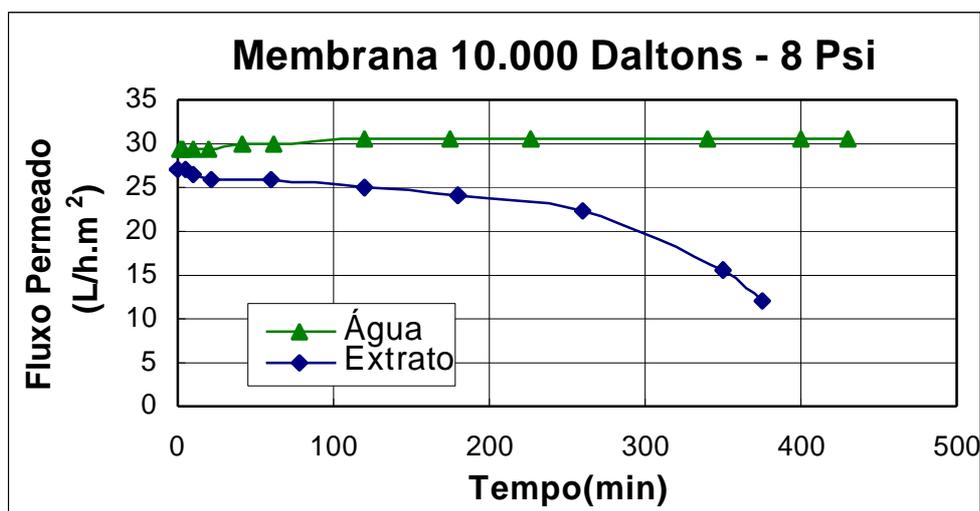


Figura 4.2 - Fluxo de Água e de Extrato na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons, em Relação ao Tempo de Filtração, na Pressão de Entrada de 8 Psi (PT = 6,6).

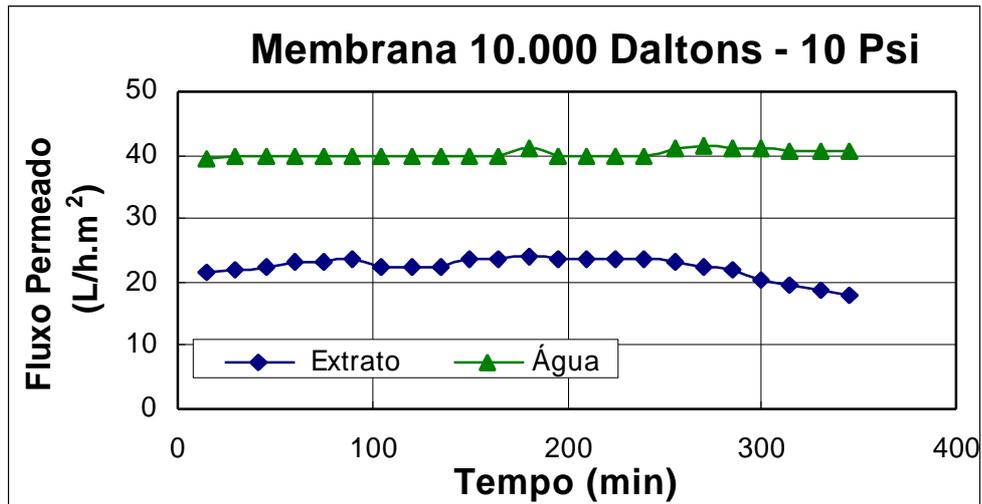


Figura 4.3 - Fluxo de Água e de Extrato na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons, em Relação ao Tempo de Filtração, na Pressão de Entrada de 10 Psi (PT = 8,7 Psi).

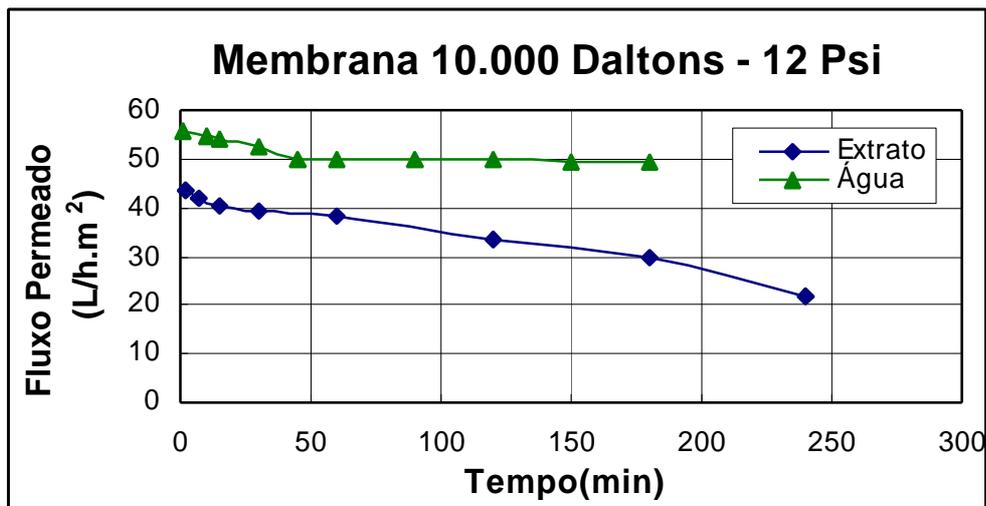


Figura 4.4 - Fluxo de Água e de Extrato na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons, em Relação ao Tempo de Filtração, na Pressão de Entrada de 12 Psi (PT = 10,8 Psi).

Nas Figuras 4.2, 4.3 e 4.4 observa-se que o fluxo de água através da membrana foi maior que o fluxo de extrato de estévia, este resultado já era esperado, visto o extrato conter uma quantidade maior de impurezas. Os valores de fluxos permeados iniciais de água para a membrana de ponto de corte de 10.000 Daltons aumentaram com o aumento da

pressão e os fluxos permeados de extrato não foram proporcionais a este aumento. Os valores de resistência intrínseca da membrana e resistência hidráulica estão no **Anexo V**.

PRÁDANOS *et al.* (1994) afirmaram que o fator limitante em muitas práticas de UF de soluções macromoleculares é o declínio de fluxo permeado com o tempo. Esta redução no fluxo tem sido atribuída a três tipos de fenômenos: **i)** concentração polarizada, isto é, a acomodação ou repulsão de solutos devido às cargas elétricas das moléculas na superfície da membrana, que passam a ser uma resistência adicional além da resistência da membrana, **ii)** redução na força motriz resultante do aumento da pressão osmótica na superfície da membrana e **iii)** processo de incrustação “fouling”.

Na **Figura 4.5** são apresentadas as curvas de fluxo permeado de extrato em função da taxa de concentração de volume (TCV).

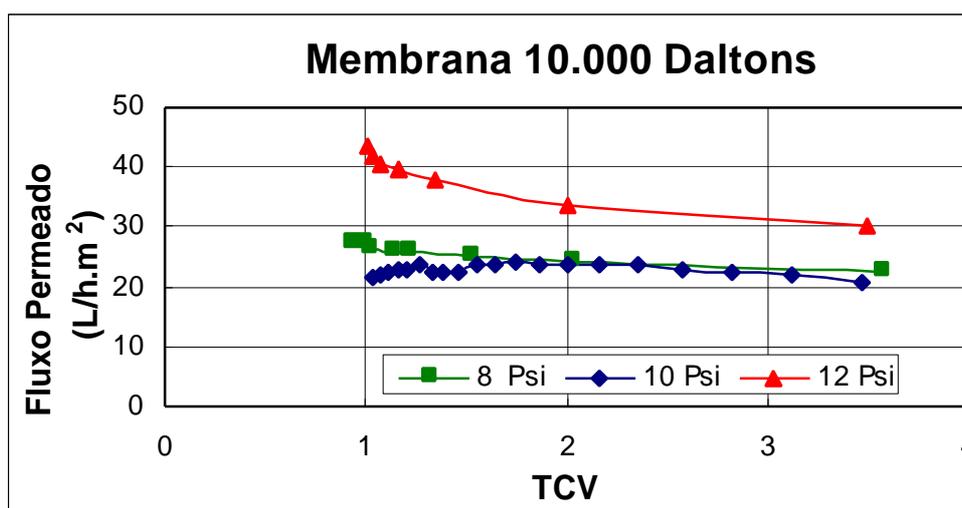


Figura 4.5 - Fluxo Permeado de Extrato na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons, em Função da Taxa de Concentração de Volume, nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi .

Observou-se que nas pressões de 8 e 10 Psi não ocorreu uma diferença significativa de fluxo permeado em função da TCV, porém, à pressão de 12 Psi constatou-se um sensível aumento no fluxo permeado. O aumento de pressão de 8 para 10 Psi não foi suficiente para romper algum bloqueio (“fouling”) que possivelmente poderia estar ocorrendo nos poros da membrana. À 12 Psi pode ter ocorrido um aumento de pressão suficiente para romper alguns bloqueios e assim aumentar o fluxo através da membrana.

KIRK *et al.* (1983) demonstraram que o fluxo permeado aumentava com o aumento da pressão transmembrana até um valor crítico, e depois decrescia.

Na **Figura 4.6** apresentam-se os valores de pureza calculados a partir da **equação (3.4)**. Os valores de concentração de adoçantes e sólidos totais, utilizados para o cálculo da pureza, estão apresentados no **Anexo IV**.

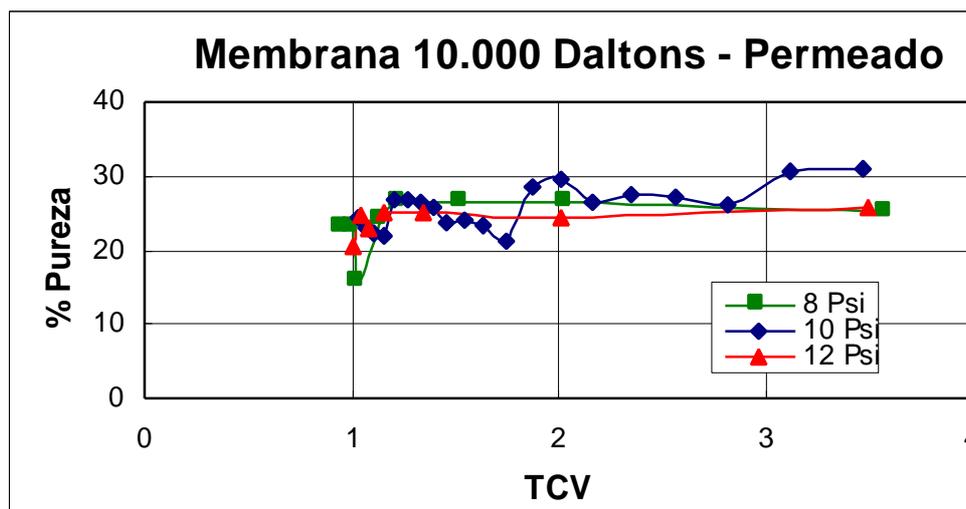


Figura 4.6 - Pureza do Permeado da Membrana de Ponto de Corte 10.000 Daltons em Relação à Taxa de Concentração de Volume nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi - Pureza do extrato Cru = 24,2% (8 Psi); 23% (10 Psi) e 26,5% (12 Psi).

O teor de pureza permaneceu praticamente constante, em torno de 25%, numa faixa de TCV de 1 a 3,5 (71% do volume inicial recuperado como permeado) para as pressões de 8 e 12 Psi. Na pressão de 8 Psi os teores de pureza ficaram próximos ao valor da pureza do extrato cru; e na pressão de 12 Psi estes valores ficaram ligeiramente abaixo do valor daquele do extrato cru.

Na pressão de 10 Psi a % de pureza foi ligeiramente superior, ficando em torno de 30% para TCVs maiores que 2,8, sendo que estes valores são significativamente superiores ao valor da pureza do extrato cru.

Nas **Figuras 4.7 e 4.8** são mostrados os valores de despigmentação à 420 nm (cor) e à 670 nm (turbidez), em função da taxa de concentração de volume, nas pressões de entrada de 8, 10 e 12 Psi.

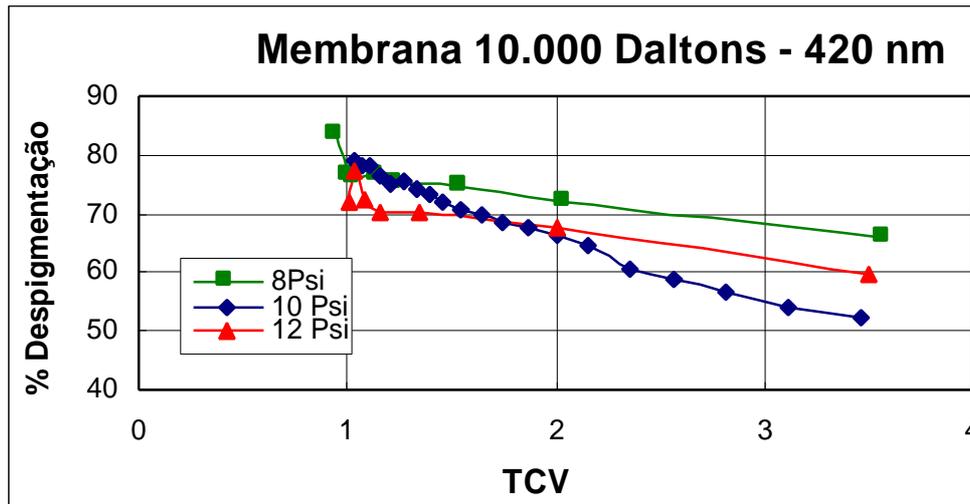


Figura 4.7 -Retirada de Cor no Permeado da Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons em relação a Taxa de Concentração de Volume nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi.

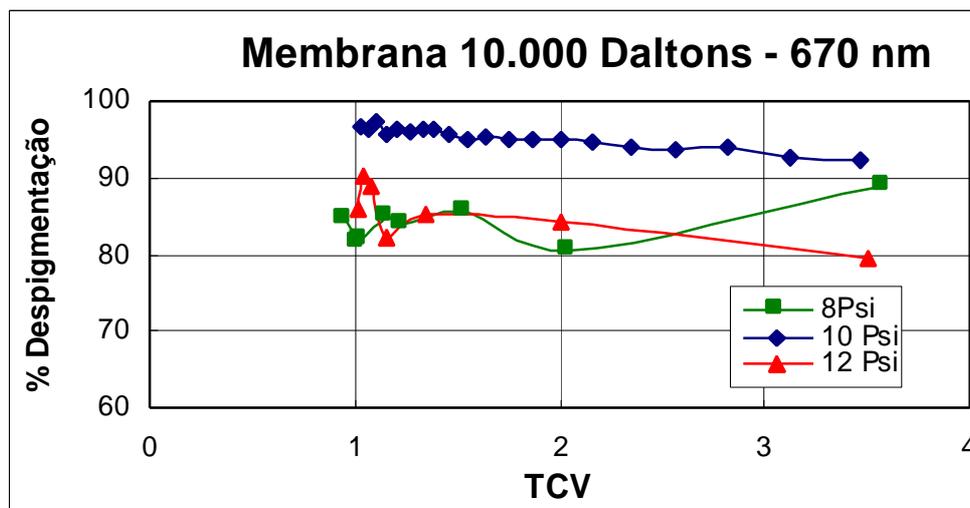


Figura 4.8 - Retirada de Turbidez no Permeado da Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons em relação a Taxa de Concentração de Volume nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi.

Na membrana de ponto de corte 10.000 Daltons a retirada de cor e turbidez não apresentaram uma proporcionalidade com as pressões utilizadas. Os níveis de retirada de cor e turbidez iniciaram-se em valores entre 80-95% de despigmentação.

Na faixa de TCV de 1-3,5 estudada, observou-se que a pressão de 8 Psi apresentou valores ligeiramente maiores para a retirada de cor (68%). Porém, de uma maneira geral, esta membrana não foi eficiente para a retirada de cor. Pode ter ocorrido a adsorção dos pigmentos, provavelmente partículas pequenas, na superfície da membrana e, com o tempo, estas partículas foram se soltando fazendo assim, baixar os valores de despigmentação com o decorrer da filtração.

A retirada de turbidez foi mais constante no ensaio de 10 Psi, e apresentou valores superiores aos apresentados nas pressões de 8 e 12 Psi até uma TCV de 3. Maiores pressões geralmente implicam em maior polarização e compactação do gel (ou outro tipo de material) na superfície da membrana, o que pode ajudar na remoção dos pigmentos. Os pigmentos causadores de turbidez parecem ter tamanhos bem variados, porém maiores que os pigmentos causadores de cor, o que pode explicar o fato de que à 12 Psi certa quantidade de pigmentos (provavelmente partículas de menor tamanho) fosse “empurrada” através da membrana fazendo com que a turbidez aumentasse.

Para a membrana de 10.000 Daltons não se observaram grandes diferenças nos valores de fluxo permeado, pureza e despigmentação entre as pressões testadas. De um modo geral, os melhores resultados foram obtidos à 10 Psi.

- Membrana 30.000 Daltons (PCPM)

Na membrana de ponto de corte de 30.000 Daltons, inicialmente se testou a faixa de pressão transmembrana ótima para se trabalhar, e conforme a curva apresentada na **Figura 4.1**. Para esta membrana, a faixa de pressão transmembrana vai até valores próximos a 15 Psi. Assim, trabalhou-se com as pressões de entrada no sistema de filtração de 8, 10 e 12 Psi, que equívalem a pressões transmembranas de 6,7; 8,7 e 11 Psi, respectivamente. Nestas condições foram obtidos os valores de fluxo permeado de água e de extrato de estévia, em função do tempo de filtração, que estão apresentados nas **Figuras 4.9, 4.10 e 4.11**.

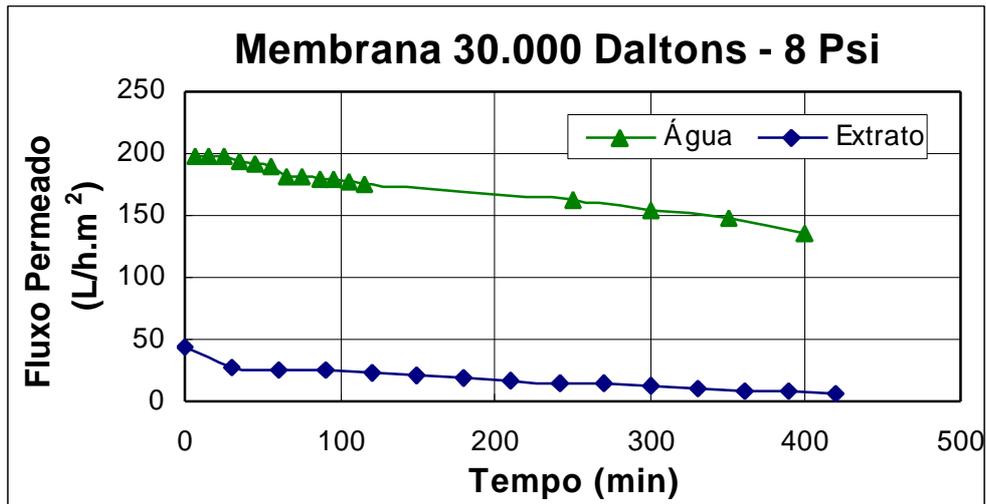


Figura 4.9 - Fluxo de Água e de Extrato na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons, em Relação ao Tempo de Filtração, na Pressão de Entrada de 8 Psi (PT = 6,7).

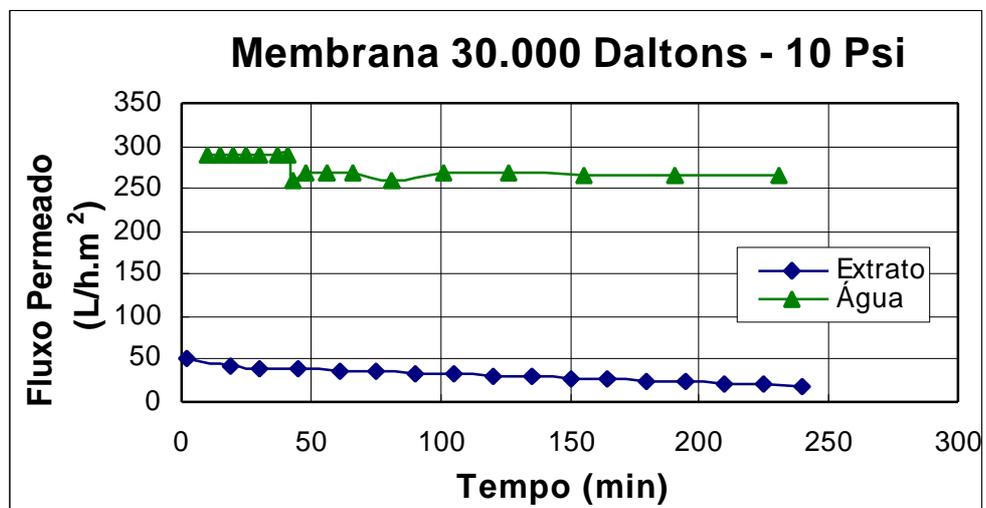


Figura 4.10 - Fluxo de Água e de Permeado na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons, em Relação ao tempo de Filtração, na Pressão de Entrada de 10 Psi (PT = 8,7 Psi).

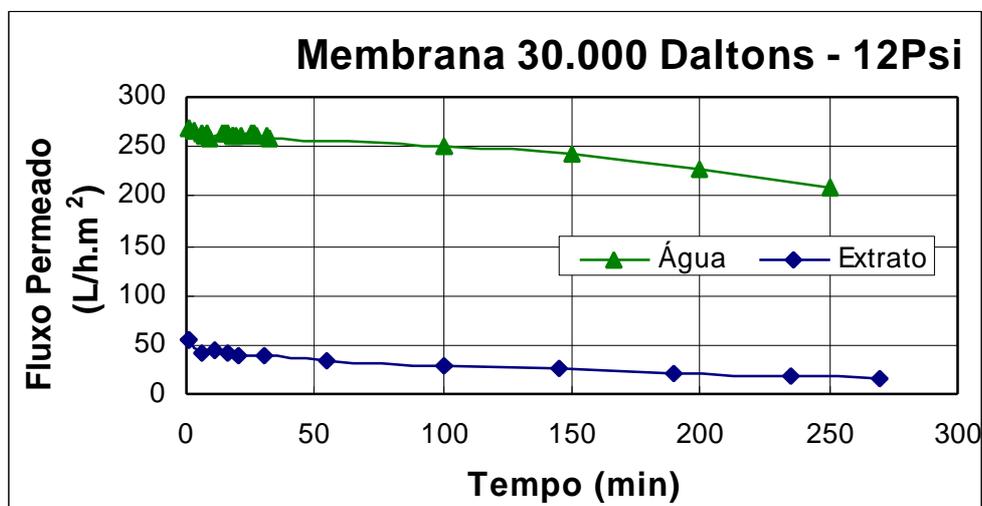


Figura 4.11 - Fluxo de Água e de Permeado na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons, em Relação ao tempo de Filtração, na Pressão de Entrada de 12 Psi (PT = 11 Psi).

O comportamento das curvas de fluxo de água e extrato foi semelhante ao apresentado na membrana de ponto de corte de 10.000 Daltons, nas pressões estudadas, porém com a membrana de ponto de corte de 30.000 Daltons obteve-se uma maior diferença entre o fluxo de água e extrato. Os valores de resistência intrínseca da membrana e resistência hidráulica estão no **Anexo V**.

Na **Figura 4.12** são apresentadas os valores de fluxo permeado de extrato na membrana de ponto de corte 30.000 Daltons nas pressões de entrada de 8, 10 e 12 Psi, em função da taxa de concentração de volume (TCV).

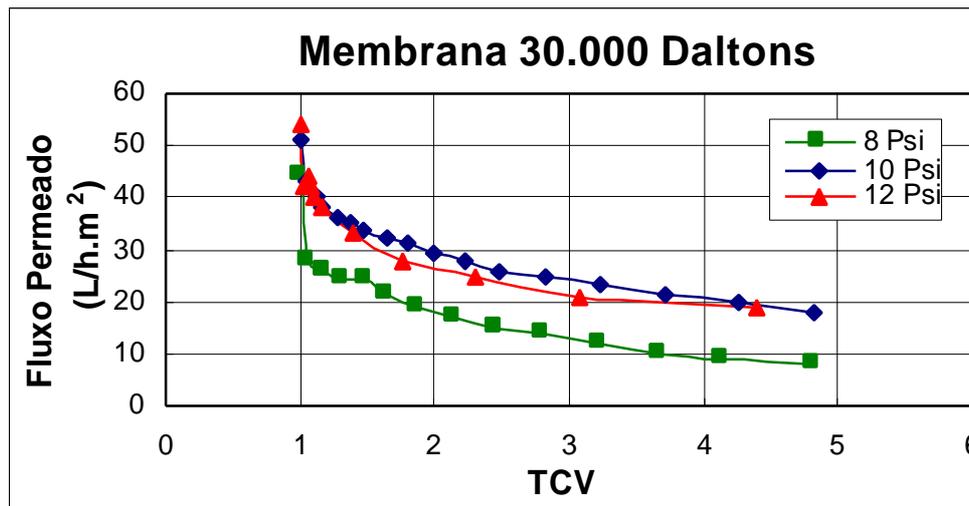


Figura 4.12 - Fluxo Permeado na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons, em Função da Taxa de Concentração de Volume, nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi .

Na **Figura 4.12** observou-se que nas pressões de 10 e 12 Psi os valores de fluxo permeado foram mais altos, e praticamente semelhantes; e à 8 Psi observaram-se valores menores. O fluxo permeado foi ligeiramente maior à 10 Psi. O comportamento do fluxo permeado à 12 Psi pode ser devido ao entupimento dos poros da membrana nesta pressão. Não fosse o efeito da compactação da membrana e da camada de gel e a colmatação dos poros, um aumento na pressão resultaria num aumento proporcional no fluxo de permeado (PETRUS, 1997). KIRK *et al.* (1983) demonstraram que o fluxo permeado aumentava com o aumento da pressão transmembrana até um valor crítico, e depois decrescia. PETRUS (1997) observou que a partir de maiores valores de pressão o fluxo de água deixa de ser diretamente proporcional à pressão, devido à compactação da membrana. CHAMCHONG e NOOMHORM (1991), trabalhando com suco de tangerina numa membrana de ponto de corte de 0,1 μm , relataram em seu trabalho que depois de um nível crítico de pressão transmembrana o fluxo permeado se torna independente da pressão.

Os fluxos permeados iniciais na membrana de ponto de corte 30.000 Daltons foram superiores aos apresentados pela membrana 10.000 Daltons em todas as pressões estudadas. Contudo para TCVs maiores que 2, foram inferiores às membranas de 10.000 Daltons nas pressões de 8 e 12 Psi.

FUH *et al.*, (1990) obtiveram valores iniciais de fluxo permeado para o extrato de estévia em torno de 75 L/h.m^2 , utilizando uma membrana tubular com ponto de corte 25.000 Daltons, à 123 Psi. Estes autores verificaram um fluxo permeado de extrato de estévia de aproximadamente 65 L/h.m^2 numa TCV de 4,2. Este comportamento de fluxo permeado relatado por FUH *et al.* (1990) também pode ser devido à porosidade ou ao tipo de membrana utilizada.

Os valores iniciais de fluxo permeado encontrados neste trabalho (50 L/h.m^2) foram próximos aos relatados por FUH *et al.* (1990), porém numa TCV de 4,2 os valores de fluxo apresentaram-se inferiores (20 L/h.m^2).

Na **Figura 4.13** apresentam-se os valores de pureza calculados a partir da **equação (3.4)**, Os valores de concentração de adoçantes e sólidos totais, utilizados para o cálculo da pureza, estão apresentados no **Anexo IV**.

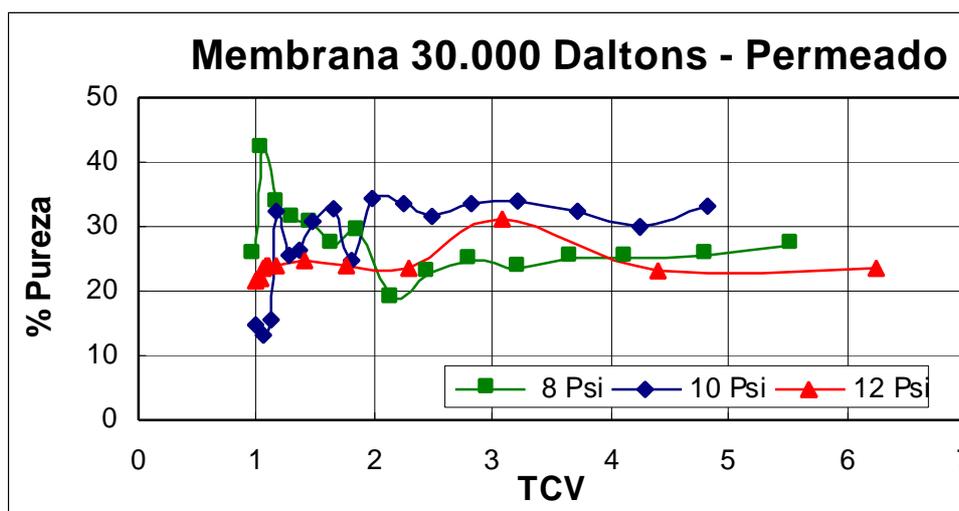


Figura 4.13 - Pureza do Permeado da Membrana de Ponto de Corte 30.000 Daltons em Relação a Taxa de Concentração de Volume nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi.

A pureza no permeado para a pressão de entrada de 10 Psi apresentou-se razoavelmente maior numa faixa de TCV de 2 - 4,8. Num valor de TCV de 4,3 (77% do volume inicial recuperado como permeado) obteve-se uma pureza, na pressão de entrada de 10 Psi, em torno de 30%, enquanto que para a pressão de entrada de 8 e 12 Psi, a pureza ficou em torno de 25% e 23%, respectivamente.

Nas **Figuras 4.14 e 4.15** são mostrados os valores de despigmentação à 420 nm (cor) e à 670 nm (turbidez) em função da taxa de concentração de volume.

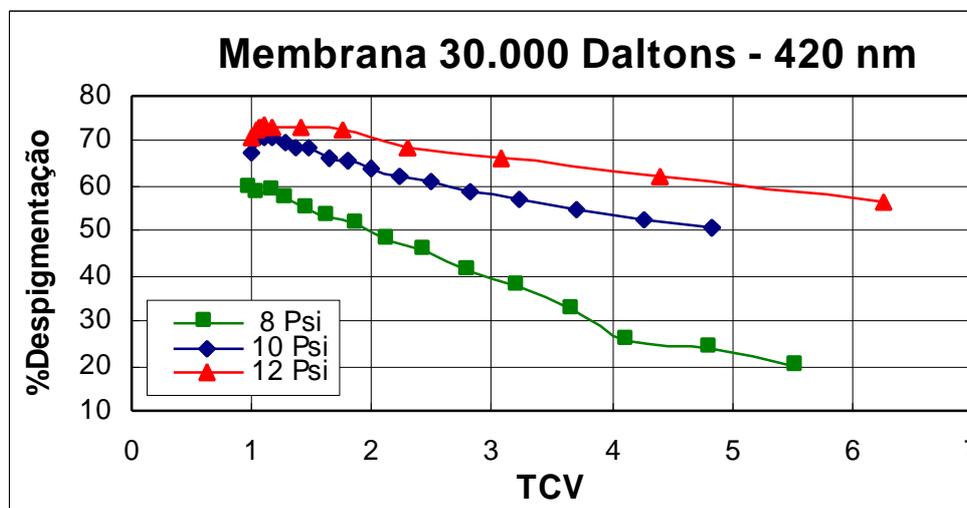


Figura 4.14 - Remoção de Cor no Permeado da Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons em relação a Taxa de Concentração de Volume nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi.

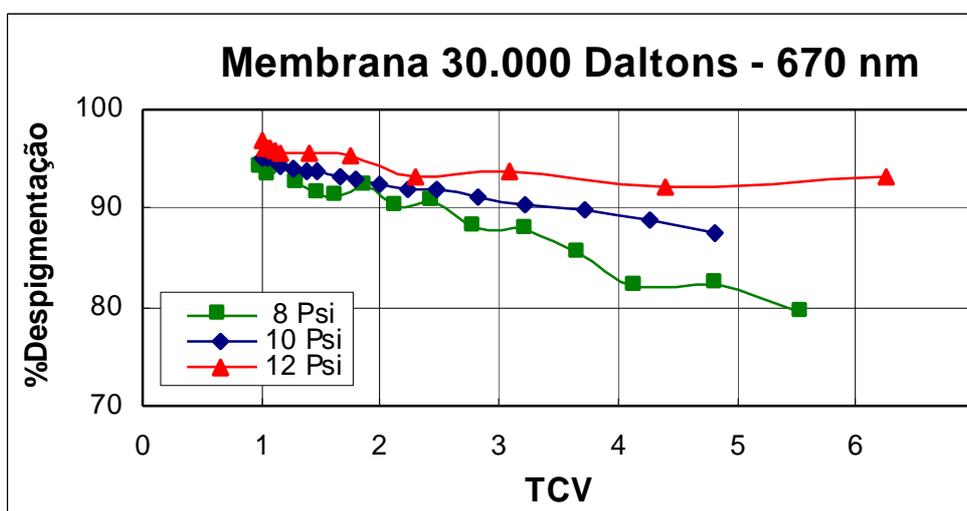


Figura 4.15 - Remoção de Turbidez no Permeado da Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons em relação a Taxa de Concentração de Volume nas Pressões de Entrada de 8, 10 e 12 Psi.

Verificou-se uma proporcionalidade entre a despigmentação (420 e 670 nm) e a pressão. Quanto maior a pressão utilizada maior foi a remoção dos pigmentos do extrato.

Maior pressão geralmente implica em maior polarização e colmatação do gel (ou outro tipo de material) na superfície da membrana que pode ajudar na remoção dos pigmentos.

FUH *et al.* (1990) encontraram valores de despigmentação à 420 nm (cor) na faixa de 98% e à 670 nm (turbidez) 96%, trabalhando com extrato de estévia num sistema de UF, com uma membrana tubular de ponto de corte 25.000 Daltons à 123 Psi. A remoção de turbidez no extrato de estévia encontrada neste trabalho (94%) foi semelhante à relatada por FUH *et al.* (1990), porém a retirada de cor foi um pouco inferior (59%), isto provavelmente seja devido a diferença das condições operacionais.

A influência das pressões nos parâmetros: fluxo permeado, pureza e despigmentação foi significativa nos ensaios de UF com a membrana de ponto de corte 30.000 Daltons. Num contexto geral, os melhores resultados dos parâmetros analisados foram obtidos à 10 Psi.

- Membrana 100.000 Daltons (PCPM)

Na membrana de ponto de corte de 100.000 Daltons trabalhou-se apenas com a pressão de entrada no sistema de filtração de 8 Psi, o que equívaleu a uma pressão transmembrana de 7,5 Psi, e, nestas condições os valores de fluxo permeado de água e de extrato de estévia, ao longo do tempo de ultrafiltração, são apresentados na **Figura 4.16**.

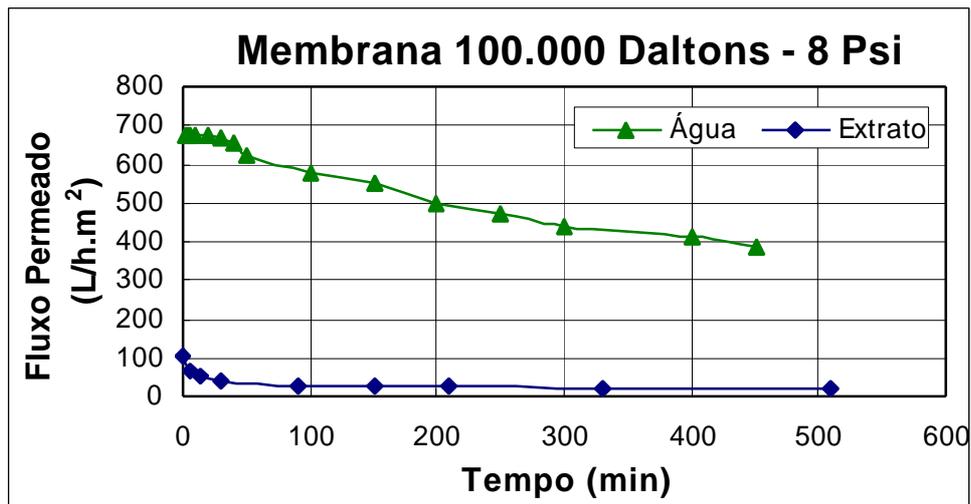


Figura 4.16 - Fluxo de Água e de Extrato na Membrana de Ponto de Corte de 100.000 Daltons, em Relação ao tempo de Filtração, na Pressão de Entrada de 8 Psi (PT = 7,5).

O fluxo permeado inicial de extrato através da membrana de ponto de corte 100.000 Daltons foi superior aos encontrados com as membranas de ponto de corte 10.000 e 30.000 Daltons. Os valores da resistência intrínseca da membrana e da resistência hidráulica estão no Anexo V.

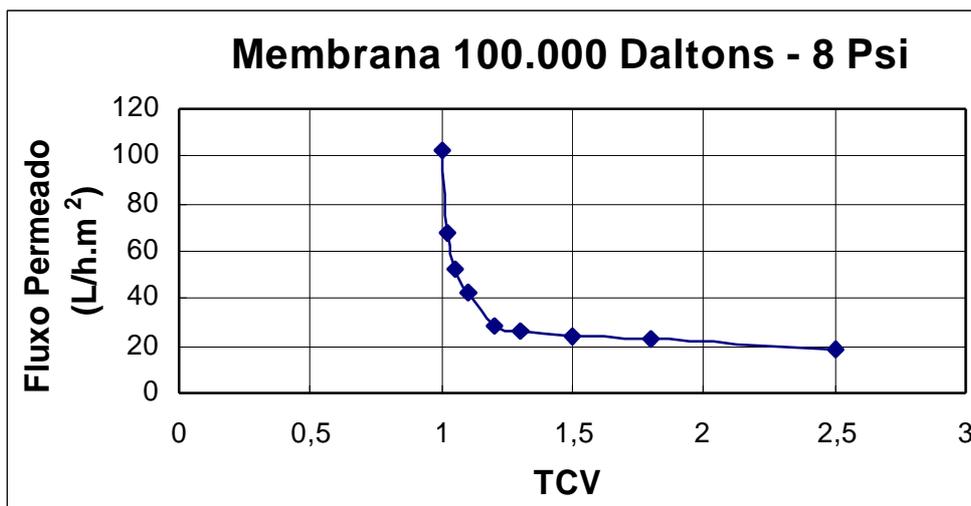


Figura 4.17 - Fluxo Permeado do Extrato de Estévia na Membrana de Ponto de Corte de 100.000 Daltons, em Relação à Taxa de Concentração de Volume, Numa Pressão de Entrada de 8 Psi (PT = 7,5 Psi).

Porém observou-se que numa TCV em torno de 2, na pressão de 8 Psi, os fluxos foram praticamente idênticos, em torno de 20 L/h.m².

FUH *et al.* (1990) encontraram valores iniciais de fluxo permeado para o extrato de estévia em torno de 80 L/h.m² à 174 Psi, para uma membrana tubular de mesmo ponto de corte, sendo que após uma TCV de 9, o fluxo permeado ficou em torno de 60 L/h.m².

A pureza do permeado para a membrana de ponto de corte de 100.000 Daltons, numa pressão de entrada de 8 Psi (**Figura 4.18**), resultou em valores próximos a 25%, numa TCV de 2,5. Este valor foi ligeiramente menor do que os valores encontrados nas membranas de ponto de corte 10.000 e 30.000 Daltons. A maior abertura dos poros da membrana deixou permear os adoçantes, porém também permitiu a passagem de maior quantidade de impurezas.

Os valores de pureza foram calculados pela **equação (3.4)** e os valores de concentração de adoçantes e sólidos totais utilizados para este cálculo estão no **Anexo IV**.

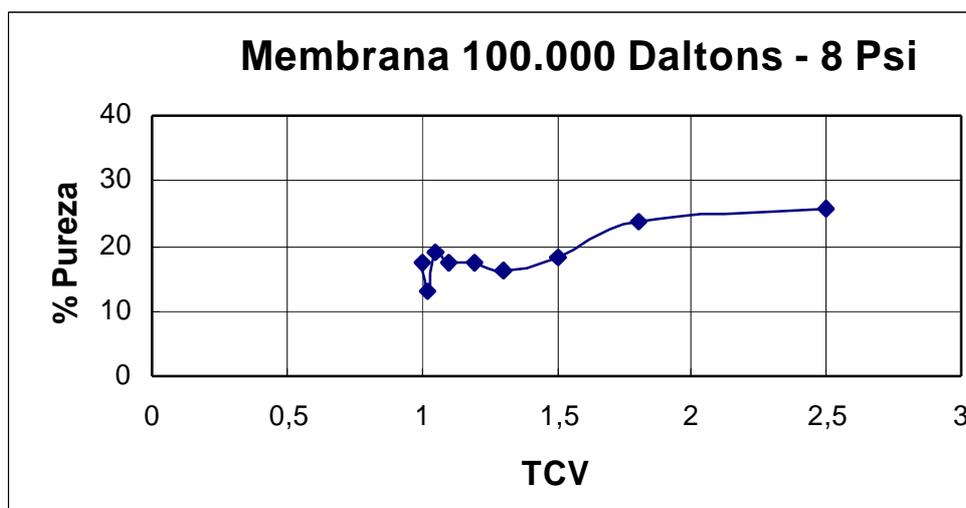


Figura 4.18 - Pureza do Permeado da Membrana de Ponto de Corte 100.000 Daltons em Relação a Taxa de Concentração de Volume nas Pressões de Entrada de 8 Psi (PT = 7,5 Psi).

Nas **Figuras 4.19 e 4.20** são mostrados os valores de despigmentação à 420 nm (cor) e à 670 nm (trubidez) do extrato.

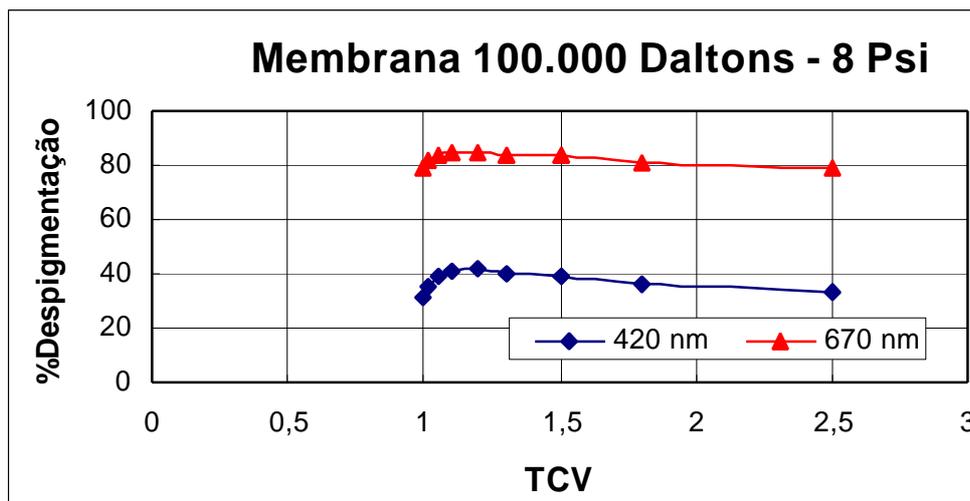


Figura 4.19 - Remoção de Cor e Turbidez no Permeado da Membrana de Ponto de Corte de 100.000 Daltons em relação a Taxa de Concentração de Volume na Pressão de Entrada de 8 Psi (PT = 7,5 Psi).

A membrana de ponto de corte de 100.000 Daltons, na pressão de entrada de 8 Psi, permitiu uma passagem dos pigmentos responsáveis pela cor, o que resultou numa despigmentação em torno de 40%. Esse valor se assemelha com o encontrado por FUH *et al.* (1990), trabalhando com extrato de estévia num sistema de UF, com uma membrana tubular de ponto de corte 100.000 Daltons à 174 Psi. Os valores obtidos para a remoção de turbidez ficaram próximos à 80%, e foram inferiores aos encontrados por FUH *et al.* (1990) (100%). Isto provavelmente deve ser devido ao tipo de membrana utilizada e a baixa pressão utilizada neste trabalho.

4.2.3 Comparação entre as Diferentes Membranas Utilizadas

Neste item será abordada a influência do ponto de corte entre as membranas de 10.000, 30.000 e 100.000 Daltons nos parâmetros de fluxo permeado, pureza e despigmentação no processo de UF nas diferentes pressões trabalhadas.

Na **Figura 4.20** estão apresentados os valores de fluxo permeado para as três aberturas de membranas utilizadas neste trabalho na pressão de 8 Psi.

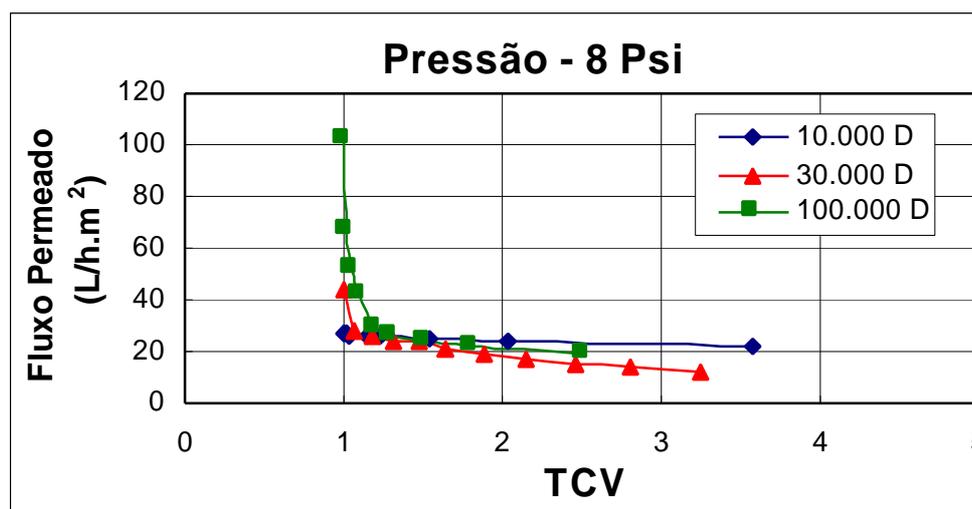


Figura 4.20 - Fluxo Permeado de Extrato de Estévia nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000, 30.000 e 100.000 Daltons, à 8 Psi.

Os valores iniciais de fluxo permeado foram diretamente proporcionais ao ponto de corte da membrana, porém ao longo da filtração o fluxo permeado teve um comportamento mais constante na membrana de 10.000 Daltons (PCPM).

McLELLAN (1989) verificaram que na clarificação do suco de maçã, maiores fluxos foram conseguidos com maiores pontos de corte, em detrimento da qualidade do suco (*apud* PETRUS, 1997).

CAPANELLI *et al.* (1983) verificaram que membranas com diferentes composições químicas, pontos de corte e porosidade global, tiveram comportamento semelhante durante a UF de sucos cítricos. Este comportamento foi atribuído ao gel formado na superfície da membrana, que passou a ser, segundo os autores, responsável pela clarificação dos sucos e que a membrana agiu meramente como um suporte microporoso.

Na **Figura 4.21** estão apresentados os valores de pureza do permeado na pressão de 8 Psi.

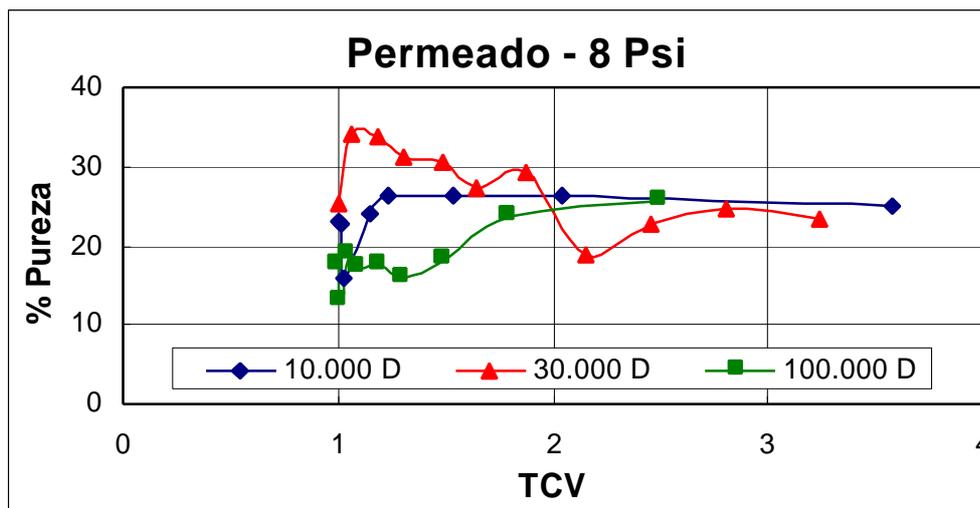


Figura 4.21 - Pureza do Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000, 30.000 e 100.000 Daltons, à 8 Psi.

Os valores de pureza foram inicialmente superiores na membrana 30.000 Daltons, e após uma TCV de 2 as três membranas tenderam a um valor em torno de 26%.

Nas Figuras 4.22 e 4.23 estão apresentados os valores de despigmentação à 420 nm (cor) e à 670 nm (turbidez) nas três membranas testadas.

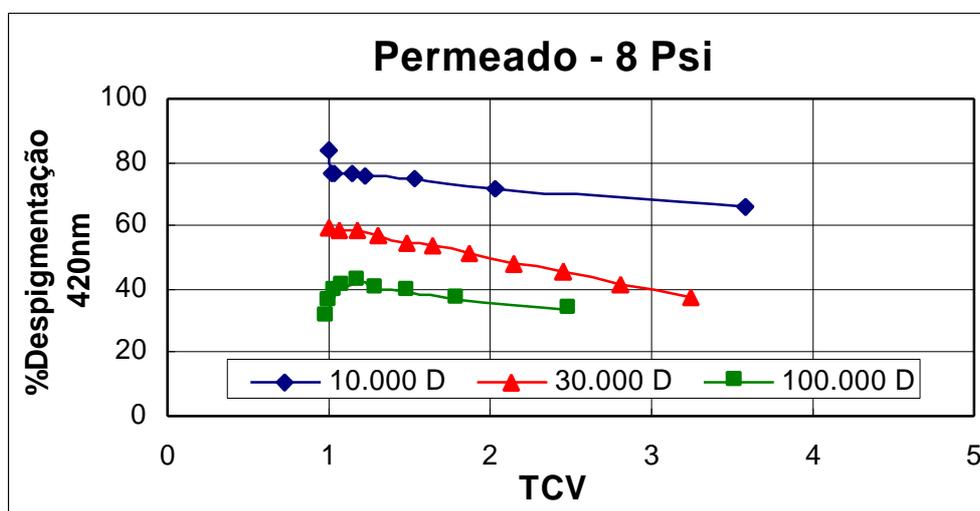


Figura 4.22 - Retirada de Cor no Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000, 30.000 e 100.000 Daltons, à 8 Psi.

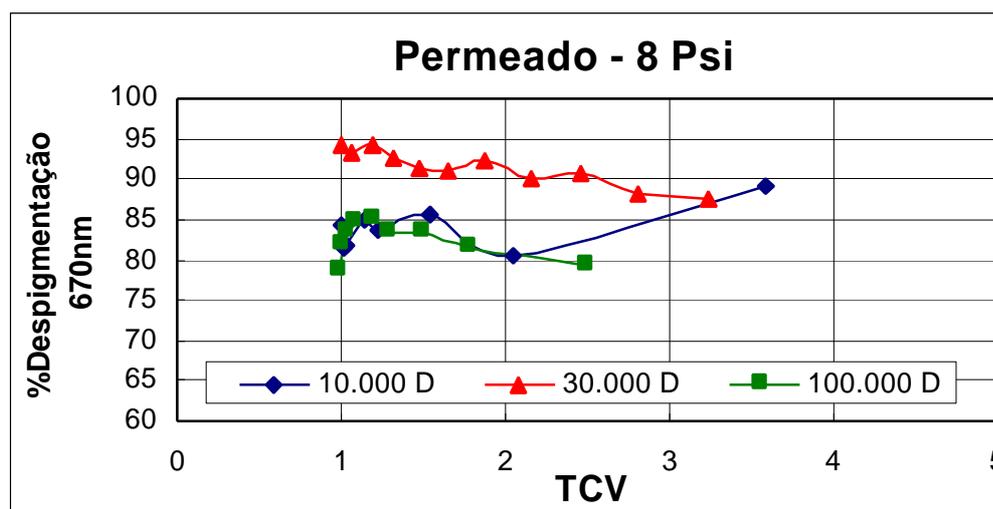


Figura 4.23 - Retirada de Turbidez no Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000, 30.000 e 100.000 Daltons, à 8 Psi.

A retirada de cor foi inversamente proporcional ao ponto de corte das membranas testadas e a retirada de turbidez foi maior na membrana 30.000 Daltons (PCPM) até uma TCV de 3,3. Em valores superiores de TCV a membrana de 10.000 Daltons (PCPM) apresentou melhores valores de despigmentação à 670 nm. A membrana 100.000 Daltons (PCPM) apresentou resultados inferiores de despigmentação (cor e turbidez).

Com os resultados apresentados, a membrana de ponto de corte 100.000 Daltons mostrou baixa porcentagem de pureza e despigmentação, mostrando-se então, inadequada para a purificação do extrato de estévia na pressão de 8 Psi. Os valores de despigmentação diferem dos encontrados por FUH *et al.* (1990) que obtiveram resultados em torno de 98%, trabalhando com uma membrana tubular (100.000 Daltons) à 174 Psi.

Nas **Figuras 4.24 e 4.25** são mostrados os valores de fluxo permeado nas três membranas testadas, nas pressões de 10 e 12 Psi.

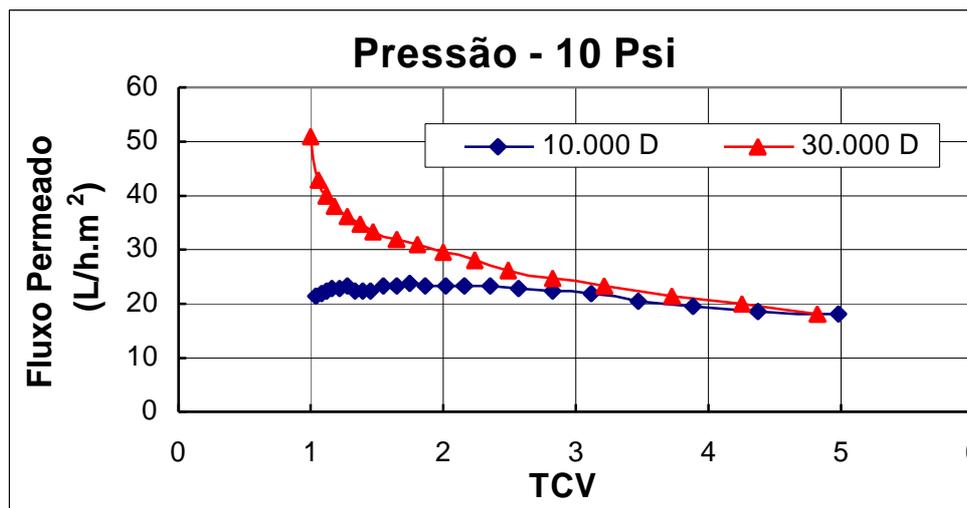


Figura 4.24 - Fluxo Permeado de Extrato de Estévia nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, à 10 Psi.

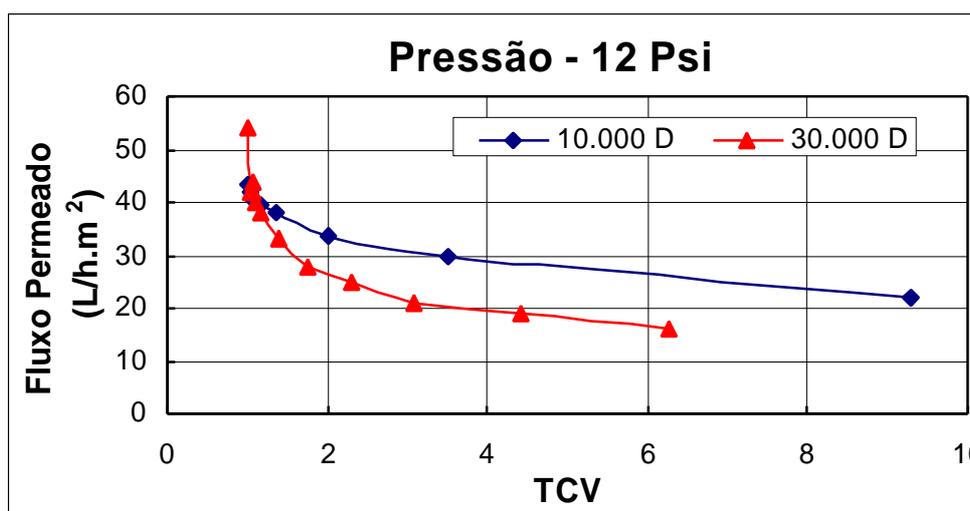


Figura 4.25 - Fluxo Permeado de Extrato de Estévia nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, à 12 Psi.

Nas pressões de 10 e 12 Psi o fluxo permeado inicial foi maior na membrana de 30.000 Daltons (PCPM). Na membrana de 10.000 Daltons o fluxo permeado manteve um comportamento mais constante ao longo da filtração. Na pressão de 12 Psi a membrana de 30.000 Daltons apresentou um fluxo menor que a membrana 10.000 Daltons durante a UF. Isto se deve provavelmente ao “fouling” formado na membrana 30.000 Daltons nesta pressão.

Nas **Figuras 4.26 e 4.27** estão apresentados os valores de pureza do permeado nas pressões de 10 e 12 Psi.

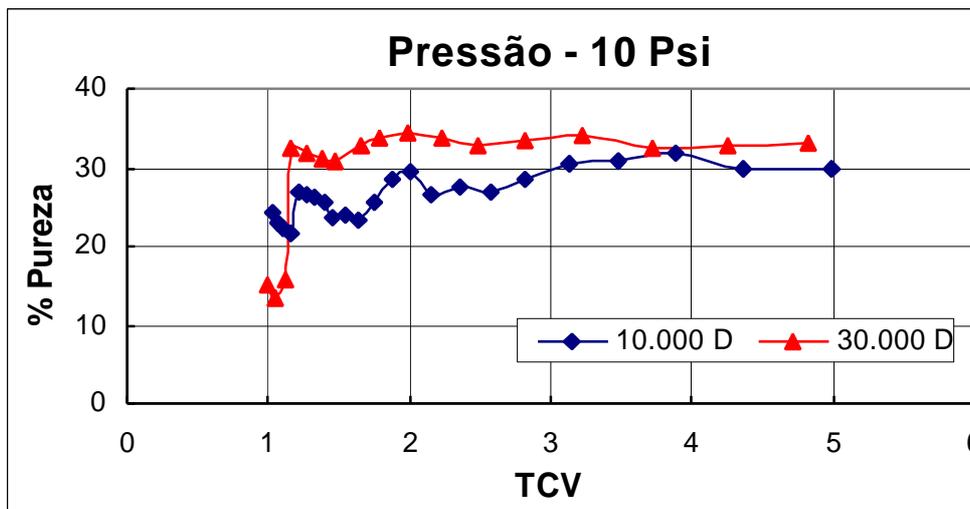


Figura 4.26 - Pureza do Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, à 10 Psi.

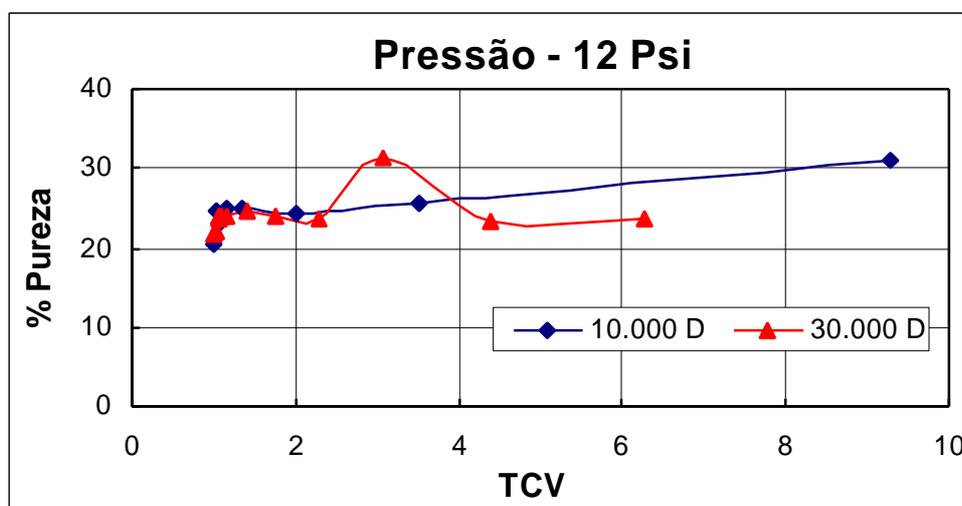


Figura 4.27 - Pureza do Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, à 12 Psi.

Na pressão de 10 Psi a membrana 30.000 Daltons apresentou os maiores valores de pureza (em torno de 33%) e a membrana de 10.000 Daltons resultou valores em torno de 30%, entre TCVs de 1,2 a 4,8. Na pressão de 12 Psi os valores iniciais de pureza foram

praticamente iguais para as duas membranas (23%), e após uma TCV de 2,3 a membrana de 10.000 Daltons mostrou resultados entre 25-30%.

Nas **Figuras 4.28 e 4.29** são apresentados os valores de despigmentação à 420 nm (cor) nas pressões de 10 e 12 Psi.

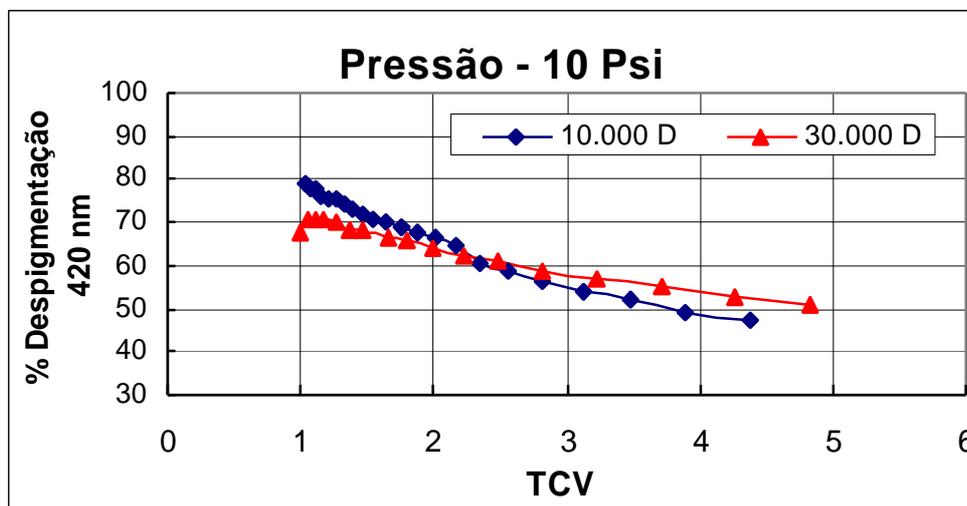


Figura 4.28 - Retirada de Cor no Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, à 10 Psi.

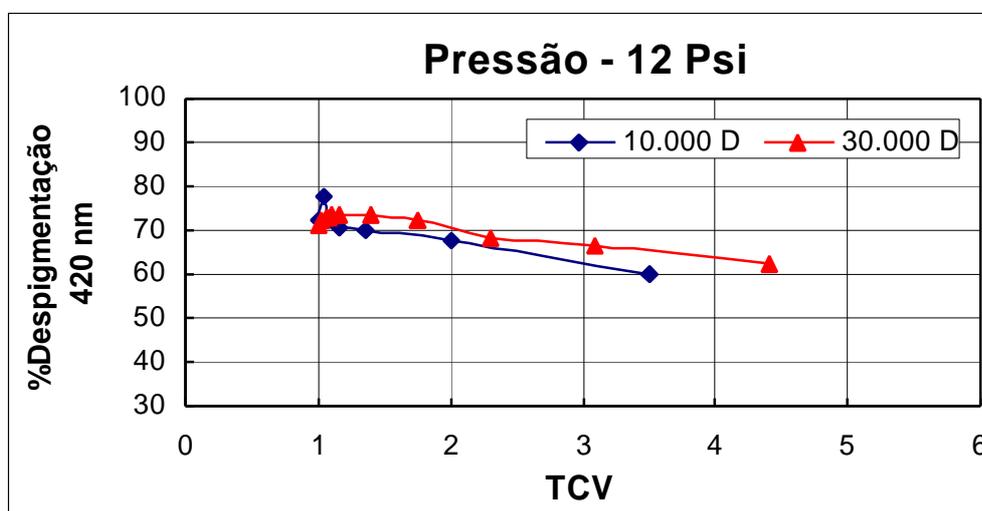


Figura 4.29 - Retirada de Cor no Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, à 12 Psi.

Na pressão de 10 Psi, a membrana de 10.000 Daltons apresentou valores iniciais de retirada de cor de aproximadamente 80% enquanto que a membrana 30.000 Daltons em

torno de 70%. As duas membranas apresentaram resultados muito próximos de retirada de cor.

Nas **Figuras 4.30 e 4.31** são apresentados os valores de despigmentação à 670 nm (turbidez) nas pressões de 10 e 12 Psi.

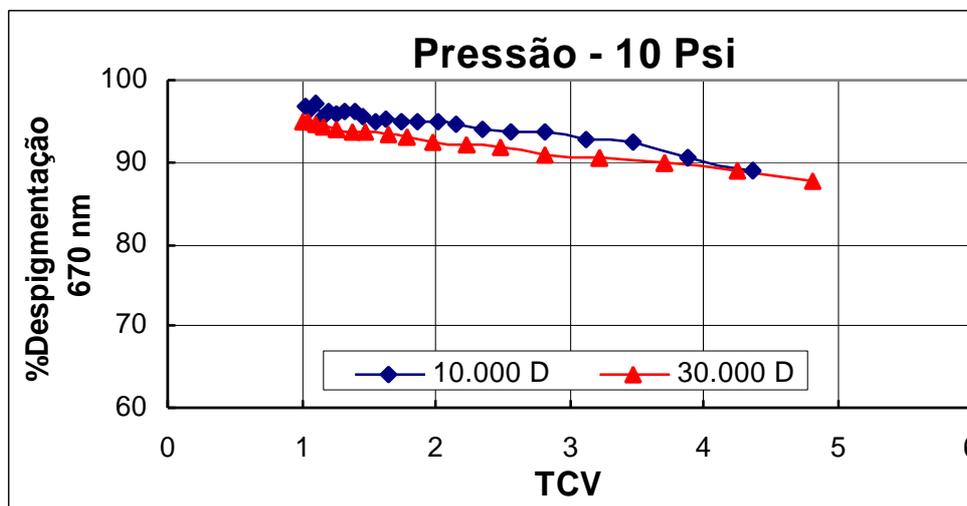


Figura 4.30 - Retirada de Turbidez no Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, à 10 Psi.

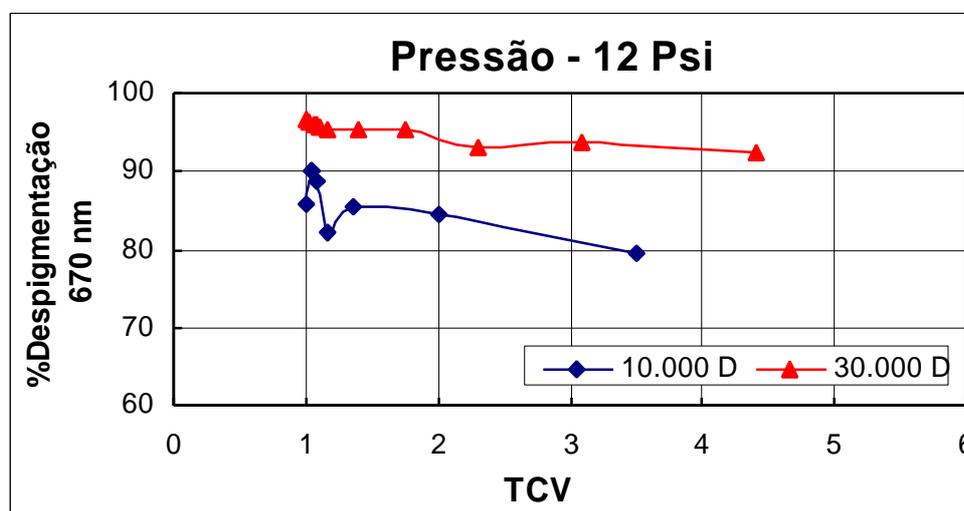


Figura 4.31 Retirada de Turbidez no Extrato de Estévia Permeado nas Membranas de Ponto de Corte de 10.000 e 30.000 Daltons, à 12 Psi.

Na pressão de 10 Psi as duas membranas apresentaram resultados próximos de retirada de turbidez, acima de 90%. Em 12 Psi a membrana de 30.000 Daltons resultou maiores valores (entre 93 – 95%) que a membrana de 10.000 Daltons (80 – 85%).

Analisando os resultados de comparação entre as membranas de 10.000, 30.000 e 100.000 Daltons nas pressões de 8, 10 e 12 Psi, pode-se concluir que, de um modo geral, a membrana de 30.000 Daltons a 10 Psi apresentou os melhores resultados de fluxo permeado, pureza e despigmentação para a purificação do extrato de estévia no processo de UF. Com base nestas conclusões foi realizada uma diafiltração na membrana de 30.000 Daltons a 10 Psi.

4.2.6 Diafiltração (DF)

Os testes de ultrafiltração foram realizados com o objetivo de retirar os adoçantes que permaneceram no retentado. Iniciou-se a DF quando a TCV estava em 12,9 (360 minutos), e os índices de pureza estavam em torno de 33%. Na **Figura 4.32** estão apresentados os resultados de fluxo em função do tempo durante a UF e DF.

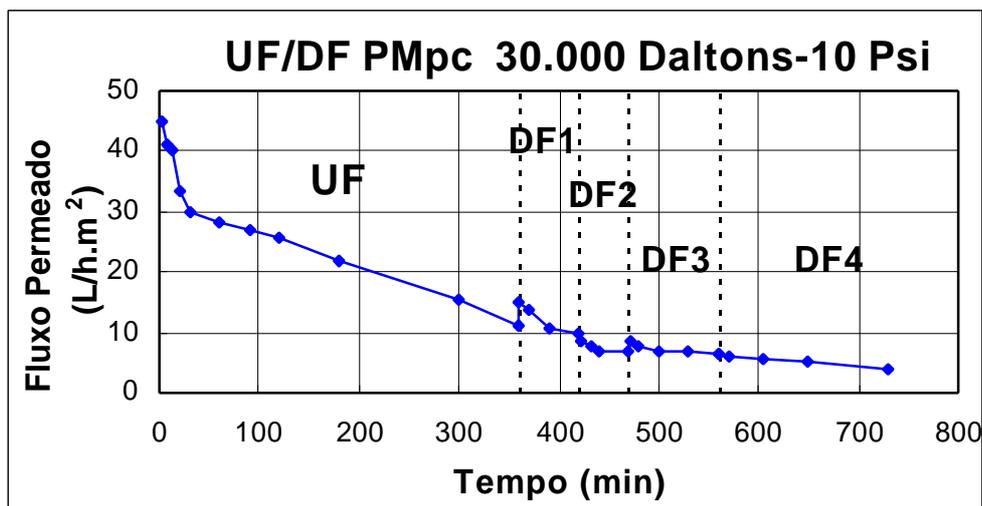


Figura 4.32 - Fluxo Permeado durante o Processo de UF e DF com a Membrana de Ponto de Corte 30.000 Daltons, à 10 Psi (Pressão de Entrada).

Efetuuou-se a DF, num sistema batelada, no qual foram feitas quatro adições sucessivas de água. A **Figura 4.33** apresenta os valores de pureza durante a UF/DF.

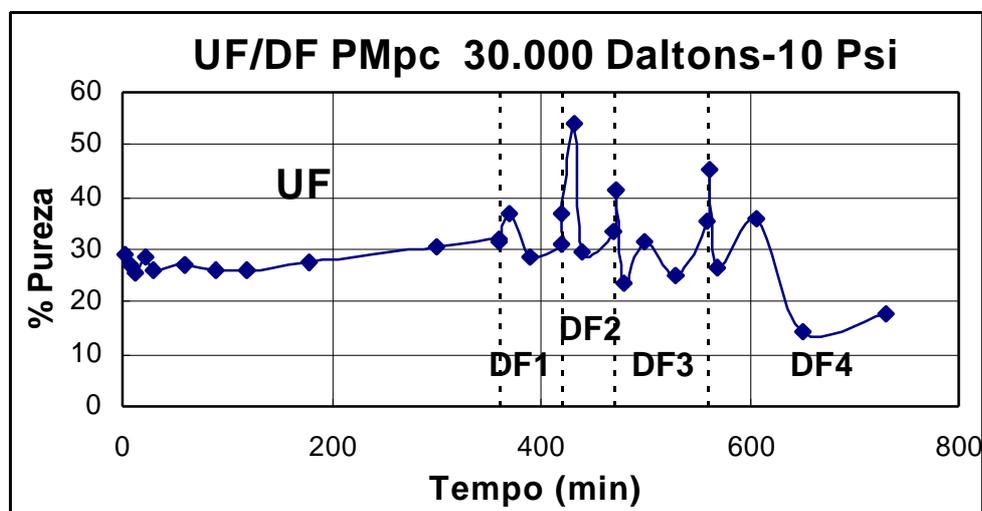


Figura 4.33 - Pureza do Permeado no Processo de UF/DF com a Membrana de Ponto de Corte 30.000 Daltons à 10 Psi.

Com a diafiltração obteve-se um significativo aumento nos índices de pureza do permeado, sendo que a pureza alcançou valores próximos à 55%. Estes resultados foram superiores aos encontrados por FUH *et al.* que obtiveram valores de pureza, após a DF de 46,5%, trabalhando com uma membrana tubular de ponto de corte 25.000 Daltons à 123 Psi.

A separação física por membranas remove impurezas efetivamente. Portanto, para se obter um aumento nos índices de pureza se faz necessário uma retirada de água, usando para isto uma osmose inversa (OI). Assim, os processos de UF, DF e OI poderiam ser usados na purificação e concentração do extrato de estévia num processo contínuo.

5. CONCLUSÕES

Neste capítulo apresentam-se as principais conclusões sobre o processo de purificação e concentração do extrato da *Stevia rebaudiana* Bertoni através de membranas descrito no Capítulo 3 e com base nos resultados apresentados no Capítulo 4. De um modo geral, por meio dos resultados obtidos, pode-se concluir que o processo de Ultrafiltração/Diafiltração foi eficiente para a purificação do extrato da *Stevia rebaudiana* Bertoni. Algumas conclusões específicas são apresentadas a seguir:

- **PMPC 10.000 Daltons**

A membrana 10.000 Daltons (PMPC) apresentou os maiores valores de fluxo permeado de extrato à 12 Psi. Nas pressões de 8 e 10 Psi não ocorreu um aumento de fluxo proporcional ao aumento da pressão.

A pureza nesta membrana apresentou resultados semelhantes, em torno de 25%, para as três pressões testadas, parecendo que a faixa de variação de pressão utilizada para esta membrana não afetou sensivelmente a purificação do extrato.

A retirada de cor apresentou pequenas variações com as pressões utilizadas. Esta despigmentação ficou entre 60-80%, sendo que os maiores valores nesta faixa estão à 8 Psi.

Na pressão de 10 Psi a retirada de turbidez ficou na faixa de 95%, e à 8 e 12 Psi obtiveram-se valores entre 80-90%.

Possivelmente os pigmentos causadores de cor no extrato tenham peso molecular inferior às partículas responsáveis pela turbidez, visto que à 8 Psi, obteve-se uma melhor retirada de cor, e com o aumento da pressão estes pigmentos conseguiram atravessar a membrana. Para a turbidez os melhores resultados foram obtidos à 10 Psi. Provavelmente na pressão de 8 Psi as partículas causadoras de turbidez permearam a membrana lentamente, e com o aumento da pressão para 10 Psi ocorreu um certo bloqueio dos poros de maneira a dificultar a passagem destas partículas. E à 12 Psi ocorreu uma força suficiente para desobstruir a passagem das partículas causadoras de turbidez através da membrana.

- PMPC 30.000 Daltons

A membrana de 30.000 Daltons (PMPC) apresentou os melhores resultados de fluxo permeado entre 10 Psi e 12 Psi. Um aumento de pressão de 10 para 12 Psi não resultou um aumento proporcional do fluxo permeado, possivelmente devido ao “fouling” ocorrido na superfície da membrana.

Os melhores valores de pureza (em torno de 33%) foram obtidos a 10 Psi. Nas pressões de 8 e 12 Psi os valores de pureza ficaram na faixa de 25-30%. Um aumento de pressão resultou num aumento de pureza nas pressões de 8 e 10 Psi. E na pressão de 12 Psi parece ter ocorrido uma certa restrição à passagem dos adoçantes pela membrana.

Nesta membrana a retirada de cor e turbidez foram diretamente proporcionais ao aumento de pressão. Os índices de retirada de cor à 12 Psi foram de 60-75%. Para a turbidez os valores obtidos à 12 Psi foram de 92-95%.

- PMPC 100.000 Daltons

A membrana de 100.000 Daltons apresentou altos valores de fluxos permeados iniciais, porém ao longo da UF apresentou uma queda acentuada neste fluxo. Apesar desta membrana apresentar maior porosidade ocorreu o fenômeno do “fouling” em sua superfície contribuindo para uma sensível redução no fluxo permeado durante o processamento.

Devido a sua maior abertura de poros resultou baixos valores de pureza e despigmentação em relação às membranas de 10.000 e 30.000 Daltons, concluindo que esta membrana não mostrou-se eficiente para a purificação do extrato de estévia na pressão de 8 Psi.

- A redução progressiva de cor e turbidez observada nas três membranas testadas, nas diferentes pressões, pode ser atribuída à formação da camada gel na superfície da membrana, que cresce com o tempo de processo e passa a se constituir numa verdadeira membrana dinâmica. Contribui, também, para a redução da cor e turbidez, a colmatação que ocorre na entrada dos poros superficiais da membrana, reduzindo de forma efetiva os seus diâmetros hidráulicos com conseqüente aumento no poder de retenção de partículas. A ocorrência destes dois fenômenos parece contribuir para a redução no fluxo permeado, que se verifica durante os processamentos.

- fluxo de água através das membranas foi sempre maior que o fluxo do extrato das folhas da estévia, visto o extrato conter, além dos princípios adoçantes, impurezas e pigmentos complexos.

- De um modo geral, na pressão de 8 Psi, os resultados obtidos de fluxo permeado, pureza e despigmentação para as três membranas testadas foram mais baixos que à 10 e 12 Psi. E os melhores resultados destes parâmetros foram obtidos na pressão de 10 Psi para a membrana de 30.000 Daltons.

No processo de purificação do extrato de estévia os resultados mostraram que somente a UF não foi suficiente, necessitando de uma DF para retirar os adoçantes remanescentes do retentado.

Os ensaios de DF realizados com a membrana de 30.000 Daltons à 10 Psi elevaram os valores de pureza do extrato de 33% para 55%.

6. SUGESTÕES

Neste trabalho teórico-experimental buscou-se abordar uma ampla faixa de parâmetros importantes acerca do processo de purificação e concentração do extrato de estévia com membranas. No entanto, encontramos algumas dificuldades em obter informações sobre a purificação deste extrato utilizando processo com membranas. Os estudos nesta área são recentes, além do que os processos com estévia têm grande interesse comercial, e a maioria do material disponível se encontra na forma de patentes (principalmente japonesas) e são de difícil obtenção. Assim, esperamos que este trabalho tenha contribuído para o avanço das pesquisas de purificação do extrato de estévia com processos de separação com membranas e que os resultados alcançados nesta pesquisa possam se constituir numa motivação para outras pesquisas na área. Deste modo, fica como sugestões para trabalhos futuros:

- ❖ Estudar a influência de pressões superiores a 12 Psi nos parâmetros de fluxo permeado, despigmentação e pureza no processo de UF/DF para a purificação do extrato de estévia.
- ❖ Realizar uma microfiltração (MF) anterior à UF a fim de melhorar ainda mais os resultados da UF/DF.
- ❖ Realizar a UF num processo contínuo com a finalidade de se efetuar uma comparação com o processo batelada estudado
- ❖ Estudar outros processos de purificação após o processo de separação com membranas: troca iônica, sedimentação, adsorção, etc., a fim de retirar o remanescente de pigmentos e elevar ainda mais a pureza do adoçante.
- ❖ Efetuar a Osmose Inversa, como um processo para se retirar a água do permeado da diafiltração e aumentar a pureza do extrato.
- ❖ Utilizar o processo de extração supercrítica antes do processo de purificação com membranas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (R.F.D.I.), **Research Foundation for the Development of Industries**, 1980, "Extraction and Purification of Stevioside" Japan Kokai, Tokkyo Koho, v.82, n.05, pp.663.
- ABE, N. AND SONO, M.**1977. "Applications of Steviosides in Food Industry" . New Food Indus. n.19, pp.67.
- ADUCCI, J. BUDDHASUKH, D., TERNAL, B.**, 1987 "Improved Isolation and Purification of Stevioside" J. Sci. Soc. Thailand, pp. 179-183.
- AHMAD, A. W., WONG, L. J.**, 1985 "Determination of Sweet Diterpene Glycosides in *Stevia rebaudiana*" Madri Res. Bull., n. 13, v. 1, pp. 103-107.
- AHMED, M S.; DOBBERSTEIN, R. H. & FARNSWORTH, N. R.**, 1980 "*Stevia rebaudiana* I – Use of p-bromophenyl-bromide to Enhance Ultraviolet Detection of Water-Soluble Organic Acids (Stevioside and Rebaudioside B) in High Performance Liquid Chromatography Analysis" J. Chromatography, n. 192, pp. 387-393.
- AHMED, M S.; DOBBERSTEIN, R. H.**, 1982 "*Stevia rebaudiana* II – High Performance Liquid Chromatography Separation and Quantification of Stevioside, Rebaudioside A and Rebaudioside C" J. Chromatography, n. 236, pp. 523-526.
- AHMED, M S.; DOBBERSTEIN, R. H.**, 1982 "*Stevia rebaudiana* III – High Performance Liquid Chromatography Separation and Quantification of Rebaudiosides B, D and E, Dulcoside A and Stevioside" J. Chromatography, n. 245, pp. 373-376.
- AIMAR, P.; BAKLOUT, S. & SANCHES, V.**, 1986 "Membrane-solute Interactions: Influence on Pure Solvent Transferring During Ultrafiltration" Journal of Membrane Science, n. 29, pp. 207-224.
- AJINOMOTO Co. INC.**, 1981 "Stevia Sweetener Purification" Japan Kokai, n. 81, v. 121, pp. 454.
- AJINOMOTO Co. INC.**, 1981 "Stevioside Removal From Stevia Sweetener" Japan Kokai, n. 81, v. 121, pp. 455.

- AKASHI, H. & YOKOYAMA, Y. & OSADA, M.** (TAMA BIOCHEMICAL RESEARCH Co. LTD.), 1975, "Extraction and Purification of Stevioside" Japan Kokai, n. 75, pp. 240-300.
- ALLINGER, N. L.**, 1978 "Carboidratos" **Química Orgânica**, 2^a ed., cap.25, Editora Guanabara Dois S. A., Rio de Janeiro – Brasil
- ALVAREZ, M.**, 1984, "*Stevia rebaudiana* Bert. (Bertoni) – Estado Atual do Conhecimento".
- ALVAREZ, M. & COUTO, A. C.C.**, 1984 "Processo de Fracionamento dos Componentes das Folhas da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (Fund. Univer. Est. de Maringá e Banco do Brasil) Pedido de Privilégio no Brasil, protocolo nº 84, v. 02, pp. 752.
- ALVAREZ, M., KUSUMOTO, I. T.**, 1987, "Quantitative Analysis of Glicosidic Sweeteners of *Stevia rebaudiana* and Their Hydrolysis Products by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)" Arq. Biol. Technol., n. 30, v. 2, pp 337-348.
- ALVES, L.M. & RUDDAT, M.**, 1979 "The Presence of Gibberellin A₂₀ in *Stevia rebaudiana* and its Significance for the biological Activity of Steviol" Plant and Cell Physiology, n. 20, v. 1, pp. 123-130.
- ALVES, L.M.** 1975 "The Gibberellin and Gibberellin Like Substances of *Stevia rebaudiana* Bertoni" Univ. Chicago, Photoduplication Dep. – from Diss. Inst. Botany, n. 36, v. 7, pp. 3194.
- AOAC**, 1984, **Official Methods of the Association of Analytical Chemists**, AOAC, Washington – DC.
- AQUINO, R. P.; BEHAR, I.; BIONDI, A.; DE SIMONI, F.; SCALESSE, G.**, "Isolation of Sweet Compounds from *Stevia rebaudiana*" Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., n. 61, v. 9, pp. 1247-1252.
- ARASHI, H.**, 1987 "Purification of Stevioside From *Stevia rebaudiana* Leaves" (Arashi agro-desenvolvimento Ltda.) Bras. Pedido PI BR, n. 87, v. 00, pp. 453, (C1 C13D1/14), 6 pp.
- ARYA, V. P.**, 1962, "Position and Configuration of the Carboxyl Group in Steviol and Isosteviol" J. Sci. Ind. Res., n. 21-B, pp. 93-95.

- ASANO, K.; TOMOMATSU, S. & KAWASAKI, M.**, 1975 “Extraction of Stevioside”(Tagasaku Perfumary Co. Ltd.) Japan Kokai, n. 75, v. 88, pp. 100.
- BAKER, R. W. & STRATHMANN, H.**, 1970 “Ultrafiltration of Macromolecular Solutions with High Flux Membranes” Journal of Applied Polymer Science, n. 14, pp. 1197-1214.
- BEATON, N. C.**, 1979 “Ultrafiltration and Reverse Osmosis in the Dairy Industry – An Introduction to Sanitary Considerations” journal Food Protection, n. 42, v. 7, pp. 584-590.
- BELL, F.**; 1954 “**Stevioside: A Unique Sweetening Agent**” Chemistry and Industry, n. 32, pp. 897-898.
- BER BUND**, 1920 “Eine Neue Zuckerpflanze” Publicação Jornalística em Berna – Suíça em 3 de Dezembro de 1920.
- BIAN, S. SUN, H. LIU, L. ZHOU, H.** , 1986 “Extraction of Total Stevioside by Macroreticular Resins” Zhongcaoyao, n. 17, v. 6, pp. 12-13.
- BRIDEL, M. ET LAVIEILLE, R.**, 1931, **Le Principe Sucré du Kaá-Hê-é (Stevia rebaudiana Bertoni)**. Bull. Soc. Chim. Biol., n. 13, pp. 781-796. Paris
- BRIDEL, M. ET LAVIEILLE, R.**, 1931 **Le Principe à Saveur Sucrée du Kaá-Hê-é (Stevia rebaudiana Bertoni)**. Bull. Soc. Chem. Biol. n. 31, pp. 636-655 – Paris.
- CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M.**, 1996, *Alimentos para Fins Especiais – Dietéticos*, Livraria Varela, São Paulo, pp. 26.
- CAPANNELLI, G.; BOTTINO, A.; MUNARI, S.; BALLARINO, G.; MIRZAIAN, H.; RISPOLI, G.; LISTER, D. G.; MASCHIO, G.**, 1992 “Ultrafiltration of Fresh Orange and Lemon Juices” Food Science & Technology (Lebensmittel Wissenschaft & Technologie) , n. 25, v. 6, pp. 518-522.
- SCOTT, K. and HUGHES, R.**, 1996, “Membrane Equipment and Plant Design”, *Industrial Membrane Separation Technology*, 1 ed., Chapter 3, London, UK, Blackie Academic & Professional.
- CHAMCHONG, M. & NOOMHORM, A.**, 1991 “Effect of pH and Enzymatic Treatment on Microfiltration and Ultrafiltration of Tangerine Juice” Journal of Food Process Eng., n. 14, pp. 21-34.

- CHANG, C. Y.; CHANG, W. H.**, 1985 “A Study on the Conditions of Extraction of Stevioside from Stevia Leaves” *Chung-Kuo Nung Yeh Hua hsueh Hui Chih*, n.23, v. 1-2, pp. 168-167.
- CHANG, S. & COOK, J.**, 1983 “Stability Studies of Stevioside and Rebaudioside A in Carbonated Beverages” (Corp. Res. Dev. Dep. Coca-Cola Co.) *J. Agric. Food Chem.*, n. 31, v. 2, pp. 409-412.
- CHENG, T. F.; CHANG, T.Y. and CHANG, W.H.**,1985 “A Study on the Purification of Steviosides with Use of Ion-exchange Resins” *J. Chinese Agri. Chem. Soc.*, n. 23, pp. 178.
- CHERYAN, M.** 1977 “Mass Transfer Characteristics of Hollow Fiber Ultrafiltration of Soy Protein Systems”*J. Food Proc. Eng.*, n. 1, pp. 169-287.
- CHERYAN, M.**, 1986a “Introduction” In: **CHERYAN, M.** ed., *Ultrafiltration Handbook*, Cap. 1, Lancaster, Technomic.
- CHERYAN, M.**, 1986c “Modeling of Ultrafiltration Process” In: **CHERYAN, M.** ed., *Ultrafiltration Handbook*, Cap. 4, Lancaster, Technomic.
- CHERYAN, M.; KUO, K. P.**, 1984 “Hollow Fibers and Spiral Wound Modules for Ultrafiltration of Whey: Energy Consumption and Performance” *Journal Dairy Science*, n. 67, pp. 1406-1413.
- CHIAN, B. H. & CHERYAN, M.**, 1987 “Modeling of Hollow Fiber Ultrafiltration of Skimmilk under Mass-transfer Conditions” *J. Food Eng.*, n. 4, v. 6, pp. 241-255.
- CHISSO CORP.**, 1980, “Stevia Sweetener Purification”, *Japan Kokai*, n. 80, v. 120, pp. 770.
- CORRÊA, M. P.** ,1926, Caá-êhê. no *Dicionário das Plantas Têxteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, 1ª-edição, vol. 1, pg. 348. – Ministério da Agricultura – Rio de Janeiro.
- CRAMMER B. and IKAN R.**,1987.”Progress in the Chemistry and Properties of Rebaudioside”, *Chemistry and Properties of Rebaudiosides*,Chapter 2, Jerusalém, Israel.
- D’AGOSTINHO, M., DE SIMONE, F., AQUINO, R.**, 1984 “Sterols From *Stevia rebaudiana* Bertoni” *Soc. Ital. Biol. Sper.*, n. 60, v. 12, pp. 2237-2240.

- DE CERNADAS, R. R.; PRYLUKA, M.**, 1985 “A Method for the Isolation of Stevioside from Leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni” *Revista Agroquim. Tecnol. Aliment.* (Buenos Aires), n 25, v. 2, pp. 268-272.
- DIETERICH, K.**, 1909, “Some New Naturally Occuring Sweet Substances.” *Pharm. J. & Pharmacist*, n. 28, pp. 769-836.
- DJERASSI, C., QUITT, P., MOSETTIG, E., CAMBIE, R. C., RUTLEDGE, P. S., BRIGGS, L. H.**, 1961, “Optical Rotatory Dispersion Studies – LVII – The Complete Absolute Configurations of Steviol, Kaurene and Diterpene Alkaloids of the Garryfoline and Atisine Groups” *J. Am. Chem. Soc.*, n. 83, pp. 3720-3722.
- DOLDER, F., LICHTI, H., MOSETTIG, E., QUITT, P.**, 1960, “The Structure and Stereochemistry of Steviol and Isosteviol” *J. Am. Chem. Soc.*, n. 82, pp. 246-247.
- DZIEZAK, J. D.**, 1990 “Membrane Separation Technology Offers Processors Unlimited Potential” *Food Technol.*, n. 44, v. 9, pp. 108.
- EYKAMP, W. & STEEN, J.**, 1987”*Handbook of Separation Technology*” In: ROUSSEAU, R. W., *Ultrafiltration and Reversis Osmosis*, Cap. 18, New York, Wiley.
- FANE, A. G.; FELL, C. J. D. & WATERS, A.G.**, 1981 “the Relationship Between membrane Surface Pore Characteristics and Flux for Ultrafiltration Membranes” *Journal of Membrane Science*, n. 9, pp. 245-262.
- FERGUSON, P. H.**, 1989 “Membrane Processing in the Food and Dairy Industries” FIELD, R. W. & HOWELL. J. A. (eds), **Process Engineering in the Food Industry**, New York, Elsevier Science.
- FUH, W.S.** and Chiang, B.H.,1990 “Purification of Stevioside by Membrane and Ion Exchange Process”, *Journal of Food Science*, v. 55,n. 5,pp. 1454-1457 .
- FUJI FOODS K. K.**, 1982, “Stevioside (Tokkyo Koho)” *Japan Kokai*, n. 82, v. 46, pp. 998.
- GALIARD, L.; AMATO, A.; BASILI, A. CAVAZZUTI, G.; GALEFFI, C., BOLASCO, A. CHIMENTI, F., GATTAVECCHIA, E. TONELLI, D.** , 1986 “Determination of Stevioside in *Stevia rebaudiana* by Reverse-phase High Performance Liquid Chromatography” *Ann. Chimie* , n. 76, v. 1-2, pp. 39-43.

- GAO, X.'LUI, Q.**, 1986 “Determination of Stevia Glycosides by 2,4-dinitrophenylhydrazine Gravimetry” *Shipin Kexue* (Beijing), n. 73, pp. 51-54.
- GIAVANETTO, R. H.**, 1989 “Extraction of Stevioside from *Stevia rebaudiana*” Eur. Pat. Appl. EP 302, 948 (CICO7H15/256), pp. 3.
- GLÓRIA, T. S.**, 1986 “Cromatografia em Camada Delgada de Produtos Farmacêuticos” *Rev. Fac. Farm. Bioq. São Paulo*, n.4, v. 2, pp. 391-400.
- GLOVER, F. A.**, 1986, “Modifications to the Composition of Milk”, In. Robinson, r. K., Ed. *Modern Dairy Technology Advances in Milk Processing*, Cap. 5, New York, USA, Elsevier Applied Science.
- GRENBY, T. H.**, 1987 “Stevia: Steps in Developing a New Sweetener” *Developments in Sweeteners* , Chapter 1, London, UK, Elsevier Applied Science.
- HAGA, T.; ISE, R. & KOBAYASHI, A.**, 1976 “Purification of Stevioside” (Sanyo Kokusaku Pulp. Co. Ltd.) *Japan Kokai*, n. 76, v. 149, pp. 300.
- HASHIMOTO, Y.; MORIYAMA, M.; NAKAMURA, S.; ISHIGURO, S. & KOMURO, M.**, 1978 “High Performance Liquid Chromatographic Determination of Stevia components on a Hydrophilic Packed Column” *J. of Chromatography*, n. 161, pp. 403-405.
- HASHIMOTO, Y.; MORIYASU, M.;** , 1978 “Determination of Sweet Components in *Stevia rebaudiana* by High Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet Detection ” *Shoyakugaku Zasshi*, n. 32, v. 4, pp. 209-211.
- HAYASHI, T. & NODA, N.**, 1973, “ Determinação do Poder Adoçante do Esteviosídeo” *Anais de Conferência do Nippon seyaky Gakka. Tokyo Taikai*, pp.42, Tóquio.
- HERNANDEZ, E.; CHEN, C. S.; SHAW, P. E.; CARTER, R. D. & BARROS, S.**, 1992a “Ultrafiltration of Orange Juice: Effect on Soluble Solids and Aroma” *Journal Agric. Food Chem.*, n. 40, v. 6, pp. 986-988.
- HERNANDEZ, E.; COUTURE, R.; ROUSEFF, R. CHEN, C. S. & BARROS, S.**, 1992b “Evaluation of Ultrafiltration and Adsorption to Debitter Grapefruit Juice and Grapefruit Pulp Wash” *Journal Food Science*, n. 57, v. 3, pp. 664-666.
- HUANG, J.**, 1982 “Isolation of Stevioside From Leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni Indigenous of China” *Zhongcaoyao*, n. 15, v. 8, pp. 379-382.

- IGOSHI, M. AND KATO, H.**, 1976, "Purification of Steviosides" Japan Kokai Tokkyo Koho n.79, pp.12-400.
- INGLETT, G. E., AND MAY, J. F.** 1968, "Tropical Plants with Unusual Taste Properties" Econ. Bot. n. 22, pp.326-331.
- INGLETT, G. E., AND MAY, J. F.** 1969,"Serendipity berries (*Dioscoreophyllum cumminsii*) – Source of a New Intense Sweetener" J. Food Res. , n. 34, pp. 408-411.
- ISHIZONE, H.**, 1979, "Separation and Purification of Stevioside (Hriuchi Itaro Shoten K. K.)" Japan Kokai, n. 79, v. 12, pp. 400
- JABUR, I., THOMAS, S.**, 1984, Trabalho realizado na Universidade Estadual de Maringá.(comunicação pessoal).
- KANEDA, A., KASAI, R.; YAMASAKI, K & TANAKA, O.**, 1977 "Chemical Studies on Sweet Diterpene glucoside of *Stevia rebaudiana*: Conversion of Stevioside Into Rebaudioside A" Chem. Pharm. Bull., n.25, v. 9, pp 2466-2467.
- KANEDA, A.; KUBOMURA, T.; MIYASAKI, K.; WAKO,K.; TAKAHASHI,C. & SENDA,S.** ,1977, "New Sweetener from Stevia"- Nikken Chemicals Co. Ltd., Japan Kokai, n.77, v. 110, pp. 871.
- KASAI, R.; YAMAGUSHI, H.; TANAKA, O.**, 1988 "High Performance Liquid Chromatography of Glycosides on a New Type of Hydroxilapatite Column" J. Chromatography, n. 407, pp. 205-210.
- KATO, R.; SAKAGUSHI, Y. & MOTOI, N.**, 1977 "Extraction and Purification of Stevioside" (Daicel, Ltd.) Japan Kokai, n. 77, v. 136, pp. 200.
- KAWATANI, T., TANEKI, R. & TANABE, T.**, 1973, "Stevia Cultive Studies" Jap. Jour. Trop. Agric., n. 17, pp. 125-130.
- KIENLE, U.** 1989 "Process for Preparation of a Natural Sweetening Agent from *Stevia rebaudiana* and its Use" Eur. Pat. Appl. EP 335,265)C1 C07H15/256), 7 pp.
- KIER, L.B.** 1972, "Theoretical Studies on the Sweet taste Glucofore. In Structure – Activity Relationships in Chemoreception" Bens, G. Ed. (London), pp. 101-108.
- KIKUCHI, K.** 1985. "Steviosides Derivative as a New Sweetener". Food Sci.(Japan), n.85, pp.52.

- KIKUSHI, H. & SAWAGUSHI, Y.**, 1977, “Stevioside (Sanyo Kakusaku Pulp. Co.)” Japan Kokai, n. 77, v. 57, pp.199.
- KIM, N. S.; OH, S .L.; NAM, Y. J. MIN, B. Y.; SUH, K. B.**, 1983 “Comparative Studies on the Assay Methods of Stevia Sweeteners” Han’guk Sikp’um Kurahakhoechi, n. 15, v. 3, pp. 209-214.
- KIMURA, S.**, 1991 “Transport Phenomena in Membrane Separation Process” J. Chem. Eng. Japan,n. 25, v. 5, pp. Pp. 469-476.
- KINGHORN, A. D.; NANAYAKKAR, N. P. D.; SOEJARTO, D. D. & MEDON, P. J.**,1982 “Potential Sweeteners Agents of Plant Origin I Purification of *Stevia rebaudiana* Sweet Constituents by Droplet Counter Current Chromatography” Journal of Chromatography, n. 237, pp. 478-483.
- KIRK, D. E. MONTGOMERY, M. W. & KORTEKASS, M. G.**, 1983 “Clarification of Pear Juice by Hollow Fiber Ultrafiltration” Journal Food Science, n. 48, v. 6, pp. 1663-1666.
- KIUNI, M; NAKASAWA; SASAKI, S. & FUKUMURA, T.**, 1977 “Stevioside Production” (Japan Organo Corp. Ltd.) Japan Kokai, n. 77, v. 100, pp. 500.
- KOBAYASHI, M.; HORIKAWA, H.; UENO, J.;MITSUHASHI, H.; KOBOMURA, S.; MIYASAKI, K. & CHIDA, S.** , 1978, “New Sweetener from *Stevia rebaudiana*” – Nikken Chemicals Co. Ltd., Japan Kokai, n. 76, v. 91, pp 300.
- KODAKA, K.**, 1977 “Purification of Sugar Solutions From Stevia Dry Leaves” Japan Kokai, n. 77, v. 110, pp. 872.
- KOHDA, H. & TANAKA, O.**, 1975, “Stevioside Enzymatic Hydrolyses” Yakugaku Zasshi, n. 95, pp. 246
- KOHDA, H., TANAKA, O. & NISHI, K.** ,1976, “Diterpene Glycosides of *Stevia paniculata* Lag. : Structures and Aglycones” Chem. Pharm. Bull., v.25, n. 5, pp. 1040-1044.
- KOHDA, H.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; MURAKAMI, K. & TANAKA, O.**, 1976 “New Sweet Diterpene Glucoside from *Stevia rebaudiana*” Phytochemistry, n. 15, pp. 981-983.

- KORBERT, R.**, 1915 “Sweet Principles of Eupatorium and Glycyrriza” Am. J. Pharm., n. 87, pp.555-568.
- KULKARNI, S. S.; FUNK, E. W. & LI, N. N.**, 1992 “Theory and Mechanistic Concepts”
In: KULKARNI, S. S.; FUNK, E. W. & LI, N. N., ED. *Ultrafiltration Handbook*,
Cap. 27, New York, Van Nostrand Reinhold.
- LAWRENSE, A R., FERGUSON, L. N.**, 1959, “Exploratory Physicochemical Studies on the Sense of Taste” Nature, n. 183, pp. 1469-1471.
- LI, R., ZHOU, R. RAN, Z., LI, QQ.** ,1984 “Isolation of Glycosides from Stevia Species”
Zhongguo Tiaoweipin, n. 11, pp. 16-17.
- LI, Y., LI, Y.**, 1983 “Extraction of Stevioside From *Stevia rebaudiana* – an Experimental Method for High Yield” Shipin Kexue (Beijing), n. 46, pp. 20-22.
- MAKAPUGAY, H. C.; NANAYAKARA, N. P. D.; KINGHORN, A. D.**, 1984
“Potential Sweetening Agents of Plant Origin V – Improved High Performance Liquid Chromatography Separation of the *Stevia rebaudiana* Sweet Diterpenes Glycosides Using Linear Gradient Elution” J. Chromatography, n. 283, pp. 390-395.
- MARUZEM CHEMICAL Co. Ltd.**, 1982 “Separation of Stevioside and Rebaudioside A” Japan Kokai, n. 82, v. 86, pp. 264.
- MARUZEM CHEMICAL Co. Ltd.**, 1983 “A New Sweetener: Ruboside ” Japan Kokai, n. 83, v. 28, pp. 245.
- MASUYAMA, F.**, 1980, “Stevioside Sweetener Purification from *Stevia rebaudiana* Leaves” Japan Kokai, n. 80, v. 7, pp. 39.
- MATSUMI, S.**, 1974, “Present Status and Problems of the Use of Stevia for Sweetening”, Shokuhin Kogyo, v. 17, n. 10, pp. 60-64.
- MATSUO, T.; KANAMORI, H.; SAKAMOTO, I.**, 1986 “Nonsweet Glucosides in the Leaves of *Stevia rebaudiana*” Hiroshima Ken Eisei Kenkusho Kenkyu Hokoku, n. 33, pp. 25-29.
- MAUBOIS, J. L.**, 1980 “Ultrafiltration of Whey” Journal Soc. Dairy Technol., n. 33, v. 2, pp. 55-58.

- MAUBOIS, J. L.**, 1991 “New Applications of Membrane Technology in the Dairy Industry” *Austr. J. Dairy Technol.*, n. 46, v. 2, pp. 91-95.
- MEILICH, H., NECHAMKIN, H., SHAREFKIN, J.**, 1981 “Carboidratos” Braga. J. M., Grassmuck, K. E.(eds), **Química Orgânica** , 2 ed., cap. 25, São Paulo, , Ed. McGraw-Hill do Brasil.
- MELLO, E. M.**, 1989 “*Obtenção e Caracterização de Concentrado Proteico do Soro de Queijo por Ultrafiltração*” Tese de Doutorado, D. T. A. – Fac. Eng. Alim. – UNICAMP – Campinas, 118p.
- MERYN, U. & CHERYAN, M.**, 1980 “Factors Affecting the Mechanism of Flux Declining During Ultrafiltration of Cottage Cheese Whey” *J. Food Process Preserv.*, n. 4, pp. 183-198.
- METIVIER, J. & VIANA, A. M.**, 1979 “Determination of Microgram. Quantities of Steviosides from Leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. By Two Dimensional Thin Layer Chromatography” *J. Exp. Bot.*, n. 30, v. 117, pp. 805-810.
- METIVIER, J. & VIANA, A. M.**, 1979 “The Effect of Long and Short Day Length Upon the Growth of whole Plants and the Level of Soluble Proteins, Sugars and Stevioside in Leaves of *Stevia rebaudiana* Bert.” *J. Exp. Bot.*, n. 30, v. 119, pp. 1211-1222.
- MISUFUME, S. UDA, Y., IKEDA, M.**, 1987 “Extraction of Stevioside as a Sweetener from Plants” *Japan Kokai Tokkyo Koho JP*, n. 62, v. 56, pp. 158. (87 56, 158) (Cl A23L1/221). 4 pp.
- MITSUBISHI ACETATE Co. LTD.**, 1983 “Purification of Stevioside Extract” *Japan Kokai*, n. 83, v. 28, pp. 247.
- MITSUBISHI ACETATE Co. LTD.**, 1983 “Stevioside Sweetener Purification” *Japan Kokai*, n. 83, v. 28, pp. 246.
- MITSUHASHI, H.; UENO, J. & SUMITA, T.**, 1975 “Studies on the Cultivation of *Stevia rebaudiana* – Determination of Stevioside I” *Yakugaku Zasshi*, n. 95, v. 1, pp. 127-130.
- MITSUHASHI, H.; UENO, J. & SUMITA, T.**, 1975 “Studies on the Cultivation of *Stevia rebaudiana* – Determination of Stevioside II” *Yakugaku Zasshi*, n. 95, v. 12, pp. 1501-1503.

- MIWA, K.** , 1978 “Extraction and Purification of Plant Components” (Toyo Ink. Mfg. Co. Ltd.) Japan Kokai, n. 78, v. 105, pp. 500.
- MIWA, K.** , 1979 “Extraction of Stevioside or Phyllocladine” (Toyo Ink. Mfg. Co. Ltd.) Japan Kokai, n. 79, v. 103, pp. 900.
- MIWA, K.; MAEDA, S. & MURATA, Y.** , 1979 “Purification of Stevioside” (Toyo Ink. Mfg. Co. Ltd.) Japan Kokai, n. 79, v. 90, pp. 199.
- MIWA, K.; MAEDA, S. & MURATA, Y.** , 1979 “Stevia Sweetener Purification by Electrolysis” (Toyo Ink. Mfg. Co. Ltd.) Japan Kokai, n. 79, v. 89, pp. 066.
- MORITA, E.** , 1977, “Improvement of Stevioside Sweetener” – Morita Kokagu Kogyo Co. Ltd. – Japan Kokai, n.77, v.117, pp 474.
- MORITA, E.** , 1977, “Taste Improved Sweetener” – Morita Kokagu Kogyo Co. Ltd. – Japan Kokai, n.77, v.122, pp 676.
- MORITA, E.** , 1977, “Tobacco Flavor and from Aroma Improvement with Stevia Extract” – Morita Kokagu Kogyo Co. Ltd. – Japan Kokai, n.77, v.148, pp 700.
- MORITA, E.**, 1973, “ Use of Stevioside in Food ” Jap. Food Science., n. 12, pp. 68-71.
- MOSETTIG, E. , BEGLINGER, V., DOLDER, F., LICHTI, H., QUITTI, P., WATERS, J. A.**, 1963, “The Absolute Configuration of Steviol and Isosteviol” J. AM Chem. Soc., n. 85, pp. 2305-2309.
- MOSETTIG, E., NES, W. R.**,1956, “Stevioside II – The Structure of the Aglucon” J. Org. Chem., n. 20, pp. 884-899.
- MOSETTIG, E., QUITTI, P., BEGLINGER, V., WATERS, J. A., VORBRUEGGEN, H., DJERASSI, C.**, 1961 “A Direct Correlation of the Diterpene Alkaloids and Phyllocladene Group – Interconversion of Garryfoline and Steviol” J. Am. Chem. Soc., n. 83, pp. 3163-3164.
- MULDER, M.**, 1990 “Basic Principles of Membrane Technology”, Separation Processes, , Chapter 1, London, UK, Kluwer Academic Publishers.
- MYASAKI, Y.; KANEMATSU, A. & WATANABE, Y.**,1974, “Agricultural Tests for Growth of Stevia and Stevioside Yield” Jap. Jour. Trop. Agric., n. 17, pp. 158-163.

- NABETA, K.; KASAI, T. & SUGISAWA, H.**, 1976 “Phytosterol from the Callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni” *Agric. Biol. Chem.*, n. 40, v. 10, pp. 2103-2104.
- NABETANI, H.; NAKAJIMA, M.; WATANABE,,^a; NAKAAO, S.I.; KIMURA, S.**, 1990 “Effects of Osmotic Pressure and Adsorption on Ultrafiltration of Ovalbumin” *AIChE Journal*, n. 36, v. 6, pp. 907-915.
- NAKAO, S. I.; NAKAMURA, T.; KIMURA, S.**, 1979 “Characteristics of Macromolecular Gel Layer Formed on Ultrafiltration Tubular Membrane” *AIChE. J.*, n. 25, v. 4, pp. 615-622.
- NIE , H.**, 1985 “Determination of Stevioside by High Performance Liquid Chromatography” *Shengwu Huashue Yu Shengwu Wuli Jinzhan*, n. 64, pp. 63-65.
- NISHIYAMA, P.; ALVAREZ, M.; VIEIRA, L.G.E.**, 1992 “Quantitative Analysis of Stevioside in the Leaves of *Stevia rebaudiana* by Near Infrared Reflectance Spectroscopy” *J. Sci. Food Agric.*, n. 59, v. 3, pp. 277-281.
- NÓBREGA, R. BORGES, C., HABERT, A.**, 1997, **Apostila do Curso de Processos de Separação com Membranas**, Maringá, setembro, 1997.
- OHE, Y.; OKANE, H.; WATANABE, M.; SHIBASATO, M. & KAMATA, Z.**, 1977 “Separation of Sweeteners from Stevia”(Toyo Sugar Refining Co. Ltd.) *Japan Kokai*, n. 77, v. 120, pp. 170.
- ORTEGA, A. MARTINEZ, R. & GARCIA, C. L.**, 1980 “Diterpenes from *Stevia salicifolia* Cav. – Structure of Stevinsol and Salicifoliol” *Rev. Latinoamericana de Química*, n.11, v. 1, pp. 45-48.
- OSHIMA, Y., SAITO, J., HIKINO, H.**, 1986 “Sterebins A, B, C and D, bisnorditerpenoids of *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaves” *Tetraedron*, n. 42, v. 23, pp. 6443-6446.
- OSHIMA, Y., SAITO, J., HIKINO, H.**, 1988 “Sterebins E, F, G and H, diterpenoids of *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaves” *Phytochemistry*, n. 27, v. 2, pp. 624-626.
- PENG, K. FAN, S. WANG, W.**, 1985 “Separation and Quantitative Determination of Stevioside by Reversed-phase HPLC” *Sepu.*, n. 2, v. 1, pp. 6-10.
- PERSINOS, G. J.**, 1973 “Method of Producing Stevioside (Amazon Natural Drug Company) U. S. Patent, n. 73, v. 3 pp. 410.

- PETRUS, J.C.C.** ,1984, *Concentração do Soro Lácteo por Ultrafiltração Tangencial*, Monografia, UFV, Viçosa, MG, Brasil.
- PETRUS, J.C.C.** ,1997, *Preparação, Modificação e Caracterização de Membranas Assimétricas para Clarificação de Suco de Frutas*, Tese de Doutorado, FEA - UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- POMARET, M. M. M., LAVIEILLE, R.**, 1931, *Le Principe à Saveur Sucré du Kaá-Hê-é (Stevia rebaudiana Bertoni)– IV – Quelques Propriétés Physiologiques du Stévioside*. Bull. Soc. Chim. Biol., n. 13, pp. 1248-1253 – Paris.
- PORTER, M. C.**, 1972 “Concentration Polarization with Membrane Ultrafiltration” Ind. Eng. Chem. Res. Develop., n. 11, v. 3, pp. 234-248.
- PRÁDANOS, P.; ABAJO, J.; GONZALEZ, A.**, 1994 “Mass Transfer and Osmotic Pressures for Dextrane T500 on a New Polyamide Membrane ” In; *Congresso Íbero Americano em Ciência e Tecnologia de Membranas* , pp. 208-215, Rio de Janeiro-Br, Agosto.
- RASENACK, P.**, 1908 “Über die Süsstoffe des Eupatorium rebaudianum und des Süssholzes” *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt*, n. 28, pp. 420-443.
- REBAUDI, O** , 1900, “Nota sobre el Caá-éhé” *Revista de Química Farmacéutica*, Buenos Aires. 1,2,3.
- RENNER, E. & SALAM, M. H. A.**, 1991 “Basic Principles” In: **RENNER, E. & SALAM, M. H. A.**,ed., Cap. 2, *Applications of Ultrafiltration in the Industry* London, Elsevier Science.
- SAKAMOTO, I.; KOHDA, H.; MURAKAMI, K & TANAKA, O.**, 1975 “Quantitative Analysis of Stevioside” *Yakugaku Zasshi*, n. 95, pp. 12.
- SAKAMOTO, I.; YAMASAKI, K. & TANAKA, O.**, 1977, “Application of ¹³C NMR Spectroscopy to Chemistry of Plant Glycosides: Rebaudiosides D and E, New Sweet Diterpene Glycosides of *Stevia rebaudiana* Bertoni” *Chem. Pharm. Bull.*n.25, v. 1, pp. 3437-3439.
- SAKAMOTO, I; KOHDA, H; MURAKAMI, K & TANAKA, O.** , 1977, “Application of ¹³C NMR Spectroscopy to Chemistry of Natural Glycosides: Rebaudioside C, a New Sweet Diterpene Glycoside of *Stevia rebaudiana*” *Chem. Pharm. Bull.*, n. 25, pp. 844-846.

- SAMANIEGO, C. C.**, 1946 “*Stevia rebaudiana* – Caa-jhe-he (yerba dulce)” Rev. Farm. Buenos Aires, n. 88, pp. 199-202.
- SAMANIEGO, C. C.**, 1946, “*Stevia rebaudiana* – Caa jhe-he (yerba dulce)”, Rev. Farm. Buenos Aires, n. 88, pp. 3-160.
- SASAKI, K.**, 1983. “Application of Steviosides in Beverages.” New Food Indus. n.25, pp.38.
- SATO, T.; KURODA, J. & MIHARA, K.**, 1980, “Stevioside Purification” (Institute for Production and Development Science) Japan Kokai, n. 80, v. 39, pp. 731.
- SAWAGUSHI, Y. & KIKUCHI, H.**, 1977 ”Purification of Stevioside” (Sanyo Kokusaku Pulp. Co. Ltd.) Japan Kokai, n.77, v. 05, pp. 800.
- SCOTT K. & HUGHES, R.**, 1996, **Industrial Membrane Separation Technology**, 1st ed. New York, Chapman & Hall.
- SEIKISUI CHEMICAL CO.,LTDA**, 1983 “Purification of Stevia Sweeteners by Precipitation (Tokkyo Koho)” Japan Kokai, n. 83, v. 212, pp. 759.
- SEIKISUI CHEMICAL CO.,LTDA**, 1984 “Purification of Stevia Sweeteners” Japan Kokai Tokkyo Koho JP, n. 59, v. 42, pp. 862.(8442,862) (Cl A23L1/22). 4pp.
- SHALLENBERGER, R. S. AND ACREE, T. E.**, 1967, “Molecular Theory of Sweet Taste”, Nature, n. 216, pp. 480-482.
- SHALLENBERGER, R. S.**, 1963, “Hydrogen Bonding and the Varying Sweetness of the Sugars” Journal Food of Science, n. 28, pp. 584-589.
- SHIMADZU CORP.**, 1983 “Stevia Sweeteners Analysis” Japan Kokai Koho JP, n. 58, v. 187, pp. 857 ((83, 187, 857)) (ClG01N31/08) 3pp.
- SHOLICHIN, M.; YAMAZAKI, K.; MIYAMA, R.; YAHARA, S. & TANAKA, O.**, 1980 “Labdane-Type Diterpenes from *Stevia rebaudiana*” Phytochemistry, n. 19, pp. 326-327.
- SOLOMONS. T. W.**, 1983, “ Os Carboidratos” Oliveira, B. O. **Química Orgânica**, vol. 3, cap.24, Rio de Janeiro - Brasil
- STRIEDNER, J. CZYGAN, F. C. BRAUNEEGG, G.**, 1991 “Contribution to the Biotechnological Production of Sweeteners from *Stevia rebaudiana* Bertoni I – A

- Method for the Serial Analysis of Diterpene Glycosides by HPLC” Acta. Biotechnol., n. 11, v. 5, pp. 495-499.
- SUSUKI, H.; IKEDA, T.; MATSUMOTO, T. & NOGUSHI, M.**, 1976 “Isolation and Identification of Rutin from Culture Cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni” Agric. Biol. Chem. , n. 40, v. 4, pp. 819-820.
- SUTHERLAND, J. & FREE, M. J.**, 1991 “A Method for Monitoring Leakage Through Membranes During Ultrafiltration of Milk” Austr. J. Dairy Techn., n. 46, v. 1, pp. 40-42.
- TAKAHASHI, T.** 1987 “Method for Obtaining Sweetening Sugars From Leaves of Stevia” (Arashi Agro-desenvolvimento Ltda.) Bras. Pedido PI BR, n. 86, v. 05, pp. 325. (C1 CO7H15/24), 12 pp.
- TAKAMURA, K.; KAWAGUCHI, M. & ISONO, C.**, 1977 “Stevioside from *Stevia rebaudiana*” (Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.) Japan Kokai, n. 77, v. 05, pp. 800.
- TAKAMURA, K.; KAWAGUCHI, M. & ISONO, C.**, 1978, “Stevioside Isolation” (Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.) Japan Kokai, n. 78, v. 91, pp. 173.
- TAMA SEIGAKU, K. K.**, 1982, “Stevioside Purification (Tokkyo Koho)” Japan Kokai, n. 82, v. 75, pp. 992.
- TAN, S.; SHIBUTA, Y.; TANAKA, O.** (1988) “Isolation of Sweetener from *Stevia rebaudiana*” (Mitsui Petrochemical Industries) Japan Kokai ,Tokkyo Koho JP, n. 63, v.177, pp. 764 ((88177,764)) (CLA 23L1/22) 7pp.
- TANAKA, O.**, 1980, “Chemistry of *Stevia rebaudiana* Bertoni- New Source of Natural Sweeteners” Recent. Adv. Nat. Prod. Res., Proc. Int. Symp., pp. 111-119.
- TANAKA, O.**, 1982, “Steviol- Glycosides: New Natural Sweeteners” Trends in Analytical Chemistry , n.1, v. 11, pp 246-248.
- TANAKA, O.;YAMASAKI, K.; KASAI, K. & KOHDA, H.**, 1977, “Preparation of Sweetening Agents” – Ajinomoto CO. Inc., Japan Kokai, n.77, v. 41, pp. 275.
- THOMAS, E.** 1937, *Stevia rebaudiana* Bull. Assoc. Chem., n. 54, pp. 844-847.Londres.
- TOYO SEITO, K. K.**, 1980, “Stevioside Extraction of *Stevia rebaudiana*” Japan Kokai, n. 80, v. 40, pp. 596.

- TOYO SUGAR REFINING CO. Ltd.**, 1981 “Sterol Glycoside Purification” Japan Kokai, n. 81, v. 137, pp. 866.
- TOYO SUGAR REFINING CO. Ltd.**, 1982 “Purification of α - glucosilstevioside” Japan Kokai, n. 82, v. 43, pp. 659.
- VIOTTO, W.**, 1993 “Ultrafiltração de Soro Doce de Queijo Minas Frescal” Efeito de Pré-tratamento do Soro no Desempenho da Membrana e na Composição e Solubilidade do Concentrado Proteico do Soro” Tese (Doutorado), D. T. A. – Fac. Eng. Alim. – UNICAMP - Campinas 213p.
- VIS, E., FLETCHER, H. G.**, 1956 “Stevioside IV - Evidence that Stevioside is a Sophoroside” J. Am. Chem. Soc., n. 78, pp. 4709-4710.
- VON SCHMELING, G. A.**, 1967 **Caá-Heê Edulcorante Não Calórico (*Stevia rebaudiana* Bertoni)**. Boletim do Sanatório São Lucas. n. 5, pp. 1-14. São Paulo-SP.
- WAKABAYASHI, T.**, 1981 “Purificação de Extratos Contendo Steviosideo” Pedido Brasileiro , PI – BR, n. 81, v. 03, pp. 228.
- WATERS, J. A., BECKER, E. D., MOSETTIG, E.**, 1962 “Anodis Decarboxylation of Isosteviol Acid” J. Org. Chem., n. 27, pp. 4689-4691.
- WETZEL, D. L.**, 1983 “Near Infrared Reflectance Analysis – Sleeper Among Spectroscopic Techniques” Anal. Chem., n. 55, v. 12, pp. 1165 A- 1176^a
- WOOD, H. B., ALLERTON, R., DIEHL, W., FLETCHER, G. H.** 1955 “Stevioside I. The Structure of the Glucose Moities” J. Org. Chem., n. 20, pp. 875-883.
- WOOD, H. B., FLETCHER, G. H.**, 1955, “Stevioside III – The Anomeric 2,3,4,6- tetra-O-acetyl-1-Omesitoyl-D-glucopyranoses and their Behavior with Alkali” J. Am. Chem. Soc., n. 78, pp. 207-210.
- XU, W; MENG, L. & LI, Z.**, 1982 “Study on the Composition of the Sweetener from *Rubus suavissimus* S.Lee” Sp. Nov. Linchan Huaxue Yu Gongye, n. 2, v. 2, pp. 38-41.
- YAMADA, S. & KAJIMA, S.**, 1980, “Pure Stevioside Production (Tokkyo Koho)” Japan Kokai, n. 80, v. 162, pp. 953.

- YAMAMOTO, A.**, 1970, “Fabricação de Doces em Conservas” Japan Kokai, v. 70, n. 48, pp. 172.
- YAMASAKI, K.; KOHDA, H.; KOBAYASHI, T.; KASAI, R. & TANAKA, O.**, 1976, “Structures of Stevia Diterpenes-Glucosides: Application of Carbon-13 NMR” Tetrahedron Lett., n. 13, pp 1005-1008.
- YOKOYAMA, S.; SUGIYAMA, H.**, 1980 “Clarification of Aqueous Extract from Stevia Leaves by Using Magnesia Adsorbent” Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, n. 37, v. 11, pp. 899-905.
- YOSHIDA, S.**, 1986 “Production of Sweet Substances in *Stevia rebaudiana* I – Simple Determination of Sweet Glycosides in Stevia Plant with A Thin Layer Chromatoscanner and their Accumulation Patterns with Plant Growth” Nippon Sokumotsun Gakkai Kigi, n. 55, v. 2, pp. 189-195.
- ZHOU, R. RAAN, Z., LI, Q., ZI, X. RONG, Y., LI, R.**, 1984 “Ion Exchange Methods in Extraction and Purification of Steviosides from *Stevia rebaudiana*” Zhongguo Tiaoweippin, n. 12, pp. 12-13.
- ZI, X. ; LI, R.; ZHOU, R.; RAN, Z.; RONG, Y.**, 1984 “Ion Exchange Methods in Extraction and Purification of Stevioside from *Stevia rebaudiana*” n. 12, pp. 12-13.
- ZI, X.; LI, R.; ZHOU, R.**, 1986 “Extraction of Steviosides from Stevia by Modified Water Extraction-Alcohol Precipitation Methods” Zhongguo Tiaoweipin, n. 2, pp. 17-18.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO I - Metodologia de Quantificação dos Adoçantes da *Stevia rebaudiana* Bertoni por Cromatografia de Papel

Neste anexo será apresentada a metodologia de cromatografia de papel inicialmente utilizada para a quantificação do extrato de estévia, mas que não foi utilizada neste trabalho por ser uma técnica demorada, que pode apresentar interferências de outros glicosídeos do extrato.

8.1.1 Cromatografia de Papel

Foram efetuados testes de quantificação dos adoçantes da estévia através de cromatografia de papel e a extração dos princípios adoçantes das folhas da *Stevia rebaudiana* Bertoni foi efetuada seguindo a proporção de folhas:água contida na metodologia de HASHIMOTO e MORIYASU (1978). O princípio adoçante foi extraído por infusão numa proporção de 1 g de folhas secas para 6 mL de água destilada e deixados em repouso por 2 horas. Decorrido este tempo, filtrou-se a vácuo em papel de filtro quantitativo. Este era o extrato cru, que também se chamou de chá, utilizado para a aplicação nos papéis para cromatografia.

O papel de filtro Watman 1, foi recortado num tamanho adequado para a câmara de vidro. Um dos papéis foi umedecido com ácido bórico 0,3 M e deixado secar.

Na altura de 5 cm da borda do papel foram marcados, com lápis, pontos distanciados 2,5 cm cada um ao longo de sua largura. Nestes pontos foram pingados, cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta automática, gotas de amostras preparadas de D-glucose, D-maltose, tanino, sacarose, malto-dextrina, extrato de estévia e esteviosídeo padrão. Na hora de fazer a aplicação das gotas, aplicou-se uma gota, secou-se a gota com o

auxílio de um secador, para fazer nova aplicação de amostra no mesmo ponto para que se concentrasse a amostra e a gota não ficasse muito grande. No caso do extrato foi aplicado 10 vezes no mesmo lugar. Os outros foram aplicados 5 vezes.

Foram feitas as aplicações em dois papéis de filtro, um com ácido bórico outro não. E, então foram colocados numa câmara de vidro, presos pela extremidade superior numa cubeta contendo 200 ml da fase móvel, uma solução de acetato de etila:isopropanol:água(6:3:1). Assim a fase móvel vai se transportando através do papel até alcançar as gotas aplicadas.

Também foi colocada a fase móvel no fundo da câmara (o papel não entra em contato com a solução do fundo) para que o meio fique saturado. A câmara foi fechada e lacrada com vaselina.

Após 15 horas e 45 minutos, observou-se que os papéis estavam impregnados com o meio solvente. Então efetuou-se a retirada dos papéis da câmara. Os papéis foram deixados secar à temperatura ambiente. Após a secagem efetuou-se a aplicação da solução reveladora. Deixou-se secar à temperatura ambiente. Então, depois de secas, os papéis foram colocados na estufa a 100°C por alguns minutos, para finalizar a revelação das manchas.

- Soluções Utilizadas em Cromatografia de Papel

◆ Amostras

Foram preparadas várias soluções de carboidratos com pesos moleculares conhecidos. Assim, foram preparadas soluções a 10% de D-glucose (P.M. =180,16), D-maltose (P.M. =360,32), tanino (P.M. =1700), sacarose, malto-dextrina e esteviosídeo padrão.

◆ Solução Reveladora

A solução reveladora usada para visualizar as manchas foi preparada com: 400 ml de acetona + 4 g de difenilamina + 8 ml de anilina + 40 ml de ácido fosfórico 85%.

Primeiro colocou-se a difenilamina num erlrmeyer e com o auxílio de uma pipeta adicionou-se a anilina, agitou-se. Depois, adicionou-se a acetona, e, por último, juntou-se o

ácido fosfórico. A mistura tornou-se branca, e agitou-se até a solução tornar-se amarelo-claro transparente. A solução reveladora foi conservada em geladeira.

8.2 ANEXO II – Limpeza das Membranas

Neste item será apresentada a metodologia de lavagem das membranas utilizada neste trabalho, sendo que a limpeza das membranas, no módulo de filtração tangencial, foi efetuada segundo as instruções do fabricante:

- Drenou-se o extrato da unidade
- Passou-se de 10 a 20 L de água destilada no sistema.
- Fechou-se a saída do permeado para garantir que o material encrustado da membrana saísse no retentado ao invés de passar pela membrana, pois iria favorecer o entupimento.
- Colocou-se 1000 mL de NaOH (0,5 M) num reservatório, bombeou-se 100 mL desta solução de limpeza, a 40 -50°C, através do sistema, com o cuidado de não retornar o retentado no reservatório.
- Para sanitizar, e até retirar a coloração marrom-esverdeado do sistema, foi usada também solução de NaOCl (500 ppm) para limpeza e sanitização das membranas.
- Deixou-se o sistema descansar por 30 minutos.
- Repetiu-se este passo quantas vezes foi necessário até o fluido que deixa o sistema estar limpo aos olhos.
- Abriu-se a saída do permeado. Bombeou-se mais 100 mL através do sistema e parou-se a bomba. Deixou-se o sistema descansar por 30 minutos.
- Enxaguou-se o sistema com água ultrapurificada (Milli-Q, água destilada, deionizada ou equivalente)
- Para guardar as membranas por poucos dias, as mesmas foram colocadas em um reservatório com NaCl a 5%, em geladeira.

Após a limpeza, fazia-se um teste de fluxo de água limpa:

- Colocou-se em um reservatório 1L de água ultrapurificada.
- Retornou-se para este reservatório o retentado e o permeado. Este é o modo de reciclo total.
- Colocou-se a bomba na velocidade 8. Usando uma válvula de estrangulamento, fechou-se saída do retentado até obter uma pressão de entrada de 5 Psi. Usando uma proveta, mediu-se o fluxo de permeado e de retentado. Registrou-se os resultados.
- Aumentou-se a pressão de entrada para 10 Psi, e mediu-se o fluxo de permeado e de retentado novamente. Registrou-se os resultados.
- Graficou-se o fluxo de permeado contra a pressão transmembrana. Ocorreu uma correspondência direta entre a pressão e o fluxo: 5 Psi – x mL/min, 10 Psi – 2x mL/min, 15 Psi – 3x mL/min...

Ou seja, o gráfico teve um comportamento linear.

Este teste de água limpa foi usado para se descobrir a performance das membranas e determinar quando limpá-las. Para fazer isto, efetuou-se a corrida do teste da água limpa para cada tipo de membrana, e através destes valores, foi possível determinar a efetividade do procedimento de limpeza. Se o fluxo de água limpa final fosse menor ou igual que 80% do primeiro valor de fluxo de água limpa, poderia se selecionar um agente de limpeza mais efetivo.

8.3 ANEXO III - Curvas Padrões

Neste anexo serão apresentadas as curvas padrões de adoçantes e absorvância. A curva de adoçantes foi utilizada para a quantificação dos adoçantes na cromatografia líquida de alta pressão conforme citado no **item 3.6.3**. E a curva de absorvância foi utilizada para a leitura de absorvância ótica no cálculo de despigmentação conforme citado no **item 3.7.4**.

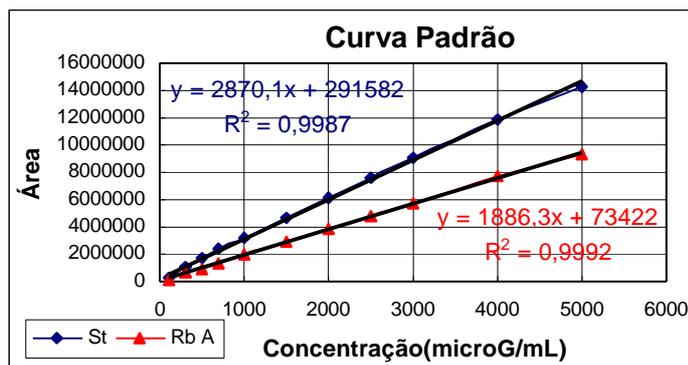


Figura 8.3.1 -Curva Padrão de Adoçantes -Esteviosídeo (St) e Rebaudiosídeo A (Rb A)

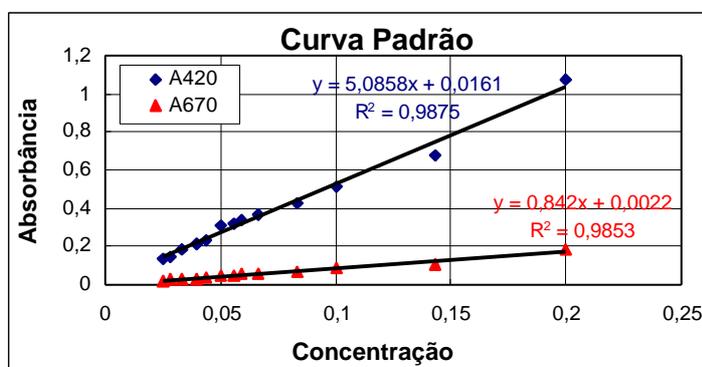


Figura 8.3.2 - Curva Padrão de Absorbância Ótica a 420 nm e a 670 nm.

8.4 ANEXO IV - Curvas de Concentração de Adoçantes e Teor de Sólidos Totais.

Nas Figuras 8.4.1 a 8.4.14 apresentam-se os gráficos de concentração de adoçantes e teor de sólidos totais para a filtração tangencial, no permeado e retentado, nas membranas de ponto de corte 10.000, 30.000 Daltons, nas pressões de 8, 10 e 12 Psi, e 100.000 Daltons na pressão de 8 Psi. Esses valores estão envolvidos no cálculo da percentagem de pureza, conforme equação (3.4), e apresentados no item 4.2.

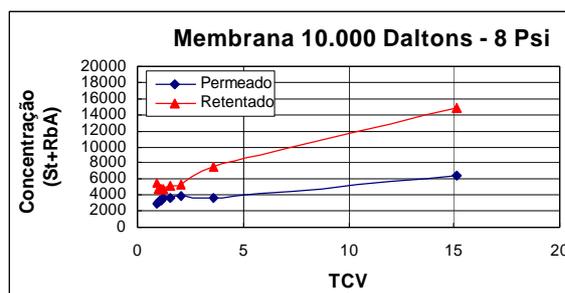


Figura 8.4.1 - Concentração de Adoçantes (**mg/mL**) no Permeado e no Retentado em Função da Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons à 8 Psi (PT = 6,6 Psi) - (Extrato Cru – St - 2603 **mg/mL**; Rb A - 1564 **mg/mL**).

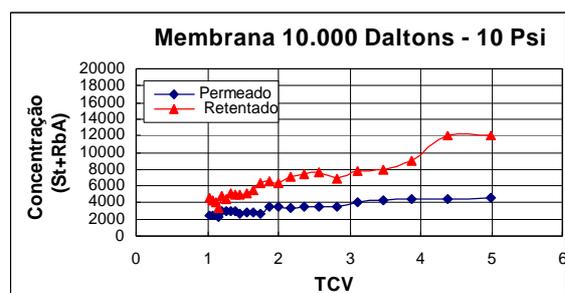


Figura 8.4.2 - Concentração de Adoçantes (**mg/mL**) no Permeado e no Retentado em Função Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons à 10 Psi (PT = 8,7 Psi) - (Extrato Cru – St - 2342 **mg/mL**; Rb A - 1561 **mg/mL**).

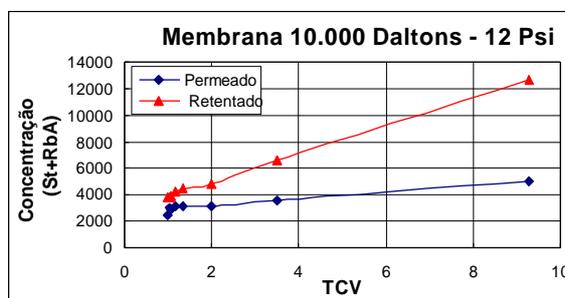


Figura 8.4.3 - Concentração de Adoçantes (**mg/mL**) no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons à 12 Psi (PT = 10,8 Psi) - (Extrato Cru – St – 2730,7 **mg/mL**; Rb A - 1506 **mg/mL**).

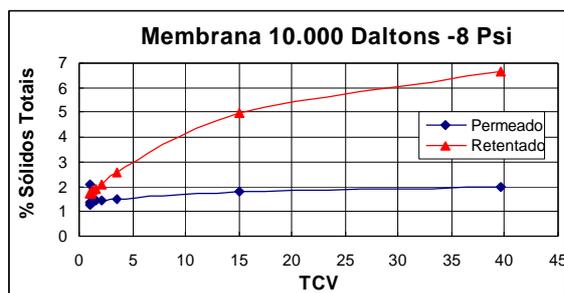


Figura 8.4.4 - Percentagem de Sólidos Totais no Permeado e no Retentado em Função da Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons à 8 Psi (PT = 6,6 Psi) - (Sólidos Totais Extrato Cru = 1,72%).

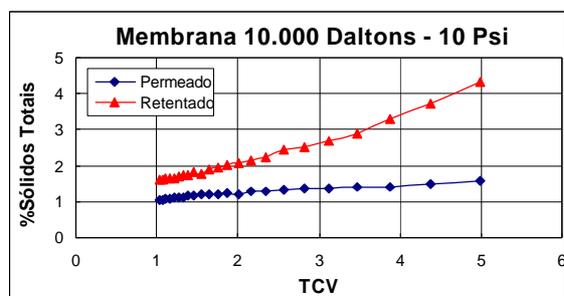


Figura 8.4.5 - Percentagem de Sólidos Totais no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons à 10 Psi (PT = 8,7 Psi) - (Sólidos Totais Extrato Cru = 1,70%).

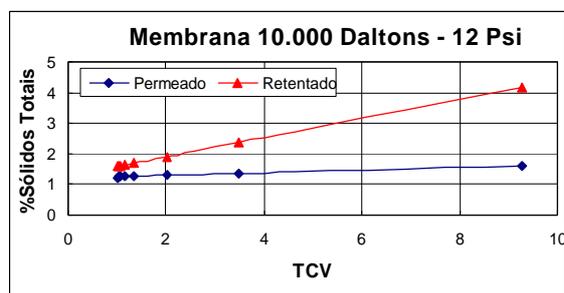


Figura 8.4.6 - Percentagem de Sólidos Totais no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 10.000 Daltons à 12 Psi (PT = 10,8 Psi) - (Sólidos Totais Extrato Cru = 1,60%).

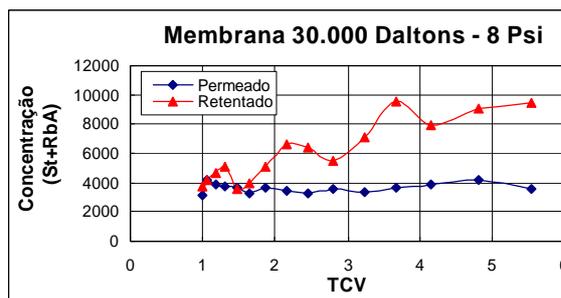


Figura 8.4.7 - Concentração de Adoçantes (**ng/mL**) no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons à 8 Psi (PT = 6,7 Psi) – (Cru – St = 2076 **ng/mL** e Rb A = 1487 **ng/mL**).

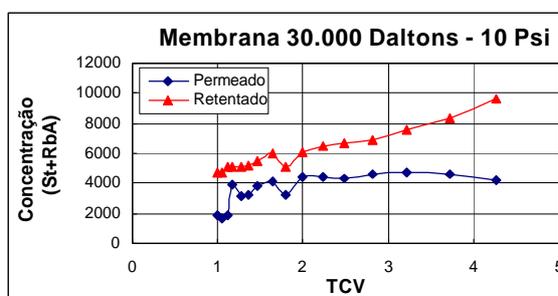


Figura 8.4.8 - Concentração de Adoçantes (**ng/mL**) no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons à 10 Psi (PT = 8,7 Psi) - (Cru – St = 2990 **ng/mL** e Rb A = 1712 **ng/mL**).

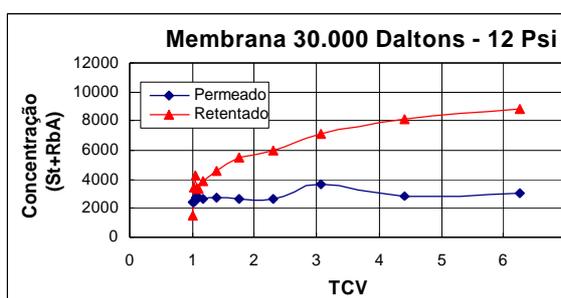


Figura 8.4.9 - Concentração de Adoçantes (**ng/mL**) no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons à 12 Psi (PT = 11 Psi) - (Cru – St = 2076 **ng/mL** e Rb A = 1487 **ng/mL**).

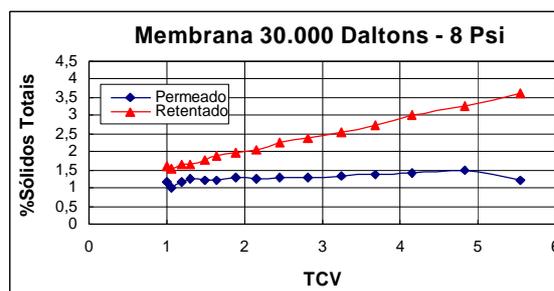


Figura 8.4.10 - Percentagem de Sólidos Totais no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons à 8 Psi (PT = 6,7 Psi) – (Sólidos Totais no Extrato Cru = 1,51%).

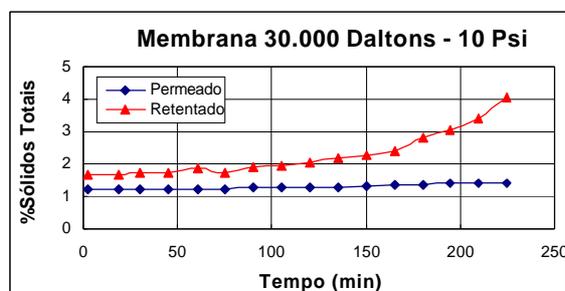


Figura 8.4.11 - Percentagem de Sólidos Totais no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons à 10 Psi (PT = 8,7 Psi) - (Sólidos Totais no Extrato Cru = 1,70%).

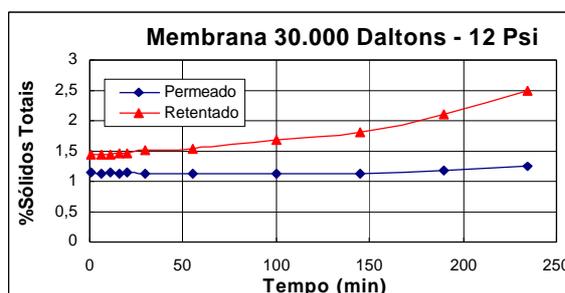


Figura 8.4.12 - Percentagem de Sólidos Totais no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 30.000 Daltons à 12 Psi (PT = 11 Psi) - (Sólidos Totais no Extrato Cru = 1,50%).

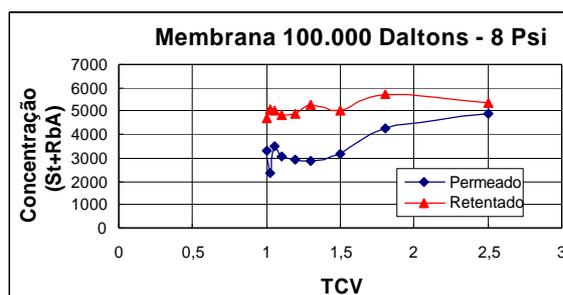


Figura 8.4.13 - Concentração de Adoçantes (mg/mL) no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 100.000 Daltons à 8 Psi (PT = 7,5 Psi) – (Cru – St = 2342 mg/mL e Rb A = 1553 mg/mL).

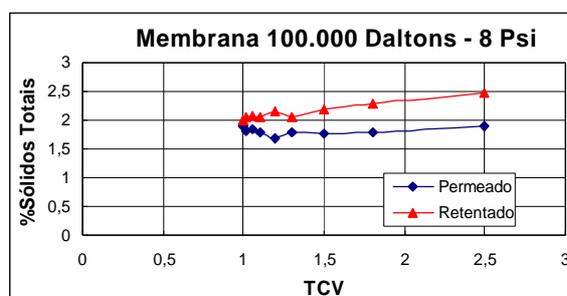


Figura 8.4.14 - Percentagem de Sólidos Totais no Permeado e no Retentado pela Taxa de Concentração de Volume na Membrana de Ponto de Corte de 100.000 Daltons à 8 Psi (PT = 7,5 Psi) – (Sólidos Totais no Extrato Cru = 1,43%).

8.5 ANEXO V - Análise das Resistências Envolvidas no Processo de UF

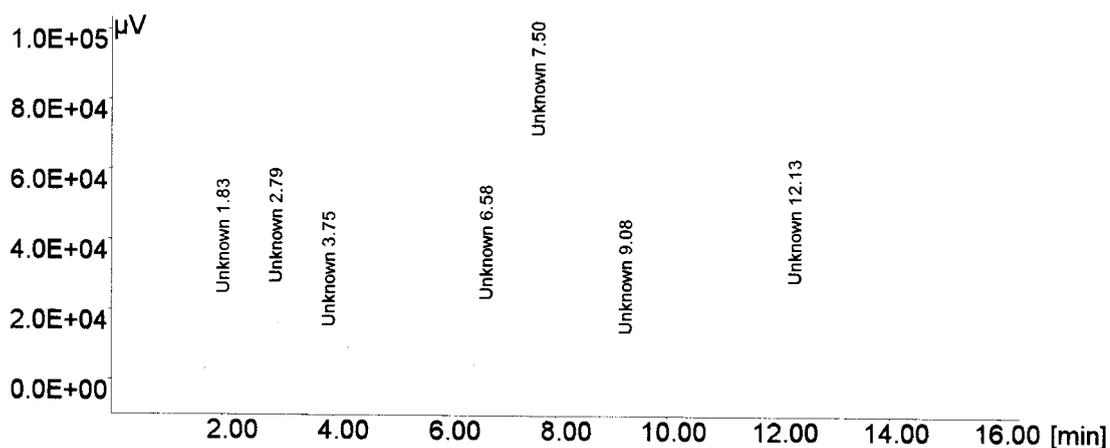
Neste anexo estão apresentados os valores da resistência R_m , que representa a resistência intrínseca da membrana em função da camada gel, camada filtrante e diâmetro dos poros; e da resistência R_d , que representa as resistências de colmatção interna R_i (adsorção) e externa R_e (devido ao fenômeno de polarização e depósito de partículas) formadas no decorrer da filtração.

Tabela 8.5.1 - Resistências das Membranas de Ponto de Corte 10.000, 30.000 e 100.000 Daltons.

PMpc (Daltons)	Pressão de Entrada (Psi)	R _m (m ⁻¹)	R _d (m ⁻¹)
10.000	8	5,9465 E+12	1,467 E+15
10.000	10	6,0096 E+12	1,2891 E+15
10.000	12	6,0812 E+12	1,6003 E+15
30.000	8	1,06608 E+12	2,6672 E+15
30.000	10	8,6558 E+11	1,2891 E+15
30.000	12	1,1785 E+12	1,8337 E+15
100.000	8	3,286 E+11	1,0528 E+15

8.6 ANEXO VI - Cromatogramas

Neste anexo são apresentados os cromatogramas realizados por cromatografia líquida de alta performance (CLAP). Estão demonstrados os cromatogramas do extrato cru de estévia, do filtrado e da solução padrão de adoçantes (1000µg/mL).



File name : CHA_006.CH1 User : SILVANIA Curr. Date : 23-Sep-99 15:38:28

Acqu. Date : 5-May-99 17:16:10

Info :

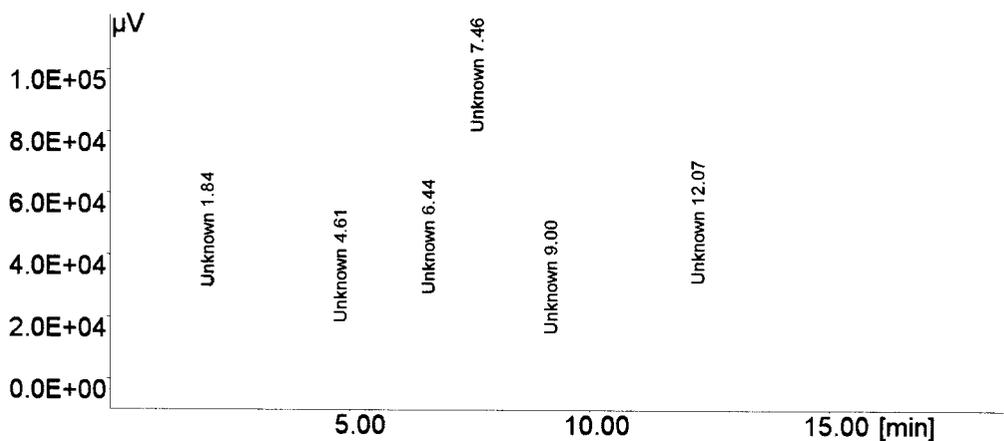
extrato - dia 05/05/99 - coluna 22 cm - 1.5 mL/min - diluição 1:5

Vial # = 1 Rack # = 1

Control Method :

#	Name	Rt	Area	Quantity
1	Unknown	1.83	118009.400	0.000
2	Unknown	2.79	238196.900	0.000
3	Unknown	3.75	92326.100	0.000
4	Unknown	6.58	288061.300	0.000
5	Unknown	7.50	1536851.700	0.000
6	Unknown	9.08	208803.200	0.000
7	Unknown	12.13	565107.400	0.000

Total Area of Peak = 3047356.00



File name : F____034.CH1 User : SILVANIA Curr. Date : 23-Sep-99 16:17:34

Acqu. Date : 5-May-99 18:14:12

Info :

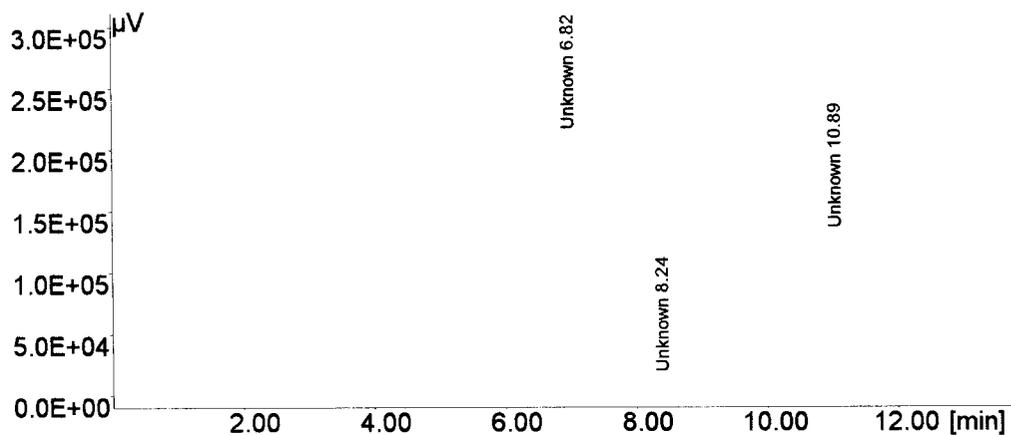
filtrato 3 - dia 05/05/99 - coluna 22 cm - 1.5 mL/min - diluição 1:3

Vial # = 1 Rack # = 1

Control Method :

#	Name	Rt	Area	Quantity
1	Unknown	1.84	123669.600	0.000
2	Unknown	4.61	100581.600	0.000
3	Unknown	6.44	338716.400	0.000
4	Unknown	7.46	1861524.200	0.000
5	Unknown	9.00	110697.600	0.000
6	Unknown	12.07	593518.700	0.000

Total Area of Peak = 3128708.10



File name : PAD__086.CH1 User : SILVANIA Curr. Date : 23-Sep-99 16:35:20

Acqu. Date : 1-Jun-99 4:53:50

Info :
padrão 1500 microG/mL - coluna 22 cm - 1,5 mL/min (padrão preparado em 22/05/99)

Vial # = 1 Rack # = 1

Control Method :

#	Name	Rt	Area	Quantity
1	Unknown	6.82	4687006.100	0.000
2	Unknown	8.24	168781.100	0.000
3	Unknown	10.89	2982527.000	0.000

Total Area of Peak = 7838314.20