



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ESTUDO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DOS GLICOSÍDEOS
DA *Stevia rebaudiana* Bertoni COM MISTURA CO₂+ÁGUA**

Simone Keiko Yoda
Engenheira de Alimentos (UNESP)

Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
Orientadora

Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques
Co-orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Simone Keiko Yoda**, aprovada pela Comissão Julgadora em 09 de novembro de 2001.

Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Campinas, 09 de novembro de 2001


Profa. Dra. Maria A. A. Meireles
Presidente da Banca

Campinas - São Paulo - Brasil
Setembro de 2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: T/UNICAMP
Y73e
 Ex. 47403
 TOMBO 837102
 PROC. 837102
 C ☐ D ☒ X
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 04-02-02
 N.º CPD

CM00163102-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Y73e Yoda, Simone Keiko
 Estudo da cinética de extração dos glicosídeos da *Stevia rebaudiana* Bertoni com mistura CO₂-água / Simone Keiko
 Yoda. -- Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Maria Angela de Almeida Meireles
 Co-orientador: Márcia Ortiz Mayo Marques
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
 Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Stevia rebaudiana* Bertoni. 2.Extração com fluido
 supercrítico. 3.Solvente. 4.Modelagem. I.Meireles, Maria
 Angela de Almeida. Marques, Márcia Ortiz Mayo.
 II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
 de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles (Orientadora)
(DEA/FEA/UNICAMP)



Prof.^a. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira (membro)
(ENQ/UFSC)



Prof.^a. Dra. Neura Bragagnolo (membro)
(DCA/FEA/UNICAMP)

Prof. Dr. Satoshi Tobinaga (Suplente)
(DEA/FEA/UNICAMP)

Dedico

À meus pais, que com dedicação e
esforço muito contribuíram com minha
formação educacional e pessoal. A meu irmão
e irmã, por estarem sempre presentes e a meu marido, pela
compreensão e carinho demonstrados durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles, pela orientação e profissionalismo demonstrados desde a elaboração do projeto de tese até a execução e finalização do trabalho.

À Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques (*Instituto Agrônomo de Campinas – IAC*), pelo precioso suporte e profissionalismo na realização das etapas analíticas.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP* (99/05494-2) pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

À *Steviafarma Industrial*, pelo fornecimento da matéria-prima e realização de análises cromatográficas.

Ao Eng. A. Goto (*Steviafarma Industrial*) pela assistência e esclarecimentos prestados relativos às metodologias analíticas.

Ao Ariovaldo Astini (*Laboratório de Separações Físicas – LASEFI*), pelo constante apoio durante a realização do trabalho em laboratório.

À Paula Canela, pelo companheirismo e amizade demonstrados durante o curso de mestrado.

À Deise Alexandre, pela amizade e apoio, principalmente durante a etapa final de elaboração da tese.

À Prof^a. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira, à Prof^a. Dra. Neura Bragagnolo e ao Prof. Dr. Satoshi Tobinaga, membros da banca examinadora, pela sugestões na correção da tese.

Aos professores do *Departamento de Engenharia de Alimentos (FEA - UNICAMP)*, pela oportunidade de aprendizado.

À todos os amigos do curso de mestrado, pelos momentos compartilhados e a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

<i>Índice de Figuras</i>	<i>xiii</i>
<i>Índice de Tabelas</i>	<i>xix</i>
<i>Nomenclatura</i>	<i>xxi</i>
<i>Resumo</i>	<i>xxiii</i>
<i>Abstract</i>	<i>xxv</i>
I. INTRODUÇÃO.....	3
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
II.1. Mercado de edulcorantes.....	9
II.2. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertonii.....	10
II.2.1. Histórico	10
II.2.2. Descrição botânica	12
II.2.3. Composição química.....	13
II.2.4. Propriedades	15
II.2.5. Aspectos tóxicos e farmacológicos.....	17
II.2.6. Aplicabilidade da estévia em alimentos	17
II.3. Métodos de extração, identificação e quantificação dos glicosídeos	18
II.3.1. Métodos de extração dos glicosídeos.....	18
II.3.2. Métodos de identificação e quantificação dos glicosídeos.....	21
II.4. Extração supercrítica.....	22
II.4.1. Solubilidade	26
II.4.2. Curvas de extração.....	27
II.5. Modelos de transferência de massa.....	29

III. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
III.1. Preparação e caracterização da matéria-prima	37
III.1.1. Umidade da matéria-prima.....	37
III.1.2. Carboidratos totais e teor de adoçantes.....	39
III.1.3. Densidade Real/Densidade das folhas secas de estévia.....	39
III.1.4. Porosidade total do leito e partículas	40
III.1.5. Distribuição granulométrica.....	40
III.1.6. Diâmetro das partículas.....	41
III.2. Unidade de extração.....	41
III.3. Planejamento experimental	43
III.4. Procedimento experimental	44
III.4.1. Pré-tratamento	45
III.4.2. Extração dos glicosídeos.....	49
III.5. Análises dos extratos	51
III.5.1. Identificação e quantificação dos extratos não glicosídicos	51
III.5.2. Quantificação dos glicosídeos.....	53
III.6. Determinação da solubilidade (Y^*) dos sistemas binários e ternários	55
III.7. Análise da cinética de extração	56
III.8. Modelagem	56
III.9. Contratempos	57
IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
IV.1. Caracterização da matéria-prima.....	61
IV.1.1. Umidade, carboidratos totais e teor de adoçantes	61
IV.1.2. Densidade real e aparente e porosidade do leito	61

IV.1.3. Distribuição granulométrica.....	62
IV.1.4. Diâmetro das partículas	63
IV.2. Ensaios	63
IV.2.1. Pré-tratamento	63
IV.2.2. Extração dos glicosídeos.....	65
IV.3. Análise estatística	68
IV.4. Determinação da solubilidade.....	71
IV.5. Análise dos extratos.....	72
IV.5.1. Identificação e quantificação dos extratos não glicosídicos	72
IV.5.2. Quantificação dos glicosídeos.....	76
IV.6. Modelagem.....	84
V. CONCLUSÕES.....	89
V.1. Pré-tratamento	89
V.2. Extração dos glicosídeos com CO₂+água	90
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
APÊNDICE.....	105
A. Treinamento operacional.....	107
A.1. Preparo de material de coleta de amostras	107
A.2. Preparo da matéria-prima.....	108
A.3. Procedimento operacional	108
B. Ensaio preliminares.....	111
C. Calibração de instrumentos de controle e equipamentos.....	115
C.1. Manômetros.....	115

C.2. Termopares.....	117
C.3. Espectrofotômetro <i>Hitachi UV 3010</i>	117
C.4. Bomba de co-solvente.....	118
D. Memorial de cálculo.....	121
D.1. Cálculo da vazão de água (ml/min) para a bomba de co-solvente	121
D.2. Cálculo da vazão de água (g/min) do processo	122
D.3. Cálculo da vazão de CO ₂ (g/min) e da mistura CO ₂ +água (g/min).....	123
E. Dados experimentais	127
E.1. Pré-tratamento.....	127
E.2. Extração com CO ₂ +água	134
E.3. Demais ensaios.....	141
F. Análises dos extratos	149
F.1. Resultados obtidos no pré-tratamento	149
F.2. Resultados obtidos das extrações com CO ₂ +água	151
G. Software utilizado	159
G.1. Regressão linear.....	159
G.2. Regressão não linear	160
H. Dados obtidos no programa SAS	161
H.1. Pré-tratamento	161
H.2. Extração dos glicosídeos.....	187

Índice de Figuras

Fig.II.2.2. Estévia [<i>Stevita Co.</i> ,1999].	12
Fig.II.2.3. Estruturas moleculares dos glicosídeos da estévia [Crammer e Ikan,1987].....	14
Fig.II.4. Diagrama de fases PxT para o CO ₂ [King e Bott, 1995].....	23
Fig.II.4.2. Curva de extração do óleo de cravo.	28
Fig.III.1. Folhas de estévia acondicionadas.	37
Fig.III.1.1. Equipamento utilizado na determinação da umidade.....	38
Fig.III.2_a. Unidade de extração supercrítica 1.	42
Fig.III.2_b. Fluxograma da unidade de extração supercrítica 1.....	43
Fig.III.4. Diagrama de blocos dos procedimentos experimentais.	45
Fig.III.4.1. Célula de extração e "socador" da unidade de extração supercrítica 1.	45
Fig.IV.2.1_a. Curvas de extração do pré-tratamento.....	65
Fig.IV.2.2_a. Curvas de extração dos glicosídeos com CO ₂ +água.	68
Fig.IV.3_a. Gráfico de tendência (T x M _{cer}).	69
Fig.IV.3_b. Gráfico de tendência (T x R _{total}).	69
Fig.IV.3_e. Pontos obtidos nos ensaios 22 e 24 (250 bar/30°C).....	70
Fig.IV.4_a. Curva de medida de solubilidade do pré-tratamento.	71
Fig.IV.4_b. Curva de medida de solubilidade com CO ₂ +água.	72
Fig.IV.5.1_a. Placa cromatográfica das amostras - ensaio 20.....	73
Fig.IV.5.1_b. Cromatograma da amostra 9 - ensaio 20.....	73
Fig.IV.5.1_c. Jhanol.....	75

Fig.IV.5.1_d. Austroinulina.	75
Fig.IV.5.2_a. Cromatograma da estévia (matéria-prima) obtido por CLAE	78
Fig.IV.5.2_b. Espectro de absorbância a 210 nm da amostra 4.	79
Fig.IV.5.2_c. Espectro de absorbância a 210 nm da amostra 8.	79
Fig.IV.5.2_d. Cromatograma obtido por CLAE: amostra 4 - ensaio 18.....	80
Fig.IV.5.2_e. Cromatograma obtido por CLAE: amostra 8 - ensaio 18.....	80
Fig.IV.5.2_f. Cromatograma obtido por CLAE: amostra 4 - ensaio 17.	80
Fig.IV.5.2_g. Fração mássica inicial x rebaudiosídeo A/esteviosídeo.....	82
Fig.IV.5.2_h. Cromatograma obtido por CG: amostra 4 - ensaio 14.	83
Fig.IV.5.2_i. Cromatograma obtido por CG: amostra 4 - ensaio 17.	83
Fig.IV.6.1_a. Modelagem dos ensaios 10 e 15.	85
Fig.A.3_1. Curva de extração do cravo-da-índia.	110
Fig.A.3_2. Curva de extração do gengibre.	110
Fig.B_1.Dados de extração da estévia.	112
Fig.B_2. Dados de extração do <i>Porophyllum</i>	113
Fig.B_3. Dados de extração da <i>Tabernaemontana</i>	114
Fig.D.2. Esquema do sistema para cálculo da vazão de água.	122
Fig.D.3. Esquema do sistema para cálculo da vazão de CO ₂ e da mistura.....	124
Fig.E.1_1. Curva de extração do ensaio 10.....	129
Fig.E.1_2. Curva de extração do ensaio 12.....	129
Fig.E.1_3. Curva de extração do ensaio 13.....	130

Fig.E.1_4. Curva de extração do ensaio 15.....	130
Fig.E.1_5. Curva de extração do ensaio 16.....	131
Fig.E.1_6. Curva de extração do ensaio 20.....	131
Fig.E.1_7. Curva de extração do ensaio 21.....	132
Fig.E.1_8. Curva de extração do ensaio 23.....	132
Fig.E.1_9. Curva de extração do ensaio 25.....	133
Fig.E.1_10. Dados de medida da solubilidade (ensaio 26).....	133
Fig.E.2_1. Curva de extração do ensaio 14 (extrato aquoso).....	136
Fig.E.2_2. Curva de extração do ensaio 17 (extrato aquoso).....	136
Fig.E.2_3. Curva de extração do ensaio 18 (extrato aquoso).....	137
Fig.E.2_4. Curva de extração do ensaio 19 (extrato aquoso).....	137
Fig.E.2_5. Curva de extração do ensaio 14 (extrato seco).....	138
Fig.E.2_6. Curva de extração do ensaio 17 (extrato seco).....	138
Fig.E.2_7. Curva de extração do ensaio 18 (extrato seco).....	139
Fig.E.2_8. Curva de extração do ensaio 19 (extrato seco).....	139
Fig.E.2_9. Curva de extração do ensaio 27 (extrato seco).....	140
Fig.E.2_10. Curva de extração do ensaio 27 (extrato seco).....	140
Fig.E.3_1. Dados de extração do ensaio 1.	143
Fig.E.3_2. Dados de extração do ensaio 2.	143
Fig.E.3_3. Dados de extração do ensaio 3.	144
Fig.E.3_4. Dados de extração do ensaio 4.	144

Fig.E.3_5. Dados de extração do ensaio 5.	145
Fig.E.3_6. Dados de extração do ensaio 6.	145
Fig.E.3_7. Dados de extração do ensaio 7.	146
Fig.E.3_8. Dados de extração do ensaio 8.	146
Fig.E.3_9. Dados de extração do ensaio 9.	147
Fig.E.3_10. Dados de extração do ensaio 22.	147
Fig.E.3_11. Dados de extração do ensaio 24.	148
Fig.F.1_1. Cromatograma obtido por CG - EM da amostra 7.	149
Fig.F.1_2. Cromatograma obtido por CG - EM da amostra 12	149
Fig.F.1_3. Nerolidol.....	150
Fig.F.1_4. Espatuleno.....	150
Fig.F.1_5. Óxido de cariofileno	150
Fig.F.1_6. Epi - α - cadinol.....	150
Fig.F.1_7. Khusinol	150
Fig.F.1_8. β - amirina	150
Fig.F.1_9. α - amirina.....	150
Fig.F.1_10. Óxido de manoila.....	150
Fig.F.1_11. Ceto - óxido de manoila	151
Fig.F.1_12. 3 - α - acetoxi - manool.....	151
Fig.F.1_13. Estigmasterol	151
Fig.F.2_1. Curva de calibração obtida por UV	152

Fig.F.2_2. Espectro de absorbância no UV para o padrão rebaudiosídeo A	152
Fig.F.2_3. Espectro de absorbância no UV: amostra 1 - ensaio 14.....	153
Fig.F.2_4. Espectro de absorbância no UV: amostra 10 - ensaio 14.....	153
Fig.F.2_5. Espectro de absorbância no UV: amostra 1 - ensaio 17.....	153
Fig.F.2_6. Espectro de absorbância no UV: amostra 10 - ensaio 17.....	153
Fig.F.2_7. Curva padrão para o esteviosídeo.....	154
Fig.F.2_8. Curva padrão para o rebaudiosídeo A.....	154
Fig.F.2_9. Cromatograma obtido por CLAE da estévia pré-tratada.	155
Fig.F.2_10. Cromatograma obtido por CLAE da estévia pós extração.....	155
Fig.F.2_11. Curva padrão de esteviosídeo.....	156
Fig.F.2_12. Curva padrão de rebaudiosídeo A.....	156
Fig.F.2_13. Cromatograma obtido por CLAE da amostra 4 - ensaio 14.....	157
Fig.F.2_14. Cromatograma obtido por CLAE da amostra 8 - ensaio 14.....	158
Fig.F.2_15. Cromatograma obtido por CLAE da amostra 8 - ensaio 17.....	158
Fig.H.1_1_c. Gráfico de dispersão - ensaio 10.	163
Fig.H.1_1_d. Gráfico de ajuste - ensaio 10.....	163
Fig.H.1_2_c. Gráfico de dispersão - ensaio 12.	166
Fig.H.1_2_d. Gráfico de ajuste - ensaio 12.....	166
Fig.H.1_3_c. Gráfico de dispersão - ensaio 13.	169
Fig.H.1_3_d. Gráfico de ajuste - ensaio 13.....	169
Fig.H.1_4_c. Gráfico de dispersão - ensaio 15.	172

Fig.H.1_4_d. Gráfico de ajuste - ensaio 15.....	172
Fig.H.1_5_c. Gráfico de dispersão - ensaio 16.	175
Fig.H.1_5_d. Gráfico de ajuste - ensaio 16.....	175
Fig.H.1_6_c. Gráfico de dispersão - ensaio 20.	178
Fig.H.1_6_d. Gráfico de ajuste - ensaio 20.....	178
Fig.H.1_7_c. Gráfico de dispersão - ensaio 21.	181
Fig.H.1_7_d. Gráfico de ajuste - ensaio 21.....	181
Fig.H.1_8_c. Gráfico de dispersão - ensaio 23.	184
Fig.H.1_8_d. Gráfico de ajuste - ensaio 23.....	184
Fig.H.1_9_c. Gráfico de dispersão - ensaio 25.	187
Fig.H.1_9_d. Gráfico de ajuste - ensaio 25.....	187
Fig.H.1_10_c. Gráfico de dispersão - ensaio 26.	190
Fig.H.1_10_d. Gráfico de ajuste - ensaio 26.....	190
Fig.H.2_1_c. Gráfico de dispersão - ensaio 14.	193
Fig.H.2_1_d. Gráfico de ajuste - ensaio 14.....	193
Fig.H.2_2_c. Gráfico de dispersão - ensaio 17.	196
Fig.H.2_2_d. Gráfico de ajuste - ensaio 17.....	196
Fig.H.2_3_c. Gráfico de dispersão - ensaio 18.	199
Fig.H.2_3_d. Gráfico de ajuste - ensaio 18.....	199
Fig.H.2_4_c. Gráfico de dispersão - ensaio 19.	202
Fig.H.2_4_d. Gráfico de ajuste - ensaio 19.....	202

Índice de Tabelas

Tab.II.2.1. Etapas significativas na pesquisa da estévia [Phillips, 1987].	11
Tab.II.2.3. Radicais das estruturas moleculares da Fig.II.2.3 [Crammer e Ikan, 1987].	14
Tab.II.2.4_b. Propriedades físico-químicas do esteviosídeo e rebaudiosídeos [Crammer e Ikan, 1987; Phillips, 1987].	16
Tab.II.3.1_a. Composição química do extrato de estévia do pré-tratamento [Pasquel, Marques e Meireles, 1999].	21
Tab.II.3.2. Dados analíticos de estévia por CLAE [Crammer e Ikan, 1987].	22
Tab.III.4.1. Dimensões das células de extração utilizadas.	46
Tab.III.4.2. Condições de operação das extrações com CO ₂ +água.	49
Tab.IV.1.2. Valores de densidade aparente (ρ_a) e porosidade (ϵ).	62
Tab.IV.1.3. Massa média (%) retida em cada peneira.	63
Tab.IV.2.1. Dados cinéticos do pré-tratamento.	64
Tab.IV.2.2_a. Dados cinéticos das extrações com CO ₂ +água.	66
Tab.IV.2.2_b. Dados cinéticos das extrações com CO ₂ +água.	66
Tab.IV.3_a. Dados do ensaio 14,17,18 e 19.	68
Tab.IV.5.1. Composição química da amostra 2 - ensaio 20.	74
Tab.IV.5.2_a. Concentração de esteviosídeo e rebaudiosídeo A na estévia.	77
Tab.IV.5.2_b. Fração mássica e valores de esteviosídeo e rebaudiosídeo A obtidos por CLAE.	81
Tab.IV.6.1. Coeficientes obtidos na modelagem.	84
Tab.A.3_1. Dados de extração do Cravo e Gengibre.	109

Tab.B_1. Ensaios preliminares.....	111
Tab.B_2. Dados de extração da estévia.....	112
Tab.B_3. Dados de extração do <i>Porophyllum</i>	113
Tab.B_4. Dados de extração da <i>Tabernaemontana</i>	114
Tab.C.1_1. Manômetro 5a, 0-100 kgf/cm ²	115
Tab.C.1_2. Manômetro 5b, 0-500 kgf/cm ²	116
Tab.C.1_3. Manômetro 5c, 0-500 kgf/cm ²	116
Tab.C.3_1. Valores de absorbância para filtros padrão.....	117
Tab.C.3_2. Valores de absorbância experimentais para filtros padrão.....	118
Tab.C.4_1. Medições na bomba de co-solvente.....	118
Tab.D.3. Valores de vazões dos ensaios 17, 18, 19 e 27.....	125
Tab.E.1_1. Dados do pré-tratamento (massa x tempo).....	127
Tab.E.1_2. Dados do pré-tratamento (massa x tempo).....	128
Tab.E.1_3. Condições de operação do pré-tratamento.....	128
Tab.E.2_1. Dados das extrações com CO ₂ +água (extrato aquoso).....	134
Tab.E.2_2. Dados das extrações com CO ₂ +água (extrato seco).....	135
Tab.E.2_3. Condições de operação das extrações com CO ₂ +água.....	135
Tab.E.3_1. Dados dos ensaios 1 a 6.....	141
Tab.E.3_2. Dados dos ensaios 7 a 9, 22 e 24.....	142
Tab.E.3_3. Condições de operação dos ensaios 1 a 9, 22 e 24.....	142
Tab.F.2_1. Área dos picos nos cromatogramas.....	155
Tab.F.2_2. Área dos picos nos cromatogramas.....	157

Nomenclatura

CER: etapa de taxa de extração constante

da: densidade aparente

dr: densidade real

Dp: diâmetro médio das partículas

D_{pi}: diâmetro da partícula da fração i

FER: etapa de taxa de extração decrescente

H: comprimento do leito

J: taxa de transferência interfacial de massa

k_{Ya}: coeficiente de transferência de massa da fase fluida

k_{Xa}: coeficiente de transferência de massa da fase sólida

M: massa total de amostra

M_{CER}: taxa de extração no período CER

M_i: massa de amostra na fração i

m_{ext}: massa de extrato

n: número de frações.

N: massa de matéria-prima livre de soluto

Q_{co2}: vazão média do solvente

R_{CER}: rendimento em extrato na etapa de taxa constante de extração

R_{Total}: rendimento total em extrato

S: área da secção transversal do leito

t: tempo

t_{CER}: duração da etapa de taxa constante de extração

U : velocidade superficial

x_i : percentagem retida de amostra na fração i

X : razão mássica de soluto na fase sólida

X_0 : razão mássica inicial de soluto na fase sólida

X_k : razão mássica de soluto no interior de células intactas.

X^* : razão mássica de soluto no sólido inerte em equilíbrio com Y^*

X_P : razão mássica de soluto facilmente acessível na fase sólida.

Y : razão mássica de soluto na fase fluida

Y^* : solubilidade do soluto no solvente

Y_{CER} : razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna

Y_{in} : razão mássica de soluto na fase supercrítica na entrada no leito

Y_{out} : razão mássica de soluto na fase supercrítica na saída no leito

ϵ : porosidade do leito

ρ_{CO_2} : densidade do solvente

ρ_f : densidade da fase fluida

ρ_s : densidade da fase sólida

ΔX : média aritmética da razão mássica de soluto na fase sólida

ΔY : diferença média logarítmica para a razão mássica de soluto na fase fluida

TESE DE MESTRADO

Autora: Simone Keiko Yoda

Título: Estudo da cinética de extração dos glicosídeos da *Stevia rebaudiana* Bertoni com mistura CO₂+água

Orientadora: Profa. Dra. Maria Ângela de Almeida Meireles

Departamento de Engenharia de Alimentos – DEA, FEA, Unicamp, Setembro/2001

RESUMO

O extrato obtido a partir das folhas da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni apresenta propriedades edulcorantes devido a seus glicosídeos, principalmente esteviosídeo e rebaudiosídeo A. No entanto o sabor residual perceptível limita seu uso e aceitação, sendo desejável portanto a remoção deste. O pré-tratamento das folhas de estévia usando CO₂ supercrítico reduz o sabor residual, pela retirada de alguns compostos responsáveis pelo amargor, o que não ocorre com os processos convencionais.

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou o estudo da extração dos glicosídeos da estévia, usando uma etapa de pré-tratamento e posteriormente efetuando uma extração dos glicosídeos com a mistura CO₂+água, para se obter um extrato com maior teor de rebaudiosídeo A (glicosídeo de maior poder edulcorante e menor sabor residual) quando comparado a processos convencionais. O processo proposto incluiu duas etapas: pré-tratamento com CO₂ a 200 bar/ 30°C, vazão de $5,14 \pm 0,25 \times 10^{-5}$ kg/s e 12 horas de extração e extração dos glicosídeos com CO₂+água a 120 bar/10 e 16°C e 250 bar/10 e 16°C, co-solvente igual a 9,5% (molar).

Para ambas as etapas, utilizou-se uma unidade de extração supercrítica com um extrator de leito fixo, sendo os extratos obtidos posteriormente analisados por cromatografia gasosa

(extrato não glicosídico) e cromatografia líquida de alta eficiência (extrato glicosídico). Na etapa de pré-tratamento, o rendimento apresentado foi de $1,50 \pm 0,17\%$; efetuou-se a caracterização da composição química do extrato, determinou-se a solubilidade (Y^*) a $1,67 \times 10^{-5}$ kgCO₂/s e modelou-se o processo segundo Sovová [1994]. Em relação à etapa de extração dos glicosídeos, realizou-se o estudo do efeito das variáveis (temperatura e pressão), sendo 250 bar/16°C a melhor condição em termos de rendimento (1,18%). A proporção de esteviosídeo: rebaudiosídeo A foi de 1:0,6.

Palavras-chave: estévia, glicosídeos, extração supercrítica, co-solvente, modelagem.

MASTER THESIS

Author: Simone Keiko Yoda

Title: Study of kinetic of extracting of *Stevia rebaudiana* Bertoni glycosides with mixture CO₂+water

Major Professor: Dr. Maria Ângela de Almeida Meireles

Department of Food Engineering – DEA, FEA, Unicamp, September 2001

ABSTRACT

The extract obtained from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves shows sweetening properties because of their glycosides, mainly stevioside and rebaudioside A. Nevertheless, the perceptive aftertaste limits its use and acceptance, being desirable the removal of that. The pre-treatment of the stevia leaves using supercritical CO₂ reduces the aftertaste by removing some compounds responsible for the bitterness. It doesn't happen with the conventional process.

In this context, this work had the objective of studying the extraction of stevia glycosides, using a step of pre-treatment and lately making an extraction of the glycosides with CO₂+water, once an extract with greater quantity of rebaudioside A (sweetest and lowest after taste glycoside), than in conventional process. The process proposed included two steps: pre-treatment with CO₂ at 200 bar/30°C, flow rate of $5,14 \pm 0,25 \times 10^{-5}$ kg/s and 12 hours of extraction; glycosides extraction with mixture CO₂+water at 120 bar/10 and 16°C e 250 bar/10 and 16°C, 9,5% (molar) of co-solvent.

For both, a fixed bed supercritical extractor was used, the extracts obtained were lately analysed by gas chromatograph (compounds non glycosidics) and high performance liquid chromatograph (glycosidic extract). In the pre-treatment the yield was $1,50 \pm 0,17\%$; the

chemical composition of the extract was characterized, the determination of operational solubility (Y^*) at $1,67 \times 10^{-5}$ kg/s and the modelling of the process were done. In the step of extraction, the study of the variables (temperature and pressure) effect was done, and considering the yield the better condition was 250 bar/16°C (1,18%). The ratio between stevioside and rebaudioside A was 1:0,6.

Keywords: stevia, glycosides, supercritical extraction, co-solvent, modelling.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O uso de produtos alternativos como substitutos do açúcar gera um mercado crescente, principalmente quando se trata de produtos obtidos de fontes naturais, uma vez que a maioria dos edulcorantes é obtida sinteticamente.

A *Stevia rebaudiana* Bertoni é uma planta nativa do Paraguai que possui propriedades edulcorantes [Robinson, 1930; Soejarto *et al.*, 1982]. O extrato obtido a partir de suas folhas contém uma mistura complexa de compostos, dentre eles os glicosídeos e os terpenos. Os primeiros englobam principalmente o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A; já os terpenos são associados ao sabor amargo. Embora todos os glicosídeos da estévia também contribuam para o sabor residual amargo de seus extratos, existem indicações de que o rebaudiosídeo A além de possuir um maior poder edulcorante, tem sabor residual menos acentuado do que o esteviosídeo [Kingham e Soejarto, 1991].

O processo de extração convencional dos glicosídeos (extração sólido-líquido, seguida de líquido-líquido), não remove o amargor residual. Já a extração com fluidos supercríticos apresenta vantagens em relação às operações convencionais, pois explora as altas densidades (próximas as dos líquidos) apresentadas pelos fluidos supercríticos, associadas às difusividades intermediárias entre gases e líquidos e viscosidades baixas, características dos gases [Muller, 1999]. Estas propriedades tornam altas as taxas de extração devido ao grande poder de solvatação conferido pelas altas densidades dos fluidos, enquanto os baixos valores de viscosidade combinados com altos valores de difusividade fornecem alto poder de penetração na matriz sólida [Rodrigues, 1996].

Para se obter extratos com maior intensidade de doçura e maior aceitabilidade, Pasquel [1999] efetuou um pré-tratamento das folhas de estévia com CO₂ pressurizado visando somente a remoção de substâncias associadas ao sabor residual, pois os glicosídeos não são solúveis em CO₂. Numa segunda etapa, houve a retirada dos mesmos através de extrações com CO₂+água, ou CO₂+etanol e ainda CO₂+etanol+água. A mistura CO₂+água apresentou melhores resultados, uma vez que o rebaudiosídeo A é solúvel em água e assim sendo o extrato glicosídico apresentou um teor de rebaudiosídeo A maior que o de esteviosídeo quando comparado a processos convencionais.

Uma vez obtido o extrato, é importante também a modelagem matemática do processo para determinação de parâmetros ligados ao mesmo, como as dimensões requeridas para a coluna de extração ou a vazão ideal para a otimização do processo [Martínez e Meireles, 2000]. O processo de extração supercrítica foi estudado por Sovová [1994] e o modelo desenvolvido baseia-se em balanços de massa que considera o escoamento axial do solvente através de um leito fixo de secção transversal cilíndrica.

Diante do exposto, o presente trabalho propôs o estudo da extração dos glicosídeos da estévia, partindo de um pré-tratamento de suas folhas usando CO₂ supercrítico em condições pré-determinadas. O processo incluiu duas etapas: 1) pré-tratamento com CO₂ a 200 bar/30°C, $5,14 \pm 0,25 \times 10^{-5}$ kgCO₂/s e 12 horas de extração; 2) extração dos glicosídeos com mistura CO₂+água, co-solvente igual a 9,5% (molar) e tendo como variáveis a temperatura (10 e 16°C) e a pressão (120 e 250 bar).

O estudo da primeira etapa abrangeu a caracterização da composição química do extrato por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG_EM), a determinação da solubilidade (Y^*) assim como a modelagem do processo segundo Sovová [1994]. Em relação a segunda etapa, verificou-se as melhores condições operacionais para a maximização do rendimento dos extratos e quantificou-se os glicosídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Baseando-se nos resultados obtidos na etapa de extração com CO_2 +água, efetuou-se uma análise estatística descritiva para se verificar o efeito das variáveis temperatura e pressão no processo. Os parâmetros cinéticos no período CER (etapa de taxa de extração constante), M_{CER} - taxa de extração, t_{CER} - duração do período e R_{CER} - rendimento em extrato, foram determinados no pré-tratamento e na extração dos glicosídeos.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. MERCADO DE EDULCORANTES

A demanda mundial de edulcorantes tem aumentado nos últimos anos, especialmente quando se trata de produtos obtidos de fontes naturais. Estima-se que o mercado de adoçantes movimenta cerca de US\$ 100 bilhões/ ano. Já o mercado de adoçantes de baixa caloria movimenta cerca de US\$ 2 bilhões ao ano e é um mercado crescente [Rafi, 1999], o que torna necessária a busca por melhores técnicas de obtenção de tais produtos.

Em relação a estévia estima-se que 650 – 700 toneladas de folhas secas foram usadas em 1981 no mercado de extrato de esteviosídeo. O maior mercado é o Japão, onde há muitas companhias envolvidas na comercialização de adoçantes de estévia e onde o produto é conhecido desde 1954. Das 1.000 toneladas de folhas de estévia usadas no Japão em 1982, cerca de 300 foram produzidas no país, 450 vieram da China, 150 de Taiwan, 100 da Tailândia e 50 da Coreia, Brasil e Malásia [Mowrey, 1992]. Neste mesmo ano, extratos puros ou parcialmente purificados (90%) eram comercializados na China com valores entre 90 a 130 dólares o quilo. Em 1983 foram comercializadas no Japão, cerca de 80 toneladas de extrato e em 1985, 300 toneladas. Este último valor é equivalente a 30.000 - 60.000 toneladas de sacarose [Kingham e Soejarto, 1991].

No Brasil, o uso de estévia foi aprovado em meados de 1987 como agente flavorizante e edulcorante em várias classes de alimentos [Goto, 1997]. Um outro ponto a ser abordado, é que a maioria dos edulcorantes é termossensível e não pode ser usada em produtos termicamente processados. A estévia por outro lado é muito estável [Kingham e Soejarto,

1985], podendo assim ser usada em tais produtos. No entanto seu sabor amargo associado à presença de alguns componentes terpênicos e a seus próprios glicosídeos, limita o uso e aceitação no mercado de edulcorantes.

Pasquel [1999] constatou que o pré-tratamento das folhas de estévia com CO₂ supercrítico produz extratos com maior intensidade de doçura e maior aceitabilidade. E mais, o uso da mistura CO₂+água na extração dos glicosídeos das folhas pré-tratadas da estévia, resultou em produto com maior teor de rebaudiosídeo A, quando comparado a processos convencionais.

II.2. *Stevia rebaudiana* BERTONI

II.2.1. Histórico

A primeira descrição da estévia em literatura científica foi realizada pelo naturalista Moisés S. Bertoni em 1899 sob o nome de *Eupatorium rebaudianum*. Em 1905 Bertoni transferiu a planta do gênero *Eupatorium* para o gênero *Stevia*, como é conhecida atualmente [Phillips, 1987]. A Tab.II.2.1 indica uma sequência cronológica dos acontecimentos mais marcantes da pesquisa sobre os princípios adoçantes da estévia.

Tab.II.2.1.Etapas significativas na pesquisa da estévia [Phillips, 1987]

Ano	Evento
1908	O esteviosídeo é cristalizado pela primeira vez
1909	A eupatorina e a rebaudina são identificadas
1931	O esteviosídeo é separado em moléculas de glicose e esteviol
1955	É proposta a união beta de moléculas de glicose ao esteviol
1955	É proposta a estrutura do esteviol
1963	São confirmadas as estruturas do esteviol e isoesteviol
1970	O esteviosídeo é sintetizado pela primeira vez
1975	São determinados os rebaudiosídeos A e B
1977	São determinados os rebaudiosídeos C (=dulcosídeo B), D e E
1977	É determinado o dulcosídeo A
1979	Primeira síntese de edulcorantes análogos
1989	Primeira patente sobre o seu processamento supercrítico

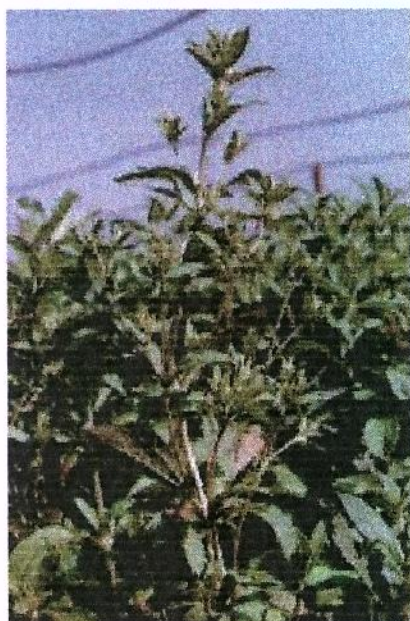
A estévia é nativa do Paraguai e se estende por todo o continente americano, sendo denominada pelos índios guaranis de "Ka-Hee", "Caá-hê-é" ou Kaá-é-hê", significando erva-doce [Phillips, 1987].

No Japão, a estévia foi amplamente difundida a partir de 1968 e desde então tem sido introduzida em diversos países, incluindo Brasil, Coréia, México, Indonésia, Tanzânia, EUA e desde 1990 no Canadá [Lee *et al.*, 1979; Donalisio *et al.*, 1982; Shock, 1982; Goenadi, 1983; Saxena e Ming, 1988; Brandle e Rosa, 1992; Fors, 1995]. Outros países onde a estévia é cultivada extensivamente incluem Singapura, Tailândia, Malásia e China [Phillips, 1987]. A partir de 18 de setembro de 1995 o *FDA (Food and Drug Administration)* anunciou que a estévia podia ser vendida e consumida como um “suplemento da dieta para benefícios nutricionais” [Joyce, 1996].

II.2.2. Descrição botânica

A estévia é um membro da família *Compositae* e sua descrição botânica foi dada como *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni [Soejarto *et al.*, 1983]. A planta (Fig.II.2.2) é um dos 154 membros do gênero *Stevia*, sendo uma de suas duas espécies que produzem glicosídeos doces [Robinson, 1930; Soejarto *et al.*, 1982].

No Brasil foram mencionadas 14 espécies, sendo que em relação às demais a *Stevia rebaudiana* é explorada comercialmente para a extração dos princípios adoçantes [Goto, 1997]. Embora a planta seja encontrada crescendo selvagem, os híbridos mais potentes (mais ricos em esteviosídeos) são cultivados em plantações.



A planta constitui-se como um sub-arbusto ereto de 1 m de altura, caule pardo, folhas opostas, flores pálidas com escamas pardo-esverdeadas [Robinson, 1930]. Em relação a sua floração, prefere dias curtos com fotoperíodo crítico entre 13 e 14 horas [Angelucci, 1979]. Membros do gênero são frequentemente encontrados a uma altitude de 500 a 3.000 m do nível do mar. Embora estejam presentes em todo o mundo, o clima tropical favorece seu desenvolvimento [Goto, 1997].

Fig.II.2.2.Estévia [Stevita Co., 1999]

II.2.3. Composição química

Progressos significantes na elucidação das estruturas dos adoçantes da estévia não tinham sido feitos até 1931 quando Bridel e Lavieille descreveram o isolamento de um glicosídeo cristalino que eles chamaram esteviosídeo. Eles concluíram de suas análises que o esteviosídeo era constituído de uma aglicona esteviol conjugada por três unidades de glicose. Também propuseram estruturas para o esteviol e isoesteviol, as quais foram confirmadas mais tarde pelo mesmo grupo em 1963 [Phillips, 1987].

Maiores progressos na elucidação da estrutura do esteviosídeo ocorreram em 1955, com as contribuições de Mosetting e Wood e seus colegas do *Instituto Nacional de Saúde Americano*. Eles tinham interesse no uso medicinal potencial do esteviosídeo. Esses estudiosos confirmaram a fórmula estrutural ($C_{38} H_{60} O_{18}$) sugerida anteriormente por Bridel e Lavieille [Kim e Dubois, 1991]. Nessa época também, houve a descoberta de que uma unidade de glicose poderia ser removida para produzir o que eles chamaram esteviolbiosídeo [Phillips, 1987].

Durante os anos 70, foram encontradas substâncias análogas ao esteviosídeo indentificadas como rebaudiosídeos A, B, C (dulcosídeo B), D e E e dulcosídeo A [Kinghorn e Soejarto, 1991]. Os componentes “doces” da estévia são classificados em esteviosídeo, o maior constituinte, rebaudiosídeo A, rebaudiosídeo C e dulcosídeo A (Fig.II.2.3). Na Tab.II.2.3, encontram-se os radicais R_1 e R_2 da Fig.II.2.3 correspondentes a cada um dos glicosídeos da estévia.

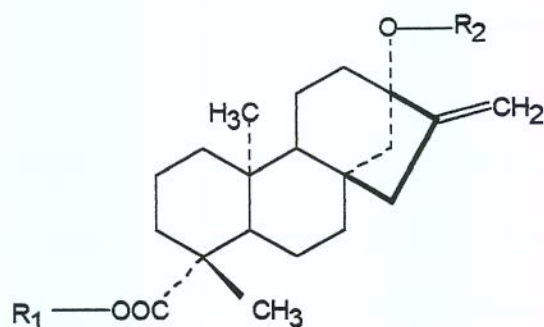


Fig.II.2.3.Estruturas moleculares dos glicosídeos da estévia [Crammer e Ikan, 1987]

Tab.II.2.3.Radicais das estruturas da Fig.II.2.3 [Crammer e Ikan, 1987]

Nome	R ₁ *	R ₂ *
Esteviolbiosídeo	H	Glc – Glc
Esteviosídeo	Glc	Glc – Glc
Rebaudiosídeo A	Glc	Glc – Glc Glc
Rebaudiosídeo B	H	Glc – Glc Glc
Rebaudiosídeo C (dulcosídeo B)	Glc	Glc – rham Glc
Rebaudiosídeo D	Glc – Glc	Glc – Glc Glc
Rebaudiosídeo E	Glc – Glc	Glc – Glc
Dulcosídeo A	Glc	Glc – rham

*glc = beta-D-glucopiranosil; rham = alfa-L-rhamnopiranosil

As proporções típicas, em base seca, para os quatro glicosídeos encontrados nas folhas da estévia em maior quantidade são: 0,4 - 0,7% de dulcosídeo A, 1 - 2% de rebaudiosídeo C, 2 - 4% de rebaudiosídeo A e 5 - 10% de esteviosídeo [Kinghorn e Soejarto, 1991].

Além dos compostos adoçantes, a estévia apresenta inúmeros constituintes metabólicos que

não apresentam dulçor, tais como diterpenos, triterpenos, esteróis, flavonóides e óleos voláteis. Investiga-se ainda a presença de pigmentos, gomas e materiais inorgânicos [Goto, 1997].

II.2.4. Propriedades

a) Sensoriais

Dos glicosídeos presentes na estévia, somente dois, esteviosídeo e rebaudiosídeo A, têm tido suas propriedades físicas e sensoriais bem caracterizadas [Brandle, 1997]. Estima-se que o esteviosídeo seja entre 110 - 300 vezes mais doce que a sacarose, o rebaudiosídeo A 250 - 450, o rebaudiosídeo B 300 - 350, o rebaudiosídeo C 50 - 120, o rebaudiosídeo D 250 - 450, o rebaudiosídeo E 150 - 300, o dulcosídeo A 50 - 120 e o esteviolbiosídeo entre 100 - 250 [Kinghorn e Soejarto, 1991].

Em relação ao rebaudiosídeo A, foi constatado que o mesmo apresenta o menor sabor residual em relação aos demais glicosídeos e que o amargor aumenta com a concentração, tanto para o rebaudiosídeo A como para o esteviosídeo [Kinghorn e Soejarto, 1991]. O esteviosídeo apresenta alguma adstringência, o rebaudiosídeo A uma adstringência menor e os dulcosídeos A e B possuem características similares ao esteviosídeo [Phillips, 1987].

b) Físico-químicas

O esteviosídeo é uma molécula estável a 100°C quando mantido em solução de pH 3 - 9;

decompõe-se relativamente rápido a pH alcalino (maior que 10), nesta mesma temperatura (100°C). Em sua forma pura, é um material cristalino, branco, com rotação ótica de - 39,3° em água [Kingham e Soejarto, 1991].

A estabilidade hidrolítica do rebaudiosídeo A foi avaliada e em condições ácidas (por ex. bebidas carbonatadas) não foi encontrada nenhuma degradação após 3 meses em temperatura ambiente [Angelucci, 1979]. A estabilidade a pH 7 também é muito boa [Kim e Dubois, 1991]. A Tab.II.2.4_b, apresenta um resumo com algumas propriedades físico-químicas dos principais componentes da estévia.

Tab.II.2.4_b. Propriedades físico-químicas do esteviosídeo e rebaudiosídeos [Crammer e Ikan, 1987; Phillips, 1987]

Composto	P.M.	Ponto de Fusão (°C)	Solubilidade
Esteviosídeo (C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈)	805	196-198	0,13% em água. Pouco solúvel em etanol e solúvel em dioxano
Rebaudiosídeo A (C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃)	966	242 -244 248 - 250	Solúvel em água, metanol e etanol. Insolúvel em acetona, CHCl ₃ ou éter
Rebaudiosídeo B (C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈)	805	193 - 195	Pouco solúvel em metanol
Rebaudiosídeo C (C ₄₄ H ₈₀ O ₂₂)	950	215 - 217	Pouco solúvel em metanol
Rebaudiosídeo D (C ₅₀ H ₈₀ O ₂₂)	1128	283 - 286	Pouco solúvel em metanol
Rebaudiosídeo E (C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃)	966	205 - 207	Pouco solúvel em metanol
Dulcosídeo A	788	193 - 195	—
Esteviolbiosídeo	642	188 - 192	—

II.2.5. Aspectos tóxicos e farmacológicos

Muitos estudos sobre a segurança no uso da estévia foram efetuados, principalmente no Japão. Nenhuma evidência de reações adversas devido a ingestão da estévia tem aparecido em literatura científica, e baseado nisso, extratos de estévia e esteviosídeo não parecem apresentar risco potencial ao organismo humano [Kinghorn e Soejarto, 1991].

A DL₅₀ (dose letal) de um extrato contendo 50% de esteviosídeo foi de 34 g/kg corpóreo quando administrado intraperitonealmente em ratos. Em estudo realizado nos Estados Unidos, nenhuma evidência de toxicidade aguda foi observada quando doses isoladas de 2 g de glicosídeos doces de estévia (esteviosídeo, rebaudiosídeos A e C, dulcosídeo A e esteviolbiosídeo) por kg corpóreo foram administrados em camundongos por intubação oral [Goto, 1997].

Uma pesquisa publicada no *Jornal Brasileiro de Medicina*, mostrou que a estévia aumenta a tolerância de glicose no sangue [Caster, 1999]. Outros estudos mostraram que a estévia inibe o crescimento e a reprodução de algumas bactérias e outros organismos infecciosos, incluindo a bactéria causadora da cárie dentária [Joyce, 1999].

II.2.6. Aplicabilidade da estévia em alimentos

Farnsworth [1973] destaca o esteviosídeo como excelente substituto não calórico do açúcar comum, sendo este uma alternativa em regimes dietéticos.

Angelucci [1979] estudou a estabilidade de soluções aquosas, ácidas e carbonatadas

preparadas com esteviosídeo. Em bebidas os resultados foram bons, porém a baixa solubilidade do esteviosídeo dificultou sua utilização. Dados de literatura indicavam que a solubilidade do mesmo era de 2% a 30°C e 0,12% a 20°C; Angelucci [1979] obteve 0,441 g/l a 1°C, 0,81 g/l a 28°C e 12 g/l a 61°C.

Há relatos do emprego das folhas secas de estévia para adoçar mate, café e chá e no Japão como edulcorantes de produtos alimentícios [Angelucci, 1979]. Ainda em relação ao Japão, os gêneros alimentícios onde ocorrem um grande uso de esteviosídeo incluem alimentos salgados, sorvetes, doces, bebidas, frutos do mar processados e como realçadores de sabor [Phillips, 1987; Kinghorn e Soejarto, 1991].

Uma alternativa viável para o emprego da estévia em alimentos, foram as misturas com outros adoçantes tais como sacarose, glicose, frutose, sorbitol, maltitol e também com outros edulcorantes como a sacarina e acesulfame K [Goto, 1997].

II.3. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS GLICOSÍDEOS

II.3.1. Métodos de extração dos glicosídeos

a) Convencional

Métodos de produção de extratos de folhas de estévia contendo esteviosídeos em vários graus de pureza têm sido descritos. Muitos deles têm aparecido em patentes, especialmente no Japão. A maioria dos métodos de purificação de esteviosídeo envolve uma extração

inicial através de solvente aquoso, seguido pelas etapas de refinamento envolvendo uma ou mais extração seletiva através de um solvente orgânico polar, branqueamento, precipitação, coagulação, adsorção, troca iônica e cristalização [Kinghorn e Soejarto, 1991].

Segundo Phillips [1987] a literatura reporta que o aquecimento das folhas da estévia entre 90 e 110°C preferencialmente com correntes de ar, gás inerte ou vapor, destrói parte das substâncias responsáveis pelo sabor desagradável da estévia e que resultados similares podem ser obtidos por extração com água entre 25 e 29°C, ou extração com solventes orgânicos como acetato de etila, dioxano, clorofórmio, etc., a temperaturas não maiores que 10°C. Embora a água quente seja o solvente preferido devido a sua capacidade de extrair o rebaudiosídeo A, muitas patentes ressaltam as vantagens de solventes orgânicos como etanol, metanol/clorofórmio, glicerina, sorbitol ou propileno glicol; porém não oferecem muitas informações adicionais.

Na etapa de refinação, muitos processos utilizam solventes orgânicos para realizar uma separação seletiva: butanol, éter, ésteres ou organo-clorados, ou álcoois para remover impurezas; metanol ou etanol para cristalizar o esteviosídeo e etanol para cristalizar o rebaudiosídeo A.

Hidróxido de cálcio é frequentemente utilizado para precipitar impurezas e remover a cor, bem como coagulantes para remover impurezas coloidais. O uso de resinas de troca iônica é comum nas etapas finais de refino do extrato, embora estejam patenteados processos que utilizam diálise e ultrafiltração junto com filtração em gel. A separação final é geralmente feita por cristalização de uma solução aquosa com a ajuda de determinados solventes

[Pasquel, 1999].

b) Extração com fluidos supercríticos

A extração supercrítica tem sido utilizada para obtenção dos mais variados produtos. Referentes ao *Laboratório de Separações Físicas (LASEFI)*, podem ser citados trabalhos como a extração supercrítica de óleos essenciais e oleosinas [Ferreira *et al.*, 1999], óleos vegetais e vitaminas lipossolúveis [França *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 1997] e mesmo dos glicosídeos da estévia [Pasquel *et al.*, 2000]. Todos os trabalhos têm obtido produtos de melhor qualidade quando comparados aos obtidos pelos métodos convencionais.

Pasquel [1999] investigou as melhores condições para o pré-tratamento da estévia com CO₂ pressurizado visando a retirada dos compostos que causavam amargor ao extrato. O estudo foi dividido em três etapas:

- 1º) pré-tratamento das folhas com CO₂ pressurizado - extração de compostos não glicosídicos;
- 2º) extração convencional e com CO₂+co-solvente, a partir de folhas pré-tratadas e sem pré-tratamento - extração dos compostos glicosídicos;
- 3º) análise sensorial dos extratos glicosídicos de folhas pré-tratadas e sem pré-tratamento.

Em relação à primeira etapa, a Tab.II.3.1_a, mostra a composição química dos extratos de estévia obtidos na etapa de pré-tratamento; observa-se a presença de algumas substâncias que conferem amargor ao extrato, tais como os terpenos. Na segunda etapa, verificou-se um maior rendimento em massa quando se utilizou água como co-solvente (9,5% molar) a 120 bar e 16°C, sendo a relação média de esteviosídeo: rebaudiosídeo A de 3:1. Por fim, a

análise sensorial determinou ainda que a percepção do sabor residual foi maior para o caso de folhas sem pré-tratamento.

Tab.II.3.1_a.Composição química do extrato de estêvia do pré-tratamento [Pasquel, Marques e Meireles, 1999]

Classe	Constituintes	% (massa)
Sesquiterpenos	Espatulenol	1,49
Ácidos graxos	Ác. Decanóico	3,35
	Ác. 8.11. 14-eicosatrienóico	3,05
Hidrocarbonetos alifáticos	2-metil – octadecano	2,55
	pentacosano	8,54
	octacosano	8,42
Esteróides	Estigmasterol	1,63
	β -sitosterol	1,26
Triterpenos	α/β -amirina	0,68
	lupeol	5,94
	acetato de β -amirina	4,85
	triterpeno pentacíclico (PM:468)	14,1
Não identificados		44,14

II.3.2. Métodos de identificação e quantificação dos glicosídeos

No começo dos anos 70, o desenvolvimento das técnicas de cromatografia em camada delgada e gás-líquido possibilitou aos grupos de pesquisa no Japão separarem os glicosídeos diterpênicos individualmente. Porém, dos métodos analíticos desenvolvidos para essas determinações, somente a ressonância magnética nuclear foi inteiramente satisfatória. Os métodos de cromatografia citados possuíam a desvantagem de contar com a derivação e a cromatografia em camada delgada também não tinha um reagente corante apropriado nem técnicas densiométricas para a determinação final. Subsequentemente, a

cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada para a identificação individual dos glicosídeos diterpênicos e tornou-se a técnica padrão [Phillips, 1987].

Sendo assim, a CLAE tem sido empregada para quantificação dos glicosídeos da estévia em alimentos e bebidas (Tab.II.3.2). As vantagens desta técnica incluem a extrema rapidez da análise e o fato dos rebaudiosídeos recuperados inalterados poderem ser usados como padrões para análises [Crammer e Ikan, 1987].

Tab.II.3.2.Dados analíticos de estévia por CLAE [Crammer e Ikan, 1987]

Fase estacionária	Fase móvel	Constituintes detectados
<i>Shodex Ohpak</i>	CH ₃ CN-H ₂ O (4:1)	Esteviosídeo, rebaudiosídeo A
<i>Lichrosorb - NH₂</i>	CH ₃ CN-H ₂ O (85:15)	Esteviosídeo, rebaudiosídeo A
<i>Protein-1-125</i>	(CH ₃) ₂ CHOH	Esteviosídeo, rebaudiosídeos B, D, E, dulcosídeo A
<i>Bondpak</i>	CH ₃ CN - H ₂ O (80:20)	Esteviosídeo, rebaudiosídeo A

Há relatos na literatura onde a quantificação dos glicosídeos é realizada por espectrofotometria no ultra-violeta a 210 nm [Nikolova-Damyanova *et. al*, 1994]. Pasquel [1999], utilizou tal técnica, efetuando uma curva de calibração com amostra comercial de esteviosídeo a 95% diluído em água.

II.4. EXTRAÇÃO SUPERCRTICA

Os primeiros estudos de solubilidade em gases supercríticos vieram logo após os experimentos clássicos de Andrews sobre o fenômeno crítico vapor/líquido em fluidos puros. Este trabalho foi realizado principalmente devido ao interesse que existia nas propriedades dos fluidos (incluindo seu poder de dissolução) ao redor do ponto crítico. Em

1879 Hannay e Hogarth reportaram que eles tinham extraído uma variedade de sólidos, incluindo enxofre, vários derivados do bromo, iodo e cloro e clorofila com uma série de solventes a temperaturas e pressões maiores que a temperatura e pressão crítica do solvente. Os solventes considerados incluíam etanol, metanol, dietil e algumas olefinas [King e Bott, 1995].

Segundo Pasquel [1999], a literatura especializada é quase unânime no uso do termo extração supercrítica ou extração com fluidos supercríticos para definir o processo de separação que usa como solvente um fluido acima de suas condições críticas. O termo extração pressurizada permite referir-se ao mesmo tempo a substâncias em condições subcríticas e supercríticas, isto é, na vizinhança do ponto crítico (Fig.II.4). Porém, existem outras denominações que costumam ser utilizadas na literatura, referindo-se à condição físico-química do solvente: gases densos, supercríticos ou comprimidos [Pasquel e Meireles, 1998].

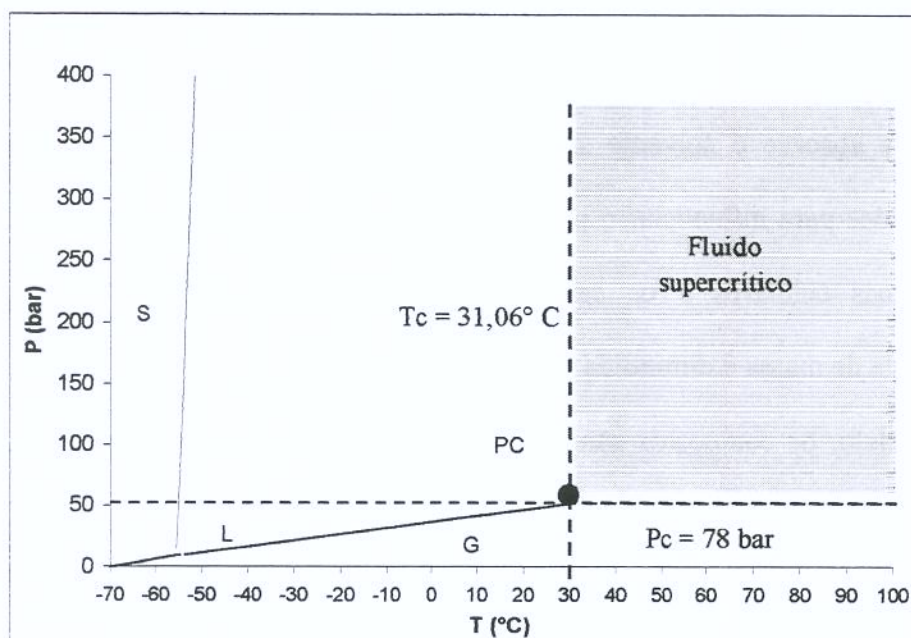


Fig.II.4. Diagrama de fases P x T para o CO₂ [King e Bott, 1995]

Em alimentos e produtos farmacêuticos, o dióxido de carbono (CO_2) é o fluido mais utilizado como solvente, seja como fluido supercrítico ou líquido subcrítico, uma vez que suas características se assemelham a de um solvente ideal [Meireles e Nikolov, 1994]. Além disso, sua temperatura crítica é próxima à temperatura ambiente, é barato, inodoro, transparente, atóxico, inflamável e não corrosivo [Goto, Sato, Hirose, 1993].

A extração supercrítica explora as altas densidades (próximas as dos líquidos) apresentadas pelos fluidos supercríticos, associadas às difusividades intermediárias entre gases e líquidos e viscosidades baixas, características dos gases [Muller, 1999]. Estas propriedades tornam altas as taxas de extração devido ao grande poder de solvatação conferido pelas altas densidades dos fluidos, enquanto os baixos valores de viscosidade combinados com altos valores de difusividade fornecem alto poder de penetração na matriz sólida [Rodrigues, 1996].

Segundo Brunner [1994] a extração de compostos solúveis na fase sólida ocorre em diversas etapas consecutivas e paralelas:

- A matriz absorve o solvente supercrítico e outros fluidos que são deliberadamente adicionados para influenciar o processo de extração. As células incham-se, ou seja, as membranas celulares e os canais intercelulares são alargados. A resistência ao transporte de massa é diminuída por estas medidas;
- Em paralelo, os compostos são dissolvidos pelo solvente. Uma reação química pode ocorrer previamente à solvatação;
- Os compostos dissolvidos são transportados para a superfície externa do sólido. A difusão é o mecanismo de transporte mais importante;

- Os compostos dissolvidos passam através da superfície externa. A mudança de fase pode ocorrer naquele lugar;
- Os compostos são transportados da camada superficial para o seio do solvente supercrítico e são subsequentemente removidos com o solvente do seio do material sólido.

As técnicas de extração convencionais oferecem bons resultados, mas todas são longas e requerem grandes quantidades de solventes. Comparando-se a extração líquida com as extrações com fluido supercrítico e fluido subcrítico, as últimas apresentam algumas vantagens, incluindo: (a) elas são rápidas, simples e menos caras em termos de custo de solvente, (b) variações das condições de extração podem ser introduzidas pela mudança da pressão, temperatura e natureza dos fluidos usados, e (c) geram extratos que estão prontos para análise [Liu, Ong, Li, 1997].

Além disso, o poder de dissolução do fluido supercrítico depende significativamente das propriedades de temperatura e pressão, e a pressões próximas ao ponto crítico, somente componentes voláteis são extraídos, enquanto extratos que incluem gorduras, ceras, resinas e corantes são extraídos a alta pressão onde o fluido tem uma densidade similar à de um líquido [Goto, Sato, Hirose, 1993]. Também influenciam o processo de extração, parâmetros de processo como a densidade e vazão de solvente, bem como as condições do sólido, como tamanho de partículas [Brunner, 1994].

Os equipamentos necessários para uma extração com fluidos supercríticos são mais caros quando comparados àqueles para um processo de separação convencional, como extração

com solventes ou destilação por arraste a vapor. Entretanto, o custo de operação é usualmente menor e o custo total dos produtos pode ser comparado com o convencional se as condições de processo são otimizadas e se a capacidade do extrator é suficiente. Já existem diversas plantas na Europa produzindo extratos de condimentos, aromas e componentes cosméticos através da extração com dióxido de carbono a alta pressão [Sovová *et al.*, 1994].

II.4.1. Solubilidade

A solubilidade em fluidos supercríticos é uma informação fundamental nos processos de separação, como no caso da extração de produtos de matérias-primas vegetais. O conhecimento da solubilidade dos constituintes a serem extraídos ou evitados na extração, permite uma seleção da faixa de pressão e temperatura de operação [França, 1999].

Em se tratando de componentes isolados da matriz de inertes, a solubilidade de um líquido num solvente supercrítico depende da volatilidade do soluto e das forças de interação soluto/solvente e solvente/solvente na fase rica em solvente e, soluto/solvente e soluto/soluto, na fase sendo extraída, que são dependentes da densidade [King e Bott, 1995]. Na etapa de extração a solubilidade deve ser entendida como a quantidade de soluto que pode ser solubilizada nas condições de operação e geralmente, deve ser obtida experimentalmente [França, 1999].

A solubilidade no fluido supercrítico (Y^*) é a máxima concentração do extrato que pode ocorrer na fase solvente e que se encontra em equilíbrio com a concentração do extrato na

fase sólida [Rodrigues, Marques, Meireles, 2000]. A metodologia experimental usada para a determinação da solubilidade, normalmente envolve processos dinâmicos, com o solvente passando através de um leito de sólido contendo o soluto e estáticos, onde o solvente é posto em contato com o soluto durante um determinado tempo, suficiente para se saturar [França, 1999].

II.4.2. Curvas de extração

A Fig.II.4.2 mostra uma curva de extração típica obtida, onde podem ser observadas as seguintes etapas:

- etapa de taxa de extração constante (CER) - predomínio da transferência de massa devido à convecção na fase fluida (verde);
- etapa de taxa de extração decrescente (FER) – tanto os efeitos convectivos na fase fluida quanto os difusionais na fase sólida determinam a velocidade do processo (azul);
- etapa de taxa de extração controlada pela difusão no sólido - predomínio do fenômeno difusional (vermelho).

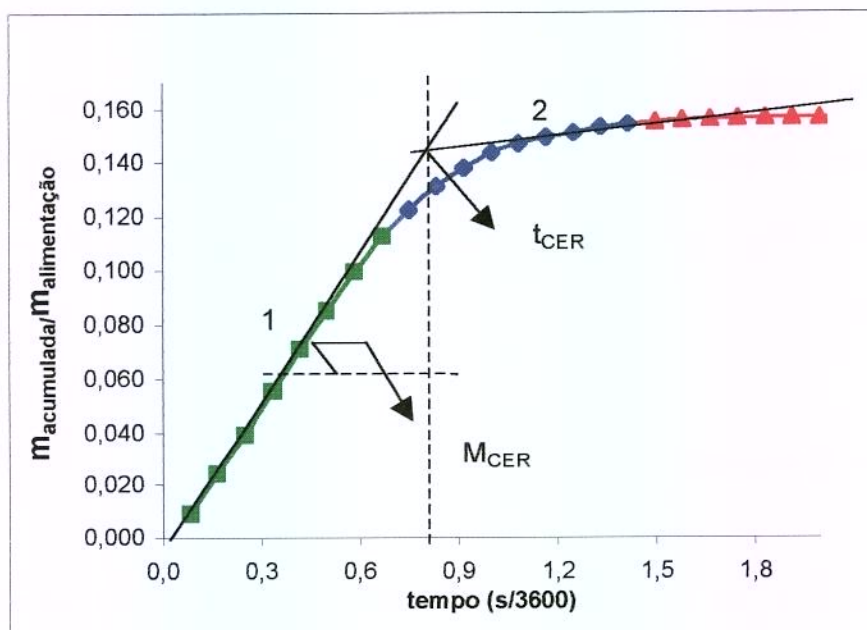


Fig.II.4.2.Curva de extração do óleo de cravo

Para a interpretação das curvas de extração, é necessário o conhecimento dos seguintes parâmetros [Rodrigues, 1996]:

- M_{CER} - taxa de extração na etapa CER (kg/s);
- Y_{CER} - razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER (kg extrato/kg CO_2);
- t_{CER} - duração da etapa CER (s);
- R_{CER} - rendimento em extrato na etapa CER (% massa);
- R_{Total} - rendimento total em extrato (% massa).

Tais parâmetros podem ser obtidos pelo ajuste de duas retas (Fig.II.4.2) sob a curva típica através do ajuste pelo método *spline* com o auxílio do pacote estatístico SAS [Povh, Meireles, Marques, 2001]. A reta 1 descreve o período CER e pela interseção das retas 1 e 2 obtém-se o parâmetro t_{CER} . O parâmetro M_{CER} é o valor da tangente da reta 1 e a partir do

mesmo, obtém-se o valor de Y_{CER} através da Eq. (II.4.2).

$$Y_{CER} = M_{CER} / Q_{CO_2} \quad \text{Eq. (II.4.2)}$$

Onde: Q_{CO_2} é a vazão média do solvente para o período CER.

II.5. MODELOS DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA

Os modelos matemáticos permitem generalizar os resultados experimentais, que posteriormente poderão ser aplicados a novas condições de trabalho e/ou a outros materiais diferentes daqueles inicialmente pesquisados [Pasquel, 1999]. A modelagem é importante também para a determinação de parâmetros ligados ao processo, como as dimensões requeridas para a coluna de extração ou a vazão ideal para a otimização do mesmo [Martínez e Meireles, 2000].

Reverchon [1997] descreve três enfoques diferentes em relação à modelagem:

- modelos empíricos;
- modelos baseados em uma analogia com a transferência de calor;
- modelos baseados em balanços diferenciais de massa.

Para modelar os processos de extração com fluidos supercríticos, Brunner [1994] faz uma aproximação para processos em regime permanente. Descreve ainda, que a extração de substâncias de substratos sólidos com fluidos supercríticos envolve pelo menos duas fases, uma sólida e outra fluida. Como na interface as concentrações referentes a cada fase são representadas por grandezas diferentes, as fases têm que ser modeladas separadamente.

Em relação aos modelos baseados em balanços de massa, a abordagem mais utilizada para descrever a taxa de transferência de massa, considera escoamento pistonado no leito e despreza a dispersão axial, predizendo as concentrações de soluto no leito de sólidos e no fluido como uma função do tempo e da posição no leito [Pasquel, 1999].

Poucos trabalhos sistemáticos de extração com fluido supercrítico de óleos essenciais de matrizes herbáceas estão disponíveis e são caracterizadas pelos baixos rendimentos num processo de extração complexo. Reverchon, Donsi e Osséo [1993] propuseram a descrição de um modelo para a extração de óleos essenciais de matrizes herbáceas com fluido supercrítico. Este modelo matemático é uma aproximação com os dados experimentais obtidos de diferentes materiais, tamanho de partículas e escalas experimentais.

Segundo Pasquel [1999] a característica do pré-tratamento das folhas de estêvia onde predomina a etapa de extração convectiva dos solutos, coincide com a hipótese principal do modelo de Lack [Sovová, 1994 e Sovová *et al.*, 1994]. Este modelo é baseado em balanços de massa e considera o escoamento axial do solvente com velocidade superficial U através de um leito fixo de seção transversal cilíndrica. Sendo assim, o modelo usado por Sovová *et al.* [1994] e França *et al.* [1999], propõe as seguintes equações para as fases sólida e fluida, respectivamente:

$$-\rho_s(1-\varepsilon)\frac{\partial X}{\partial t} = J(X, Y) \quad \text{Eq.(II.5_1)}$$

$$\rho_f U \frac{\partial Y}{\partial h} = J(X, Y) \quad \text{Eq.(II.5_2)}$$

Onde: X e Y são as razões mássicas de soluto nas fases sólida e fluida respectivamente, t é

o tempo (s), U é a velocidade superficial do solvente (m/s), ρ_s e ρ_f são as densidades da fase sólida e fluida respectivamente, ε é a porosidade do leito e $J(X,Y)$ é a taxa de transferência interfacial de massa.

Considerando as condições inicial e de contorno $\{X(h, t = 0) = X_0 \text{ e } Y(h = 0, t) = 0\}$ e substituindo $J(X,Y)$ pelas expressões apropriadas para cada etapa do processo de extração, o modelo é expresso num conjunto de três equações [Pasquel *et al.*, 2000]:

- Para o período de taxa constante de extração - quando $t < t_{CER}$

$$m_{ext} = Y^* [1 - \exp(-Z)] Q_{CO_2} t \quad \text{Eq.(II.5_3)}$$

- Para o período de taxa decrescente de extração - quando $t_{CER} \leq t < t_{FER}$

$$m_{ext} = Y^* [t - t_{CER} \exp(z_w - Z)] Q_{CO_2} \quad \text{Eq.(II.5_4)}$$

- Para o período controlado pela difusão - quando $t \geq t_{FER}$

$$m_{ext} = N \left\langle X_0 - \frac{Y^*}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp \left(\frac{WX_0}{Y^*} \right) - 1 \right] \exp \left[\left(\frac{WQ_{CO_2}}{N} \right) (t_{CER} - t) \right] \frac{X_k}{X_0} \right\} \right\rangle \quad \text{Eq.(II.5_5)}$$

Nas três equações do modelo a quantidade Z é diretamente proporcional ao coeficiente de transferência de massa da fase fluida:

$$Z = \frac{Nk_{Ys} \rho_{CO_2}}{Q_{CO_2} (1 - \varepsilon) \rho_s} \quad \text{Eq.(II.5_6)}$$

As demais restrições e definições são a seguir descritas:

$$t_{CER} = \frac{X_0 - X_k}{Y^* Z} \frac{N}{Q_{CO_2}} \quad \text{Eq.(II.5_7)}$$

$$\frac{z_w}{Z} = \frac{Y^*}{WX_0} \ln \left\{ \frac{X_0 \exp[(WQ_{CO_2}/N)(t - t_{CER})] - X_k}{X_0 - X_k} \right\} \quad \text{Eq.(II.5_8)}$$

$$W = \frac{Nk_{Xa}}{Q_{CO_2}(1 - \varepsilon)} \quad \text{Eq.(II.5_9)}$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{N}{Q_{CO_2}W} \ln \frac{X_k + (X_0 - X_k) \exp(WX_0/Y^*)}{X_0} \quad \text{Eq.(II.5_10)}$$

Onde: m_{ext} é a massa de extrato (kg), t_{CER} duração da etapa de taxa constante de extração (s), N é a massa de matéria-prima livre de soluto (kg), Y^* é a solubilidade (kg/kg), Q_{CO_2} é a vazão média do solvente (kg/s), t_{FER} é o período de taxa decrescente de extração (s), X_0 é a razão mássica inicial de soluto na fase sólida, X_k é a razão mássica de soluto no interior de células intactas.

k_{Ya} e k_{Xa} são respectivamente os coeficientes de transferência de massa da fase fluida e fase sólida (s^{-1}), sendo definidos pelas equações:

$$k_{Ya} = \frac{M_{CER}}{\rho_{CO_2} \cdot S \cdot H \cdot \Delta Y} \quad \text{Eq.(II.5_11)}$$

$$k_{Xa} = \frac{k_{Ya} \cdot \rho_{CO_2} \cdot \Delta Y}{\rho_s \cdot \Delta X} \quad \text{Eq.(II.5_12)}$$

Onde: M_{CER} é a taxa de extração no período CER (kg/s), ρ_{CO_2} é a densidade do solvente (kg/m^3), S é a área da secção transversal do leito (m^2), H é o comprimento do leito (m), ΔY e ΔX são respectivamente as médias logarítmicas para as razões mássicas de soluto na fase fluida e fase sólida [Ferreira *et al.*, 1999]:

$$\Delta Y = \frac{(Y^* - Y_{in}) - (Y^* - Y_{out})}{\ln[(Y^* - Y_{in})/(Y^* - Y_{out})]} \quad \text{Eq.(II.5_13)}$$

$$\Delta X = \frac{(X^* - X_p) - (X^* - X_k)}{\ln[(X^* - X_p)/(X^* - X_k)]} \quad \text{Eq.(II.5_14)}$$

Onde: Y_{in} e Y_{out} são as razões mássicas de entrada e saída no leito, respectivamente. X^* é a razão mássica de soluto na fase sólida em equilíbrio com Y^* e X_p é razão mássica de soluto facilmente acessível na fase sólida.

Para o uso do modelo, é necessário o conhecimento dos parâmetros do mesmo. Pasquel *et al.* [2000] avaliaram os mesmos usando dados experimentais e de literatura. Para estimar os parâmetros do modelo, Povh, Meireles e Marques [2001] adotaram o seguinte procedimento:

- i) a razão mássica de soluto inicial (X_0) foi calculada usando-se 10% acima da quantidade total de extrato para cada condição experimental;
- ii) o sólido inerte foi considerado como a alimentação menos a massa total de extrato. Água foi incluída no sólido inerte, desde que a umidade (base seca) do sólido residual fosse a mesma da alimentação;
- iii) os valores de Y_{CER} obtidos sob condições específicas, foram usados como uma estimativa para a solubilidade do extrato no solvente supercrítico;
- iv) os valores de M_{CER} foram usados para estimar Z , usando a Eq.(II.5_3);
- v) o coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{Ya}) foi calculado através da Eq.(II.5_6);
- vi) o tempo ($t_{CER, Spl}$) foi calculado como uma interseção entre a primeira e a segunda linha de spline (Fig.II.4.2) e a Eq.(II.5_7) foi usada para obter uma estimativa de X_p ;
- vii) o parâmetro W , que inclui o coeficiente de transferência de massa na fase sólida, foi

estimado usando-se as Eq.(II.5_9), Eq.(II.5_12) e ΔX e ΔY definidos de acordo com as Eq.(II.5_16) e Eq.(II.5_17) respectivamente:

$$\Delta Y = \frac{M_{CER}}{\rho_{CO_2} S.H k_{Ya}} \quad \text{Eq.(II.5_16)}$$

$$\Delta X = \frac{(X_p + X_k)}{2} \quad \text{Eq.(II.5_17)}$$

Onde: $X_p = X_0 - X_k$, sendo X_p a razão mássica de soluto do soluto facilmente acessível na fase sólida, X_0 a razão mássica inicial de soluto na fase sólida, X_k a razão mássica de soluto no interior de células intactas; ΔY é definido pela Eq.(II.5_16) e ΔX é a média aritmética na fase sólida.

Com os parâmetros calculados conforme descrito anteriormente e através de um procedimento de tentativa e erro, t_{CER} foi calculado para minimizar a seguinte função:

$OF = \frac{1}{n} \sum_i (m_{ext} - m_{ext}^{calc.})_i^2$, onde $m_{ext}^{calc.}$ é a massa de extrato calculada e n é o número de dados.

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

III.1. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

As folhas de estévia foram obtidas da *Steviafarma Industrial* (Maringá - Brasil) em dezembro de 1999, sendo em seguida acondicionadas em sacos plásticos. Os mesmos foram selados (Seladora *Intertec Equipamentos Ltda.*, série MAS, Brasil), submetidos a vácuo (Bomba *ArtLab*, mod. 141, Brasil) e armazenados em ambiente refrigerado (ca. 20°C). No total, foram preparados 62 sacos plásticos (Fig.III.1) com cerca de 100 g cada.



Fig.III.1.1. Folhas de estévia acondicionadas

O fluido de extração utilizado (CO₂) foi adquirido da *White Martins* (Campinas - Brasil) com 99% de pureza e como co-solvente foi utilizada água destilada.

III.1.1. Umidade da matéria-prima

A umidade das folhas de estévia intactas/processadas foi determinada pelo método da destilação segundo Jacobs [1973]. O mesmo é usado quando se deseja distinguir entre a água e o material volátil presentes. A Fig.III.1.1 representa o equipamento utilizado na

determinação da umidade da estévia. O mesmo é constituído de um condensador (1), um tubo coletor graduado para receber a água evaporada da amostra (2), balão de fundo redondo (3) e manta de aquecimento (4).

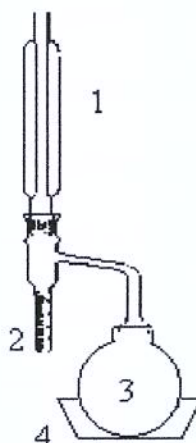


Fig.III.1.1.Equipamento utilizado na determinação da umidade

O procedimento efetuado é a seguir descrito:

- pesou-se cerca de 30 g de folhas de estévia intactas/processadas inserindo-as em um balão volumétrico de 1000 mL;
- adicionou-se 75 mL de xilol (PA-ACS-*Ecibra* 99,95%, lote 12.540, São Paulo - Brasil), deixando-se em refluxo por 3 horas na potência 3 (manta *Fisaton*, mod. 102, São Paulo - Brasil);

A umidade do material, expressa em percentagem (%), foi calculada pela Eq.(III.1.1).

$$\text{Umidade} = \left(\frac{\text{Vol.} \rho_{\text{H}_2\text{O}}}{m} \right) \cdot 100 \quad \text{Eq.(III.1.1)}$$

Onde: Vol. é o volume de água evaporada da amostra (cm^3), $\rho_{\text{H}_2\text{O}}$ é a densidade da água na temperatura de leitura do volume (g/cm^3) e m é a massa de amostra (g).

III.1.2. Carboidratos totais e teor de adoçantes

A determinação de carboidratos totais das folhas de estévia secas/pré-tratadas/após extração com CO₂+água, foi efetuada pela *Steviafarma Industrial* (Maringá - Brasil) usando o método de fenol-sulfúrico [Goto, 1997]. Os princípios adoçantes da estévia foram determinados utilizando-se a correlação entre carboidratos totais e glicosídeos diterpênicos. O conteúdo de carboidratos totais e o teor de adoçantes foram calculados pelas Eq.(III.1.2_1) e Eq.(III.1.2_2) respectivamente.

$$\text{CHT}(\%) = 3,0625 \frac{L_A}{L_P} \quad \text{Eq.(III.1.2_1)}$$

Onde: CHT é o teor de carboidratos totais solúveis em água, L_A é a leitura da absorbância de luz da amostra a 490 nm e L_P é a leitura da absorbância do padrão a 490 nm.

$$\text{Teor de adoçantes (\%)} = 0,69 \text{ CHT (\%)} - 2,06 \quad \text{Eq.(III.1.2_2)}$$

III.1.3. Densidade Real/Densidade das folhas secas de estévia

A densidade real (dr) das folhas de estévia, foi determinada pela *Central Analítica* do *Instituto de Química – UNICAMP* (Campinas – Brasil), utilizando-se a técnica da picnometria em gás Hélio, com auxílio de um densímetro (*Micromeritics*, mod. Multivolume pycnometer 1305, Estados Unidos), de uma balança analítica (*Quimis*, mod. QI-SA, precisão de ± 0,0001 g, Estados Unidos) e de um pesa filtro. A densidade aparente (da) foi determinada através da Eq.(III.1.3).

$$d_a = \frac{m}{\text{Vol.}} \quad \text{Eq.(III.1.3)}$$

Onde: m é a massa de matéria-prima usada na coluna de extração (g) e Vol. é o volume da célula de extração (cm³).

III.1.4. Porosidade total do leito e partículas

A porosidade total do leito e partículas (ε) foi calculada através da Eq.(III.1.4). Tal parâmetro é necessário para a modelagem do processo conforme Eq.(II.5_6).

$$\varepsilon = 1 - \frac{d_a}{d_r} \quad \text{Eq.(III.1.4)}$$

Onde: d_a é a densidade aparente e d_r é a densidade real, determinadas conforme item III.1.3.

III.1.5. Distribuição granulométrica

A escolha do jogo de peneiras (*Gramu Test*, Brasil) para o processamento da matéria-prima foi baseada em dados de literatura [Pasquel, 1999], sendo usada a sequência de peneiras (séria Tyler) 10, 16, 24 mesh e fundo.

Cerca de cinquenta gramas de estévia foram moídas em um multiprocessador (*Walita*, mod. *máster mega plus RI 3171*, Brasil) durante 10 segundos na potência 1 e peneiradas por 10 minutos na potência 10 em agitador (*Produ Test*, Brasil). As frações decorrentes das peneiras 16 e 24 mesh foram selecionadas para a extração e a fração retida na peneira 10 mesh foi reprocessada uma vez no multiprocessador conforme descrito anteriormente, pois ainda havia matéria-prima que poderia ser aproveitada. A proporção utilizada nas extrações em relação às frações das peneiras 16 e 24 mesh foi de 1,5:1, respectivamente.

III.1.6. Diâmetro das partículas

O diâmetro médio das partículas foi determinado através da metodologia que utiliza o diâmetro da partícula de superfície externa média, utilizando-se peneiras granulométricas da série Tyler, conforme Gomide [1983] e calculado de acordo com a Eq.(III.1.6):

$$D_p = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{D_{Pi}}}{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{D_{Pi}^3}}} \quad \text{Eq. (III.1.6)}$$

Onde: $x_i = \frac{M_i}{M}$ é a percentagem retida de amostra na fração i , D_p é o diâmetro médio das partículas, D_{Pi} é o diâmetro da partícula da fração i , M_i é a massa de amostra na fração i , M é a massa total de amostra e n é o número de frações.

III.2. UNIDADE DE EXTRAÇÃO

Foi utilizada a unidade de extração supercrítica 1 (Fig.III.2_a) do *Laboratório de Separações Físicas (LASEFI)* da *Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA)* da *Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP - Brasil)*.

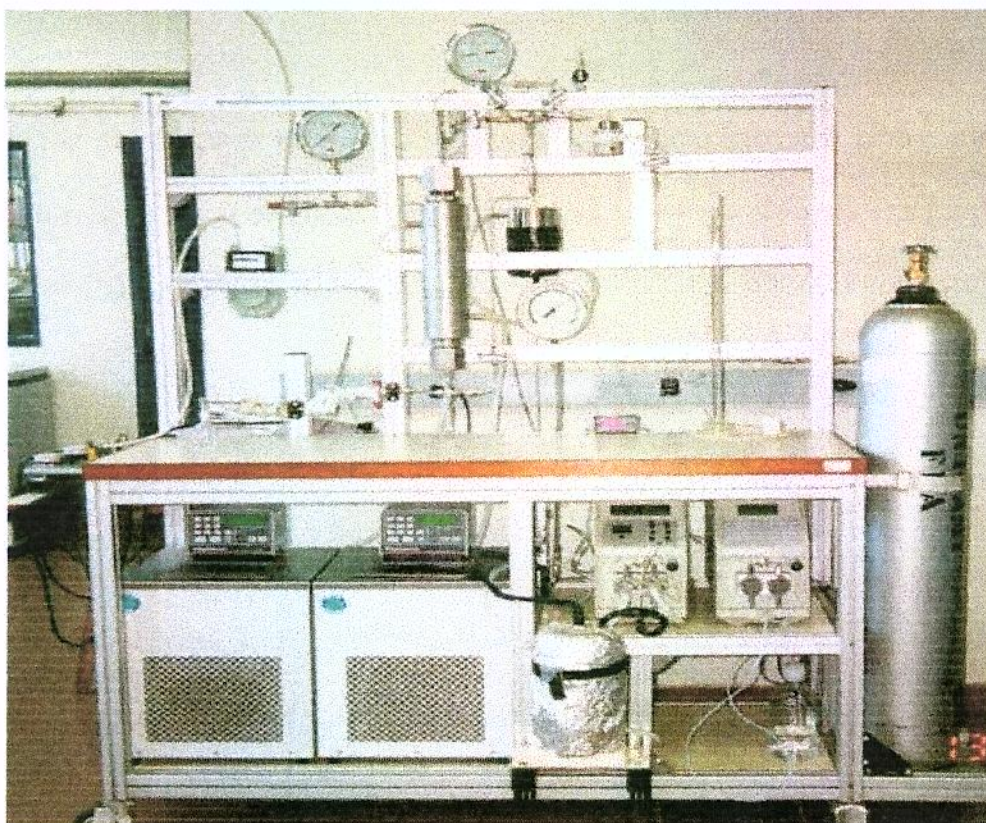


Fig.III.2_a.Unidade de extração supercrítica 1

O fluxograma do equipamento pode ser observado na Fig.III.2_b e inclui como componentes principais uma bomba de alta pressão para o solvente (*Thermo Separation Products*, mod. 2000, Flórida – Estados Unidos), uma bomba de alta pressão para o co-solvente (*Thermo Separation Products*, mod. 3500, Flórida – Estados Unidos) e dois banhos termostáticos programáveis (*PolyScience*, mod. 9510, Estados Unidos) responsáveis pela temperatura do extrator e dos cabeçotes da bomba de CO₂.

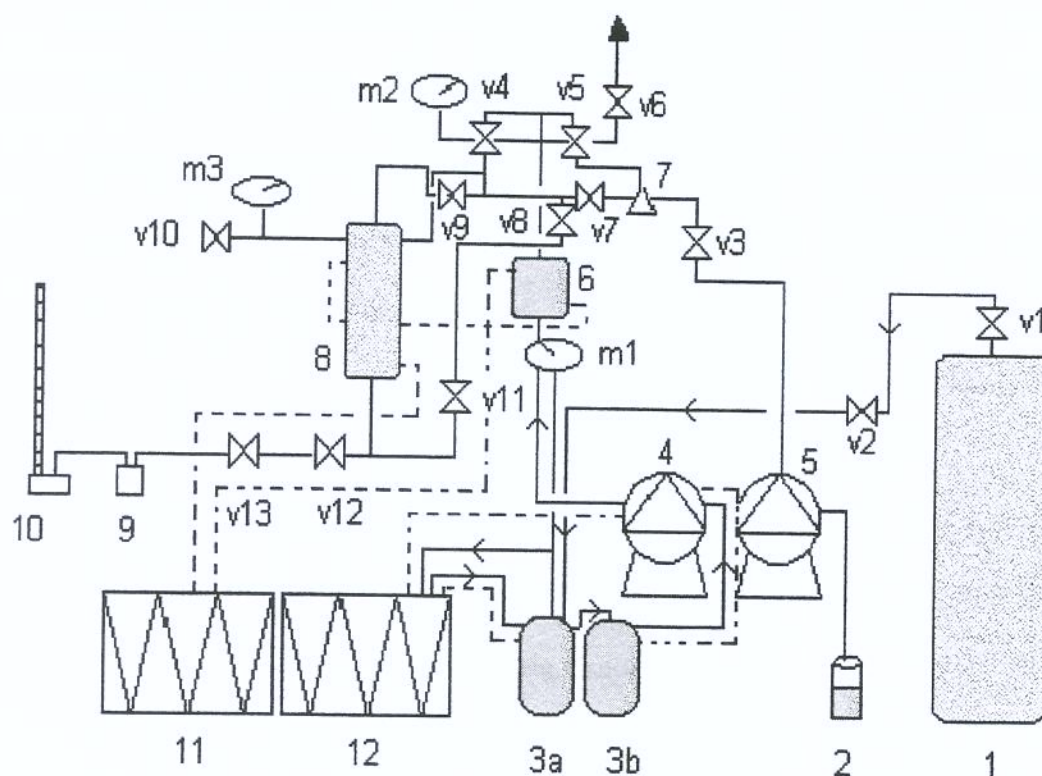


Fig.III.2_b.Fluxograma da unidade de extração supercrítica 1: (1) cilindro de CO_2 , (2) reservatório de co-solvente, (3) tanques pulmões, (4) bomba de CO_2 , (5) bomba de co-solvente, (6) tanque pulmão encamisado, (7) misturador de CO_2 e co-solvente, (8) extrator encamisado, (9) frasco coletor, (10) "bolhômetro", (11) e (12) banhos termostáticos, (m1 - m3) manômetros, (v1 - v13) válvulas.

Não estão descritos na Fig.III.2_b, os termopares na entrada e saída da bomba de CO_2 , os termopares na entrada e saída do extrator, o indicador de temperatura e a fita de aquecimento usada na tubulação de saída, anteriormente ao frasco coletor.

III.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Os ensaios de pré-tratamento foram realizados somente na condição de 200 bar/30°C, pois foi a melhor condição obtida em literatura [Pasquel, 1999]. Para os ensaios de extração dos

glicosídeos com CO₂+água foram estudadas 2 variáveis (temperatura e pressão) em dois níveis (10 e 16°C para temperatura, 120 e 250 bar para pressão). A escolha dos valores de pressão e temperatura foi baseada na literatura, uma vez que Paquel [1999] não havia estudado a extração dos glicosídeos a temperaturas inferiores a 16°C; além disso buscou-se uma otimização do melhor resultado obtido anteriormente (120 bar/16°C), usando-se uma pressão maior (250 bar) a 16°C.

Efetuuou-se um sorteio dos ensaios para verificar a ordem de realização dos mesmos, sendo obtida a seguinte sequência: 1º) 120 bar/16°C; 2º) 250 bar/16°C; 3º) 250 bar/10°C; 4º) 120 bar/10°C. De posse dos resultados, houve ainda um estudo na condição de 250 bar/30°C para esclarecimento dos resultados obtidos nas temperaturas citadas.

III.4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os procedimentos efetuados, de uma maneira geral, durante o desenvolvimento do trabalho podem ser visualizados na Fig.III.4. Pode-se assim observar duas etapas distintas, o pré-tratamento e a extração dos glicosídeos, bem como as análises particulares de cada etapa. Ressalta-se ainda que a matéria-prima utilizada no pré-tratamento era a seguir utilizada para a extração dos glicosídeos.

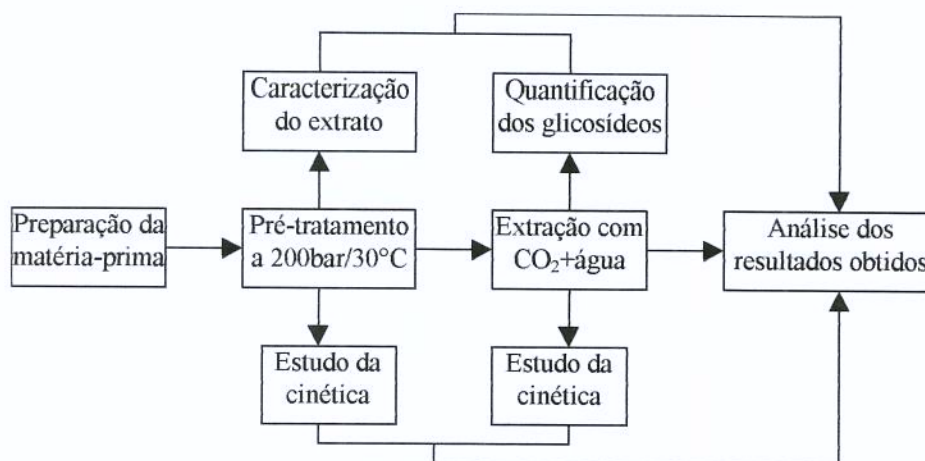


Fig.III.4.Diagrama de blocos dos procedimentos experimentais

III.4.1. Pré-tratamento

Cerca de 62 g de estévia (processadas conforme item III.1.5) foram empacotadas nas células de extração (aço inox 316) com auxílio de um "socador" de aço inox (Fig.III.4.1). Este procedimento foi padronizado, colocando-se a matéria-prima e alternando-se o "socador", afim de se evitar caminhos preferenciais no leito.

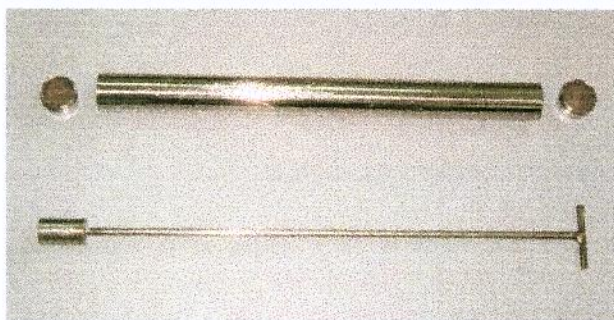


Fig.III.4.1.Célula de extração e "socador" da unidade de extração supercrítica 1

As dimensões das células são apresentadas na Tab.III.4.1. As células foram pesadas em

balança semi-analítica (*Marte*, mod. AS 200, precisão de $\pm 0,01$ g, São Paulo - Brasil).

Tab.III.4.1.Dimensões das células de extração utilizadas

Célula	Diâmetro interno (mm)	Comprimento (mm)	Volume (cm³)	Massa (g)
1	27,6	387,0	231,5	693,00
2	27,5	392,0	231,7	844,66
3	27,2	392,6	228,0	820,50

A seguir, efetuou-se o pré-tratamento da estévia a 200 bar/30°C, 12 horas de extração e vazão aproximada de $5,0 \times 10^{-5}$ kgCO₂/s. Os detalhes de operação da unidade de extração (Fig.III.2_b) podem ser resumidamente descritos a seguir:

1. Verificação da pressão no cilindro de CO₂ (1) através do manômetro m1 (deve ser maior que 45 bar para que a bomba consiga atingir a pressão desejada);
2. Acionamento dos 2 banhos termostáticos (11 e 12), digitando-se a temperatura de processo e -10°C para o banho de refrigeração dos cabeçotes das bomba de solvente (4);
3. Inserção da célula de extração (Fig.III.4.1) dentro do cilindro extrator (8), fechamento do mesmo e das válvulas v12 e v13;
4. Purga do sistema através da abertura da válvula v6 até o congelamento da tubulação de saída e em seguida fechamento da válvula;
5. Após a temperatura dos banhos estar entre -5 e -10°C e alcançada a temperatura de processo (indicador de temperatura do banho), acionamento da bomba de CO₂ (4) para a pressurização do sistema;
6. Atingida a pressão de trabalho observada no manômetro m2, abertura lenta das válvulas v4 e v9. Após equilíbrio da pressão nos manômetros m2 e m3, fechamento da válvula

- v9;
7. Repetição do procedimento anterior até se atingir a pressão de trabalho em ambos os manômetros m2 e m3;
 8. Atingida a pressão de trabalho e transcorrido o período estático (quando necessário), abertura das válvulas de saída v12 e v13 e acionamento da manta de aquecimento da tubulação de saída ;
 9. Controle da vazão através do "bolhômetro" (10) e coleta das amostras nos frascos coletores (9) conforme intervalos de tempo pré-estabelecidos;
 10. Transcorrido o tempo de extração pré-estabelecido, desligamento da bomba (4) e dos banhos termostáticos (11 e 12) e fechamento da válvula v9;
 11. Após a despressurização total do sistema (manômetro m3 indicando "zero" bar) através da válvulas v12 e v13, abertura da tampa superior do extrator (8) e retirada da célula de extração.

Na saída do extrator, após a válvula v13, o CO₂ é separado do extrato nos frascos coletores por simples despressurização. A cada 60 minutos, durante 12 horas, efetuou-se a coleta do extrato em frascos de penicilina transparentes de 50 mL previamente limpos conforme descrito no Apêndice A.1, totalizando assim 12 amostras para cada ensaio. Para a medida da vazão de CO₂ utilizou-se um "bolhômetro", que permite medir o tempo de deslocamento de uma bolha num determinado volume. O cálculo da vazão é efetuado através da Eq. (III.4.1).

$$Q_{CO_2} = \frac{P_{atm} \cdot V_{desl} \cdot PM_{CO_2} \cdot 60s}{t \cdot R \cdot T_{amb}} \quad \text{Eq. (III.4.1)}$$

Onde: Q_{CO₂} é a vazão de CO₂ (g/min.), P_{atm} é a pressão atmosférica (bar), V_{desl.} é o volume

descolado pela bolha (mL), PM_{CO_2} é a massa molecular do dióxido de carbono, t é o tempo (s) gasto durante o deslocamento da bolha, R é a constante dos gases ideais (mL.bar/mol.K) e $T_{amb.}$ é a temperatura ambiente (K).

Ressalta-se também que em todos os ensaios, a massa obtida na despressurização do sistema (amostra 13) foi coletada e pesada para contabilização do rendimento (em massa), embora não fizesse parte dos dados relativos à cinética de extração do processo. Após cada coleta, os frascos foram tampados com rolhas encapadas com teflon, pesados em balança analítica (*Sartorius*, mod. A 200 S, precisão de $\pm 0,0001$ g, Alemanha) sem as rolhas, lacrados e então guardados em freezer (*Metalfrio*, mod. DA 420, Brasil).

Antes e após cada pré-tratamento da estévia, efetuou-se a limpeza do equipamento para que o material viscoso extraído não ficasse retido na tubulação e para que não houvesse perigo de contaminação dos extratos. Tal procedimento é a seguir descrito:

1. Fechamento das válvulas v12 e v13 e inserção de cerca de 20 mL de etanol ao redor das paredes do extrator (8), em seguida fechamento do mesmo;
2. Pressurização do sistema somente através da abertura da válvula v9 até que a pressão se equilibre com a pressão do cilindro de CO_2 (1);
3. Fechamento da válvula v9 e abertura lenta das válvulas v12 e v13 para coleta do álcool em um frasco;
4. Após se atingir "zero" bar no manômetro m3, pressurização do sistema somente com CO_2 repetindo-se os itens 1 a 3 sem a adição de álcool;
5. Após se atingir "zero" bar no manômetro m3, abertura do extrator (8).

III.4.2. Extração dos glicosídeos

Foram utilizadas as células de extração com o material do pré-tratamento, às quais haviam sido armazenadas até o momento da extração com CO₂+água a temperatura ambiente (cerca de 25°C). Realizou-se então a extração dos glicosídeos a 9,5% molar de água, com 12 horas de extração e nas condições da Tab.III.4.2. O cálculo para a obtenção dos valores de % de co-solvente utilizados na bomba está descrito no Apêndice D1.

Tab.III.4.2. Condições de operação das extrações com CO₂+água

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Q _{bomba co-solvente} (mL/min.)	Co-solvente (%)
14	120	16	2,05	10,5
17	250	16	3,75	5,5
18	250	10	3,73	5,5
19	120	10	2,06	10,5

Os procedimentos para a operação da unidade de extração se diferem do pré-tratamento a partir do item 5 do pré-tratamento, a saber:

1. Enchimento do reservatório (2) com o co-solvente a ser utilizado e purga através da válvula na bomba de co-solvente (5) até a ausência de bolhas de ar na mangueira do reservatório;
2. Colocação da fita de cabos eletrônicos para interface das bombas de CO₂ (4) e de co-solvente (5) e acionamento das mesmas para a pressurização do sistema;
3. Digitação dos valores requeridos de % de co-solvente e de vazão (mL/min.) da bomba, para se atingir a pressão desejada;
4. Abertura da válvula v3, acionamento do misturador (7), abertura das válvulas v5 e v7 na sequência (a válvula v4 deve estar fechada);

5. Após atingida a pressão de trabalho observada no manômetro m2, abertura lenta da válvula v9 e após equilíbrio da pressão nos manômetros m2 e m3, fechamento da válvula v9;
6. Repetição do procedimento anterior até se atingir a temperatura de trabalho em ambos os manômetros m2 e m3;
7. Idem itens 8 e 9 do pré-tratamento;
8. Transcorrido o tempo de extração pré-estabelecido, desligamento das bombas (4 e 5), fechamento da válvula v3, desligamento do misturador (7), fechamento das válvulas v5, v7 e v9, desligamento dos banhos termostáticos (11 e 12) e retirada da fita de cabos eletrônicos;
9. Idem item 11 do pré-tratamento.

Os procedimentos de coleta (12 amostras coletadas a cada 1:00 hora e uma amostra na despressurização) e limpeza são os mesmos efetuados para o pré-tratamento. A vazão de água foi determinada conforme descrito no Apêndice D.2 e a vazão da mistura solvente (CO₂) + co-solvente (H₂O) e de CO₂, conforme Apêndice D.3.

Uma vez que o extrato obtido continha água, foi necessário a evaporação desta a fim de se obter a massa real de extrato. Tal procedimento foi efetuado com o auxílio de uma chapa de aquecimento (*Fisatom*, mod. 752 A, Brasil) a temperatura de 80°C para que não houvesse degradação dos glicosídeos.

III.5. ANÁLISES DOS EXTRATOS

III.5.1. Identificação e quantificação dos extratos não glicosídicos

a) Cromatografia gasosa (CG)

Os extratos obtidos no pré-tratamento foram analisados previamente em um cromatógrafo gasoso (*Shimadzu*, mod.17A, Japão), coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30m x 0,25mm, 0,25 μ m), gás de arraste hélio (1,7 mL/min.), injetor a 240°C, split 1/30, detector (ionização em chama) a 280°C, injeção de 1 μ L de amostra, inicialmente mantendo-se em 50°C por 5 min, em seguida elevando-se à 280°C numa razão de 10°C por min e mantendo-se nesta temperatura por 30 min, ou seja, 50°C (5 min.) – 280°C, 10°C/min; 280°C (30 min.).

Pesou-se (balança analítica *Sartorius*, mod. A 200 S, precisão $\pm 0,0001$ g, Alemanha) 5 mg de extrato e diluiu-se em 1 mL de acetato de etila (PA, *Merck*, lote 1096231000, Brasil). Foram selecionadas 3 amostras de cada pré-tratamento de acordo com a curva de extração (período CER, período FER e período difusional)

b) Fracionamento por cromatografia em camada delgada preparativa

Para a separação das substâncias para posterior identificação das mesmas, efetuou-se a cromatografia em camada delgada das amostras 2, 7, 11 e 13 do ensaio 20 (200 bar/30°C; 3,10 gCO₂/min.), utilizando placas de sílica gel *Kieselgel 60 F₂₅₄* (*Merck*, lote 1055480001 MB, Alemanha). Testou-se inicialmente como eluente, a mistura de hexano (*Cinética*

Química Ltda., lote 4254, São Paulo - SP) e acetato de etila (*Ecibra*, lote 10295, Santo Amaro - SP) na proporção 6:4 e posteriormente na proporção 8: 2. As placas foram reveladas no UV (254 e 260 nm) e a seguir borrifadas com uma solução de anisaldeído (100 mL ácido acético glacial, 2 mL de ácido sulfúrico e 1 mL de anisaldeído) e a seguir aquecidas a 100°C, obtendo-se para a mistura hexano - acetato de etila na proporção 8:2 a melhor separação das substâncias.

A amostra selecionada para o fracionamento por cromatografia em camada delgada preparativa das substâncias foi a de número 13 (ensaio 20), uma vez que a mesma apresentou maior massa. Aplicou-se 0,138 g deste extrato em duas placas de sílica gel (20 cm x 20 cm x 0,1 cm; *Fluka Chemie*, lote 2946431189, Suíça), utilizando como eluente hexano (PA, *Merck*, lote 1043741000, Darmstadt - Alemanha) e acetato de etila (PA, *Merck*, lote 1096231000, Darmstadt - Alemanha) na proporção 8:2. As placas foram reveladas utilizando-se radiações no ultra-violeta no comprimento de onda de 254 e 366 nm. As substâncias foram extraídas da sílica gel com uma mistura de acetato de etila (PA, *Merck*, lote 1096231000, Darmstadt - Alemanha) e diclorometano (PA, *Merck*, lote k24900450809, Alemanha), filtradas a vácuo com filtro sinterizado e as frações concentradas em um rotaevaporador (*Fisatom*, mod. 802, São Paulo - Brasil) a 50°C.

c) Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

As frações obtidas no fracionamento foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (*Shimadzu*, mod. *QP – 5000*, Japão), coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm), gás de arraste hélio (1,7 mL/min.), injetor a

240°C, split 1/30, detector (ionização em chamas) a 230°C, injeção de 1 µl de amostra e a seguinte programação: 50°C (5 min.) – 280°C, 10°C/min; 280°C (30 min.).

A identificação das substâncias foi baseada na análise comparativa dos espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist 62 Library), dados de literatura [Budzikiewicz, Wilson, Djerassi, 1963, 1962; Budzikiewicz, Djerassi, Williams, 1964; Bolhmann, Zdero, Grez, 1977; González *et. al*, 1977] e com os índices de retenção de Kovats [Adams, 1995].

III.5.2. Quantificação dos glicosídicos

a) Espectrofotometria no ultra-violeta (UV)

A quantificação dos glicosídeos obtidos na extração com CO₂+água, foi realizada mediante espectrofotometria no ultra-violeta (espectrofotômetro *Hitachi*, mod. *U-3010*, UV/visível, Tóquio - Japão) para todas as amostras coletadas. Os extratos que continham água foram desidratados conforme descrito no item III.4.2 e a seguir redissolvidos em quantidades conhecidas de água destilada (5 mL), de modo que a leitura da absorbância para qualquer concentração não excedesse à unidade a fim de se obter melhor precisão analítica.

Uma vez que a solubilização do rebaudiosídeo A é melhor que o esteviosídeo, efetuou-se a curva de calibração usando-se uma amostra comercial de rebaudiosídeo A 73% (*Steviafarma*, Maringá - Brasil) diluído em água destilada, com 10 concentrações (0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45 e 0,50 mg/mL). A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda de 212 nm [Nikolova-Damyanova *et. al*, 1994]. A curva de

calibração e o espectro de absorbância padrão podem ser observados no Apêndice F2 - Fig.F.2_1 e Fig.F.2_2, respectivamente.

b) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

b.1) Quantificação dos glicosídeos da matéria-prima, estévia pré-tratada e estévia pós extração

A quantificação dos glicosídeos (esteviosídeo e rebaudiosídeo A) presentes nas folhas da matéria-prima, assim como da estévia que sofreu o pré-tratamento e da estévia resultante da extração com CO₂+água foi realizada por CLAE na *Steviafarma Industrial* (Maringá - Brasil). O procedimento analítico fornecido pela empresa envolveu a secagem da amostra a 120°C por 2 horas, resfriamento em dessecador, pesagem de 40 mg da amostra seca e dissolução em 20 mL de água destilada, completando-se para 100 mL com acetonitrila [Goto, 1997].

A curvas padrão (Apêndice F.2 - Fig.F.2_7 e Fig.F.2_8) foram feitas com 5 concentrações (0, 100, 500, 1000 e 2000 ppm) usando-se amostras comerciais de esteviosídeo 100% e rebaudiosídeo A 73% (*Steviafarma*, Maringá - Brasil). As condições da análise foram: Coluna NH₂ *Brownlee*; vazão de 1,5 mL/min.; temperatura ambiente (25°C); detetor UV 210 nm; acetonitrila:água (80:20, v/v) como fase móvel e pressão da coluna de 80 atm.

b.2) Quantificação dos glicosídeos dos extratos obtidos com CO₂+água

A quantificação de esteviosídeo e rebaudiosídeo A nos extratos foi efetuada no

Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá (Maringá - Brasil) por CLAE. Os procedimentos de preparo da amostra foram os mesmos adotados no item III.5.2_b.1.

Foram feitas curvas padrão dos dois glicosídeos (Apêndice F.2 - Fig.F.2_11 e Fig.F.2_12), sendo os padrões previamente secos a 120°C por 2 horas em estufa e então resfriados em dessecador. Preparou-se uma solução padrão de 200 ppm para cada glicosídeo, pesando-se 5 mg de esteviosídeo 95% e 5 mg de rebaudiosídeo A 73% (*Steviafarma*, Maringá - Brasil), sendo a seguir transferidos para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água ultrafiltrada. Efetuou-se diluições com a fase móvel (acetonitrila:água, 80:20% v/v) para as concentrações de 10, 20, 30, 50, 70, 100 e 140 ppm.

As condições da análise no cromatógrafo (*Instrumentos Científicos CG Ltda.*, mod.CG 480-C) foram: coluna NH₂ (*Licrosorb CLAE Technology - Techsphere*), 5µm, 220 x 4,6 mm; vazão de 1,5 mL/min.; temperatura ambiente (25°C); detetor UV 210 nm (*Jasco*, mod. UV-970); acetonitrila:água (80:20, v/v) como fase móvel e pressão da coluna de 80 atm.

III.6. DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE (Y*) DOS SISTEMAS BINÁRIOS E TERNÁRIOS

Efetuuou-se uma medida da solubilidade (Y*) dos extratos de estévia nos sistemas "folhas de estévia/CO₂" e "folhas de estévia/CO₂/H₂O" através do método dinâmico usando procedimento similar ao descrito nos itens III.4.1 e III.4.2, porém com uma vazão de 1,67 x 10⁻⁵ kgCO₂/s. A vazão adequada para a determinação de Y* deve ser determinada

experimentalmente, no entanto, resultados de Rodrigues [1999] e Monteiro [1999] indicam que para os sistemas "cravo/CO₂" e "gengibre/CO₂" (respectivamente) e para o mesmo equipamento, a vazão é da ordem de $1,67 \times 10^{-5}$ kgCO₂/s e por esta razão adotou-se este valor.

Foram realizados ensaios para a determinação da solubilidade no pré-tratamento e na extração com CO₂+água, sendo que para o último caso a condição de operação escolhida (250 bar/16°C) foi a que apresentou maior rendimento dentre os demais ensaios realizados.

III.7. ANÁLISE DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

Com os dados experimentais (massa de extrato x tempo de extração) foram construídas as curvas de extração para o pré-tratamento e para a extração com CO₂+água. As curvas de extração foram ajustadas com um *spline* usando os procedimentos PROC REG e PROCNLIN do pacote estatístico *SAS System for Windows* [Freund e Littell, 1995], versão 6.12 (Apêndice G.1) e usando o procedimento descrito por Povh, Meireles e Marques [2001], foram calculados os parâmetros M_{cer} , Y_{cer} , t_{cer} , R_{cer} e R_{total} . Com estas variáveis respostas, foi efetuada uma análise estatística para estudar os efeitos das variáveis no processo.

III.8. MODELAGEM

Efetuuou-se a modelagem do pré-tratamento, utilizando o modelo de Sovová [Sovová, 1994] para representar os dados experimentais durante as três etapas cinéticas (CER, FER e etapa difusional), conforme descrito no item II.4.2. Os coeficientes de transferência de massa (k_{Ya}

e k_{Xa}) foram calculados seguindo procedimento descrito por Rodrigues *et. al* [2001].

III.9. CONTRATEMPOS

Ao se iniciar as extrações com co-solvente (H_2O), surgiram algumas dificuldades durante o processo devido ao fato de não haver muitas informações sobre o modo de operação da bomba de co-solvente. Isso acarretou na não obtenção de água na saída do extrator ou a ocorrência de descargas bruscas (golpes de pressão); esses resultados podem ser observados nos ensaios 2, 4 e 5 (Apêndice E.3). As causas que poderiam estar provocando o problema foram então levantadas e assim ensaios visando a busca de soluções foram efetuados.

O ensaio 6 foi efetuado para verificar a influência da pressurização somente com CO_2 e posterior extração com CO_2 +água. Após duas horas de extração não se obteve extrato aquoso nos frascos de coleta. No ensaio 7, foi verificada a influência da coluna d'água na bomba de co-solvente colocando-se o reservatório de água em nível superior ao da bomba. O orifício lateral no difusor (entrada do extrator) foi fechado com "teflon", afim de se direcionar o fluxo inicial de CO_2 +água para célula de extração. Como resultado, após três horas de processo, a parte superior da célula de extração estava úmida; houve também presença de água nos frascos coletores.

Após esses ensaios, verificou-se a vazão da bomba de co-solvente através de medidas da massa $_{H_2O}$ x tempo (Apêndice C.4, Tab.C.4), constatando-se que a quantidade requerida na bomba era inferior à quantidade medida. Sendo assim, acionou-se técnicos especializados para a calibração e manutenção da bomba; os resultados podem ser observados no

Apêndice C.4. Uma vez realizada a calibração da bomba, efetuou-se ainda os ensaios 8 e 9 para testar um pré-tratamento e uma extração com CO₂+água conjuntamente, pois sendo a densidade do extrato obtido no pré-tratamento diferente da densidade do extrato aquoso, haveria uma separação espontânea na saída do extrator. No entanto, obteve-se descargas bruscas de H₂O e o extrato coletado não apresentou duas fases nítidas. Sendo assim, a partir do ensaio 10, o pré-tratamento e a extração com CO₂+água foram feitos separadamente.

As condições de operação dos ensaios não considerados para cálculos cinéticos (2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9) e os dados obtidos podem ser observados na Tab.E.3 e nas Fig.E.3_1 a Fig.E.3_7 (Apêndice E.3).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

IV.1.1. Umidade, carboidratos totais e teor de adoçantes

A umidade das folhas de estévia intactas foi determinada em duplicata e calculada pela Eq.(III.1.1); o resultado obtido foi de $10,4 \pm 0,7$ %. A umidade da estévia moída (conforme item III.1.5) indicou 9,13% e da estévia após a extração com CO₂+água foi maior que 74%, pois em média 61 g de água ficou aderida nas folhas em cada ensaio realizado.

A análise de carboidratos totais da matéria-prima conforme item III.1.2, indicou 18,8 % sendo que o teor de adoçantes totais foi de 10,0 %. Este valor encontra-se dentro das médias conhecidas na literatura de 7,8 - 14,5% [Phillips, 1987] e que pode variar de acordo com as práticas agronômicas empregadas no plantio da estévia [Brandle e Rosa, 1992]. Em relação à estévia pré-tratada, os valores indicaram pouca variação para os teores de carboidratos totais e adoçantes, sendo 16,6% e 9% respectivamente. Por fim, a análise da estévia após a extração com CO₂+água (ensaio 24 - 120bar/10°C) indicou valores de 8,5% para carboidratos totais e 3% para o teor de adoçantes.

IV.1.2. Densidade real e aparente e porosidade do leito

A densidade real (dr) das folhas de estévia (processadas conforme item III.1.5) antes e após o pré-tratamento foi de 1,608 e $1,460 \times 10^3$ kg/m³ respectivamente, indicando uma não compactação do leito e uma visível remoção de compostos, uma vez que a densidade após o

processo foi menor.

Em relação à densidade aparente (D_a) calculada conforme Eq.(III.1.3), obteve-se $0,27 \pm 0,01 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$, e os valores para cada ensaio podem ser observados na Tab.IV.1.2.

A porosidade do leito calculada conforme Eq.(III.1.4) foi de $0,83 \pm 0,01$, usando-se o valor da densidade real antes do pré-tratamento ($1,608 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$) e a média da densidade aparente (0,27). Os valores de porosidade para cada ensaio também podem ser observados na Tab.IV.1.2.

Tab.IV.1.2. Valores de densidade aparente (D_a) e porosidade (ϵ)

Ensaio	m x 10 ³ (kg)	Vol. x 10 ⁶ (m ³)	D_a x 10 ³ (kg/m ³)	ϵ
10	61,00	231,50	0,26	0,84
12	63,11	231,70	0,27	0,83
13	60,67	231,50	0,26	0,84
15	61,89	231,70	0,27	0,83
16	63,18	228,00	0,28	0,82
20	62,78	228,00	0,28	0,82
21	61,38	231,50	0,27	0,83
23	61,17	231,70	0,26	0,84
25	61,81	231,50	0,27	0,83
26	62,15	231,70	0,27	0,83
Média	61,91	230,88	0,27	0,83
Desv. Pad.	0,89	1,52	0,01	0,01

IV.1.3. Distribuição granulométrica

A Tab.IV.1.3 apresenta a granulometria das folhas de estêvia, ou a % de massa retida em

cada peneira para as etapas do processamento e reprocessamento da matéria-prima, bem como os desvios-padrão de cada etapa. A malha(mm) de cada peneira também está indicada na Tab.IV.1.3.

Tab.IV.1.3. Massa média (%) retida em cada peneira

	Granulometria das folhas de estêvia trituradas			
	Mesh 10 (1,68 mm)	Mesh 16 (1,00 mm)	Mesh 24 (0,71 mm)	Fundo
Média_{processamento}	31,34	31,09	13,90	23,67
Desv. Pad.	8,05	3,96	2,85	5,10
Média_{reprocessamento}	48,35	23,69	9,23	18,72
Desv. Pad.	5,27	2,63	1,28	2,52

IV.1.4. Diâmetro das partículas

O diâmetro das partículas foi calculado de acordo com a Eq.(III.1.4). Uma vez que a proporção utilizada em relação as frações das peneiras 16 e 24 mesh foi de 1,5:1, respectivamente, e o diâmetro médio das partículas retidas na peneira 16 mesh foi de $1,0 \times 10^{-3}$ m e o da peneira 24 mesh foi de $0,75 \times 10^{-3}$ m, obteve-se um diâmetro médio das partículas igual $0,82 \times 10^{-3}$ m.

IV.2. ENSAIOS

IV.2.1. Pré-tratamento

Foram realizados no total, 11 ensaios para o pré-tratamento da estêvia e 1 para a medida de solubilidade, sendo que os ensaios 1 ($200 \text{ bar}/30^{\circ}\text{C}$; $5,10 \times 10^{-5} \text{ kgCO}_2/\text{s}$) e 3 ($200 \text{ bar}/30^{\circ}\text{C}$; $4,97 \times 10^{-5} \text{ kgCO}_2/\text{s}$) não foram considerados no cálculo dos parâmetros cinéticos

(120 bar/10 e 16°C, 250 bar/10 e 16°C e 250 bar/30°C) e um ensaio para a medida de solubilidade na melhor condição (250 bar/16°C). Os dados obtidos nas extrações com CO₂+água dos ensaios 14, 17, 18, 19 e 27 são apresentados nas Tab.IV.2.2_a e Tab.IV.2.2_b. Os dados referentes à massa de extrato aquoso/seco coletada x tempo de extração obtidos nos ensaios, assim como suas curvas de extração são apresentados no Apêndice E.2.

Tab.IV.2.2 a.Dados cinéticos das extrações com CO₂+água

Ensaio	M _{alim.} x 10 ³ (kg)	Q _{CO2} x 10 ⁵ (kg/s)	Q _{H2O} x 10 ⁵ (kg/s)	Q _{CO2+H2O} x 10 ⁵ (kg/s)
14 (120 bar/16°C)	60,62	5,93	0,22	6,15
17 (250 bar/16°C)	59,11	6,15	0,20	6,35
18 (250 bar/10°C)	58,81	6,07	0,22	6,28
19 (120 bar/10°C)	58,69	6,03	0,20	6,23
27 (250 bar/16°C)	60,28	1,34	0,14	1,48

M_{alim.}: massa de alimentação, Q_{CO2}: vazão de CO₂, Q_{H2O}: vazão de H₂O, Q_{CO2+H2O}: vazão de CO₂+H₂O

Tab.IV.2.2 b.Dados cinéticos das extrações com CO₂+água

Ensaio	M _{CER} x 10 ⁸ (kg/s)	t _{CER spl} /60 (s)	Y _{CER} x 10 ⁴ (kg _{extrato} /kg _{CO2})	R _{CER} (%)	R _{total} (%)
14 (120 bar/16°C)	2,20	330	3,70	0,55	0,76
17 (250 bar/16°C)	5,30	260	8,70	0,51	1,18
18 (250 bar/10°C)	0,30	493	0,50	0,19	0,41
19 (120 bar/10°C)	0,20	594	0,30	0,11	0,38

M_{CER}: taxa de extração no período CER, t_{CER, spl}: duração da etapa de taxa de extração constante, Y_{CER}: razão mássica de soluto na fase supercrítica na saída da coluna, R_{CER}: rendimento no período CER, R_{total}: rendimento total.

O ensaio 17 apresentou um maior rendimento em extrato, sendo cerca de 35% maior em relação ao ensaio 14; 65% em relação ao ensaio 18 e 67% em relação ao ensaio 19.

Analisando os dados cinéticos separadamente, observa-se que no ensaio 14, R_{cer} representa 72,37% de R_{total} e t_{cer} é 45,83% do tempo total de extração (720 min.). Em relação ao ensaio 17, R_{cer} é 43,22% de R_{total} e t_{cer} representa 36,11% do tempo total; para o ensaio 18, R_{cer} representa 46,34% de R_{total} e t_{cer} é 68,47% do tempo total de extração e finalmente no ensaio 19, R_{cer} é 28,95% de R_{total} , enquanto t_{cer} é 82,50% do total.

Nota-se portanto comportamentos diferenciados para cada ensaio, como pode ser observado também em relação aos períodos difusivos e convectivos. Para os ensaios 14 e 17, mais de 50% do extrato é obtido no período onde há o predomínio da transferência de massa devido à convecção, enquanto para os ensaios 18 e 19 ocorre o oposto, ou seja, mais de 80% do extrato é obtido no período onde há o predomínio do fenômeno difusivo.

A Fig.IV.2.2_a apresenta as curvas de extração com as massas de extrato após a evaporação da água conforme item III.3.2. As curvas com as massas de extrato aquoso, assim como os dados de massa x tempo são apresentados no Apêndice E.2.

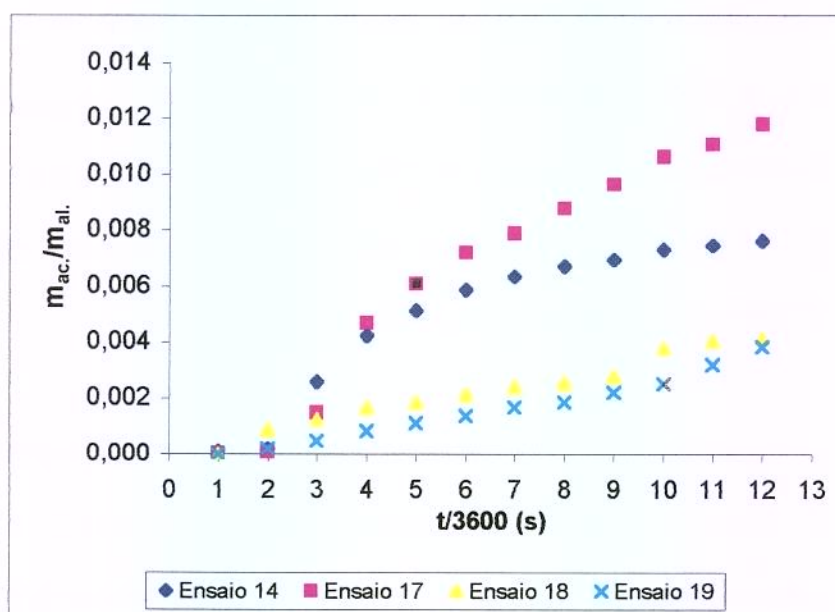


Fig.IV.2.2_a. Curvas de extração dos glicosídeos com CO₂+água - extrato seco (ensaio 14 - 120 bar/16°C, ensaio 17 - 250 bar/16°C, ensaio 18 - 250 bar/10°C, ensaio 19 - 120 bar/10°C)

IV.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados das extrações dos glicosídeos com CO₂+água (Tab.IV.2.2_a e Tab.IV.2.2_b), tendo como variáveis a temperatura e pressão foi realizada descritivamente, uma vez que não havia graus de liberdade para realização de uma análise de variância (ANOVA). A Tab.IV.3_a apresenta os dados dos ensaios 14, 17, 18 e 19 que foram analisados para verificar a influência das variáveis T e P.

Tab.IV.3. a. Dados dos ensaios 14, 17, 18 e 19

Ensaio	T (°C)	P (bar)	M _{cer} x 10 ⁸ (kg/s)	R _{total} (%)
14	16	120	2,2	0,76
17	16	250	5,3	1,18
18	10	250	0,3	0,41
19	10	120	0,2	0,38

Os gráficos de tendência são apresentados nas Fig.IV.3_a ($T \times M_{cer}$ a P constante) e Fig.IV.3_b ($T \times R_{total}$ a P constante), onde se verifica uma maior influência da temperatura no processo, tanto em relação à taxa de extração no período CER (M_{cer}) quanto em relação ao rendimento total (R_{total}).

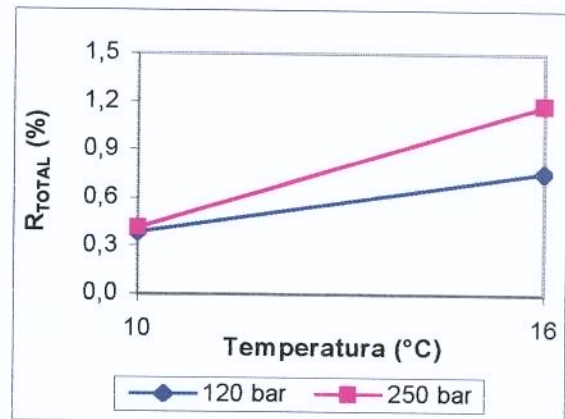
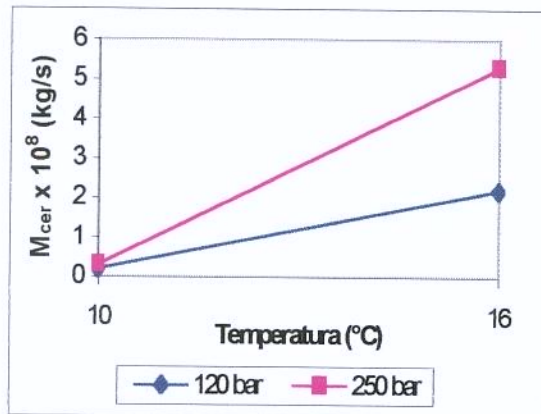


Fig.IV.3_a.Gráf. de tendência ($T \times M_{cer}$)

Fig.IV.3_b.Gráf. de tendência ($T \times R_{total}$)

Diante destes resultados optou-se por realizar ensaios na pressão de 250 bar e temperatura de 30°C, uma vez que dados de literatura [Pasquel, 1999] apresentaram ensaios com temperaturas de 16°C (maior rendimento) e 45°C (menor rendimento). Os ensaios 22 e 24 (250 bar/30°C) foram realizados com o objetivo de verificar se o aumento da temperatura ocasionaria um maior rendimento do processo, pois à temperatura de 16°C foi obtido o melhor resultado e à 10°C baixos rendimentos. No entanto, os mesmos não apresentaram resultados satisfatórios conforme mostra a Fig.IV.3_c; os dados de massa x tempo são apresentados no Apêndice E.2.

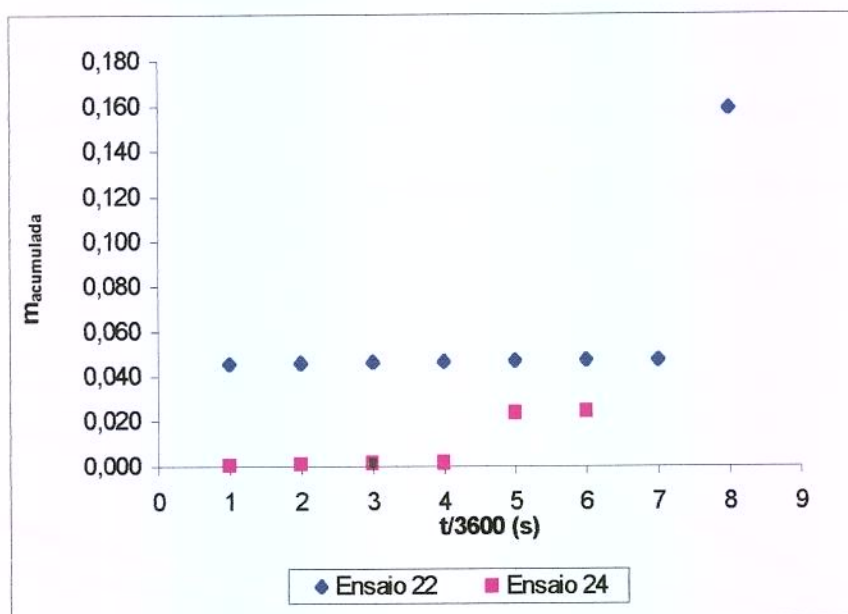


Fig.IV.3_c.Pontos obtidos nos ensaios 22 e 24 (250 bar/30°C) - extrato aquoso

A temperatura utilizada no processo foi provavelmente um fator determinante, pois embora a densidade do CO_2 na condição utilizada seja $923,37 \text{ kg/m}^3$, o que estaria dentro dos valores utilizados nos demais ensaios (mín. $900,72 \text{ kg/m}^3$ - ensaio 14 e máx. $1002,33 \text{ kg/m}^3$ - ensaio 18), a água nessa temperatura mudou o comportamento da mistura. Observou-se na saída do extrator vapor d'água nas primeiras horas de processo, ocorrendo uma descarga posteriormente; em ambos os ensaios houve também uma caramelização na válvula micrométrica.

Pasquel [1999] realizou ensaios para este sistema (folhas de estêvia + CO_2 +água) a 200 bar e 45°C e muito embora o rendimento do processo tenha sido pequeno, o comportamento da curva global de extração foi típico. Portanto, o sistema folhas de estêvia+ CO_2 +água deve ter um comportamento anômalo nas condições empregadas para a realização dos ensaios 22 e 24. Uma das maneiras de se esclarecer este ponto seria a identificação dos compostos

presentes nos extratos, do pré-tratamento inclusive. Sendo assim, o conhecimento destes compostos poderá fornecer subsídios para a compreensão das restrições termodinâmicas presentes no sistema. Os extratos foram analisados e os resultados são discutidos no item IV.5.1.

IV.4. DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE (Y^*)

Com o objetivo de se dispor da informação necessária para o projeto de processos foi usado o método dinâmico para determinar a solubilidade para os sistemas: folhas de estêvia/ CO_2 (pré-tratamento) e folhas de estêvia/ CO_2 /água (extração com CO_2 +água).

A medida de solubilidade no pré-tratamento (ensaio 26) efetuada a 200 bar/ 30°C , $1,65 \times 10^{-5} \text{ kgCO}_2/\text{s}$ e 11 horas de extração resultou em Y^* igual a 0,00082. O ensaio 26 pode ser observado na Fig.IV.4_a, onde o último ponto da curva (triângulo) refere-se à massa obtida na despressurização e não considerada para efeito do cálculo da solubilidade.

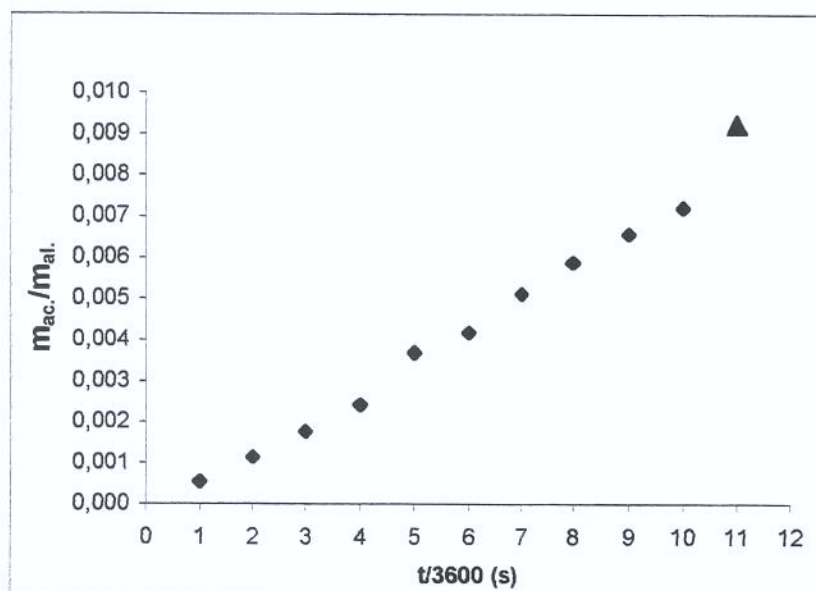


Fig.IV.4_a. Curva de medida de solubilidade do pré-tratamento (Ensaio 26 - 200 bar/ 30°C)

O ensaio 27 refere-se à medida de solubilidade da etapa de extração dos glicosídeos a 250 bar/16°C, $1,48 \times 10^{-5}$ kgCO₂/s e 9 horas de extração. A Fig.IV.4_b apresenta a curva com valores após a evaporação da água conforme item III.3.2. Nas condições de temperatura, pressão e vazão do ensaio não se obteve um bom resultado para Y*, como pode ser observado pelo comportamento atípico da curva (Fig.IV.4_b). A curva com as massas de extrato aquoso, assim como os dados de massa x tempo são apresentados no Apêndice E.2.

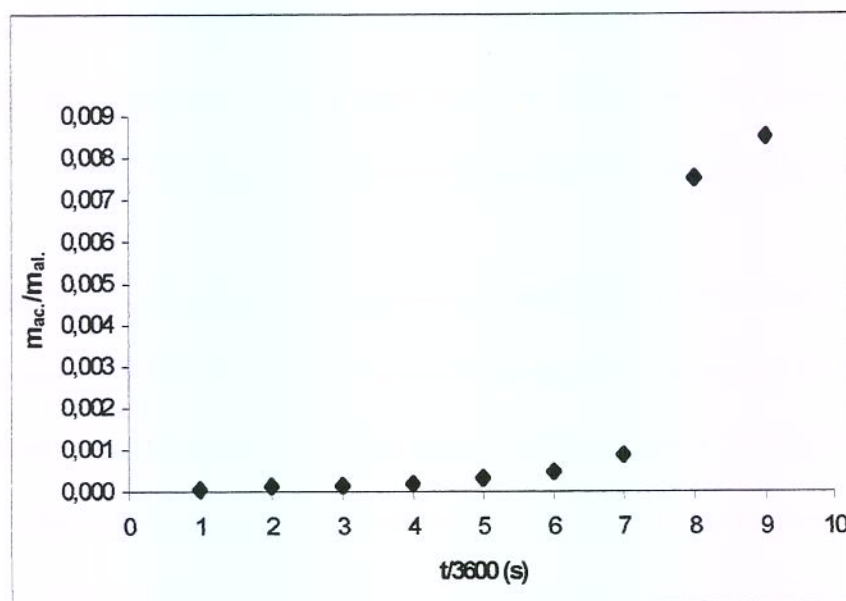


Fig.IV.4_b. Curva de medida de solubilidade c/ CO₂+água - extrato seco (ensaio 27 - 250 bar/16°C)

IV.5. ANÁLISE DOS EXTRATOS

IV.5.1. Identificação e quantificação dos extratos não glicosídicos

Os extratos do pré-tratamento analisados por cromatografia gasosa e cromatografia em camada delgada (amostras 2, 7, 11 e 13 do ensaio 20 - 200 bar/30°C e 5,17 kgCO₂/s) apresentaram perfil fitoquímico semelhante em todos os ensaios e também em relação ao

tempo de coleta da amostra, como pode ser observado nas Fig.IV.5.1_a e Fig.IV.5.2_b e em detalhes no Apêndice F.1 (Fig.F.1_1 e Fig.F.1_2). O fracionamento dos extratos do ensaio 20 em placa de sílica gel, acusou a presença de sete frações (0,04 g; 0,008 g; 0,005 g; 0,002 g; 0,006 g; 0,024 g e 0,027 g).

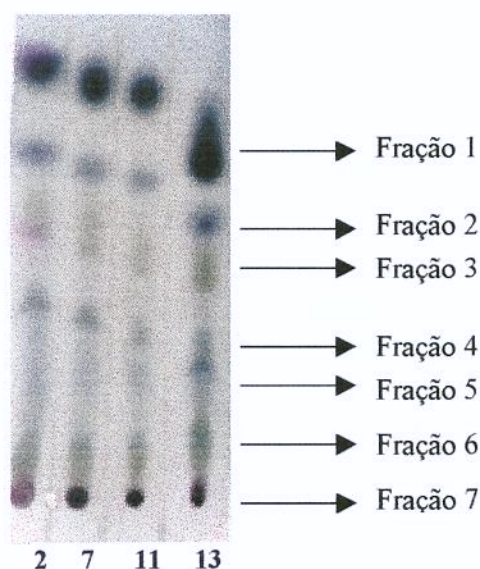


Fig.IV.5.1_a.Placa cromatográfica das amostras - ensaio 20 (200 bar/30°C)

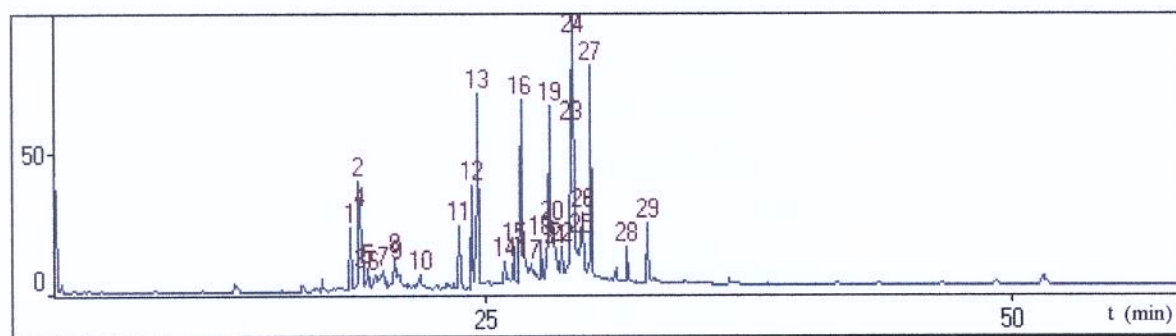


Fig.IV.5.1_b.Cromatograma obtido por CG-EM da amostra 2 - ensaio 20 (200 bar/30°C); 50°C (5 min) - 280°C, 10°C/min; 280°C (30 min)

A identificação da composição química das frações 1 a 7 por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas indicou a presença de uma fração mais leve (10 a 20

min - Fig.IV.5.1_b) composta por sesquiterpenos, dentre eles o espatulenol; uma intermediária (20 a 35 min) constituída por hidrocarbonetos alifáticos, álcoois e diterpenos do tipo labdano e uma mais pesada (40 a 55 min) composta por triterpenos. A Tab.IV.5.1 apresenta a composição química do extrato obtido no pré-tratamento para o ensaio 20 (200 bar/30°C).

Tab.IV.5.1. Composição química da amostra 2 - ensaio 20, 200 bar/30°C

Classe	Substância	(%)
Sesquiterpenos		
	Nerolidol	1,73
	Espatulenol	2,76
	Epi- α - cadinol	0,39
	Khusinol	0,81
	Nerolidol	1,73
Álcoois		
	Octadecanol	3,89
Diterpenos		
	Óxido de manoila	1,88
	3-ceto-óxido de manoila	0,62
	Jhanol	6,38
	3- α -acetoxi-manol	1,78
	Austroinulina	30,01
Hidrocarbonetos		
	n-tetracosano	13,51
	n-pentacosano	9,19
	n-octacosano	3,43
Esteróides		
	β -sitosterol	Traços*
Triterpenos		
	α -amirina	Traços*
	β -amirina	Traços*
TOTAL		76,38

*Traços $\leq 0,38\%$

Observa-se no extrato a predominância de substâncias da classe dos diterpenos labdânicos (40,67%), dentre os majoritários o jhanol (6,38%) e a austroinulina (30,01%), cujas estruturas estão demonstradas nas Fig.IV.5.1_c e Fig.IV.5.1_d. Estes álcoois labdânicos foram isolados das folhas de estêvia por Sholichin *et al.* [1980] em conjunto com 6-O-acetil-austroinulina, cuja substância não foi detectada no presente estudo. O diterpeno jhanol foi previamente isolado de *Eupatorium Jhanii* por González *et al.* [1977] e a austroinulina isolada de *Austroeupatorium inulaefolium*, sendo sua estrutura proposta por Bohlmann *et al.* [1977].

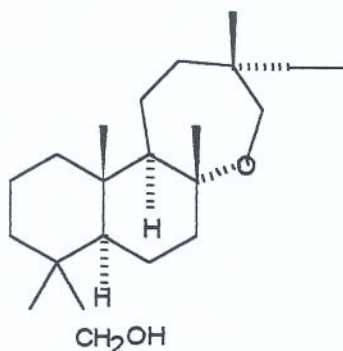


Fig.IV.5.1_c. Jhanol

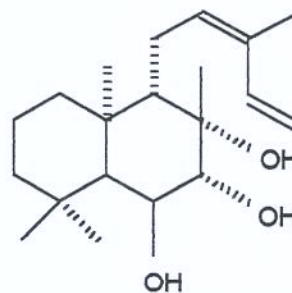


Fig.IV.5.1_d. Austroinulina

A seguir encontra-se a classe de hidrocarbonetos (26,13%), apresentando como componente majoritário o n-tetracosano (13,51%). A fração mais pesada do extrato (40 a 50 min) é constituída por β -sitosterol, α -amirina e β -amirina, porém com baixo teor. As estruturas das substâncias identificadas e apresentadas na Tab.IV.5.1 podem ser observadas no Apêndice F - Fig.F.1_3 a Fig.F.1_13.

Comparando-se o perfil dos extratos com o relatado por Pasquel *et al.* [1999], observa-se que foram extraídas praticamente as mesmas classes de compostos, não sendo relatada a

presença dos diterpenos labdânicos no trabalho anterior. Outra diferença entre estes estudos refere-se à proporção relativa dos triterpenos. No extrato obtido por Pasquel *et al.* [1999], os mesmos corresponderam a 25,57% da amostra, sendo que para este trabalho foram detectados apenas traços destas substâncias. Estas diferenças na composição química das folhas de estêvia podem ser atribuídas ao fato de não ter sido utilizado o mesmo lote do material vegetal nos dois estudos, podendo o metabolismo secundário das plantas sofrer a influência, dentre outros, de fatores climáticos, sazonalidade e estágio de desenvolvimento da planta.

Há também que ser levado em consideração que no estudo efetuado por Pasquel *et al.* [1999], cerca de 44% da composição química do extrato não foi identificada, o que não exclui a possibilidade da presença dos diterpenos labdânicos no extrato, mas em menor teor podendo estar sobrepostos por outras substâncias devido à grande complexidade da mistura. Segundo a literatura, os diterpenos co-ocorrem com mono e sesquiterpenos, sendo que a co-ocorrência com triterpenos é rara [Dev, S.; Misra, R., 1985]. A literatura relata ainda a presença de flavonóides glicosilados em calos e taninos nas folhas de estêvia [Kinghorn e Soejarto, 1985], porém estas classes de compostos não são identificadas por cromatografia à gás pelo fato das mesmas serem de baixa volatilidade .

IV.5.2. Quantificação dos glicosídeos

A concentração dos glicosídeos da matéria-prima, estêvia pré-tratada e estêvia pós-extração obtida por CLAE (*Steviafarma Industrial* - Maringá/Brasil), encontra-se descrita na Tab.IV.5.2_a.

Tab.IV.5.2 a. Concentração de esteviosídeo e rebaudiosídeo A na estévia

Amostra	Esteviosídeo (mg/kg)	Rebaudiosídeo A (mg/kg)	Est. : Reb. A
Estévia (matéria-prima)	773	475	1:0,61
Estévia pré-tratada	853	511	1:0,60
Estévia pós extração	420	341	1:0,81

Comparando-se a estévia antes (matéria-prima) e após o pré-tratamento, constata-se que a proporção esteviosídeo:rebaudiosídeo A manteve-se após o pré-tratamento. Após a extração com CO₂+água, pode-se observar um decréscimo na quantidade de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, indicando respectivamente que, para essa condição (120 bar/10°C), cerca de 45 e 30% desses glicosídeos presentes na matéria-prima foram extraídos. Houve ainda um acréscimo de rebaudiosídeo A em relação ao esteviosídeo após a extração com CO₂+água. As análises indicaram também a presença de outras substâncias (não identificadas) na matéria-prima (Fig.IV.5.2_a) que foram extraídas ao longo do processo (Apêndice F.2 - Fig.F.2_9 e Fig.F.2_10).

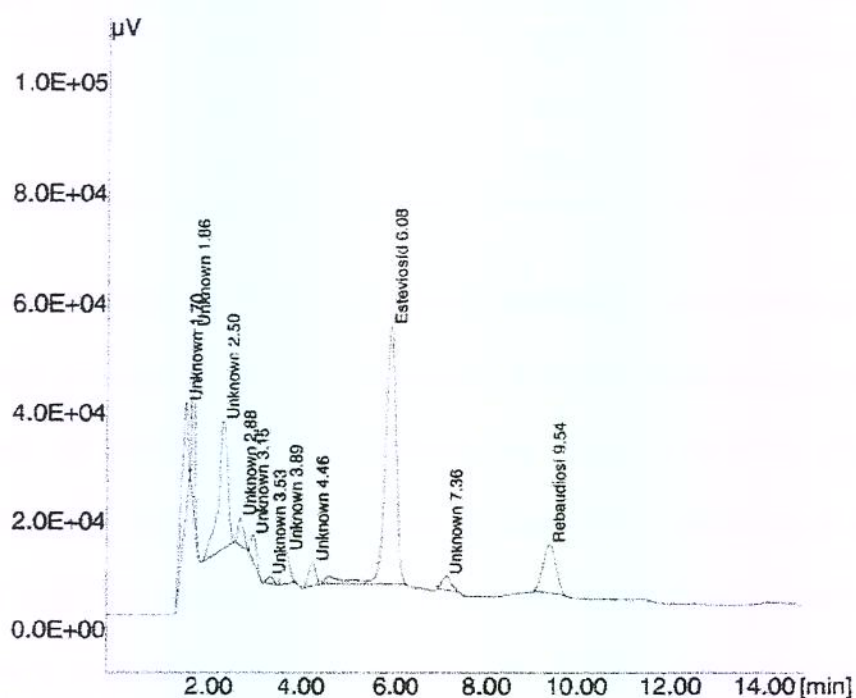


Fig.IV.5.2_a.Cromatograma da estévia (matéria-prima) obtido por CLAE; diluição 1:3; vazão de 1,5 mL/min; 25°C; pressão da coluna: 80 atm

Os resultados obtidos nas análises por espectrofotometria no UV dos extratos glicosídicos não foram coerentes, devido provavelmente à presença de um interferente no comprimento de onda ideal de leitura (210 nm) para o esteviosídeo e rebaudiosídeo A, conforme pode se observar nas Fig.IV.5.2_b e Fig.IV.5.2_c. Deve-se ressaltar que as amostras apresentaram comportamentos diferenciados em alguns casos e similares em outros, dependendo do tempo em que a amostra havia sido coletada, como pode ser observado através dos espectros de absorvância no UV apresentados no Apêndice F.2 - Fig.F.2_3 a Fig.F.2_6.

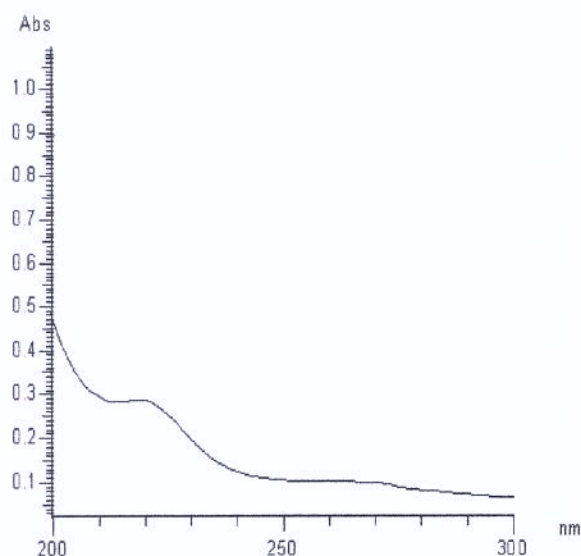


Fig.IV.5.2_b.Espectro de absor -
bância a 210 nm da amostra 4 -
ensaio 18 (250 bar/10°C)

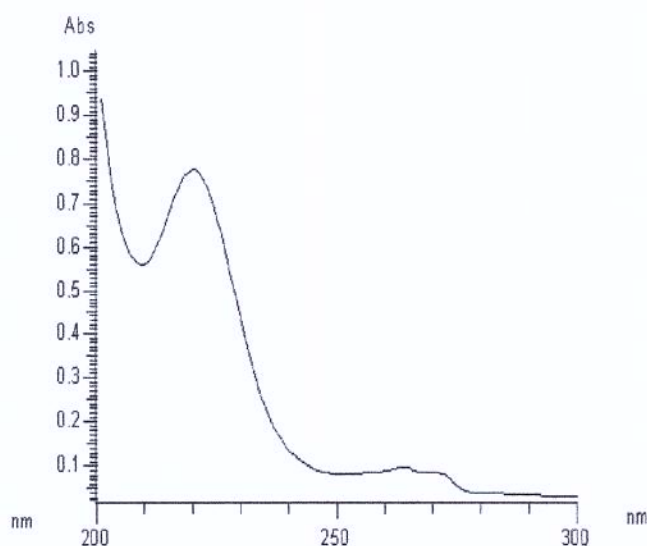


Fig.IV.5.2_c.Espectro de absor -
bância a 210 nm da amostra 8 -
ensaio 18 (250 bar/10°C)

Em virtude desses resultados, os extratos analisados por UV foram também encaminhados para a quantificação por CLAE, uma vez que esta metodologia permite a separação dos componentes da mistura, minimizando a influência de outras substâncias na quantificação dos glicosídeos (esteviosídeo e rebaudiosídeo A).

A Fig.IV.5.2_d apresenta o cromatograma da amostra 4 - ensaio 18 (coletada após 4:00h de extração), onde verifica-se a presença do esteviosídeo e rebaudiosídeo A, o que anteriormente não havia sido nitidamente constatado na análise por UV da mesma amostra. A Fig.IV.5.2_e apresenta o cromatograma da amostra 8 - ensaio 18 (coletada após 8:00h de extração) obtido por CLAE (UEM - Maringá/Brasil), onde não se detectou a presença de glicosídeos. Para efeito de comparação entre as figuras citadas, deve-se observar a diluição efetuada para cada análise e consequentemente para cada gráfico gerado.

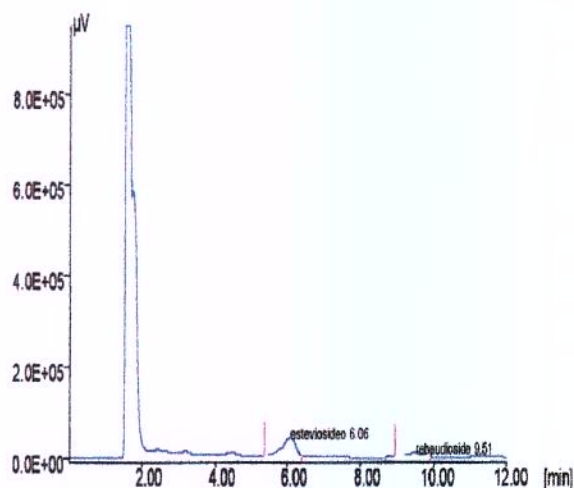


Fig.IV.5.2_d.Cromatograma obtido por CLAE: Amostra 4 - ensaio 18 (250 bar/ 10°C); s/ diluição; vazão de 1,5 mL/min; 25°C; pressão da coluna: 80 atm

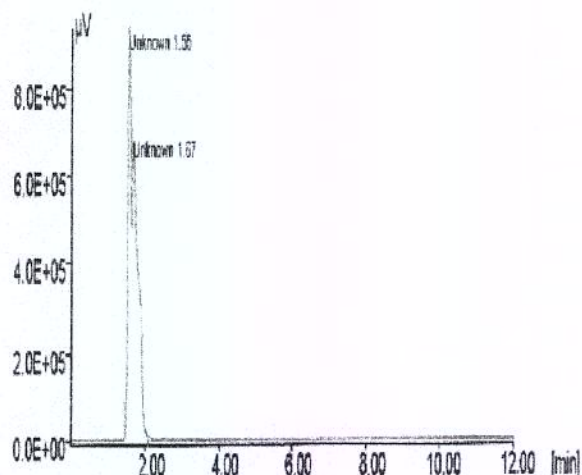


Fig.IV.5.2_e.Cromatograma obtido por CLAE: Amostra 8 - ensaio 18 (250 bar/ 10°C); s/ diluição; vazão de 1,5 mL/min; 25°C; pressão da coluna: 80 atm

O cromatograma da amostra que apresentou maior quantidade de esteviosídeo e rebaudiosídeo A (Ext. 4 - ensaio 17) pode ser observado na Fig.IV.5.2_f. Os demais cromatogramas são apresentados no Apêndice F.2 - Fig.F.2_13 a Fig.F.2_15.

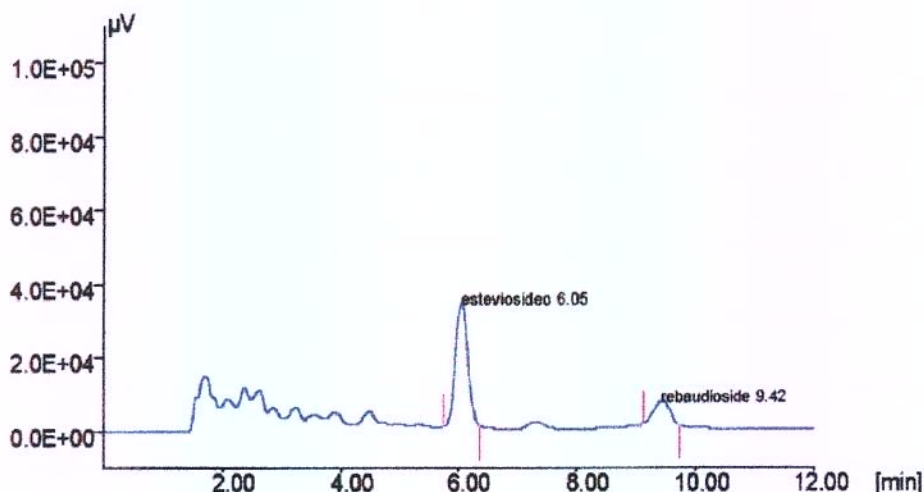


Fig.IV.5.2_f. Cromatograma obtido por CLAE da amostra 4- ensaio 17 (250 bar/16°C), diluição 1:50; vazão de 1,5 mL/min; 25°C; pressão da coluna: 80 atm

As amostras analisadas e os resultados obtidos, são apresentados na Tab.IV.5.2_b. A fração mássica inicial para cada amostra foi obtida após a evaporação da água presente nos frascos coletores, conforme item III.4.2, e redissolução em uma quantidade conhecida de água.

Tab.IV.5.2_b.Fração mássica e valores de esteviosídeo e rebaudiosídeo A obtidos por CLAE

Amostra	Fração mássica inicial (g/g)	Esteviosídeo (g/g)	Rebaudiosídeo A (g/g)	Proporção Est. : Reb. A
Ext. 4 - ensaio 14	0,02276	0,00414	0,00323	1:0,78
Ext. 4 - ensaio 17	0,04131	0,00741	0,00547	1:0,74
Ext. 4 - ensaio 18	0,00462	0,00033	0,00021	1:0,64
Ext. 4 - ensaio 19	0,00385	—	—	—
Ext. 8 - ensaio 14	0,00511	0,00122	0,00093	1:0,76
Ext. 8 - ensaio 17	0,01168	0,00248	0,00203	1:0,82
Ext. 8 - ensaio 18	0,00073	—	—	—
Ext. 8 - ensaio 19	0,00107	—	—	—

*Ensaio 14 (120 bar/16°C); Ensaio 17 (250 bar/16°C); Ensaio 18 (250 bar/10°C); Ensaio 19 (120 bar/10°C)

Para o ensaio 18, não se detectou a presença de glicosídeos na amostra 8. O ensaio 19 não apresentou glicosídeos nas amostras 4 e 8. As primeiras quatro amostras, Ext. 4 - ensaios 14, 17, 18 e 19 (coletadas após 4:00 horas de extração), foram selecionadas de maneira que estivessem dentro do período de taxa constante de extração (CER) e as demais, Ext. 8 - ensaios 14, 17, 18 e 19 (coletadas após 8:00 horas) dentro do período de taxa de extração mista ou decrescente (FER). Tal escolha foi realizada com a finalidade de se observar se a massa de glicosídeos (valores absolutos) também decrescia ao longo do processo (CER x FER), assim como decrescia a massa de extrato coletada. A resposta foi afirmativa como pode ser observado na Tab.IV.5.2_b, os valores absolutos de esteviosídeo e rebaudiosídeo A para um mesmo ensaio decrescem do período CER para o período FER.

A Fig.IV.5.2_g apresenta a fração mássica inicial de extrato nas amostras analisadas comparativamente com teor de rebaudiosídeo A e esteviosídeo presentes, pois as mesmas não eram compostas de 100% de glicosídeos como foi confirmado na análise por CLAE. Do teor de extrato inicial nas amostras do período CER, um máximo de 32,38% (Ext. 4 - ensaio 14) constituiu-se de glicosídeos (18,19% de esteviosídeo e 14,19% de rebaudiosídeo A). No período difusional, o teor máximo de glicosídeos na amostra (Ext. 8 - ensaio 14) foi de 42,07% (23,87% de esteviosídeo e 18,20% de rebaudiosídeo A).

Embora o ensaio 14 (120 bar/16°C) tenha apresentado uma percentagem relativa maior de glicosídeos na amostra, os valores absolutos de glicosídeos foram maiores no ensaio 17 (250 bar/16°C). Em geral, a proporção de esteviosídeo: rebaudiosídeo A obtida foi de 1:0,7; a proporção encontrada em extrações convencionais é de 10:1 [Pasquel, 1999].

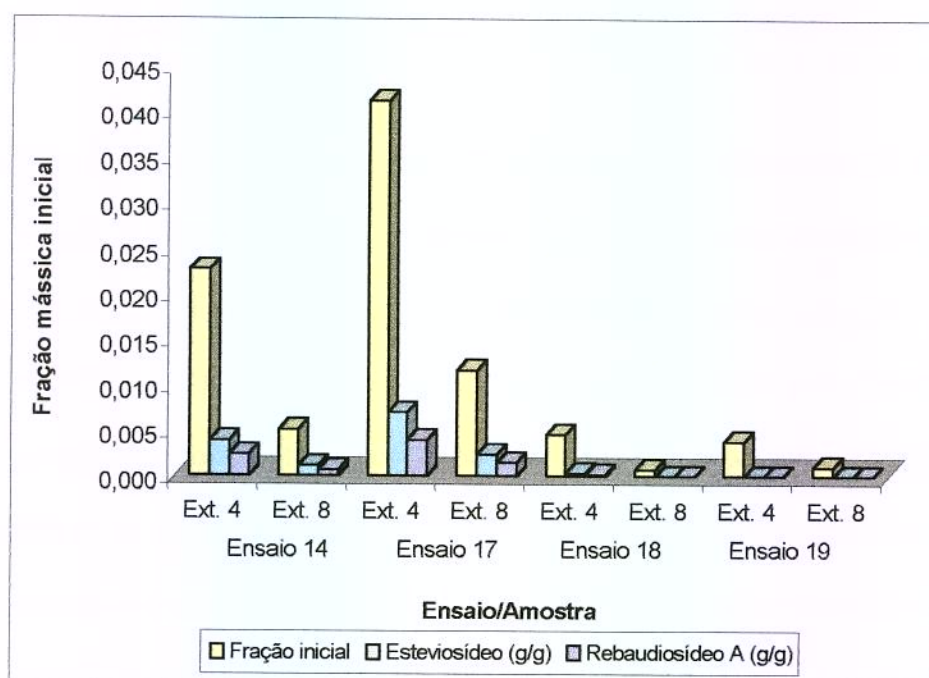


Fig.IV.5.2_g. Fração mássica inicial x rebaudiosídeo A/esteviosídeo presentes em diferentes amostras

Os extratos aquosos foram então analisados por cromatografia gasosa e em camada delgada com objetivo de se identificar as substâncias detectadas nas análises anteriores (UV e CLAE) e que não eram esteviosídeo e rebaudiosídeo A; as amostras analisadas foram as que apresentaram maior rendimento (amostra 4 e 8 - ensaios 14 e 17).

Na cromatografia gasosa, misturou-se o extrato aquoso com acetato de etila, agitou-se e após a formação de duas fases, retirou-se uma alíquota da fase que continha acetato para injeção no cromatógrafo conforme item III.5.1_a, uma vez que se desejava verificar se havia substâncias do pré-tratamento também presentes no extrato glicosídico. A cromatografia em camada delgada foi realizada conforme item III.5.1_b. No entanto, não se observou a presença de nenhuma substância em ambas as análises conforme pode ser observado nas Fig.IV.5.2_h e Fig.IV.5.2_i.

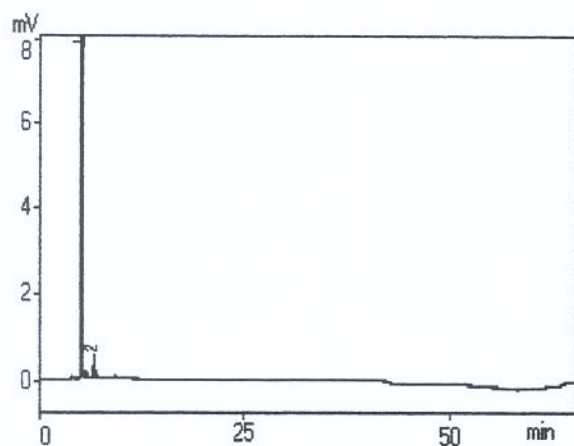


Fig.IV.5.2_h.Cromatograma obtido por CG da amostra 4 - ensaio 14 (120 bar/16°C); 50°C (5 min) - 280°C, 10°C/min, 280° (30 min)

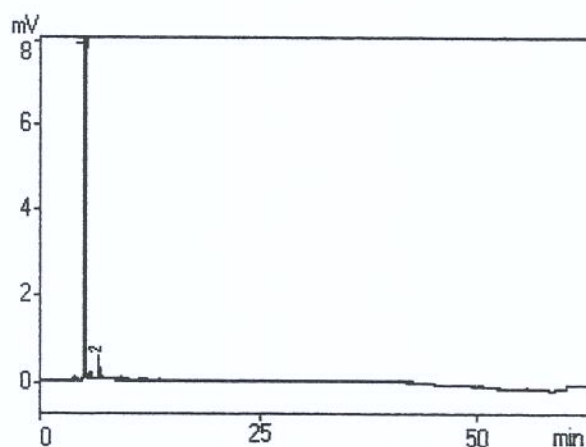


Fig.IV.5.2_i.Cromatograma obtido por CG da amostra 4 - ensaio 17 (250 bar/16°C) 50°C (5 min) - 280°C, 10°C/min, 280° (30 min)

Sendo assim, presume-se então que tais substâncias podem ser outros glicosídeos (esteviolbiosídeo, dulcosídeo A e rebaudiosídeos B, C, D e E) e/ou outros compostos

solúveis em água, como por exemplo corantes uma vez que os extratos apresentaram tonalidades de marrom ao verde, assim como flavonóides glicosilados que não são detectados no cromatógrafo conforme observado anteriormente.

IV.6. MODELAGEM

O modelo de Sovová [1994] foi aplicado aos dados experimentais do pré-tratamento e os principais os parâmetros do modelo obtidos (k_{Ya} e k_{Xa} - coeficientes de transferência de massa para o período de taxa de extração constante) são apresentados na Tab.IV.6.1.

Tab.IV.6.1.Coefficientes obtidos na modelagem

Ensaio	$k_{Ya} \times 10^4 (s)^{-1}$	$k_{Xa} \times 10^6 (s)^{-1}$
10*	1,55	4,70
12	6,12	3,59
13	2,30	4,88
15	2,23	4,87
16	2,23	4,96
20	2,18	5,06
21	3,23	5,44
23	2,19	4,15
25	2,31	4,35
Média	2,70	4,67
Desvio Padrão	1,35	0,55

*250 bar/30°C, demais ensaios 200 bar/30°C

Comparando-se os ensaios, o ensaio 10 apresentou o menor valor de k_{Ya} e o ensaio 12 o maior e menor valor de k_{Ya} e k_{Xa} , respectivamente. Os demais ensaios apresentaram resultados similares. A Fig.IV.6.1_a apresenta uma comparação entre os dados

experimentais dos ensaios 10 (250 bar/30°C) e 15 (200 bar/30°C) e o modelo cinético proposto. O ajuste foi efetuado considerando-se uma correção do tempo de extração (duas horas iniciais), podendo-se observar que o modelo ajustou bem os dados experimentais.

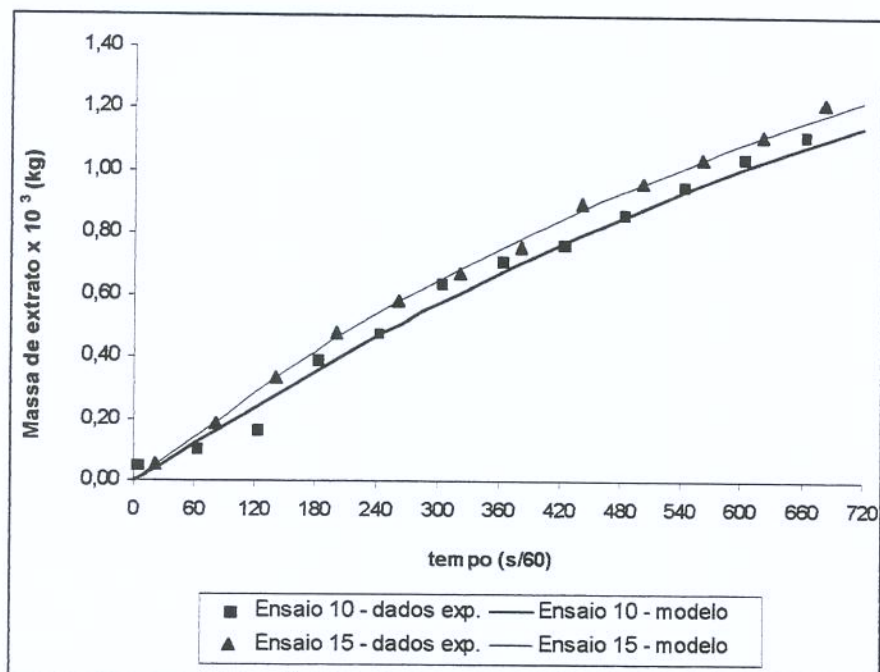


Fig. IV.6.1_a. Modelagem dos ensaios 10 (250 bar/30°C) e 15 (200 bar/30°C)

Uma vez que na etapa de extração dos glicosídeos não se obteve um bom valor para solubilidade (Y^*), parâmetro este utilizado no modelo de Sovová, não foi possível se efetuar a modelagem do processo de extração com CO_2 +água.

O modelo de Sovová da maneira como foi aplicado, apresentou comportamento similar a outros sistemas, por exemplo camomila + CO_2 [Povh, Meireles e Marques, 2001], erva-doce + CO_2 [Rodrigues, 2001]. Em relação aos resultados de Pasquel [2000], observa-se que o modelo descreveu melhor os dados experimentais (deste trabalho), uma vez que a solubilidade foi medida e não estimada para o mesmo sistema.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

V.1. PRÉ-TRATAMENTO

A matéria-prima é um fator importante no que se refere às substâncias obtidas no pré-tratamento e indesejadas na etapa de extração, sendo esta influenciada pelas técnicas agronômicas empregadas em seu cultivo.

Os ensaios relativos ao pré-tratamento apresentaram praticamente as mesmas respostas, sejam elas em termos de rendimento ou parâmetros cinéticos. Mesmo aumentando-se a pressão de 200 para 250 bar a 30°C, não houve mudanças significativas em tais respostas.

Na média, cerca de 45% do rendimento encontra-se no período de taxa de extração constante (CER), correspondendo a 43% do tempo total de extração (720 min.).

O valor encontrado para Y^* (0,00082) a 200 bar/30°C e $1,65 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s mostrou-se em média 61% maior que os valores de Y_{CER} encontrado nos demais ensaios e representa quase o dobro do valor para a maioria (ensaios 10, 15, 16, 20, 23 e 25).

As análises dos extratos obtidos por extração supercrítica não indicaram grandes variações nas substâncias presentes, quando comparado à literatura. Além dos compostos encontrados anteriormente, constatou-se ainda a presença de diterpenos.

V.2. EXTRAÇÃO DOS GLICOSÍDEOS COM CO₂+ÁGUA

Assim como para o pré-tratamento a matéria-prima também é um fator importante nessa etapa, pois quanto maior a quantidade de glicosídeos presentes, maior a possibilidade de sua extração.

A melhor condição, dentre as 4 realizadas, em termos de rendimento e parâmetros cinéticos foi de 250 bar/16°C. Os gráficos de tendência indicaram uma maior influência da temperatura quando comparada a pressão.

As análises de CLAE da estévia antes e após a extração com CO₂+água indicaram que para a condição 120 bar/10°C, 45% de esteviosídeo e 30% de rebaudiosídeo A presentes na matéria-prima foram extraídos.

O comportamento dos ensaios a 16°C mostrou-se predominantemente convectivo, uma vez que mais que 50% do rendimento encontra-se dentro do período de taxa de extração constante (CER). Já os ensaios realizados a 10°C apresentaram rendimento menor que 42% dentro desse mesmo período.

A modelagem de sistemas compostos por misturas (CO₂+água) requer um estudo mais aprofundado sobre as reais condições para a medida da solubilidade (Y*), podendo-se também fazer uso de outros modelos que melhor representem tais sistemas.

Propõe-se a busca da identificação das demais substâncias presentes no extrato glicosídico, uma vez que as técnicas empregadas foram específicas para substâncias glicosídicas (esteviosídeo e rebaudiosídeo A).

O treinamento prévio no equipamento de extração supercrítica é extremamente importante para o desenvolvimento dos ensaios do trabalho, principalmente quando se trabalha com co-solventes.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADAMS, R. P. **Identification of essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Illinois: Allured Publ. Corp, 468p., 1995.
- [2] ANGELUCCI, E. O estevióside de plantas brasileiras de *Stevia rebaudiana* Bertoni e a potencialidade de seu emprego em alimentos. Ensaio em formulações hídricas e carbonatadas. São Paulo, 1979. 78p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- [3] Bolhmann, F.; Zdero, C.; Grez, M. Weitere Inhaltsstoffe aus Vertretern der *Eupatorium* -Grupe, **Chem. Ber.** 110, 1034-1041, 1977.
- [4] BRANDLE, J. E.; ROSA, N. Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. **Can. J. Plant Sci.** 72: 1263 – 1266. 1992.
- [5] BRANDLE, J. E.; STARRATT, A. N.; GIJZEN, M. *Stevia rebaudiana* – its biological, chemical and agricultural properties. 1997
http://res.agr.ca/lond/pmrc/faq/stevia_ver.html. 23 abr. 1999.
- [6] BRUNNER, G. **Gas extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes**. 1st. Ed. Darmstadt, Alemanha: Steinkopff, 387p, 1994.
- [7] BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C.; WILLIAMS, D.H. **Strutucture Elucidation of**

- Natural Products by Mass Spectrometry.** Holden-day, San Francisco, London, Amsterdam, vol. 2, 121-139, 1964.
- [8] BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M.; DJERASSI, C. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes. **J. Am. Chem. Soc.** v.83, 3688-3699, 1963.
- [9] CASTER, D. **Stevia Raisin Rack Specialty Foods.** <http://www.raisinrack.com/stevia.htm>. 21 abr. 1999
- [10] CRAMMER, B.; IKAN, R. Progress in the chemistry and properties of rebaudiosides. In: GRENBY, T.H. (Ed.). **Developments in Sweeteners 3.** New York: Elsevier, 1987. Cap. 2, p. 45-64.
- [11] Dev, S.; Misra, R. **CRC Handbook of Terpenoides: Diterpenes,** CRC Press Inc, Florida, v.II, p.14-31, 1985.
- [12] DJERASSI, C.; BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical problems. Unsaturated Pentacyclic Triterpenoids. **Tetrahedron Letters.** n.7, 263-270, 1962.
- [13] DONALISIO, M. G. R.; DUARTE, F. R.; PINTO, A. J. D. A.; SOUZA, C. J. **Stevia rebaudiana.** Agrônômico 34: 65-68. 1982.
- [14] FERREIRA, S.R.S.; NIKOLOV, Z. L.; DORAISWAMY, L. K.; MEIRELES, M. A.

- A.; PETENATE, A. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v.14, p.235 – 245, 1999.
- [15] FARNSWORTH, N. R. Current status of sugar substitutes. **Cosmet. Perf.** Illinois 88 (7): 27-35, 1973.
- [16] FORS, A. A new character in the sweetener scenario. **Sugar J.** 58: 30. 1995.
- [17] FRANÇA, L. F. **Estudo do aproveitamento dos carotenos das fibras resultantes da prensagem na indústria de óleo de palma, pela extração com CO₂ supercrítico.** Campinas, 1999. 149 p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- [18] FRANÇA, L. F.; REBER, G.; MEIRELES, M. A. A.; MACHADO, N. T.; BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. **Journal of Supercritical Fluids**, v.14, p.247 – 256, 1999.
- [19] FREUND, R. J.; LITTELL, R. C. *SAS System for regression - SAS series in statistical applications*, SAS Institute Inc., NC, USA, 1995.
- [20] GOENADI, D. H. **Water tension and fertilization of *Stevia rebaudiana* Bertoni on Oxic Tropudalf (English abstr.).** Menara Perkebunan. 51: 85-90. 1983.
- [21] GOMIDE, R. Operações unitárias com sistemas sólidos granulares. In: **Operações**

- unitárias.** Catalogação na publicação da câmara brasileira do livro. Ed. FCA. São Paulo, vol. 1, p.27 -30, 1983.
- [22] González, A . G.; Arteaga, J. M.; Breton, J. L.; Fraga, B. M. Five New Labdane Oxides from *Eupatorium jhanni*. **Pytochemistry**, vol. 16, 107-110, 1977.
- [23] GOTO, A. **Estudo da influência do rebaudiosídeo A na solubilidade do esteviosídeo e análise sensorial dos produtos obtidos.** Maringá, 1997. 83p. Tese (Mestre em Química) - Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá.
- [24] GOTO, M.; SATO, M.; HIROSE, T. Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v.26, n.4, p.401-407, 1993.
- [25] JACOBS, M. B. **The chemical analysis of foods and products.** 3rd. Ed., Robert Krieger Publishing Co. New York, p. 21-23. 1973.
- [26] JOYCE. **Stevia liquid concentrate & stevia leaf beverage**, 1996.
<http://www.mcs.net/~joyce/stevia.html>. 21 abr. 1999
- [27] KIM, S. H.; DUBOIS, G. E. Natural high potency sweeteners. In: MARIE, S.; PIGGOTT, J. R. **Handbook of sweeteners.** New York: AVI, 1991. Cap. 6 p. 139-152.

- [28] KING, M. B.; BOTT, T. R. **Extraction of Natural products using near-critical solvents**. 2a. ed. Glasgow: Chapman & Hall, 1995, 325p.
- [29] KINGHORN, A. D.; SOEJARTO, D.D. Stevioside. In: NABORS, L. O.; GELARDI, R. C. **Alternative Sweeteners**. 2ª. Ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. Cap. 9, p. 157-171.
- [30] KINGHORN, A. D.; SOEJARTO, D.D. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In: WAGNER, H.; HIKINO, H.; FARNSWORTH, N. R. **Economic and medicinal plant research**. Academic Press, London. 1985. Vol 1, p.1-52
- [31] LEE, J. I.; KANG, K. K.; LEE, E. U. Studies on new sweetening resource plant stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) in Korea. I. **Effects of transplanting date shifting by cutting and seeding dates on agronomic characteristics and dry leaf yields of stevia (English abstr.)**. Res. Rep. Ord 21: 171-179. 1979.
- [32] LIU, J.; ONG, C. P.; LI, S. F. Y. Supercritical fluid extraction of stevia sweeteners from *Stevia rebaudiana*. **Journal of Chromatographic Science**, v.35, Sept., 1997.
- [33] MARTÍNEZ, J.; MEIRELES, M. A. A. **Aplicação do modelo de transferência de massa interfacial de Sovová [1994] no processo de extração de oleoresina de gengibre com CO₂ supercrítico**. XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Fortaleza, 2000.

- [34] MEIRELES, M. A. A.; NIKOLOV, Z. L. **Extraction and fractionation of essential oils with liquid carbon dioxide**. Elsevier, 1994.
- [35] MONTEIRO, A. R. **Otimização do processo de extração do óleo de gengibre com CO₂ supercrítico: uma avaliação do pré-tratamento e das variáveis de processo**. Campinas, 1999. 176p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- [36] MONTEIRO, A. R.; MEIRELES, M. A. A.; MARQUES, M. O.; PETENATE, A. J. Extraction of the soluble material from the shells of the bacuri fruit (*Platonia insignis* Mart) with pressurized CO₂ and other solvents. **Journal of Supercritical Fluids**, v.11, p.91–102, 1997.
- [37] MOWREY, D. **Stevia – South American Herb for Nutrition and Herbal Medicine**, 1992. <http://www.healthfree.com/herbgarden/stevlife.htm>. 03 maio 1999
- [38] MULLER, C. M. O. **Determinação do coeficiente de difusão de massa efetivo de óleo essencial de capim-limão em dióxido de carbono supercrítico**. Campinas, 1999. 33 p. Exame de qualificação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- [39] NIKOLOVA-DAMYANOVA, B.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Separation and quantitation of stevioside and rebaudioside A in plant extracts by normal-phase high performance liquid chromatography and thin-layer chromatography: A comparison.

Phytochemical Analysis, v.5, p. 81-85, 1994

[40] PASQUEL, A. **Extração dos glicosídeos da estévia com fluidos pressurizados.**

Campinas, 1999. 170p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

[41] PASQUEL, A.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. *Stevia (Stevia*

rebaudiana Bertoni) leaves pretreatment with pressurized CO₂: an evaluation of the extract composition. **Proceeding of the 6th Meeting on Supercritical Fluids: Chemistry and Materials**, p.501-506, 1999.

[42] PASQUEL, A.; MEIRELES, M. A. A. **Extracción supercrítica: principios**

fundamentales. Conocimiento, Iquitos (Perú), v.4, n°1, p. 131-162, 1998.

[43] PASQUEL, A.; MEIRELES, M. A. A.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.

Extraction of stevia glycosides with CO₂+water, CO₂+ethanol, and CO₂+water and ethanol. **Brazilian Journal of chemical engineering** (aceito). 2000

[44] PHILLIPS, K. C. *Stevia: steps in developing a new sweetener.* In: GRENBY, T.H.

(Ed.). **Developments in Sweeteners 3.** New York: Elsevier, 1987. Cap. 1, p. 1-43.

[45] POVH, N. P.; MEIRELES, M. A. A.; MARQUES, M. O. M. **Supercritical CO₂**

extraction of essential oil and oleoresin from Chamomile (*Matricaria recutita*

[L.] Rauschert). Artigo - Versão preliminar. 2001

- [46] RAFI. <http://www.rafi.org/misc/outofcontrol.html>. 23 abr. 1999
- [47] REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction of essential oils and related products. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.10, p. 1-37, 1997
- [48] REVERCHON, E.; DONSI, G.; OSSÉO, L. S. Modeling of supercritical extraction from herbaceous matrices. **Ind. Eng. Chem. Res.** 1993, 32, 2721 - 2726.
- [49] ROBINSON, B. L. **Contributions from the Gray herbarium of Harvard University.** The Gray Herbarium of Harvard University, Cambridge. 1930.
- [50] RODRIGUES, V. M.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. **Supercritical extraction of essential oil from anise seed (*Pimpinella anisum*, L) using CO₂: kinetics and equilibrium data.** In: 2nd International meeting on high pressure chemical engineering. TUHH, Hamburgo, Germany, CD-rom, 2001.
- [51] RODRIGUES, V. M. **Efeitos da vazão do solvente na cinética de extração e na qualidade do óleo de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*) obtido com CO₂ liquefeito.** Campinas, 1996. 101p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- [52] SAXENA, N. C.; MING, L. S. **Preliminary harvesting characteristics of stevia.** Phys. Prop. Agric. Mat. Prod. 3: 299 – 303. 1988.

- [53] SHOCK, C. C. **Experimental cultivation of Rebaudi's stevia in California.**
University of California Agronomy Progress Report N°. 122. 1982.
- [54] Sholichin, M.; Yamasaki, K.; Miyama, R.; Yahara, S.; Tanaka, O. Labdane-Type
Diterpenes from *Stevia rebaudiana*. **Pytochemistry**, vol. 19, 326-327, 1980.
- [55] SOEJARTO, D. D.; COMPADRE, C. M.; MEDON, P. J.; KAMATH, S. K.;
KINGHORN, A. D. Potential sweetening agents of plant origin. II. **Field search for
sweet-tasting Stevia species.** Econ. Bot. 37: 71-79. 1983.
- [56] SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. Potential sweetening
agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of stevia leaf herbarium samples
for sweetness. **J. Nat. Prod.** 45: 590-599. 1982.
- [57] SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂: I. -
Modeling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, v.49, n.3, p.409-
414, 1994.
- [58] SOVOVÁ, H.; KOMERS, R.; KUCERA, J.; JEZ, J. Supercritical carbon dioxide
extraction of caraway essential oil. **Chemical Engineering Science**, v.49, n.15,
p.2499-2505, 1994.
- [59] STEVITA CO., INC. **Stevita.** <http://www.fastlane.net/~petro/stevia/faq.htm>. 21 abr.
1999

APÊNDICE

APÊNDICE

A. TREINAMENTO OPERACIONAL

O treinamento no equipamento de extração supercrítica 1 e procedimentos do laboratório foi ministrado pela doutoranda Vera Maria Rodrigues no *Laboratório de Separações Físicas* da FEA/UNICAMP e consistiu desde a preparação do material de coleta, matéria-prima até o processo de obtenção dos extratos via tecnologia supercrítica.

A.1. Preparo de material de coleta de amostras

Os materiais de coleta de amostra consistem em frascos de volumes variados (âmbar ou transparentes dependendo do material a ser coletado), rolhas de borracha, lacres e etiquetas. Os frascos foram lavados com detergente, enxaguados em água destilada até a isenção completa do mesmo e enxaguados novamente com álcool. A seguir foram colocados em estufa a cerca de 100°C para secagem. Antes do uso dos frascos, pesou-se os mesmos em balança analítica (*Sartorius*, mod. A 200 S, precisão de $\pm 0,0001$ g, Alemanha), tomando-se cuidado para não haver contato manual e assim evitar a impregnação de substâncias que falseariam a pesagem. Já as rolhas foram embrulhadas com fita de teflon para evitar contato direto com o extrato, possível contaminação e/ou perda de material.

Ressalta-se ainda que é necessário o uso de banho de gelo durante a coleta do extrato caso o mesmo contenha substâncias voláteis, bem como o adsorvente *Porapak Q* em colunas de vidro na saída da tubulação (após os frascos) para a retenção dessas substâncias.

A.2. Preparo da matéria-prima

As matérias-primas utilizadas no treinamento de formação do leite foram o capim-limão (*Cymbopogon citratus*), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*), moídas, peneiradas e preparadas nas condições especificadas por Muller [1999], Monteiro [1999] e Rodrigues [1996], respectivamente.

A.3. Procedimento operacional

Foram realizados 2 ensaios na unidade de extração supercrítica 1 (Fig.III.2_a) envolvendo o cravo-da-índia e o gengibre. Para o ensaio com cravo-da-índia as condições foram 100 bar/25°C e vazão de 3,0 gCO₂/min; para o ensaio com gengibre as condições foram 70 bar/16°C e vazão de 2,7 gCO₂/min. Os procedimentos para a operação da unidade estão descritos no item III.2.2. A Tab.A.3_1 apresenta os resultados obtidos nas extrações de cravo-da-índia e gengibre nas condições citadas anteriormente.

Tab.A.3 1.Dados de extração do Cravo e Gengibre

Cravo		Gengibre	
t/3600 (s)	m _{acumulada} / m _{alimentação}	t/3600 (s)	m _{acumulada}
0,08	0,0091	0,25	0,0141
0,17	0,0242	0,50	0,0193
0,25	0,0391	0,58	0,0236
0,33	0,0554	0,67	0,0298
0,42	0,0709	0,75	0,0378
0,50	0,0852	0,83	0,0444
0,58	0,0995	0,92	0,0538
0,67	0,1125	1,00	0,0638
0,75	0,1223	1,08	0,0740
0,83	0,1312	1,17	0,0833
0,92	0,1378	1,25	0,0908
1,00	0,1436	1,33	0,0998
1,08	0,1469	1,42	0,1099
1,17	0,1493	1,50	0,1140
1,25	0,1510	1,67	0,1215
1,33	0,1532	1,75	0,1286
1,42	0,1541	1,83	0,1352
1,50	0,1551	1,92	0,1455
1,58	0,1557		
1,67	0,1562		
1,75	0,1564		
1,83	0,1565		
1,92	0,1566		
2,00	0,1567		
2,08	0,1569		

As Fig.A.3_1 e Fig.A.3_2 mostram as curvas de extração para o cravo-da-índia e gengibre respectivamente.

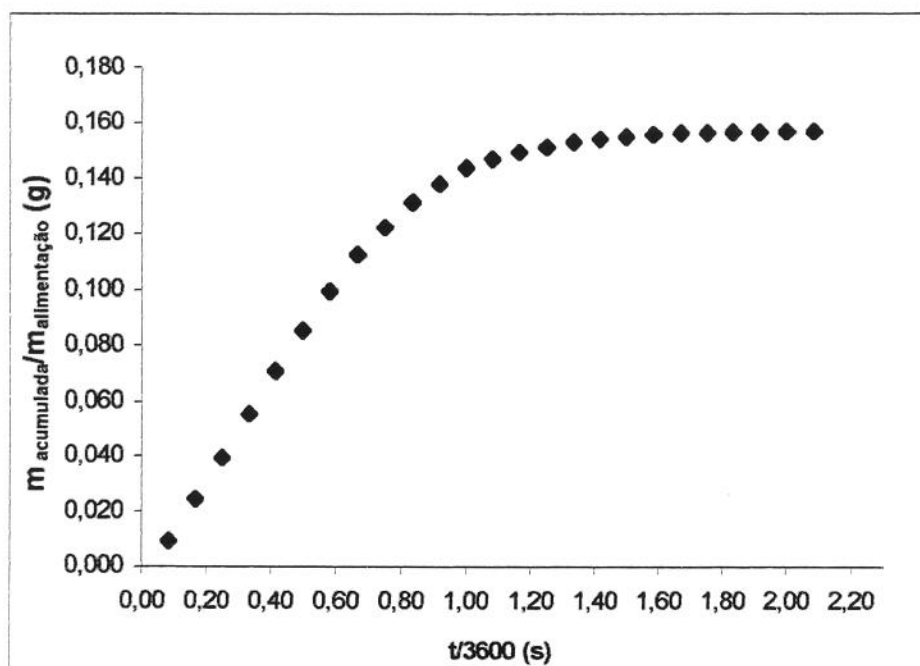


Fig.A.3_1.Curva de extração do cravo-da-índia

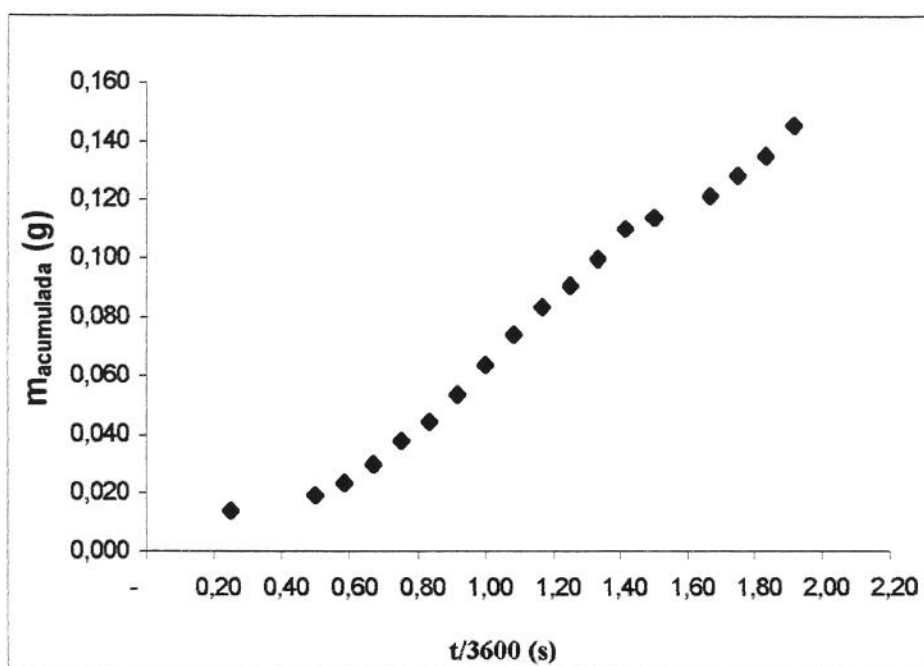


Fig.A.3_2.Curva de extração do gengibre

B. ENSAIOS PRELIMINARES

Foram realizadas extrações com diferentes matérias-primas a efeito de treinamento e checagem das condições de operação dos equipamentos. As matérias-primas utilizadas bem como as condições de operação estão especificadas na Tab.B_1.

Tab.B 1.Ensaio s preliminares

Ensaio	Matéria-prima	Condições de operação	Observações
E.P_1	Estévia	200 bar/30°C; 2,90 gCO ₂ /min.; m _{al.} = 58,00 g.	Etapa: pré-tratamento
E.P_2	Estévia	118 bar/16°C; 2,83 gCO ₂ /min.; co-solvente: 4%; m _{al.} = 57,46 g.	Etapa: extração dos glicosídeos com CO ₂ +água
E.P_3	<i>Porophyllum</i> galhos	- 180 bar/35°C; 3,82 gCO ₂ /min.; m _{al.} = 70,78 g.	Material cedido pela Fio Cruz
E.P_4	<i>Porophyllum</i> folhas	- 180 bar/35°C; 4,10 gCO ₂ /min.; m _{al.} = 88,55 g.	Material cedido pela Fio Cruz
E.P_5	<i>Tabernaemontana</i> <i>australis</i> - folhas	180 bar/35°C; 3,80 gCO ₂ /min.; m _{al.} = 71,80 g.	Material cedido pela Fio Cruz
E.P_6	<i>Tabernaemontana</i> <i>australis</i> - caule	180 bar/35°C; 4,09 gCO ₂ /min.; co-solvente (etanol): 5%; m _{al.} = 81,52 g.	Material cedido pela Fio Cruz
E.P_7	<i>Tabernaemontana</i> <i>australis</i> - casca	180 bar/35°C; 4,19 gCO ₂ /min.; co-solvente (etanol): 5% e 7%; m _{al.} = 83,20 g.	Material cedido pela Fio Cruz
E.P_8	<i>Tabernaemontana</i> <i>fuchsiofolia</i> folha	180 bar/35°C; 4,25 gCO ₂ /min.; - co-solvente (etanol): 5% e 7%; m _{al.} = 94,06 g.	Material cedido pela Fio Cruz

Os dados obtidos para as extrações realizadas são mostrados nas Tab.B_2 (estévia), Tab.B_3 (*Porophyllum*) e Tab.B_4 (*Tabernaemontana*). As curvas de extração dos

ensaios preliminares são apresentadas nas Fig.B_1 (estévia), Fig.B_2 (*Porophyllum*) e Fig.B_3 (*Tabernaemontana*).

Tab.B 2.Dados de extração da estévia

Ensaio P_1		Ensaio P_2	
t/3600 (s)	$m_{ac.}/m_{al.}$	t/3600 (s)	$m_{ac.}/m_{al.}$
1	0,0001	0,5	0,0001
2	0,0003	1,0	0,0003
3	0,0005	1,5	0,0005
4	0,0008	2,0	0,0006
5	0,0009	2,5	0,0008
6	0,0017	3,0	0,0009
7	0,0020	3,5	0,0010
8	0,0031	4,0	0,0012
9	0,0035	4,5	0,0013
10	0,0084	5,0	0,0015
11	0,0089		
12	0,0093		

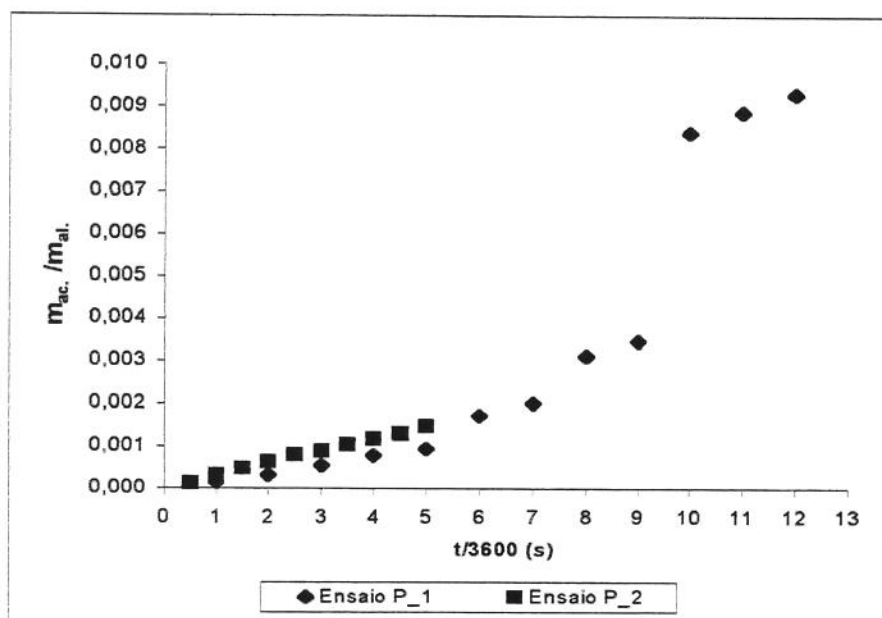
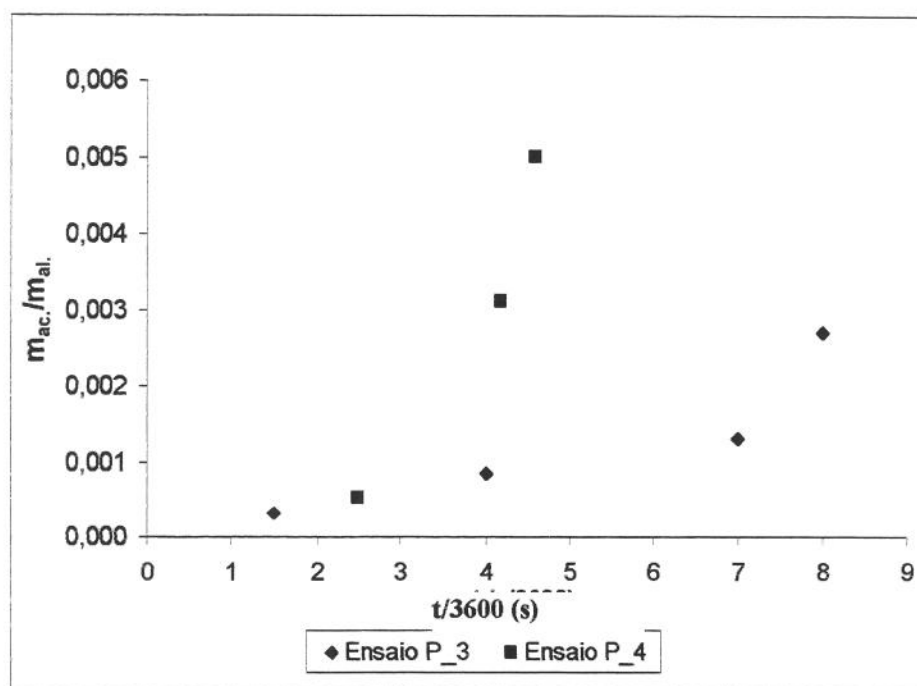


Fig.B_1.Dados de extração da estévia

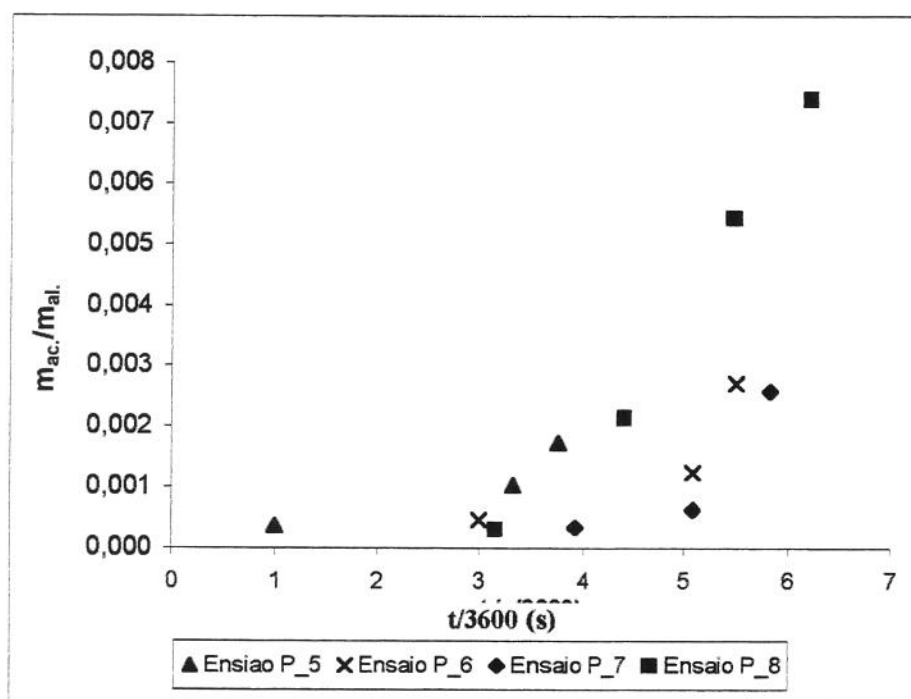
Tab.B_3.Dados de extração do *Porophyllum*

Ensaio P_3		Ensaio P_4	
$t/3600$ (s)	$m_{ac.}/m_{al.}$	$t/3600$ (s)	$m_{ac.}/m_{al.}$
1,5	0,0003	2,5	0,0005
4	0,0009	4,2	0,0031
7	0,0013	4,6	0,0050
8	0,0027		

Fig.B_2.Dados de extração do *Porophyllum*

Tab.B 4.Dados de extração da *Tabernaemontana*

Ensaio P_5		Ensaio P_6		Ensaio P_7		Ensaio P_8	
t/3600 (s)	m _{ac.} /m _{al.}	t/3600 (s)	m _{ac.} /m _{al.}	t/3600 (s)	m _{ac.} /m _{al.}	t/3600 (s)	m _{ac.} /m _{al.}
1,0	0,0004	3,0	0,0005	3,9	0,0003	3,2	0,0003
3,3	0,0010	5,1	0,0012	5,1	0,0006	4,4	0,0021
3,8	0,0017	5,5	0,0027	5,8	0,0026	5,5	0,0054
						6,2	0,0074

Fig.B_3.Dados de extração da *Tabernaemontana*

C. CALIBRAÇÃO DE INSTRUMENTOS DE CONTROLE E EQUIPAMENTOS

C.1. Manômetros

Os manômetros 5a, 5b e 5c (Fig.III.2_2) da unidade de extração 1 foram calibrados pelo *Centro de Tecnologia (CT)* da *UNICAMP* (Campinas - Brasil). As Tab.C.1_1, Tab.C.1_2 e Tab.C.1_3 apresentam os resultados dos laudos emitidos pelo *CT*.

Tab.C.1 1.Manômetro 5a, 0-100 kgf/cm²

Indicação no manômetro	Indicação na balança de peso morto*			
	Carga		Descarga	
(kgf/cm ²)	(kgf/cm ²)	Bar	(kgf/cm ²)	bar
0	0	0	0	0
10	9,53	9,35	9,44	9,26
20	19,59	19,21	19,55	19,17
30	29,78	29,20	29,71	29,14
40	39,83	39,06	39,84	39,07
50	49,97	49,00	49,97	49,00
60	60,17	59,01	60,10	58,94
70	70,21	68,85	70,11	68,75
80	80,38	78,83	80,31	78,76
90	90,36	88,61	90,36	88,61
100	100,43	98,49	100,43	98,49

* Fator de conversão (SI) utilizado: 1 bar = 1,019716 kgf/cm²

Tab.C.1 2.Manômetro 5b, 0-500 kgf/cm²

Indicação no manômetro	Indicação na balança de peso morto*			
	Carga		Descarga	
(kgf/cm ²)	(kgf/cm ²)	bar	(kgf/cm ²)	bar
0	0	0	0	0
50	52,10	51,09	51,59	50,59
100	101,66	99,69	100,71	98,77
150	150,90	147,99	149,67	146,78
200	201,06	197,17	199,72	195,86
250	251,63	246,76	250,00	245,17
300	302,01	296,18	300,47	294,66
350	351,57	344,76	350,32	343,55
400	401,32	393,57	400,02	392,29
450	450,86	442,15	450,06	441,36
500	500,56	490,89	500,56	490,89

* Fator de conversão (SI) utilizado: 1 bar = 1,019716 kgf/cm²Tab.C.1 3.Manômetro 5c, 0-500 kgf/cm²

Indicação no manômetro	Indicação na balança de peso morto*			
	Carga		Descarga	
(kgf/cm ²)	(kgf/cm ²)	bar	(kgf/cm ²)	bar
0	0	0	0	0
50	52,05	51,04	51,38	50,39
100	101,45	99,49	100,66	98,72
150	151,36	148,43	150,23	147,33
200	201,24	197,35	199,94	196,07
250	251,15	246,29	249,75	244,92
300	301,03	295,21	299,68	293,89
350	351,09	344,30	349,71	342,95
400	400,46	392,72	399,34	391,62
450	450,66	441,95	449,90	441,21
500	500,64	490,96	500,64	490,96

* Fator de conversão (SI) utilizado: 1 bar = 1,019716 kgf/cm²

C.2. Termopares

Os termopares da entrada e saída do extrator, foram calibrados através de um termômetro padrão com precisão de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ (*Incoterm*, Porto Alegre - Brasil). Mergulhou-se os termopares em um banho termostático (*PolyScience*, mod. 9510, Estados Unidos), variando a temperatura de 10 a 40°C de 2 em 2°C . Obteve-se fatores de correção de -1°C para o termopar de entrada e -3°C para o termopar de saída do extrator.

C.3. Espectrofotômetro *Hitachi UV 3010*

Foi efetuada uma checagem do equipamento pela equipe técnica da *SINC do Brasil*, que utilizou filtros padrões para verificar a resposta das leituras. A Tab.C.3_1 apresenta os dados de absorbância (Abs) permitidos em cada filtro e a Tab.C.3_2 apresenta as leituras obtidas no espectrofotômetro. Observa-se que as leituras obtidas em cada banda estão dentro da faixa permitida.

Tab.C.3 1.Valores de absorbância esperados para filtros padrão

Comprimento de onda (nm) (Máximo espectro de Banda - nm)	Absorbância		
	Nº filtro		
	10-2300	20-2300	30-2300
440,0	$1,0343 \pm 0,0024$	$0,7321 \pm 0,0023$	$0,5432 \pm 0,0023$
465,0	$0,9626 \pm 0,0024$	$0,6817 \pm 0,0023$	$0,4957 \pm 0,0023$
546,1	$0,9952 \pm 0,0024$	$0,7044 \pm 0,0023$	$0,5078 \pm 0,0023$
590,0	$1,0391 \pm 0,0024$	$0,7349 \pm 0,0023$	$0,5380 \pm 0,0023$
635,0	$0,9935 \pm 0,0024$	$0,7031 \pm 0,0023$	$0,5241 \pm 0,0023$

Tab.C.3 2.Valores de absorvância experimentais para filtros padrão

Comprimento de onda (nm) (Máximo espectro de Banda - nm)	Absorvância		
	Nº filtro		
	10-2299	20-2300	30-2300
440,0	1,039	0,738	0,545
465,0	0,967	0,687	0,498
546,1	0,998	0,709	0,509
590,0	1,041	0,739	0,539
635,0	0,996	0,706	0,525

C.4. Bomba de co-solvente

Através de ensaios preliminares, verificou-se a necessidade de uma calibração da bomba de co-solvente, uma vez que o valor especificado na mesma não correspondia ao obtido nos ensaios. Isso foi verificado através de medições da massa_{H₂O} (g) x tempo (min.) e confrontado com o especificado na bomba (*Thermo Separation Products*, mod. 3500, Flórida - Estados Unidos), que opera em % da vazão total do sistema, sendo X (%) co-solvente e 100 - X (%) solvente. A Tab.C.4_1, indica os valores obtidos nas medições a 120 bar/25°C.

Tab.C.4 1.Medições na bomba de co-solvente

Q _{bomba} (ml/min)	Especificação de solvente (CO ₂) na bomba (%)	Especificação de co-solvente (H ₂ O) na bomba (%)	Quantidade de H ₂ O medida (%)
4,70	96,0	4,0	0,69
5,00	90,5	9,5	1,87
5,25	86,0	14,0	3,54

Após a constatação de que a bomba estava operando irregularmente, acionou-se a equipe técnica da *LC Pharma*, representante da *Thermo Separation Products* no Brasil, para a calibração e manutenção da bomba. Verificou-se que a bomba estava efetivamente operando com metade da vazão especificada devido ao vazamento no "o-ring" do transdutor de pressão e ao retorno na válvula de entrada. Sendo assim, foram efetuadas as trocas do "o-ring" e do cartucho da válvula de entrada, bem como a calibração da vazão da bomba com água a 25°C. Para efeito de manutenção, também se efetuou a mudança da mangueira do reservatório de co-solvente.

D. MEMORIAL DE CÁLCULO

D.1. Cálculo da vazão de água (ml/min.) para a bomba de co-solvente

A quantidade de co-solvente utilizada nos experimentos foi de 9,5% molar de água. O controle da pressão de processo quando se trabalha com esta bomba é efetuado pela vazão da mesma. Outro fator a ser considerado é que a quantidade de co-solvente é expressa em percentagem (%) da vazão da bomba (ml/min). Sendo assim, foi necessário o cálculo para conversão da massa de água de % molar para % mássica e desta para % da vazão da bomba de co-solvente em ml/min. O memorial de cálculo é a seguir descrito:

- Considerando 100 moles, temos: $n_{\text{H}_2\text{O}} = 9,5$ e $n_{\text{CO}_2} = 100 - 9,5 = 90,5$;
- $n_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{m_{\text{H}_2\text{O}}}{PM_{\text{H}_2\text{O}}} \rightarrow m_{\text{H}_2\text{O}} = 9,5 \cdot 18 \rightarrow m_{\text{H}_2\text{O}} = 171\text{g}$;
- $n_{\text{CO}_2} = \frac{m_{\text{CO}_2}}{PM_{\text{CO}_2}} \rightarrow m_{\text{CO}_2} = 90,5 \cdot 44 \rightarrow m_{\text{CO}_2} = 3982\text{g}$;
- $m_T = 171 + 3982 = 4153\text{g}$;
- $\frac{m_{\text{H}_2\text{O}}}{m_{\text{H}_2\text{O}} + m_{\text{CO}_2}} = \%m_{\text{H}_2\text{O}} \rightarrow \frac{171\text{g}_{\text{H}_2\text{O}}}{171\text{g}_{\text{H}_2\text{O}} + 3982\text{g}_{\text{CO}_2}} = 0,0412 \text{ \% massa de H}_2\text{O}$;
- Uma vez que se quer uma $Q_{\text{CO}_2+\text{H}_2\text{O}} = 4 \text{ g/min.}$, temos:
 $m_{\text{H}_2\text{O}} = 0,0412 \cdot 4 = 0,1648\text{g}$;
- $\rho_{\text{H}_2\text{O}, 1\text{bar} / 25^\circ\text{C}} = 0,9992 \text{ g/cm}^3 \rightarrow Q_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{0,1648}{0,9992} = 0,1649 \text{ ml / min.}$

Para:

- pressão de 250 bar $\rightarrow Q_{\text{bomba}} = 3,75 \text{ ml/min.} \rightarrow \frac{Q_{\text{H}_2\text{O}}}{Q_{\text{bomba}}} = \frac{0,1649}{3,75} = 4,4\%$;
- pressão de 120 bar $\rightarrow Q_{\text{bomba}} = 2,06 \text{ ml/min.} \rightarrow \frac{Q_{\text{H}_2\text{O}}}{Q_{\text{bomba}}} = \frac{0,1649}{2,06} = 8,0\%$.

Nos ensaios utilizou-se 5,5 % de co-solvente para pressão de 250 bar e 10,5 % para pressão de 120 bar uma vez que uma quantidade significativa ficava retida no leito, como pode ser observado pelos cálculos no Apêndice D.2.

D.2. Cálculo da vazão de água (g/min) do processo

Para o cálculo da vazão real de água utilizada no processo de extração, foram verificadas as quantidades nos frascos e a quantidade retida na célula de extração. No primeiro caso, as massas coletadas nos frascos foram pesadas, a água foi evaporada e por diferença obteve-se os valores de extrato e água coletados. Para a célula de extração, pesou-se a mesma antes e após o processo.

Os cálculos foram efetuados seguindo o esquema da Fig.D.2. Para exemplificar, usou-se os dados do ensaio 14 (120 bar/16°C).

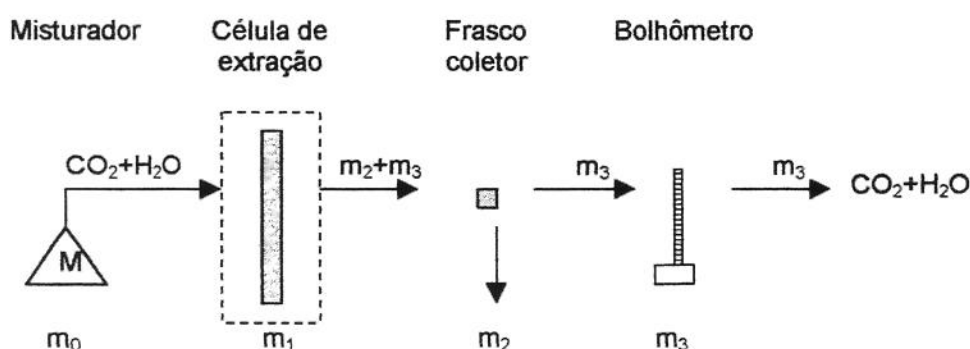


Fig.D.2. Esquema do sistema para cálculo da vazão de água

Onde: m_0 é a massa de água da alimentação, m_1 é a massa de água retida na célula de extração, m_2 é a massa de água retida nos frascos de coleta e m_3 é a massa de água que passa pelo bolhômetro.

Os valores para vazão da bomba e % de co-solvente utilizados no ensaio foram de 2,05 ml/min. e a 10,5 %, respectivamente. Sendo assim, temos:

- $Q_{H_2O} = 10,5 \% \cdot 2,05 = 0,21 \text{ ml/min.};$
- $m_0 = 0,21 \text{ ml/min.} \cdot \rho_{H_2O \text{ a } 24^\circ\text{C, 1 bar}} \cdot 720 \text{ min.} = 154,56 \text{ g};$
- $m_1 = 58,38 \text{ g (valor medido);}$
- $m_2 = 56,78 \text{ g (valor medido);}$
- $m_3 = m_0 - m_1 - m_2 = 39,4 \text{ g};$
- Considerando que a vazão de água é formada pela massa que saiu do sistema, ou seja, m_2 e m_3 , temos:

$$Q_{H_2O} = m_2 + m_3 = \frac{96,18}{720} \longrightarrow \boxed{Q_{H_2O} = 0,13 \text{ g/min.}}$$

D.3. Cálculo da vazão de CO_2 (g/min.) e da mistura CO_2 +água (g/min.)

Seguiu-se o mesmo esquema do item anterior (Apêndice D.2), considerando que todo o CO_2 entra e sai do sistema, não ficando retido na célula de extração e nos frascos coletores. Exemplifica-se também com dados do mesmo ensaio (14).

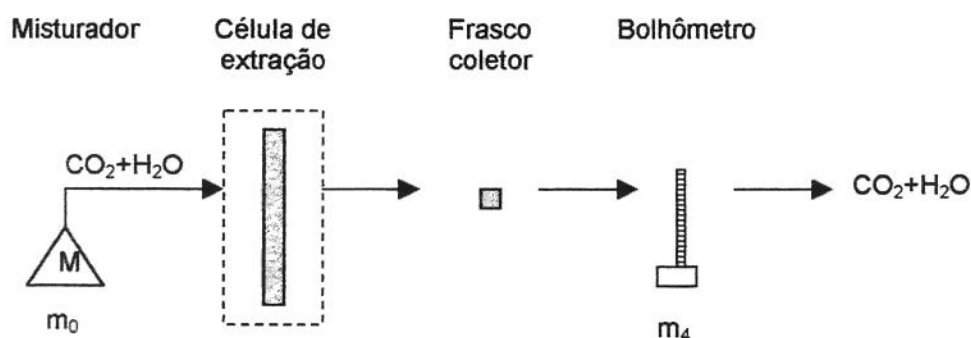


Fig.D.3. Esquema do sistema para cálculo da vazão de CO_2 e da mistura

Onde: m_0 é a massa de CO_2 da alimentação e m_4 é a massa de CO_2 que passa pelo bolhometro.

- Se $Q_{\text{H}_2\text{O}} = 0,13 \text{ g/min} \rightarrow n_{\text{H}_2\text{O}} = 0,13/18 = 0,007 \text{ moles/min.}$
- O tempo de deslocamento medido no bolhometro, referente à vazão total foi de $0,77\text{s} \rightarrow$
 $\rightarrow n_{\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}} = \frac{P_{\text{atm}} \cdot V_{\text{desl}} \cdot 60}{R \cdot T \cdot t} = 0,088 \text{ moles/min.}$
- $n_{\text{CO}_2} = 0,088 - 0,007 = 0,081 \text{ moles/min.} \rightarrow Q_{\text{CO}_2} = 0,081 \cdot 44 = 3,56 \text{ g/min.}$
- Portanto: $Q_{\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}} = 3,56 + 0,13 \rightarrow$ $Q_{\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}} = 3,69 \text{ g/min.}$

A Tab.D.3. indica os valores das vazões de água, CO_2 e da mistura para os demais ensaios (17, 18, 19 e 27), as considerações e os valores medidos. O ensaio 27 refere-se à medida de solubilidade.

Tab.D.3.Valores de vazões dos ensaios 17, 18, 19 e 27

Parâmetro	Ensaio 17 (250 bar/16°C)	Ensaio 18 (250 bar/10°C)	Ensaio 19 (120 bar/10°C)	Ensaio 27 (250 bar/16°C)
Q_{bomba} (ml/min.)	3,75	3,73	2,06	3,65
Co-solvente (%)	5,50	5,50	10,50	5,50
$m_{\text{água célula de extração}}$	65,72	52,73	67,57	66,10
$m_{\text{água frascos}}$	30,31	53,59	48,37	46,74
$Q_{\text{H}_2\text{O}}$ (g/min.)	0,12	0,13	0,12	0,08
Q_{CO_2} (g/min.)	3,69	3,64	3,62	0,81
$Q_{\text{CO}_2+\text{H}_2\text{O}}$ (g/min.)	3,81	3,77	3,74	0,89

E. DADOS EXPERIMENTAIS

E.1. Pré-tratamento

Os dados de massa coletada x tempo de extração obtidos nos pré-tratamentos são apresentados nas e Tab.E.1_1 e Tab.E.1_2; o ensaio 26 refere-se à medida de solubilidade. As curvas de extração são apresentados nas Fig.E.1_1 a Fig.E.1_10, e a Tab.E.1_3 apresenta as condições de operação de cada ensaio no pré-tratamento.

Tab.E.1 1.Dados do pré-tratamento (massa x tempo)

t/3600 (s)	Ensaio 10 (m_{ac}/m_{al})	Ensaio 12 (m_{ac}/m_{al})	Ensaio 13 (m_{ac}/m_{al})	Ensaio 15 (m_{ac}/m_{al})	Ensaio 16 (m_{ac}/m_{al})
1	0,0006	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
2	0,0011	0,0022	0,0011	0,0018	0,0010
3	0,0017	0,0051	0,0034	0,0033	0,0022
4	0,0040	0,0071	0,0047	0,0047	0,0041
5	0,0048	0,0075	0,0062	0,0057	0,0055
6	0,0064	0,0085	0,0073	0,0066	0,0067
7	0,0071	0,0093	0,0076	0,0074	0,0076
8	0,0077	0,0102	0,0080	0,0088	0,0086
9	0,0087	0,0113	0,0086	0,0095	0,0094
10	0,0095	0,0117	0,0093	0,0103	0,0102
11	0,0104	0,0122	0,0109	0,0110	0,0110
12	0,0112	0,0128	0,0116	0,0120	0,0117

Tab.E.1 2.Dados do pré-tratamento (massa x tempo)

t/3600	Ensaio 20	Ensaio 21	Ensaio 23	Ensaio 25	Ensaio 26
(s)	(m_{ac}/m_{al})	(m_{ac}/m_{al})	(m_{ac}/m_{al})	(m_{ac}/m_{al})	(m_{ac}/m_{al})
1	0,0004	0,0006	0,0005	0,0006	0,0005
2	0,0004	0,0014	0,0013	0,0012	0,0011
3	0,0023	0,0044	0,0035	0,0025	0,0018
4	0,0040	0,0056	0,0044	0,0048	0,0024
5	0,0053	0,0077	0,0052	0,0059	0,0037
6	0,0062	0,0090	0,0062	0,0073	0,0042
7	0,0070	0,0098	0,0070	0,0083	0,0051
8	0,0079	0,0105	0,0078	0,0094	0,0059
9	0,0084	0,0113	0,0094	0,0101	0,0066
10	0,0096	0,0125	0,0099	0,0110	0,0072
11	0,0104	0,0130	0,0110	0,0116	0,0092
12	0,0112	0,0137	0,0116	0,0123	

Tab.E.1 3.Condições de operação do pré-tratamento

Ensaio	Pressão	Temperatura	Q_{CO2}	M_{alimentação}
	(bar)	(°C)	(g/min.)	(g)
10	250	30	3,02	61,00
12	200	30	3,29	63,11
13	200	30	2,95	60,67
15	200	30	3,02	61,89
16	200	30	2,96	63,18
20	200	30	3,10	62,78
21	200	30	3,41	61,38
23	200	30	3,06	61,17
25	200	30	3,02	61,81
Média	—	—	3,09	61,89
Desv. Pad.	—	—	0,16	0,94
26	200	30	1,0	62,15

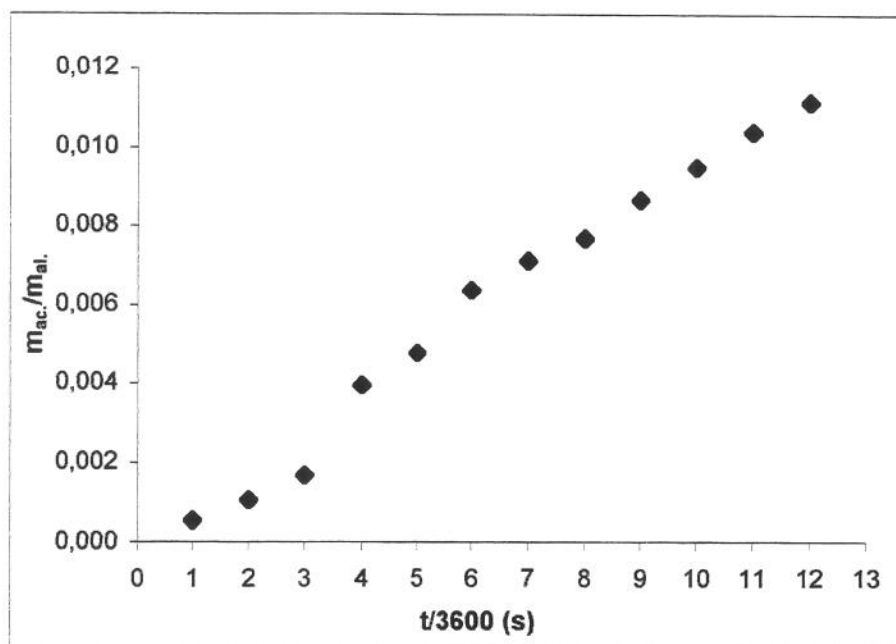


Fig.E.1_1.Curva de extração do ensaio 10

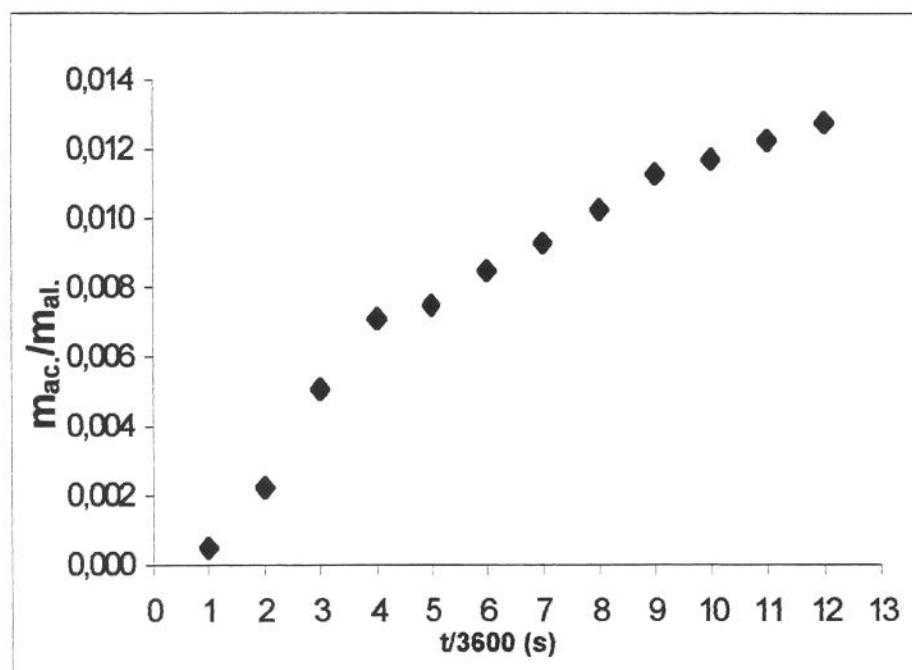


Fig.E.1_2.Curva de extração do ensaio 12

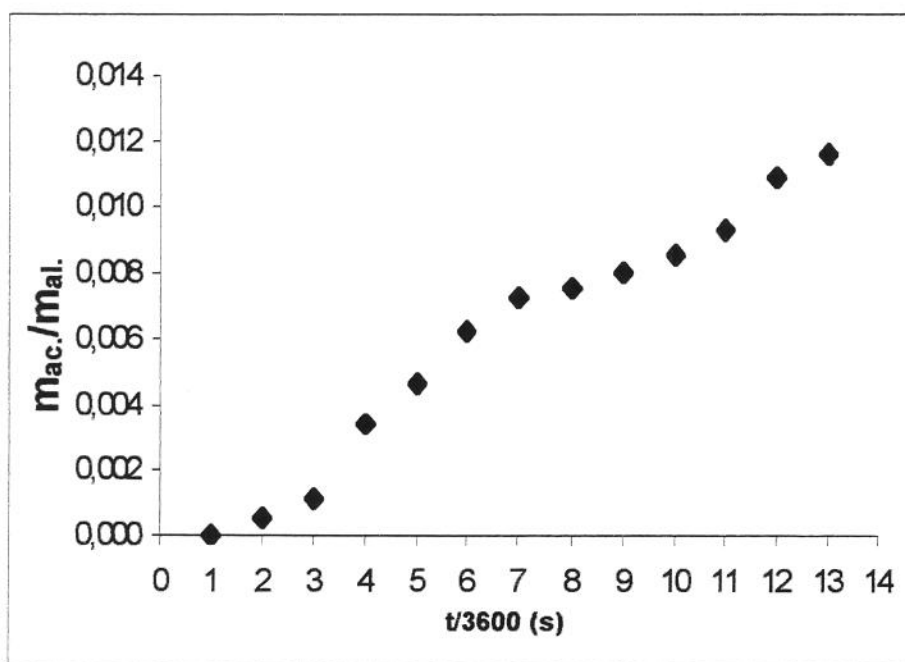


Fig.E.1_3.Curva de extração do ensaio 13

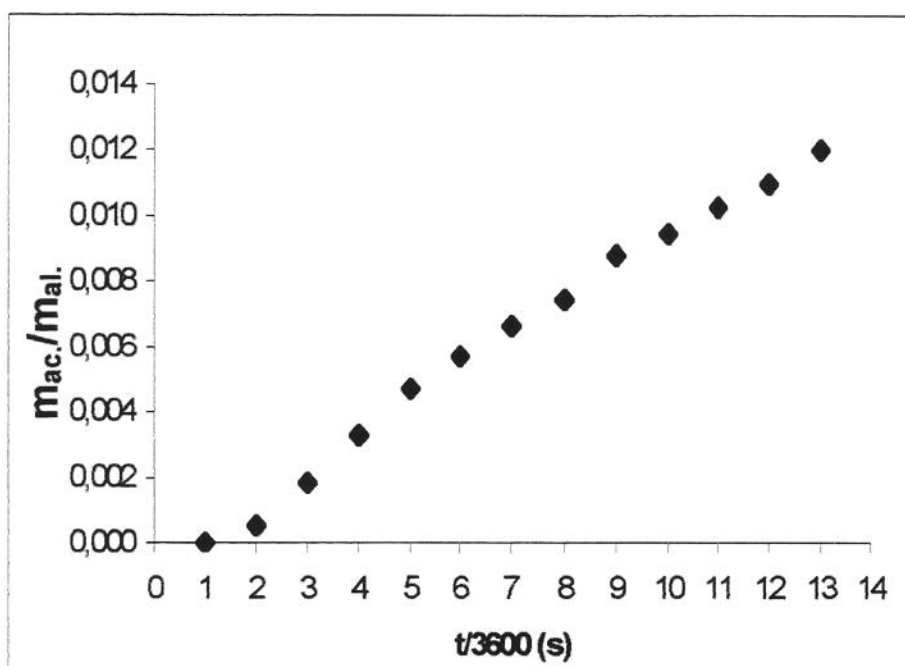


Fig.E.1_4.Curva de extração do ensaio 15

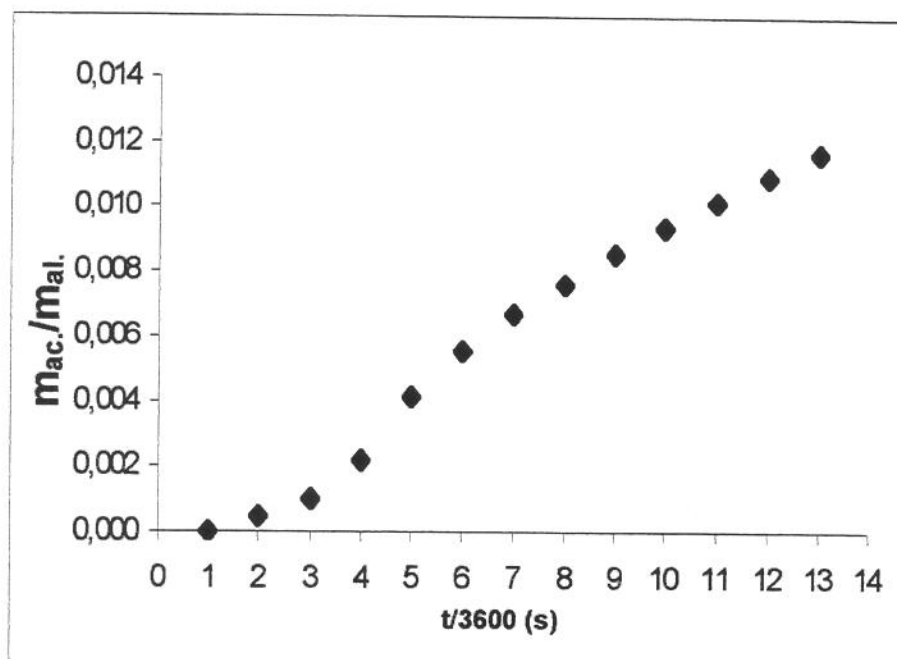


Fig.E.1_5.Curva de extração do ensaio 16

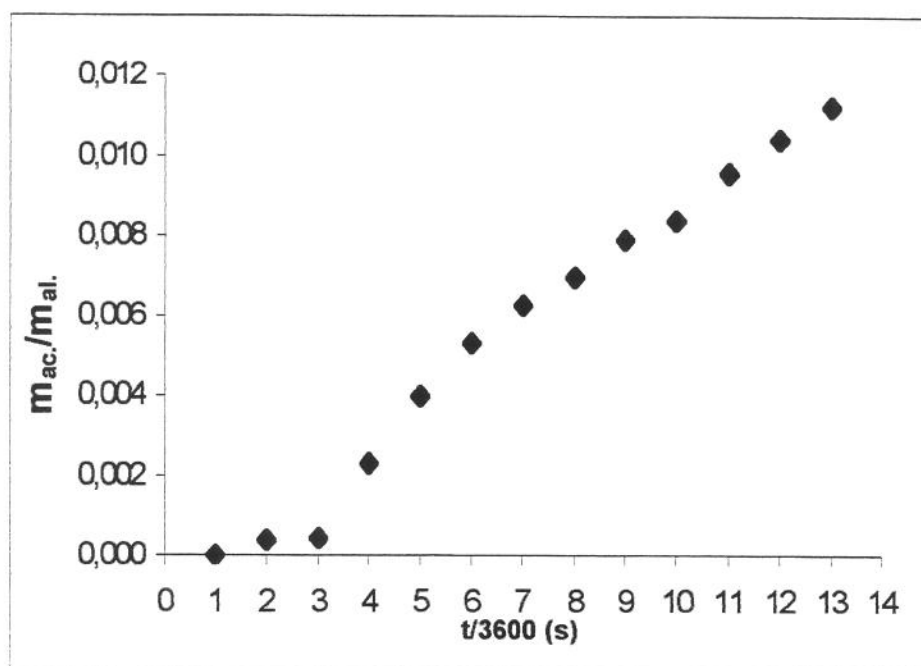


Fig.E.1_6.Curva de extração do ensaio 20

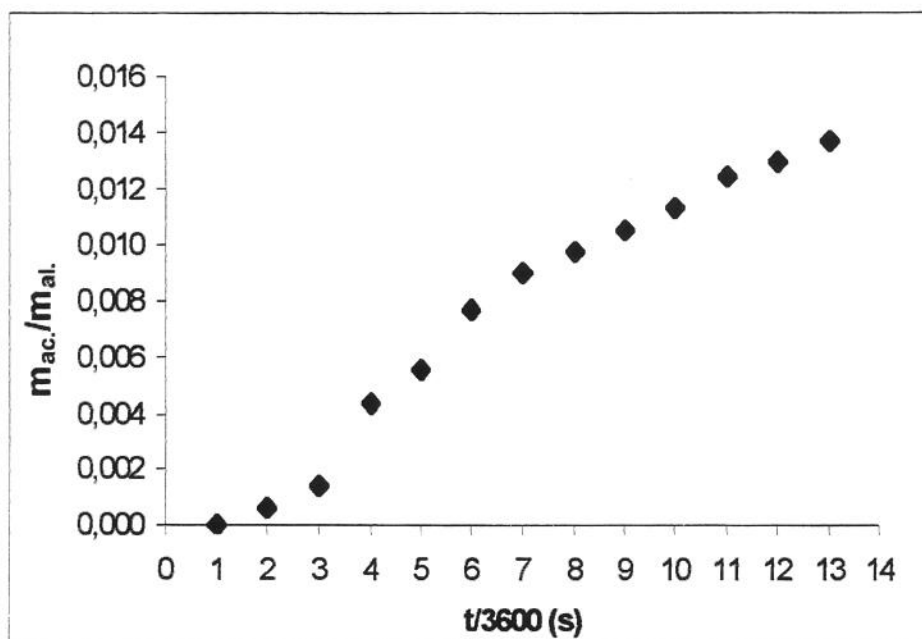


Fig.E.1_7.Curva de extração do ensaio 21

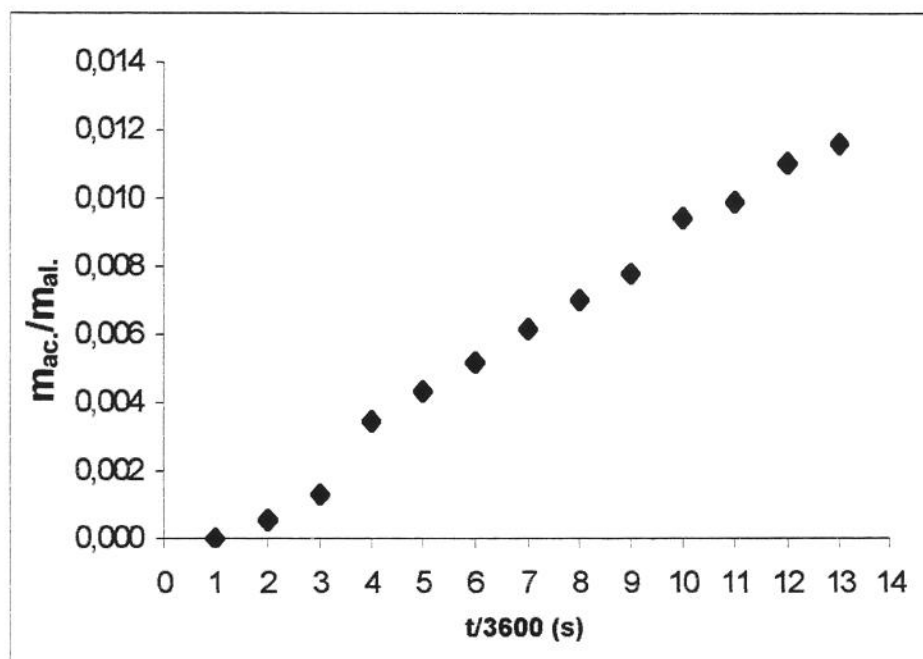


Fig.E.1_8.Curva de extração do ensaio 23

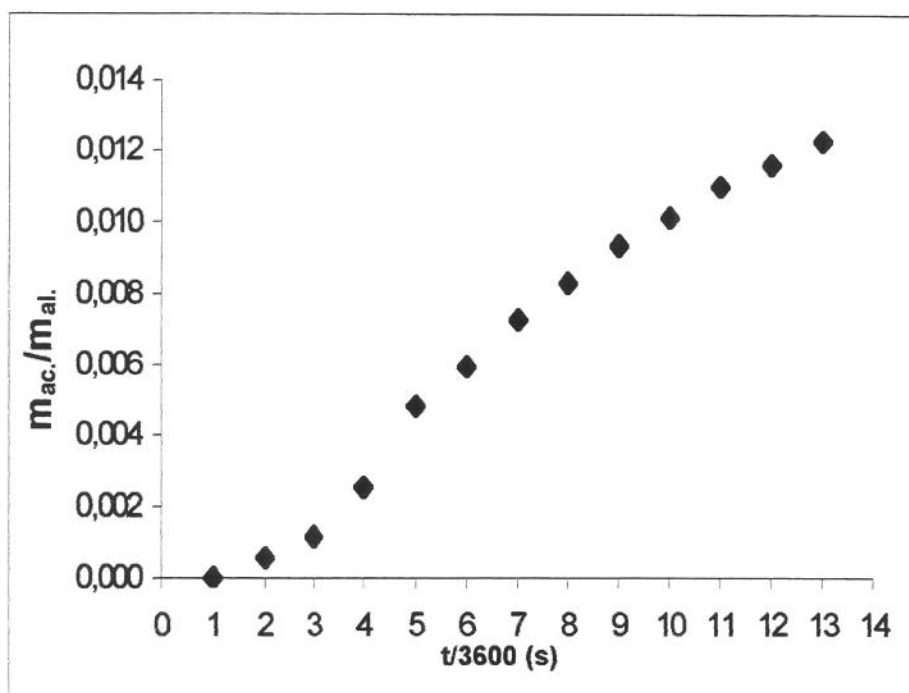


Fig.E.1_9.Curva de extração do ensaio 25

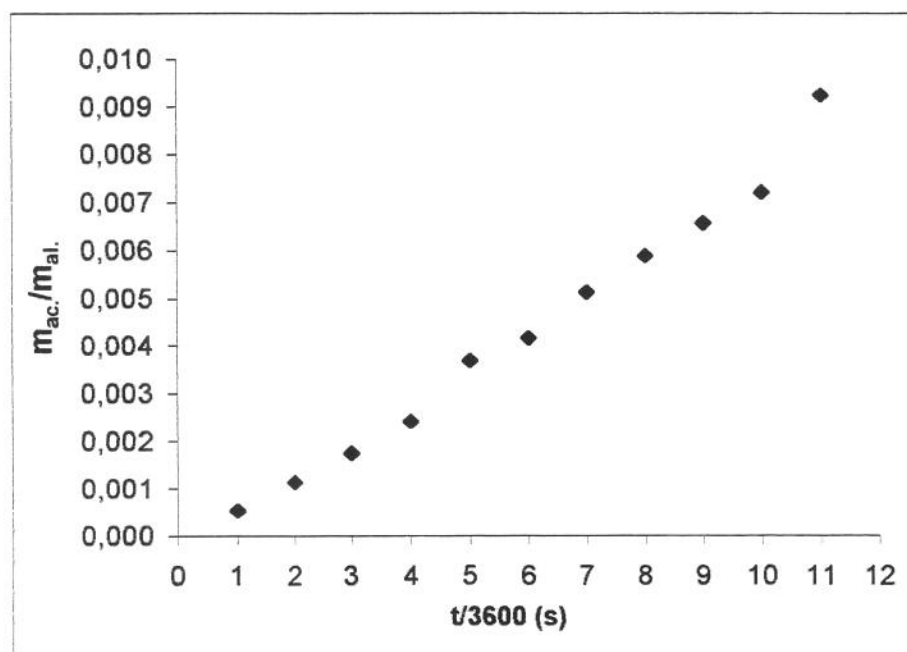


Fig.E.1_10.Dados de medida da solubilidade (ensaio 26)

E.2. Extração com CO₂+água

As curvas de extração dos glicosídeos com CO₂+água para cada ensaio, bem como os dados com valores de extratos aquosos, são apresentados nas Fig.E.2_1 a Fig.E.2_4 e Tab.E.2_1. A Tab.E.2_2 apresenta dos dados das extrações após a evaporação da água conforme descrito no item III.3.2 e as Fig.E.2_5 a Fig.E.2_8 apresentam as curvas de extração com os dados obtidos. A Tab.E.2_3 apresenta as condições de operação dos ensaios 14, 17, 18, 19 e 27 sendo que os pré-tratamentos referentes a essas extrações foram os ensaios 12, 15, 16, 13 e 26 respectivamente.

O ensaio 27 refere-se à medida de solubilidade na condição que apresentou maior rendimento (250 bar/16°C), podendo-se observar as curvas de extração com os valores de extrato aquosos e secos nas Fig.E.2_9 e Fig.E.2_10, respectivamente.

Tab.E.2 1.Dados das extrações com CO₂+água (extrato aquoso)

t/3600 (s)	Ensaio 14 (m _{ac} /m _{al})	Ensaio 17 (m _{ac} /m _{al})	Ensaio 18 (m _{ac} /m _{al})	Ensaio 19 (m _{ac} /m _{al})	Ensaio 27 (m _{ac} /m _{al})
1	0,0199	0,0515	0,0062	0,0004	0,0103
2	0,0328	0,0650	0,0157	0,0226	0,0505
3	0,1093	0,0995	0,0343	0,0490	0,0573
4	0,1967	0,1814	0,0664	0,0907	0,0898
5	0,2535	0,2321	0,0774	0,1393	0,1499
6	0,3126	0,2701	0,1336	0,1898	0,1544
7	0,3740	0,2929	0,1939	0,2648	0,2302
8	0,4439	0,3149	0,2100	0,2947	0,2794
9	0,5185	0,3467	0,3056	0,3574	0,3360
10	0,5875	0,3640	0,4486	0,4064	
11	0,6554	0,3712	0,5438	0,5080	
12	0,7390	0,3924	0,7010	0,5820	

Tab.E.2 2.Dados das extrações com CO₂+água (extrato seco)

t/3600 (s)	Ensaio 14 (m_{ac}/m_{al})	Ensaio 17 (m_{ac}/m_{al})	Ensaio 18 (m_{ac}/m_{al})	Ensaio 19 (m_{ac}/m_{al})	Ensaio 27 (m_{ac}/m_{al})
1	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
2	0,0002	0,0001	0,0008	0,0001	0,0001
3	0,0026	0,0015	0,0011	0,0002	0,0001
4	0,0042	0,0047	0,0014	0,0004	0,0002
5	0,0051	0,0061	0,0015	0,0005	0,0003
6	0,0059	0,0072	0,0017	0,0006	0,0005
7	0,0063	0,0079	0,0019	0,0007	0,0009
8	0,0067	0,0088	0,0019	0,0008	0,0075
9	0,0069	0,0096	0,0021	0,0009	0,0085
10	0,0073	0,0106	0,0030	0,0011	
11	0,0074	0,0111	0,0031	0,0016	
12	0,0076	0,0118	0,0031	0,0021	

Tab.E.2 2.Condições de operação das extrações com CO₂+água

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Q_{CO₂+H₂O} (g/min.)	Co-solvente (%)	M_{alimentação} (g)
14	120	16	3,69	10,5	60,62
17	250	16	3,81	5,5	59,11
18	250	10	3,77	5,5	58,81
19	120	10	3,74	10,5	58,69
Média	—	—	3,75	—	59,31
Desv. Pad.	—	—	0,05	—	0,89
27	250	16	0,81	5,5	60,28

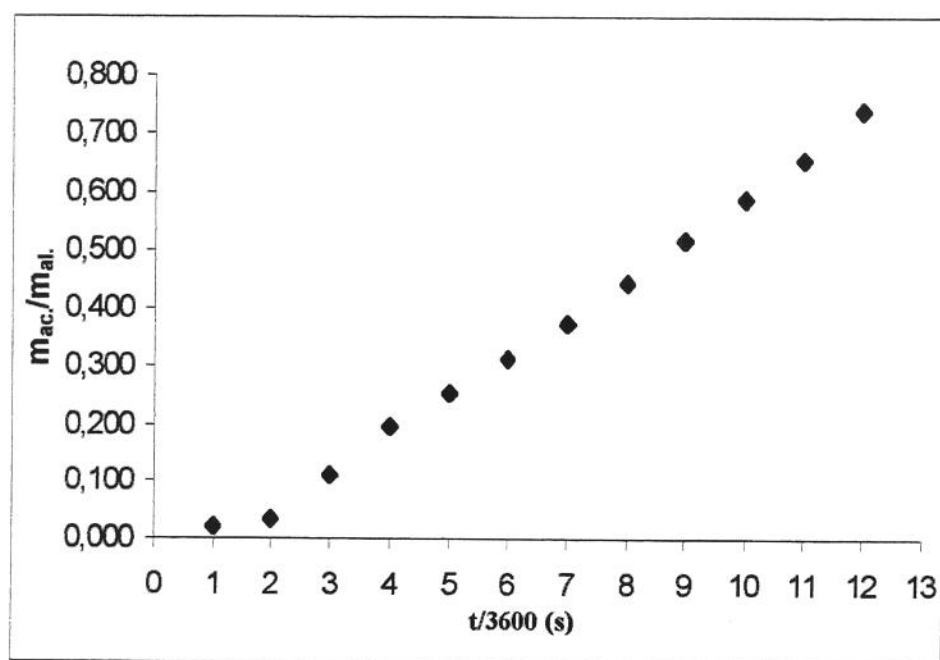


Fig.E.2_1.Curva de extração do ensaio 14 (extrato aquoso)

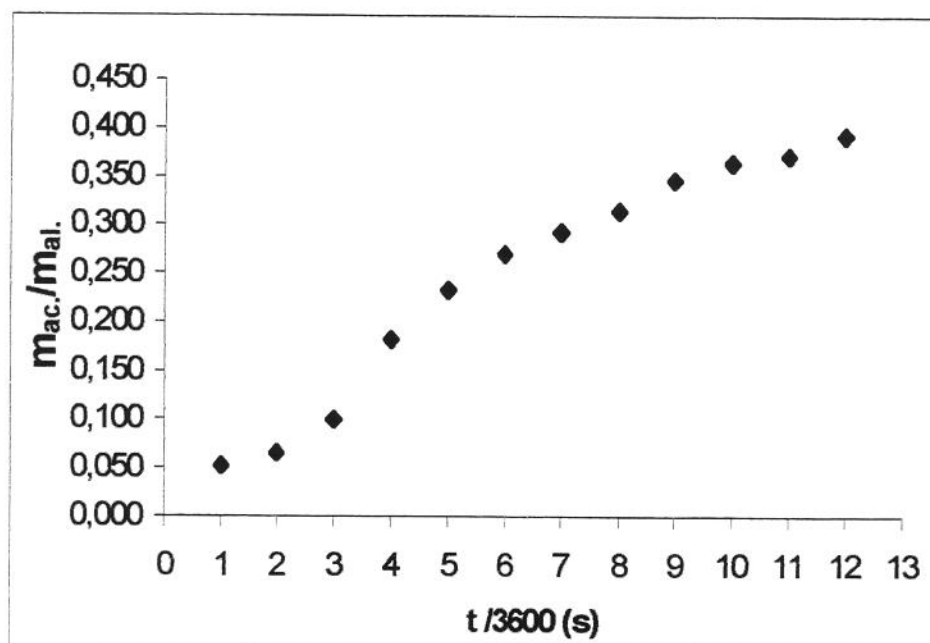


Fig.E.2_2.Curva de extração do ensaio 17 (extrato aquoso)

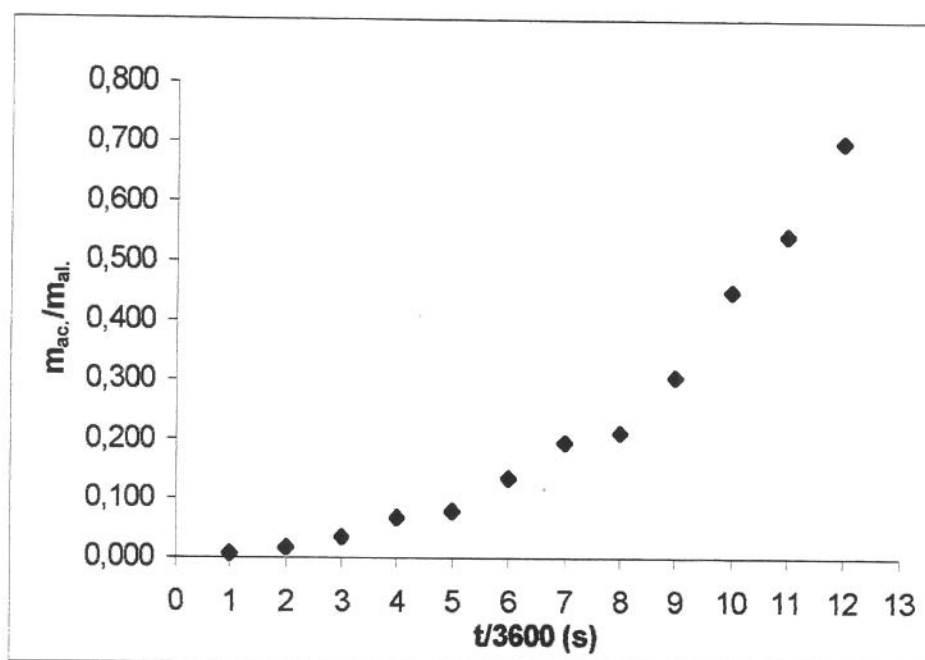


Fig.E.2_3.Curva de extração do ensaio 18 (extrato aquoso)

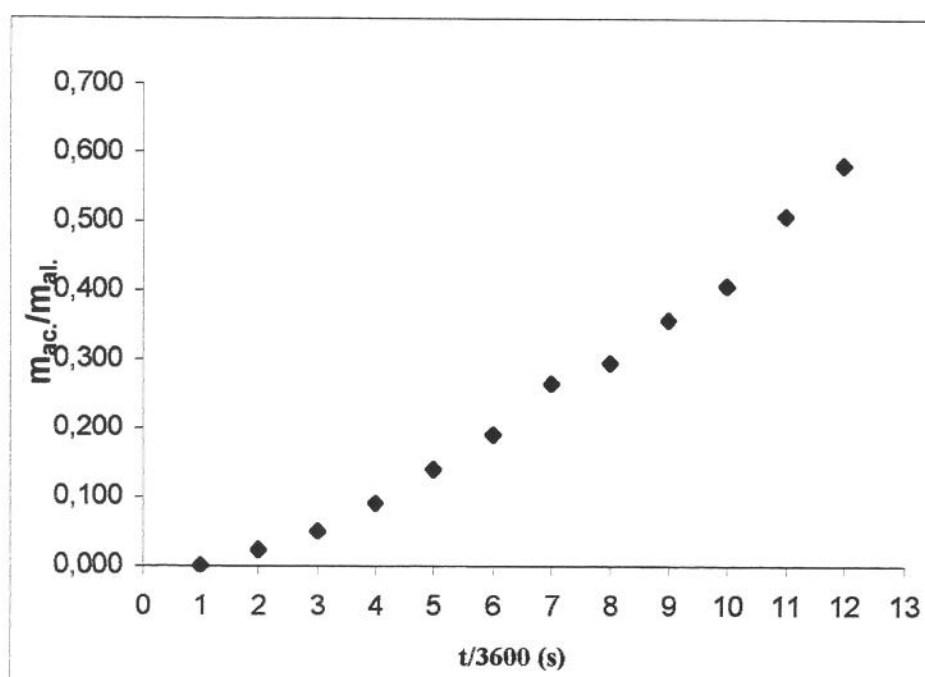


Fig.E.2_4.Curva de extração do ensaio 19 (extrato aquoso)

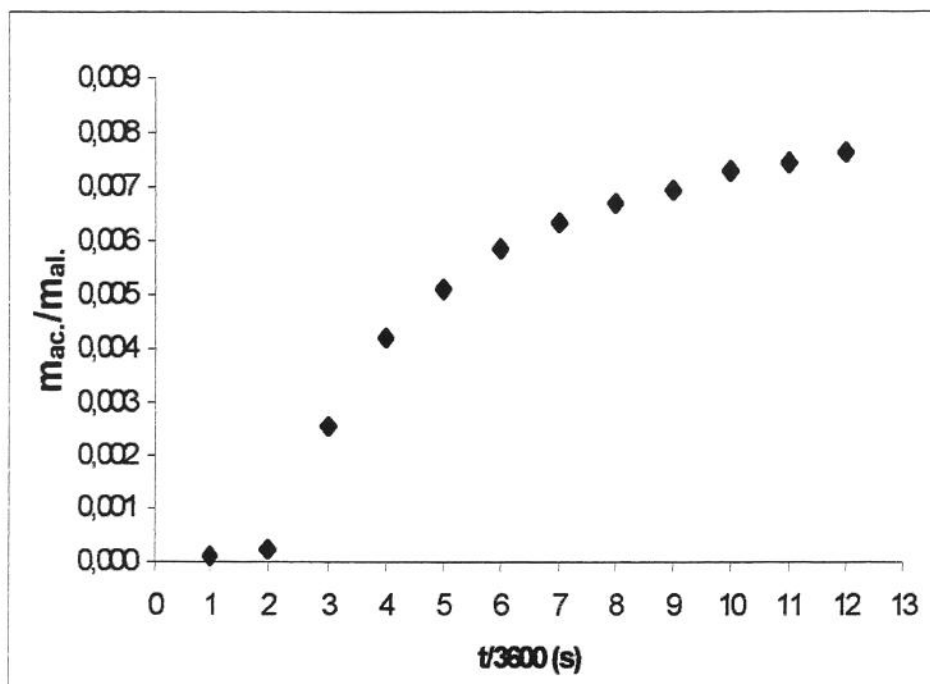


Fig.E.2_5.Curva de extração do ensaio 14 (extrato seco)

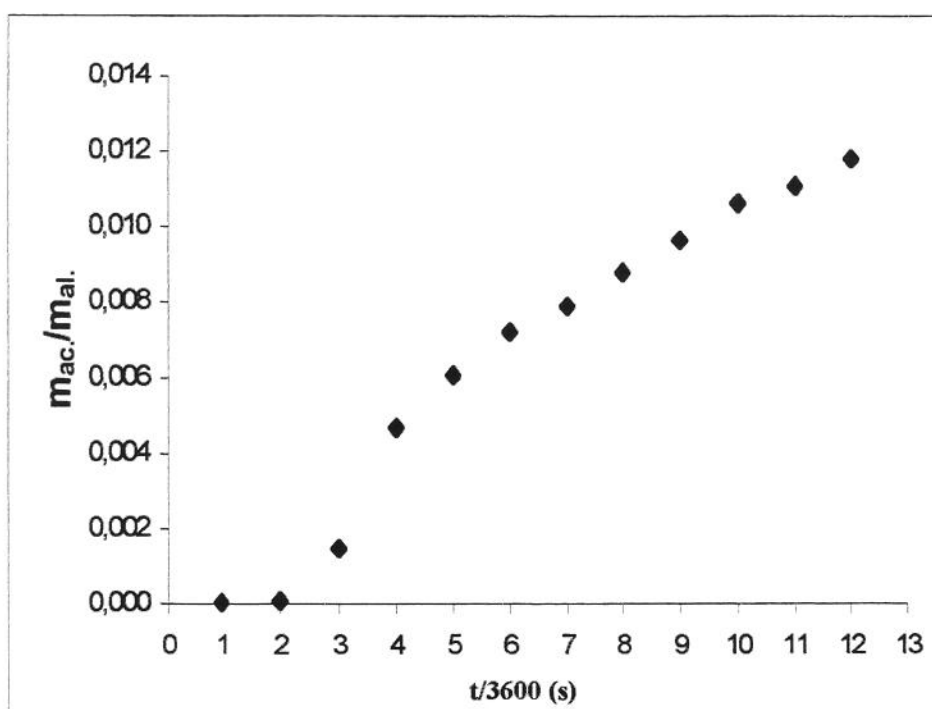


Fig.E.2_6.Curva de extração do ensaio 17 (extrato seco)

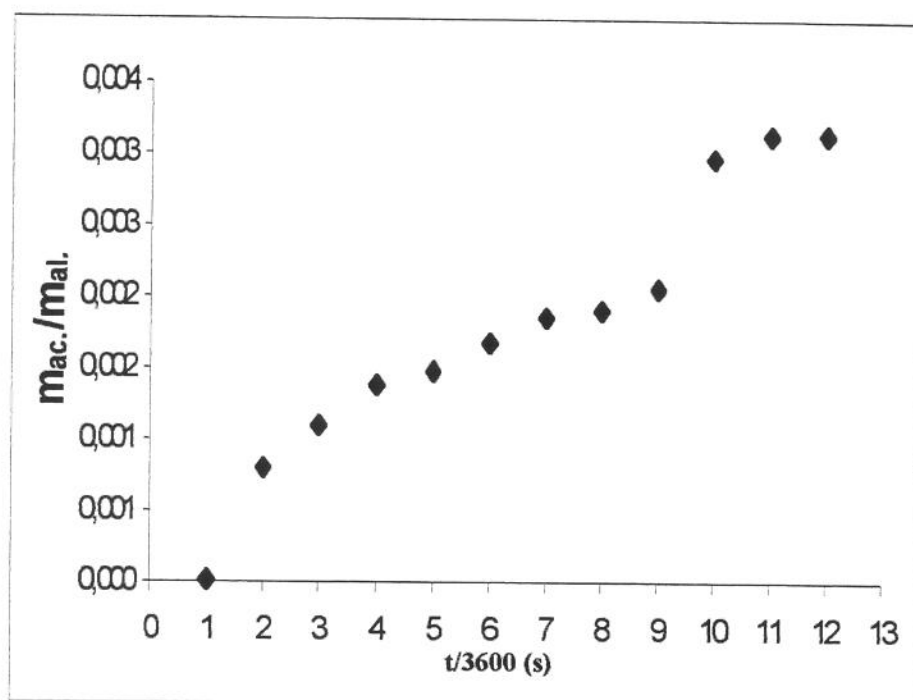


Fig.E.2_7.Curva de extração do ensaio 18 (extrato seco)

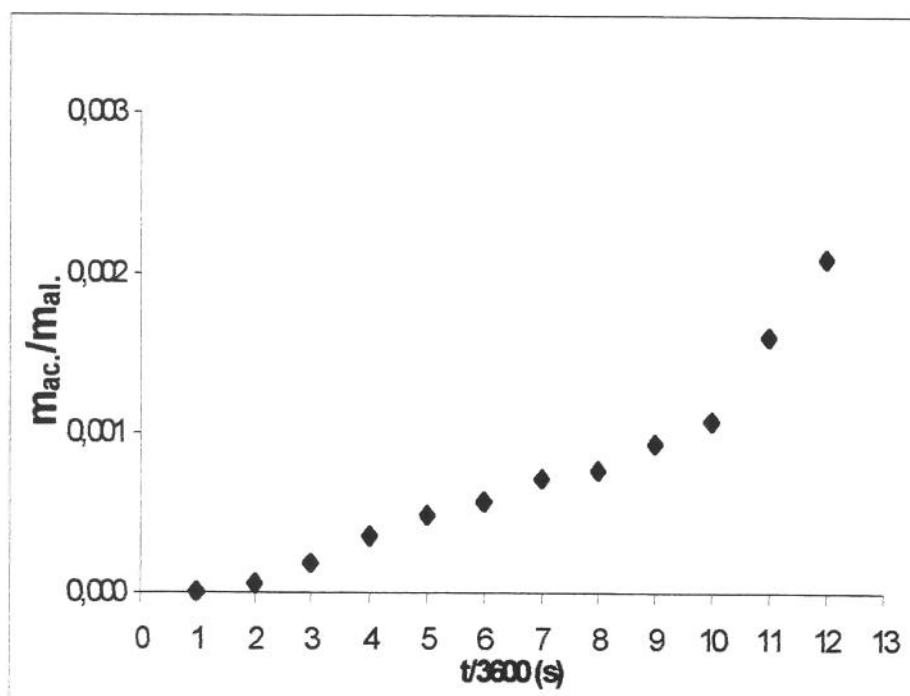


Fig.E.2_8.Curva de extração do ensaio 19 (extrato seco)

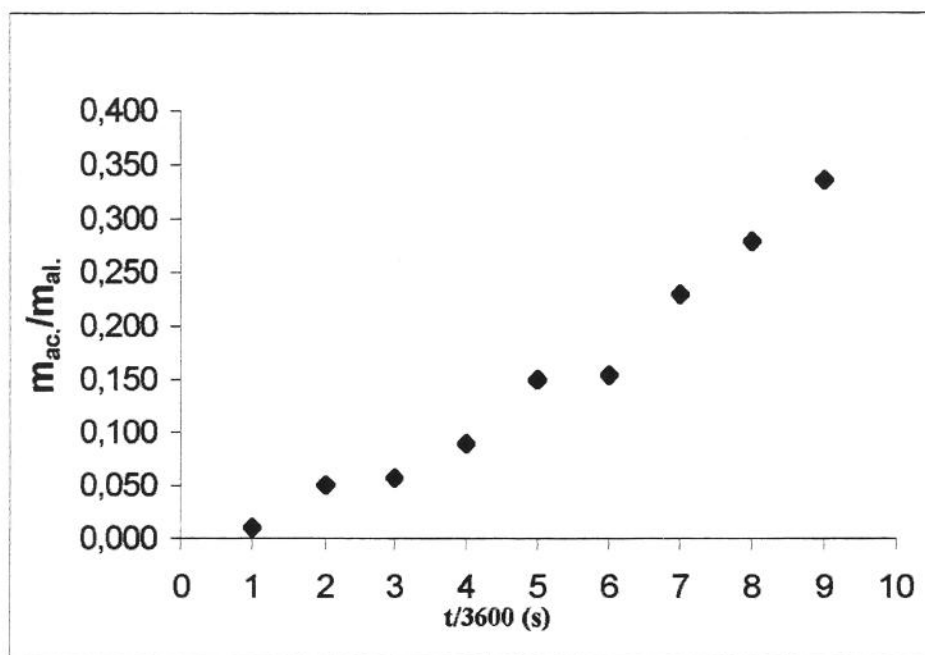


Fig.E.2_9.Curva de extração do ensaio 27 (extrato aquoso)

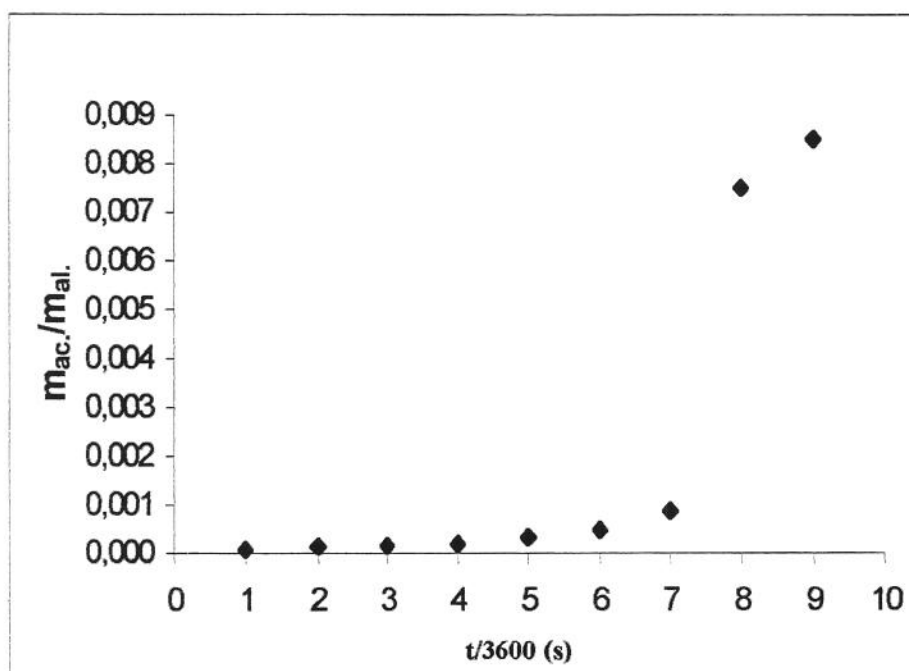


Fig.E.2_10.Curva de extração do ensaio 27 (extrato seco)

E.3. DEMAIS ENSAIOS

Conforme abordado no capítulo III.9 (contratempos), foram encontradas algumas dificuldades ao longo do trabalho realizado. As Tab.E.3_1 e Tab.E.3_2, mostram os resultados obtidos nos ensaios que não apresentaram resultados satisfatórios (2, 4 a 9, 22 e 24) ou que apresentaram suspeita de contaminação com outro co-solvente, uma vez que o procedimento de limpeza/purga da linha não estava padronizado. A Tab.E.3_3 apresenta as respectivas condições operacionais desses ensaios.

A massa de água dos ensaios relativos à etapa de extração não foi evaporada, uma vez que o objetivo era verificar sua presença ou ausência na saída do extrator. Os resultados são mostrados nas Fig.E.3_1 a Fig.E.3_11.

Tab.E.3_1.Dados dos ensaios 1 a 6

t/3600 (s)	Ensaio 1 (m_{ac}/m_{al})	Ensaio 2 (m_{ac}/m_{al})	Ensaio 3 (m_{ac}/m_{al})	Ensaio 4 (m_{ac}/m_{al})	Ensaio 5 (m_{ac}/m_{al})	Ensaio 6 (m_{ac}/m_{al})
1	0,0006	0,0005	0,0008	0,0007	0,0008	0,0016
2	0,0064	0,0009	0,0022	0,0014	0,0014	0,0085
3	0,0132	0,0475	0,0044	0,0020	0,0018	
4	0,0166	0,0480	0,0052	0,0806	0,0023	
5	0,0215	0,0485	0,0080	0,0812	0,0028	
6	0,0242	0,0490	0,0113	0,1119	0,0392	
7	0,0247	0,0496	0,0117			
8	0,0263	0,0499	0,0144			
9	0,0269	0,0504	0,0158			
10	0,0283	0,0516	0,0169			
11	0,0290	0,0522	0,0180			
12	0,0296	0,0529	0,0190			

Tab.E.3 2.Dados dos ensaios 7 a 9, 22 e 24

t/3600	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 22	Ensaio 24
(s)	(m_{ac}/m_{al})	(m_{ac}/m_{al})	(m_{ac}/m_{al})	(m_{ac}/m_{al})	(m_{ac}/m_{al})
1	0,0009	0,0007	0,0004	0,0455	0,0004
2	0,0016	0,0016	0,0007	0,0459	0,0009
3	0,0084	0,0022	0,0009	0,0462	0,0013
4		0,0026	0,0014	0,0466	0,0017
5		0,2342	0,0027	0,0468	0,0237
6		0,2991	0,0231	0,0470	0,0244
7			0,0776	0,0473	
8			0,1494	0,1590	

Tab.E.3 3.Condições de operação dos ensaios 1 a 9, 22 e 24

Ensaio	Pressão	Temp.	M_{alimentação}	Co-solvente	Etapa do	Bomba de
	(bar)	(°C)	(g)	(%)	processo	co-solvente
1	200	30	63,26	—	Pré-trat.	—
2	120	14	61,06	4,0	Extração	Descalibrada
3	200	30	61,60	—	Pré-trat.	—
4	120	16	60,18	4,0	Extração	Descalibrada
5	120	18	60,02	4,0	Extração	Descalibrada
6	120	18	53,10	4,0	Extração	Descalibrada
7	120	20	52,66	4,0	Extração	Descalibrada
8	120	20	62,03	4,0	Pré + ext.	Calibrada
9	120	20	61,86	10,5	Pré + ext.	Calibrada
18	250	30	60,52	5,5	Extração	Calibrada
19	250	30	58,93	5,6	Extração	Calibrada

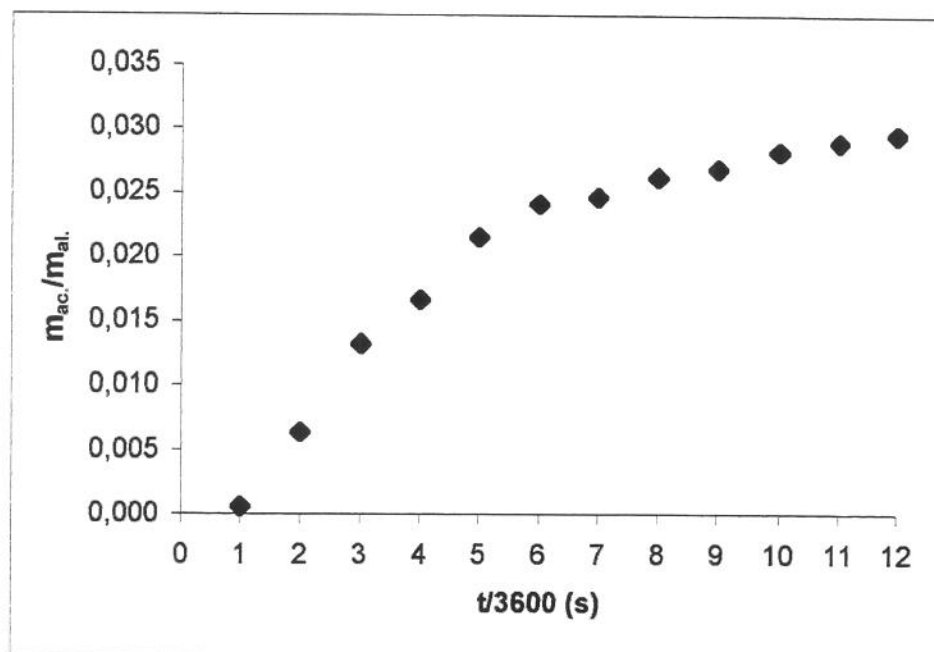


Fig.E.3_1.Dados de extração do ensaio 1

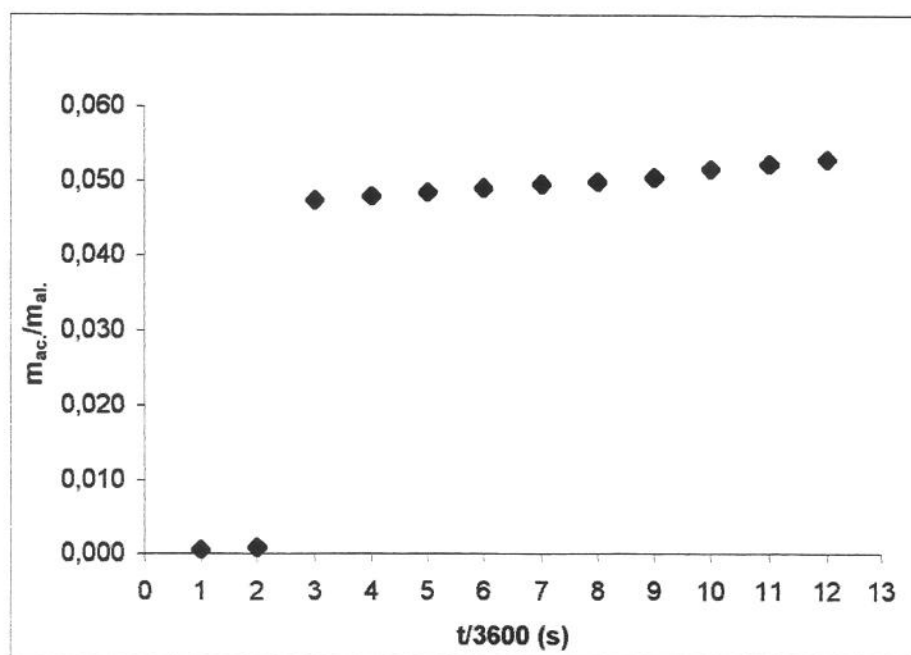


Fig.E.3_2.Dados de extração do ensaio 2

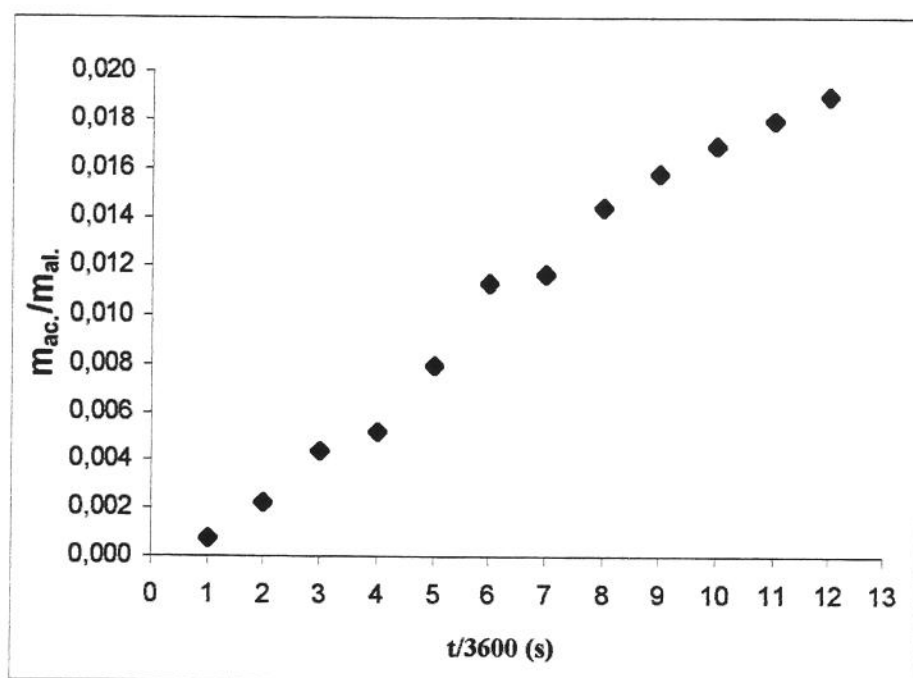


Fig.E.3_3.Curva de extração do ensaio 3

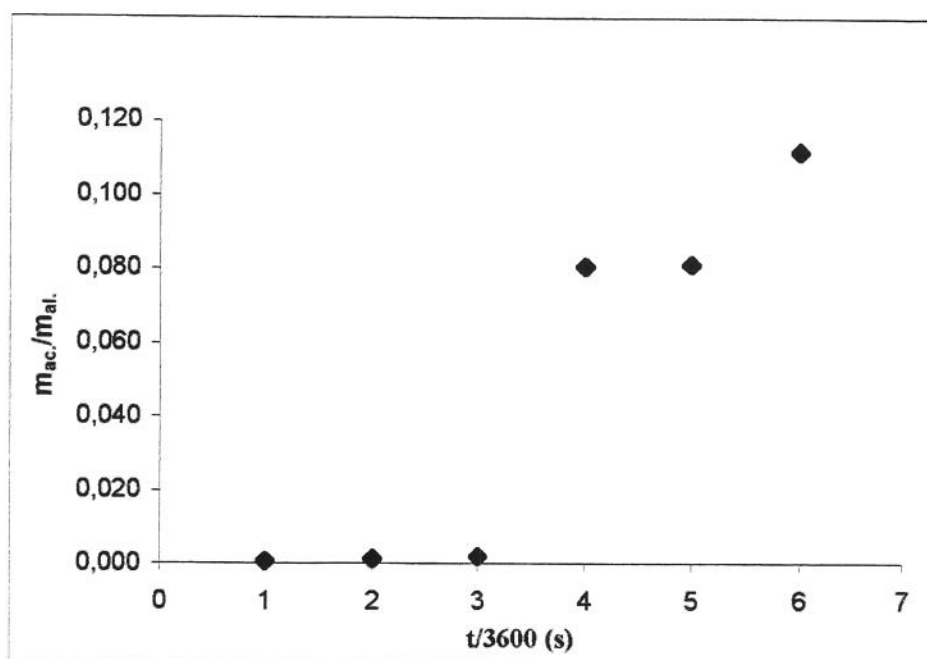


Fig.E.3_4.Dados de extração do ensaio 4

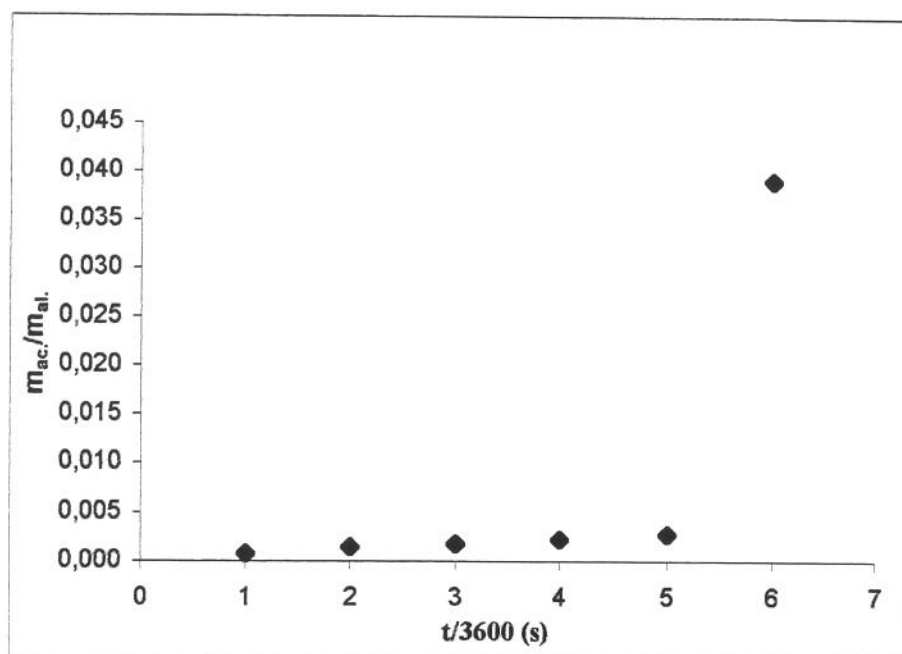


Fig.E.3_5.Dados de extração do ensaio 5

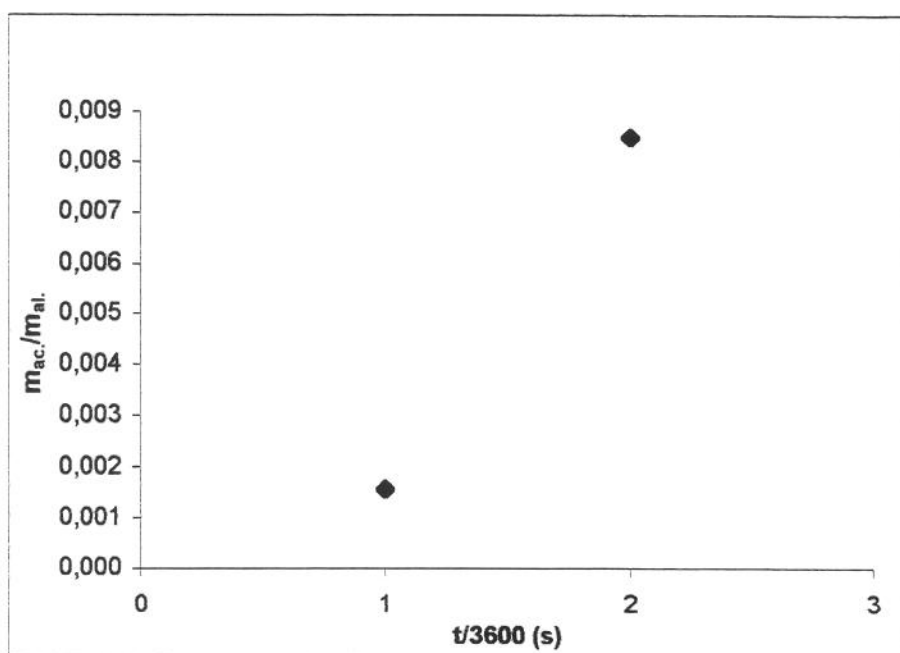


Fig.E.3_6.Dados de extração do ensaio 6

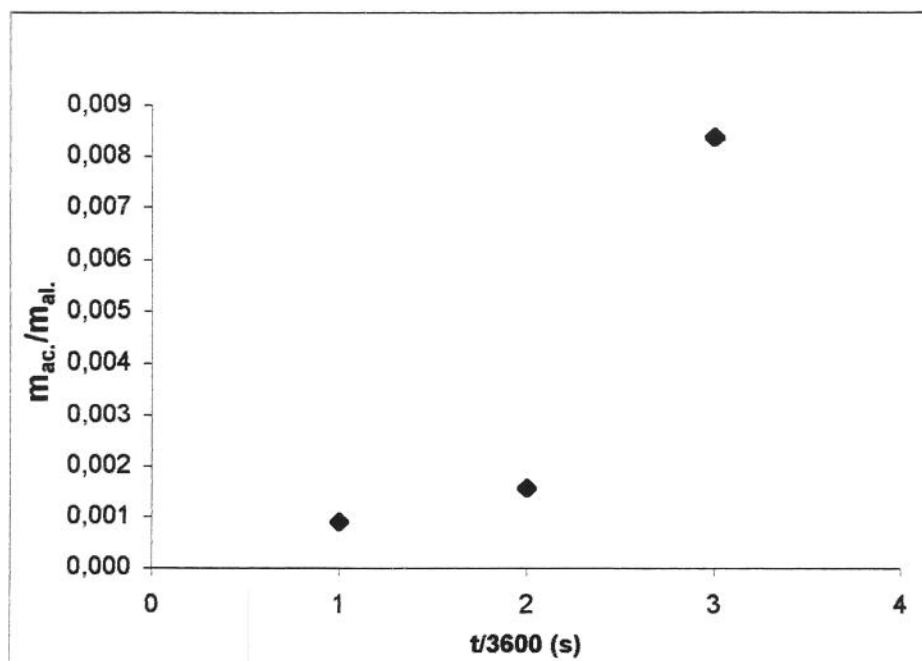


Fig.E.3_7.Dados de extração do ensaio 7

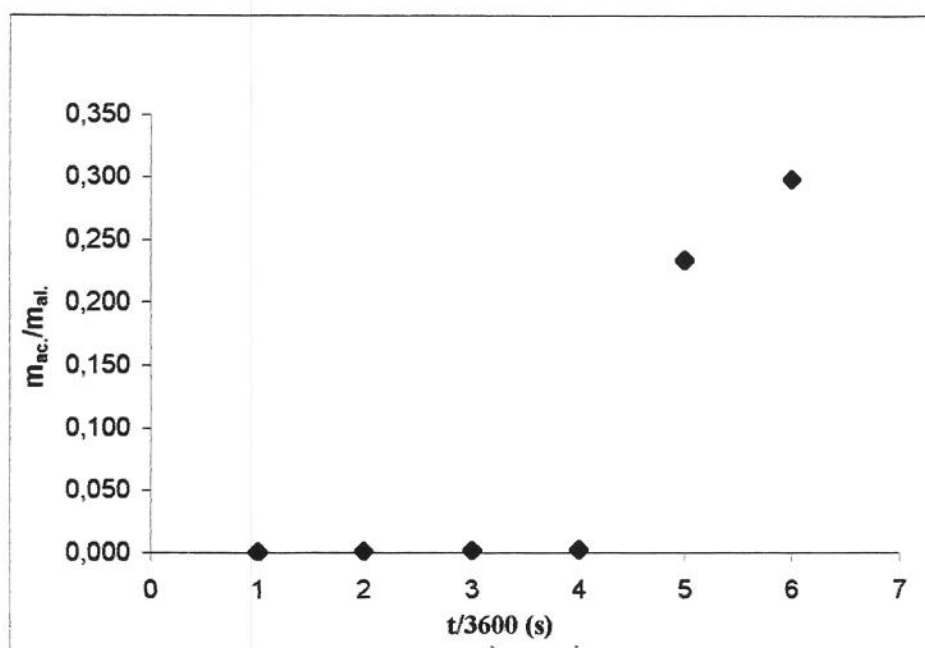


Fig.E.3_8.Dados de extração do ensaio 8

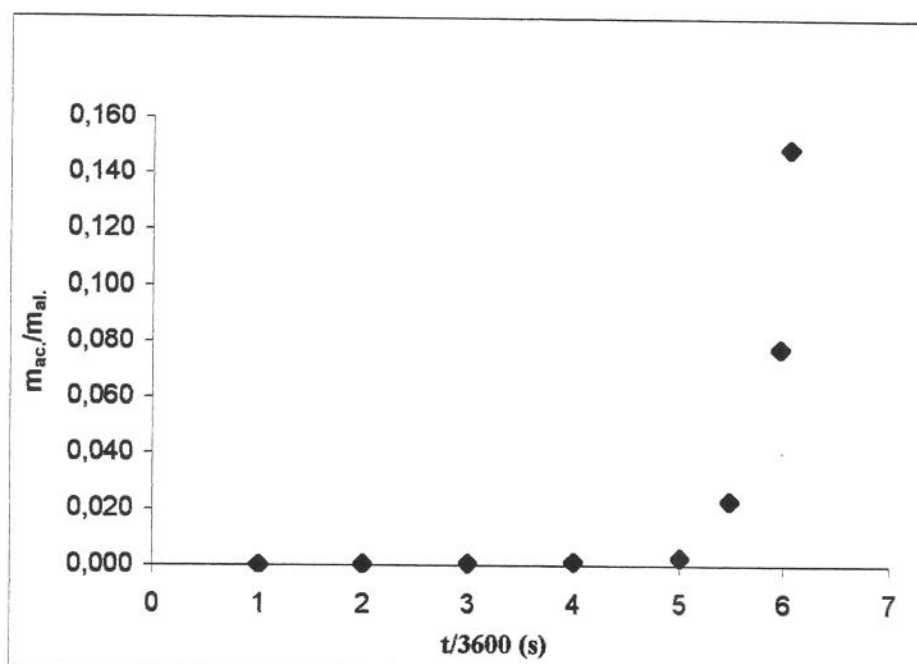


Fig.E.3_9.Dados de extração do ensaio 9

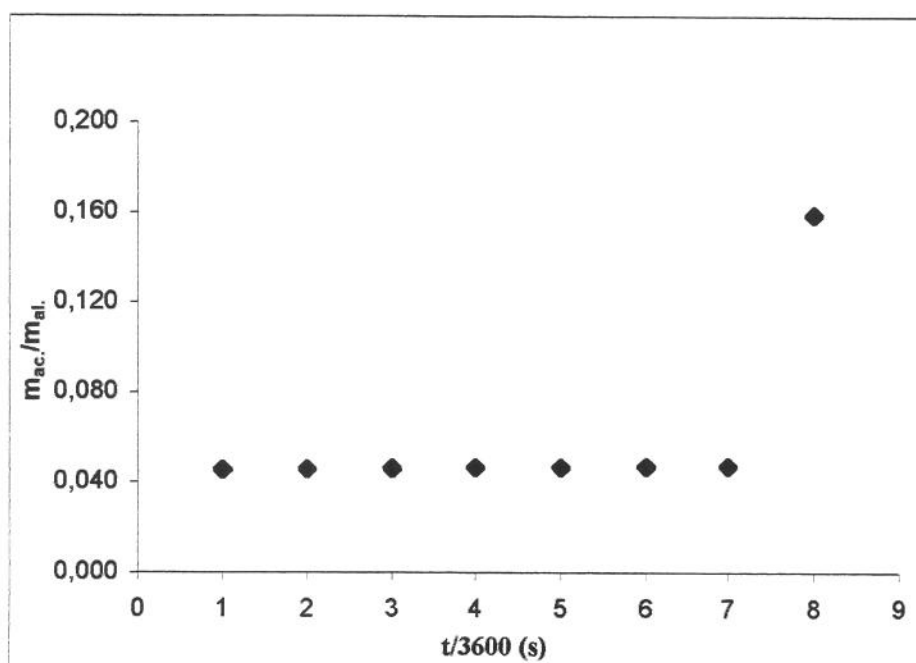


Fig.E.3_10.Dados de extração do ensaio 22

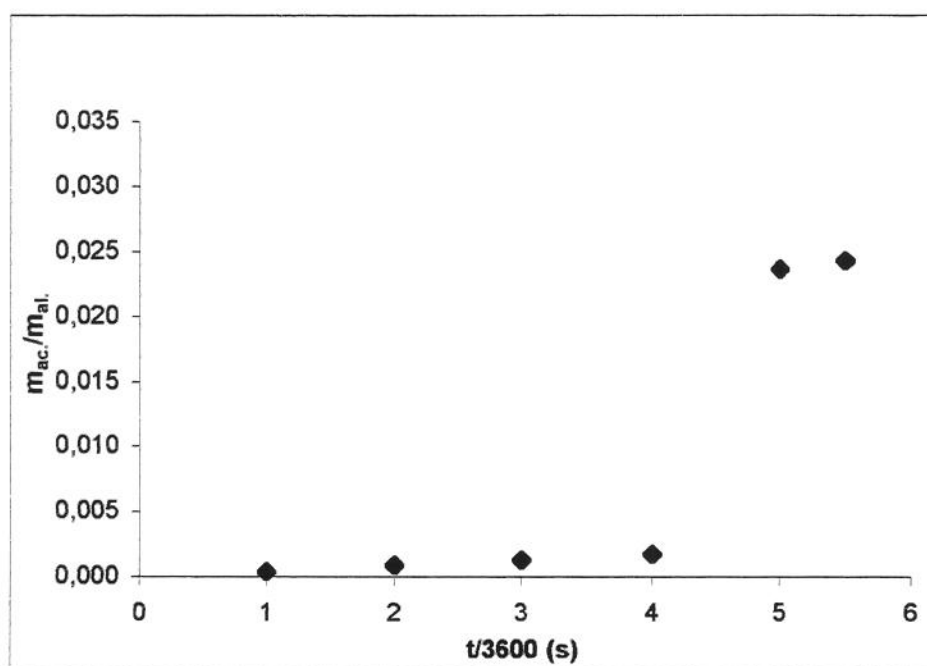


Fig.E.3_11.Dados de extração do ensaio 24

F. ANÁLISES DOS EXTRATOS

F.1. Resultados obtidos no pré-tratamento

Os cromatogramas obtidos das análises por cromatografia gasosa acoplada a espectômetro de massas do ensaio 20 (200 bar/30°C), amostras 7 e 12 são apresentados nas Fig.F.1_1 e Fig.F.1_2 respectivamente.

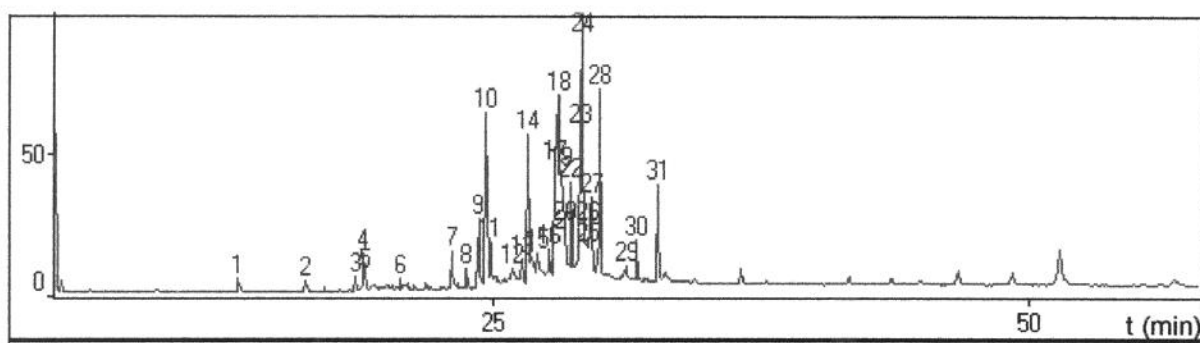


Fig.F.1_1. Cromatograma obtido por CG - EM da amostra 7

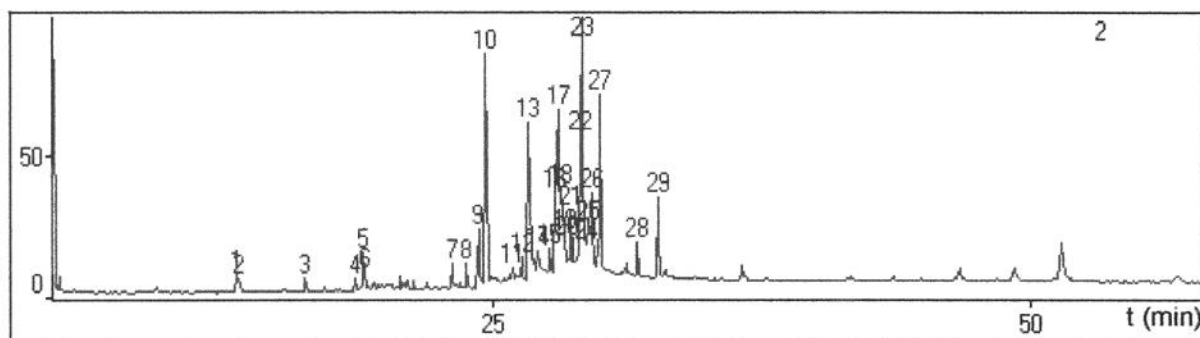


Fig.F.1_2. Cromatograma obtido por CG - EM da amostra 12

As estruturas moleculares dos compostos identificados por CG - EM no pré-tratamento, podem ser observadas através das Fig.F.1_3 a Fig.F.1_13.

a. Sesquiterpenos

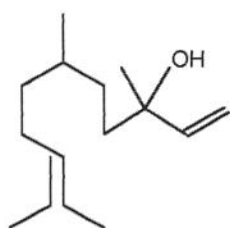


Fig.F.1_3.C₁₅H₂₆O - Nerolidol

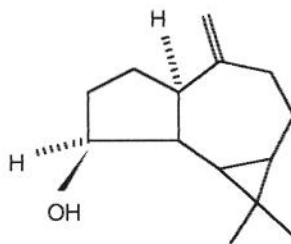


Fig.F.1_4.C₁₅H₂₄O - Espatulenol

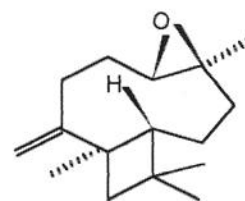


Fig.F.1_5.C₁₅H₂₄O
Óxido de Cariofileno

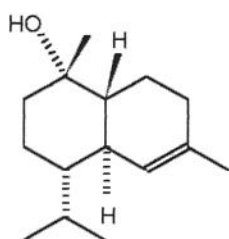


Fig.F.1_6.C₁₅H₂₆O-epi-α-cadinol

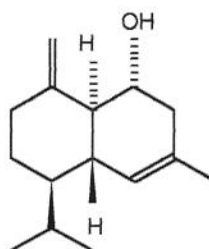


Fig.F.1_7.C₁₅H₂₄O - khusinol

b. Triterpenos

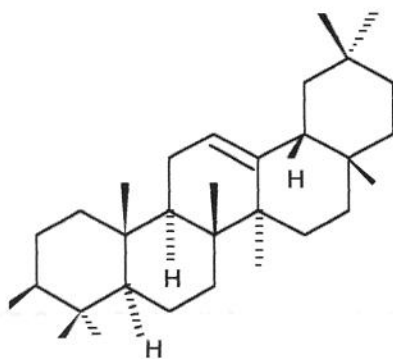


Fig.F.1_8.C₃₀H₅₁O - β-amirina

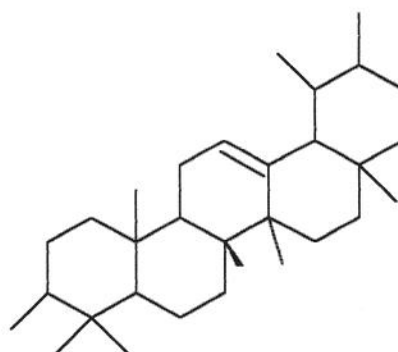
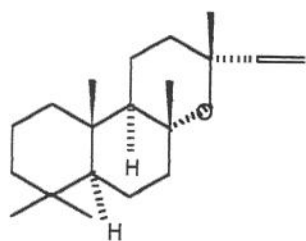
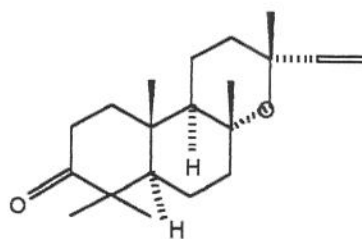
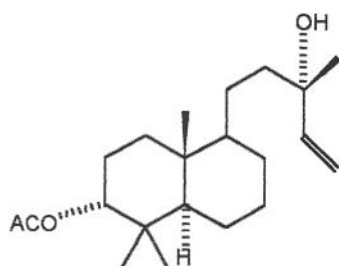
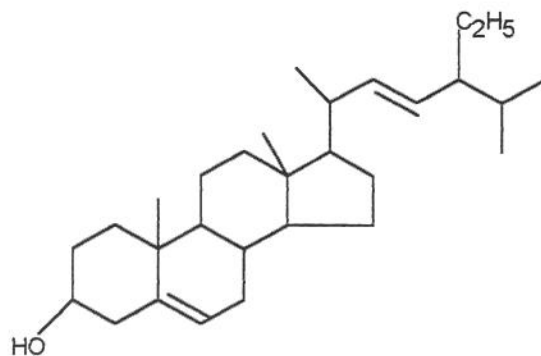


Fig.F.1_9. C₃₀H₅₀O - α-amirina

c. Diterpenos

Fig.F.1_10.C₂₀H₃₄O - Óxido de manoilFig.F.1_11.C₂₀H₃₂O₂ - Ceto-óxido de manoilFig.F.1_12.C₂₂H₃₆O₃ - 3-α-acetoxi-manool

d. Esteróide

Fig.F.1_13.C₂₉H₄₈O - estigmasterolF.2. Resultados obtidos das extrações com CO₂+água

A Fig.F.2_1 refere-se à curva de calibração das análises de espectrofotometria por UV e a

Fig.F.2_2 ao espectro de absorbância do padrão rebaudiosídeo A (95%).

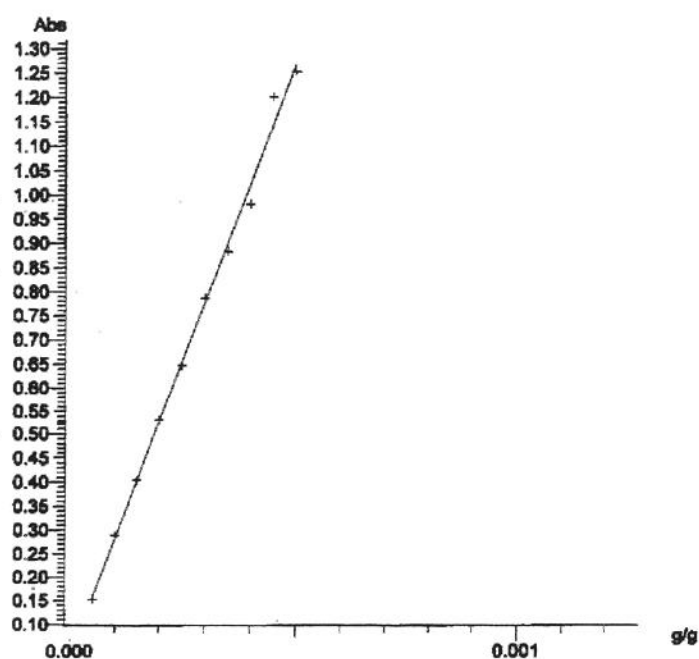


Fig.F.2_1.Curva de calibração obtida por UV

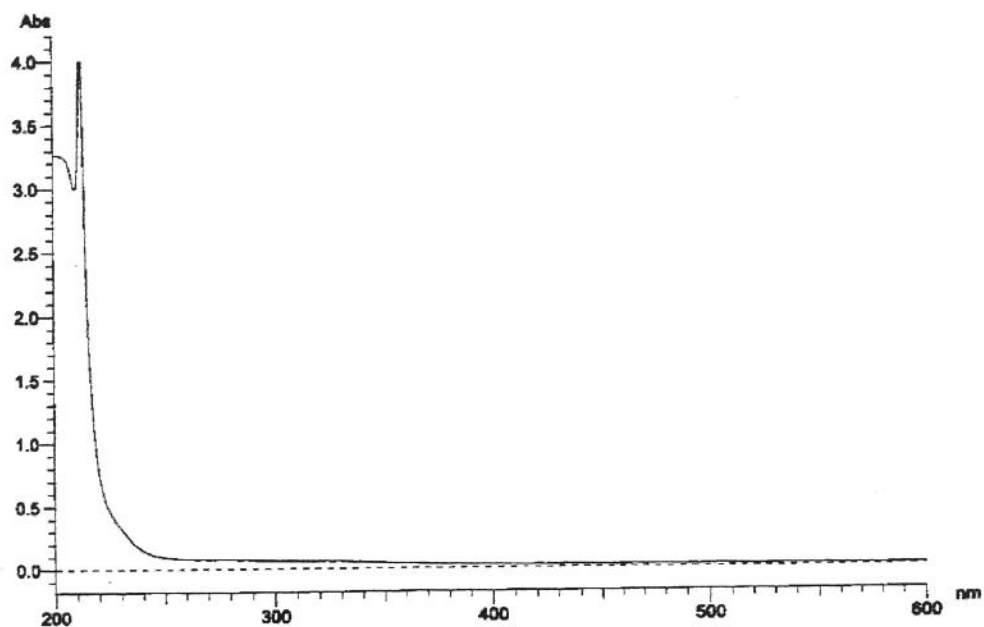


Fig.F.2_2.Espectro de absorbância no UV para o padrão rebaudiosídeo A

As Fig.F.2_3 a Fig.F.2_6 apresentam os espectros de absorbância no UV.

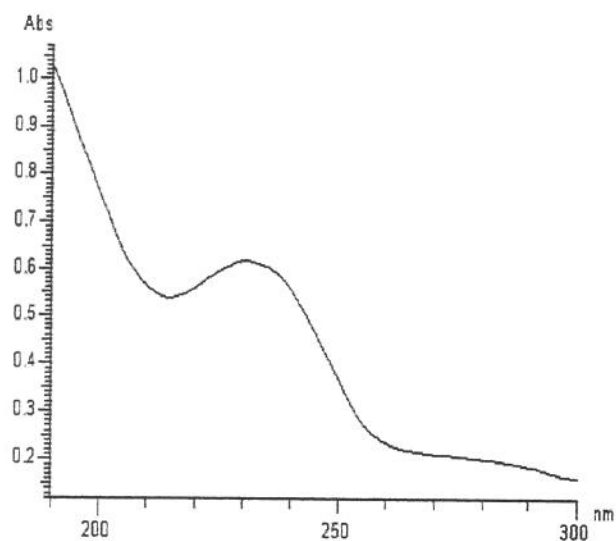


Fig.F.2_3. Espectro de absorbância no UV amostra 1 - ensaio 14 (120 bar/16°C)

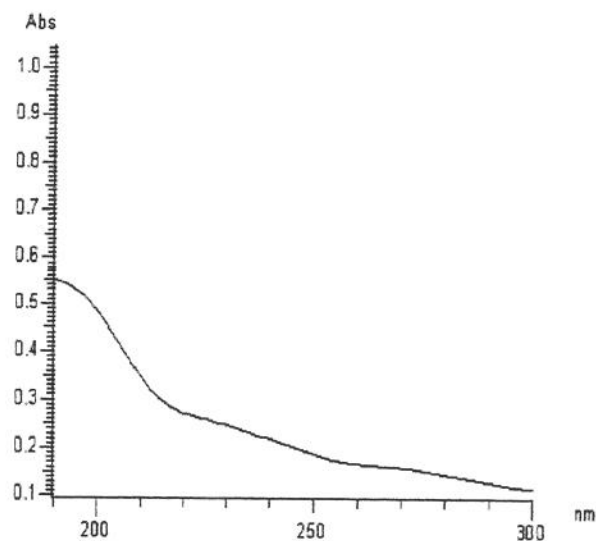


Fig.F.2_4. Espectro de absorbância no UV amostra 10 - ensaio 14 (120 bar/16°C)

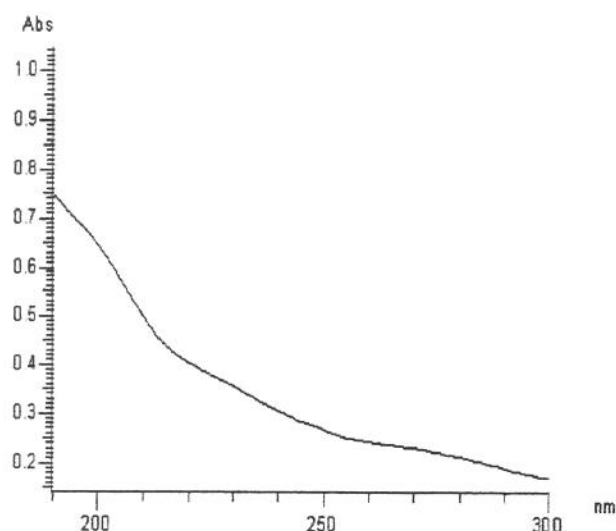


Fig.F.2_5. Espectro de absorbância no UV amostra 1 - ensaio 17 (250 bar/16°C)

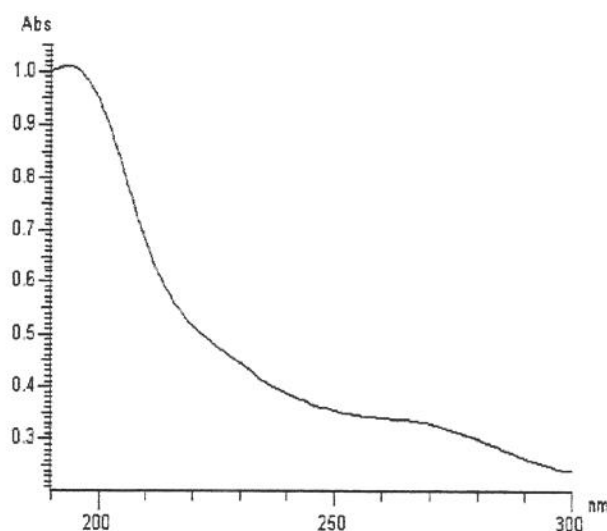


Fig.F.2_6. Espectro de absorbância no UV amostra 10 - ensaio 17 (250 bar/16°C)

As curvas padrão das análises da estévia por CLAE realizadas na *Steviafarma* (PR – Brasil) para o esteviosídeo e rebaudiosídeo A são apresentadas nas Fig.F.2_7 e Fig.F.2_8 respectivamente. Os cromatogramas da estévia pré-tratada e da estévia pós extração com

CO₂+água são apresentadas nas Fig.F.2_9 a Fig.F.2_10. A Tab.F.2_1 apresenta a área dos picos obtida para esteviosídeo e rebaudiosídeo A nos cromatogramas e a respectiva diluição para cada amostra.

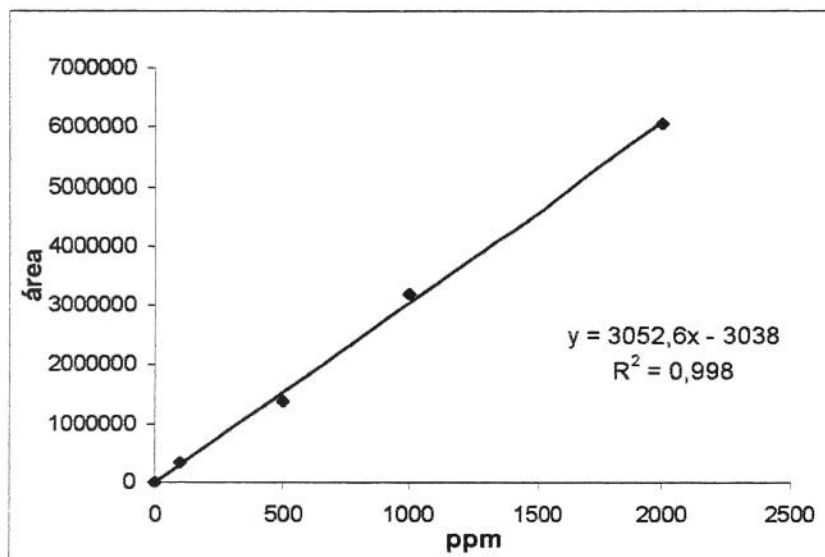


Fig.F.2_7.Curva padrão para o esteviosídeo

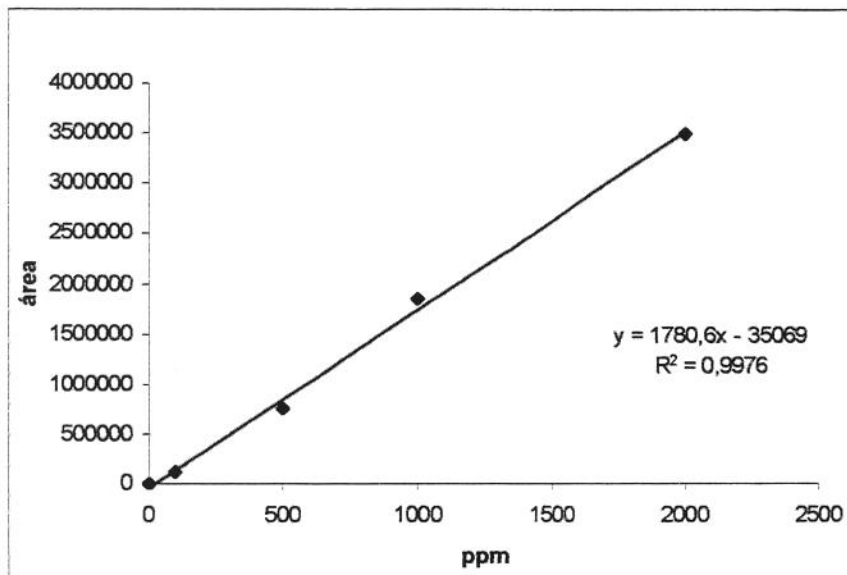


Fig.F.2_8.Curva padrão para o rebaudiosídeo A

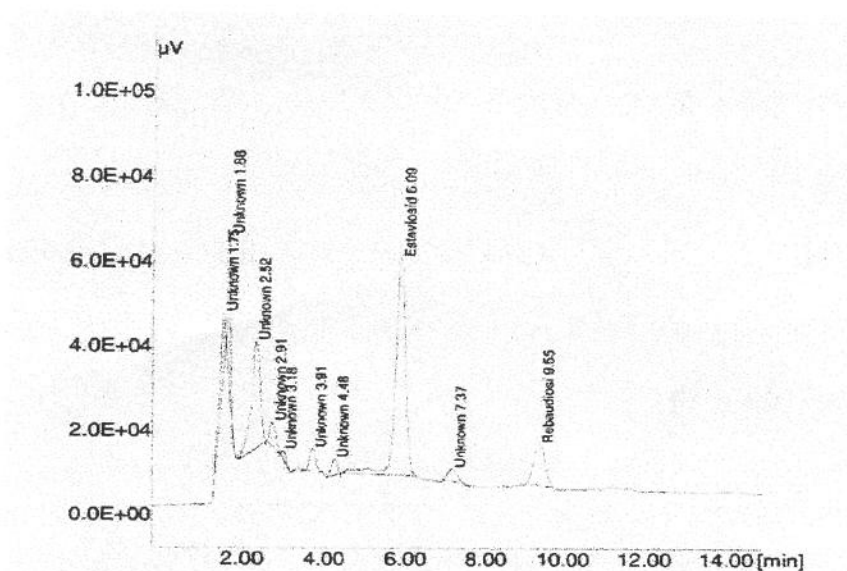


Fig.F.2_9.Cromatograma obtido por CLAE da estévia pré-tratada

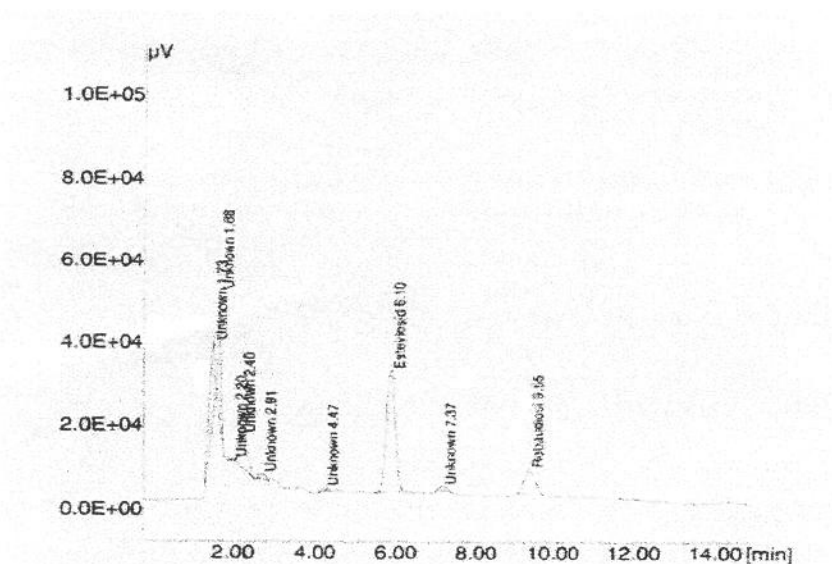


Fig.F.2_10.Cromatograma obtido por CLAE da estévia pós extração

Tab.F.2 1.Área dos picos nos cromatogramas

Amostra	Esteviosídeo	Rebaudiosídeo A	Razão
Matéria-prima	783097,6	170621,3	1:3
Estévia pré-tratada	864887,0	186155,0	1:3
Estévia pós extração	424494,6	112501,6	1:3

A identificação e quantificação dos glicosídeos só foi possível através da análise por CLAE, devido a fatores descritos anteriormente. A Fig.F.2_11 apresenta a curva padrão de esteviosídeo obtida por CLAE (UEM - Maringá/Brasil) e a Fig.2_12 a curva padrão de rebaudiosídeo A, bem como as equações usadas para o cálculo das concentrações destas substâncias nas amostras obtidas nos ensaios 14 (120 bar/16°C), 17 (250 bar/16°C), 18 (250 bar/10°C) e 19 (120 bar/10°C).

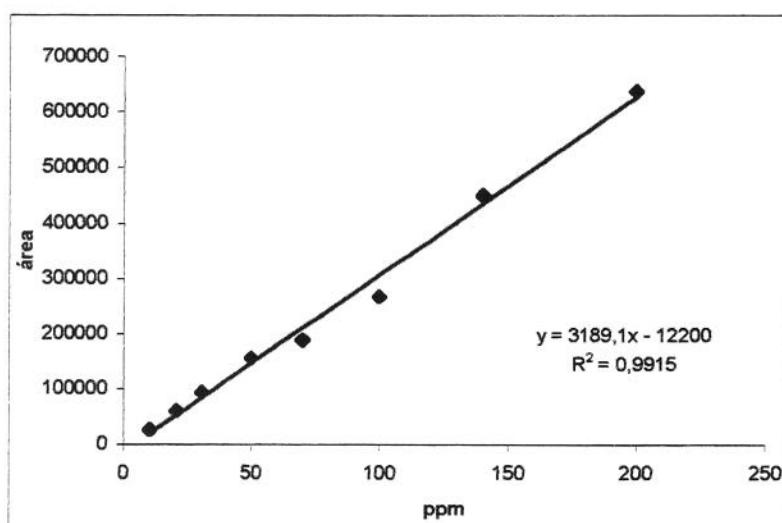


Fig.F.2_11.Curva padrão de esteviosídeo

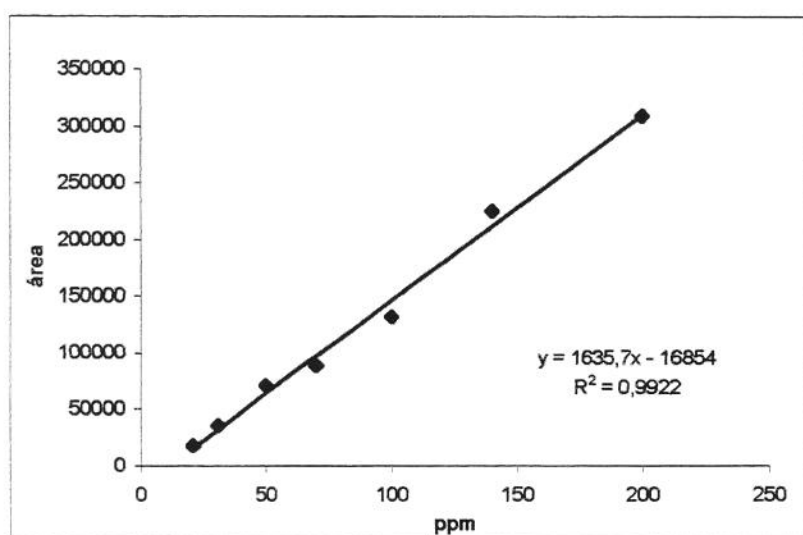


Fig.F.2_12.Curva padrão de rebaudiosídeo A

A Tab.F.2_2 apresenta a área dos picos obtida para o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A nos cromatogramas e a respectiva diluição para cada amostra. Os cromatogramas dos extratos obtidos por CLAE (*UEM* - Maringá/Brasil) são apresentados nas Fig.F.2_13 a Fig.F.2_15.

Tab.F.2_2.Área dos picos nos cromatogramas

Amostra	Esteviosídeo	Rebaudiosídeo A	Diluição
4 - ensaio 14	614614,2	176373,8	1:20
4 - ensaio 17	436627,0	113614,8	1:50
4 - ensaio 18	975509,1	234910,4	—
8 - ensaio 14	173593,7	39071,2	1:20
8 - ensaio 17	363627,1	104916,8	1:20

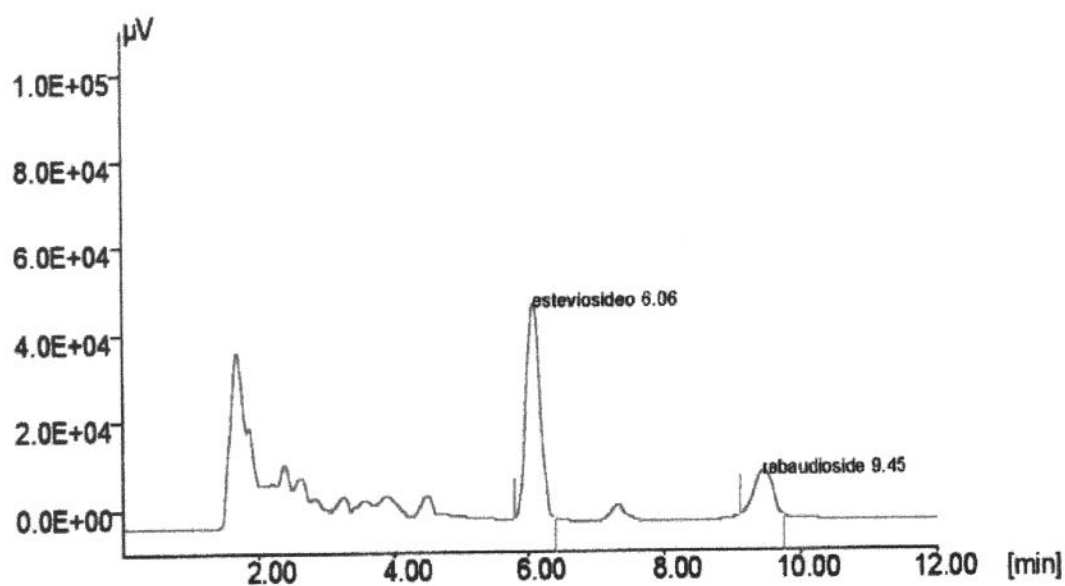


Fig.F.2_13.Cromatograma obtido por CLAE da amostra 4 - ensaio 14 (120 bar/16°C)

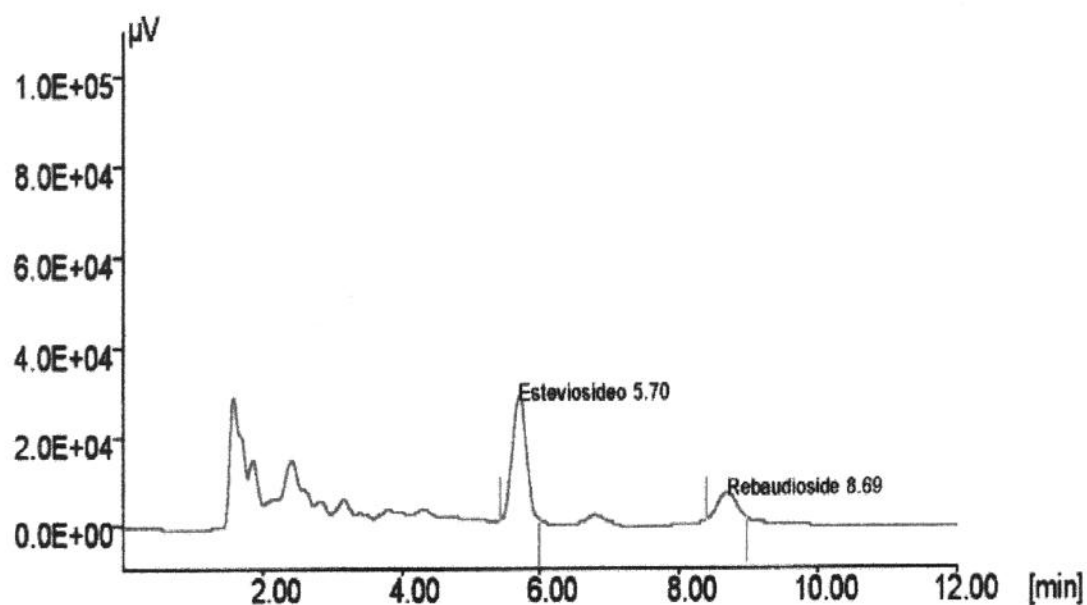


Fig.F.2 14. Cromatograma obtido por CLAE da amostra 8 - ensaio 14 (120 bar/16°C)

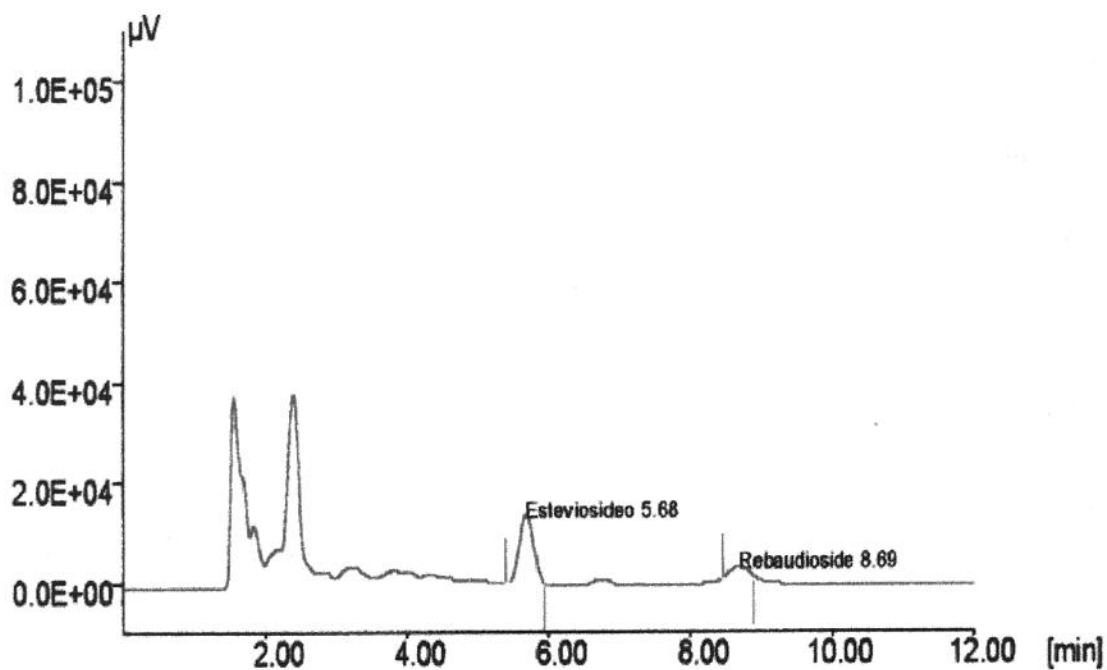


Fig.F.2 15. Cromatograma obtido por CLAE da amostra 8 - ensaio 17 (250 bar/16°C)

G. SOFTWARE UTILIZADO

Os dados de massa (g) x tempo de extração (min.) obtidos nos ensaios foram analisados em um programa escrito no pacote estatístico SAS, através de regressão linear e não-linear. O mesmo é a seguir descrito com dados do ensaio 24 (120 bar/10°C).

G.1. Regressão linear

```
options ls=80 ps=50;
Title 'Ensaio cinetico_Exp.19: 120 bar / 10oC, Simone';
data E170802;
input tmin mext;
AL1 = max(tmin-594,0);

Cards;
60    0,0003
120    0,0032
180    0,0109
240    0,0210
300    0,0287
360    0,0334
420    0,0422
480    0,0450
540    0,0549
600    0,0632
660    0,0943
720    0,1227
Proc Reg;
    Model mext = tmin AL1;
    Output out = a p=mexthat r= Mres;
Proc print;
Axis1 order = (0 to 0,15 by 0,05);
Proc gplot; Plot Mres*mexthat;
Proc gplot;
    Symbol1 value = diamond color = black; Symbol2 value = star color = black;
Plot1 mext*tmin/legend overlay vaxis = axis1; Plot2 mexthat*tmin/legend overlay vaxis =
axis1;
Run;
```

G.2. Regressão não linear

```

options ls=80 ps=50;
Title 'Ensaio cinetico-Exp.19: 120 bar / 10oC, Simone';
data E170802;
input tmin mext;
AL1 = max(tmin-594,0);

Cards;
60      0,0003
120     0,0032
180     0,0109
240     0,0210
300     0,0287
360     0,0334
420     0,0422
480     0,0450
540     0,0549
600     0,0632
660     0,0943
720     0,1227
Proc Nlin;
      parms  b0 = -0,008247
              b1 = 0,000116
              b2 = 0,000379

              knot1 = 594;

      AL1 = max(tmin-knot1,0);

      Model mext = b0 + b1*tmin + b2*AL1;
      Output out = a p=mextthat r= Mres;
Axis order = (0 to 0,2 by 0,05);
Proc gplot; Plot Mres*mextthat;
Proc gplot;
      Symbol1 value = diamond color = black; Symbol2 value = star color = black;
Plot1 mext*tmin/legend overlay vaxis = axis1; Plot2 mextthat*tmin/legend overlay vaxis =
axis1;

Run;

```

H. DADOS OBTIDOS NO PROGRAMA SAS

H.1. PRÉ-TRATAMENTO

Os resultados obtidos no programa SAS relativos aos ensaios 10, 12, 13, 15, 16, 20, 21, 23, 25 e 26, tanto para regressão linear quanto para não-linear, são apresentados a seguir.

H.1_1. Ensaio 10 (250 bar/30°C)

a) Regressão linear

Ensaio cinetico_Exp.10: 250 bar / 30oC, Simone 25
08:46 Wednesday, December 6, 2000

The REG Procedure
Model: MODEL1
Dependent Variable: mext

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.54941	0.27471	587.55	<.0001
Error	9	0.00421	0.00046		
Corrected Total	11	0.55362			

Root MSE	0.02162	R-Square	0.9924
Dependent Mean	0.37173	Adj R-Sq	0.9907
Coeff Var	5.81687		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	-0.07273	0.01901	-3.83	0.0040
tmin	1	0.00124	0.00007	17.05	<.0001

AL1 1 -0.00038 0.00012 -3.19 0.0110

Ensaio cinetico_Exp.10: 250 bar / 30oC, Simone 26
08:46 Wednesday, December 6, 2000

Obs	tmin	mext	AL1	mexthat	Mres
1	60	0.0339	0	0.00166	0.032242
2	120	0.0649	0	0.07604	-0.011143
3	180	0.1028	0	0.15043	-0.047628
4	240	0.2416	0	0.22481	0.016786
5	300	0.2919	0	0.29920	-0.007299
6	360	0.3904	0	0.37358	0.016816
7	420	0.4352	52	0.42786	0.007336
8	480	0.4699	112	0.47905	-0.009150
9	540	0.5295	172	0.53024	-0.000736
10	600	0.5810	232	0.58142	-0.000422
11	660	0.6369	292	0.63261	0.004292
12	720	0.6827	352	0.68379	-0.001095

b) Regressão não-linear

Ensaio cinetico_Exp.10: 250 bar / 30oC, Simone 28
08:46 Wednesday, December 6, 2000

The NLIN Procedure

Parameter	Approx Estimate	Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.0726	0.0214	-0.1219	-0.0234
b1	0.00124	0.000091	0.00103	0.00145
b2	-0.00039	0.000129	-0.00068	-0.00009
knot1	368.8	69.5541	208.4	529.2

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.8987170	0.6354889	0.3320899
b1	-0.8987170	1.0000000	-0.7071068	-0.5393257
b2	0.6354889	-0.7071068	1.0000000	-0.1018107
knot1	0.3320899	-0.5393257	-0.1018107	1.0000000

c) Gráfico de dispersão

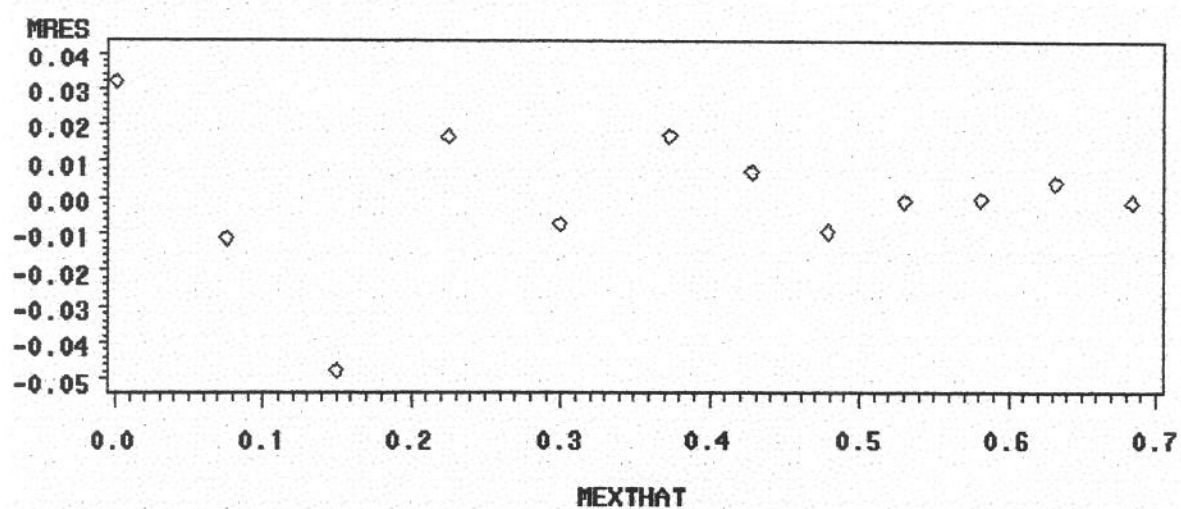


Fig.H.1_1_c.Gráfico de dispersão - ensaio 10

d) Gráfico de ajuste

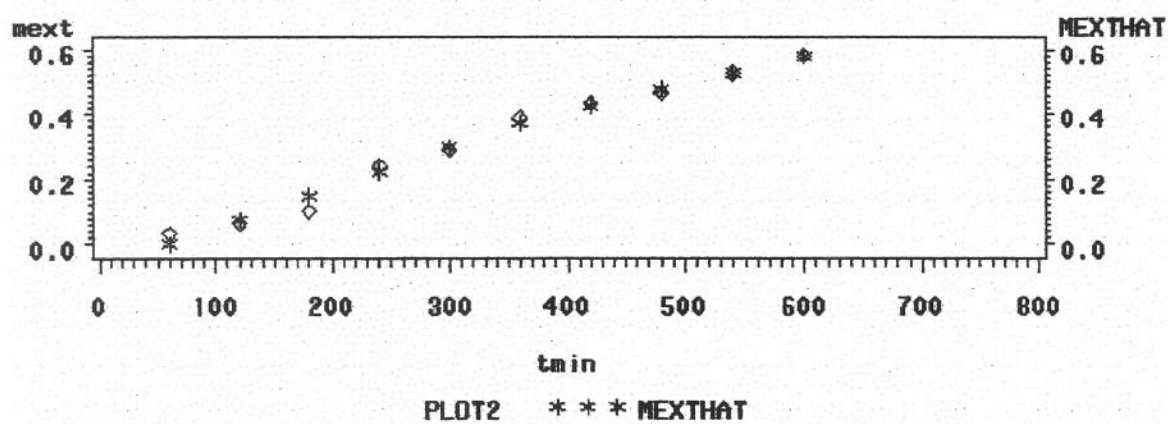


Fig.H.1_1_d.Gráfico de ajuste - ensaio 10

H.1_2. Ensaio 12 (200 bar/30°C)

a) Regressão linear

Ensaio cinetico_Exp.12: 200 bar / 30oC, Simone 45
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

Model: MODEL1

Dependent Variable: MEXT

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.68019	0.34010	1159.757	0.0001
Error	9	0.00264	0.00029		
C Total	11	0.68283			
Root MSE		0.01712	R-square	0.9961	
Dep Mean		0.51768	Adj R-sq	0.9953	
C.V.		3.30796			

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.124721	0.01992435	-6.260	0.0001
TMIN	1	0.002404	0.00010722	22.420	0.0001
AL1	1	-0.001606	0.00012984	-12.369	0.0001

Ensaio cinetico_Exp.12: 200 bar / 30oC, Simone 46
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTHAT	MRES
1	60	0.0305	0	0.01951	0.010991
2	120	0.1414	0	0.16374	-0.022338
3	180	0.3197	0	0.30797	0.011733
4	240	0.4471	5	0.44417	0.002934
5	300	0.4729	65	0.49204	-0.019138
6	360	0.5350	125	0.53991	-0.004910
7	420	0.5869	185	0.58778	-0.000882
8	480	0.6467	245	0.63565	0.011046
9	540	0.7125	305	0.68353	0.028974
10	600	0.7397	365	0.73140	0.008302
11	660	0.7728	425	0.77927	-0.006470
12	720	0.8069	485	0.82714	-0.020242

b) Regressão não-linear

Ensaio cinetico_Exp.12: 200 bar / 30oC, Simone 47
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton					
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.124721	0.002404	-0.001606	235.000000	0.002639
1	-0.125333	0.002410	-0.001612	234.383302	0.002639
2	-0.125333	0.002410	-0.001612	234.385481	0.002639

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	3.8960435546	0.9740108887
Residual	8	0.0026388554	0.0003298569
Uncorrected Total	12	3.8986824100	

(Corrected Total) 11 0.6828335425

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.1253333	0.027742858	-0.18930910	-0.06135757
B1	0.0024100	0.000214041	0.00191642	0.00290358
B2	-0.0016117	0.000217579	-0.00211344	-0.00110995
KNOT1	234.38548	17.963010281	192.96230550	275.80865674

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
ffffffffff	1	-0.9258201	0.9107651111	0.6460505874
ffff		1	-0.983738754	-0.845679163
			1	0.7723820928
				1

c) Gráfico de dispersão

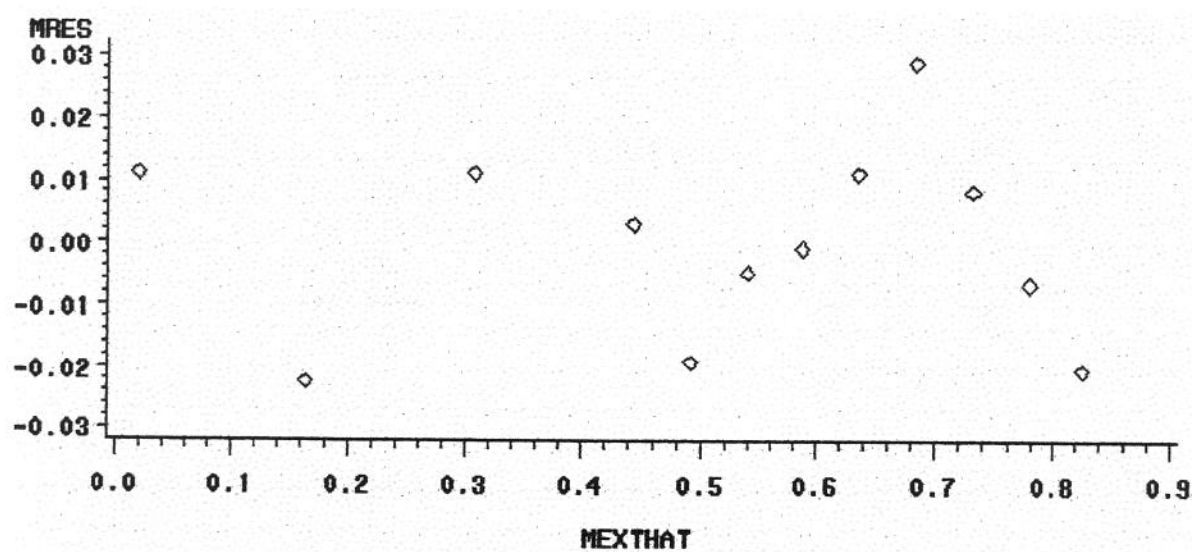


Fig.H.1_2_c.Gráfico de dispersão - ensaio 12

d) Gráfico de ajuste

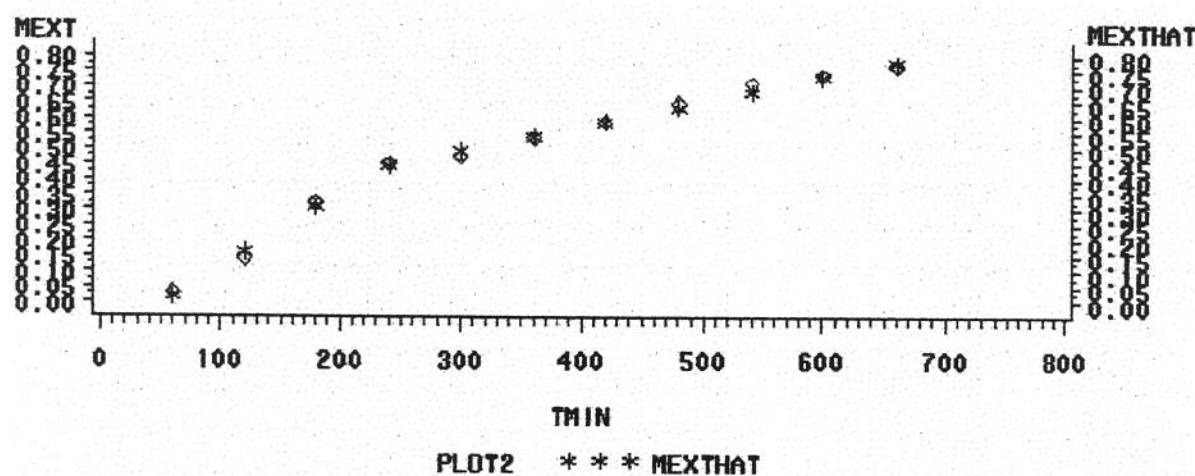


Fig.H.1_2_d.Gráfico de ajuste - ensaio 12

H.1_3. Ensaio 13 (200 bar/30°C)

a) Regressão linear

Ensaio cinetico_Exp.13: 200 bar / 30oC, Simone 57
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

Model: MODEL1

Dependent Variable: MEXT

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.50672	0.25336	410.532	0.0001
Error	9	0.00555	0.00062		
C Total	11	0.51227			
Root MSE		0.02484	R-square	0.9892	
Dep Mean		0.40038	Adj R-sq	0.9867	
C.V.		6.20479			

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.077290	0.02469485	-3.130	0.0121
TMIN	1	0.001500	0.00011046	13.577	0.0001
AL1	1	-0.000759	0.00015222	-4.983	0.0008

Ensaio cinetico_Exp.13: 200 bar / 30oC, Simone 58
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTHAT	MRES
1	60	0.0314	0	0.01269	0.018710
2	120	0.0672	0	0.10267	-0.035471
3	180	0.2078	0	0.19265	0.015148
4	240	0.2839	0	0.28263	0.001267
5	300	0.3781	2	0.37110	0.007004
6	360	0.4408	62	0.41556	0.025236
7	420	0.4589	122	0.46003	-0.001131
8	480	0.4872	182	0.50450	-0.017298
9	540	0.5191	242	0.54897	-0.029865
10	600	0.5648	302	0.59343	-0.028633
11	660	0.6616	362	0.63790	0.023700
12	720	0.7037	422	0.68237	0.021333

b) Regressão não linear

Ensaio cinetico_Exp.13: 200 bar / 30oC, Simone 56
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

Non-Linear Least Squares Iterative Phase
 Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.077290	0.001500	-0.000759	298.000000	0.005554
1	-0.076950	0.001497	-0.000756	298.861744	0.005554
2	-0.076950	0.001497	-0.000756	298.864936	0.005554

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	2.4303171690	0.6075792922
Residual	8	0.0055540810	0.0006942601
Uncorrected Total	12	2.4358712500	

(Corrected Total) 11 0.5122695625

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval Lower Upper
B0	-0.0769500	0.032270578	-0.15136680 -0.00253320
B1	0.0014968	0.000196392	0.00104395 0.00194972
B2	-0.0007562	0.000207754	-0.00123528 -0.00027711
KNOT1	298.86493	48.04125595	188.08053265 409.6493400

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
------	----	----	----	-------

ff
 ffff

B0	1	-0.912870929	0.8629489273	0.5865943631
B1	-0.912870929	1	-0.945313187	-0.804761446
B2	0.8629489273	-0.945313187	1	0.6323023668
KNOT1	0.5865943631	-0.804761446	0.6323023668	1

c) Gráfico de dispersão

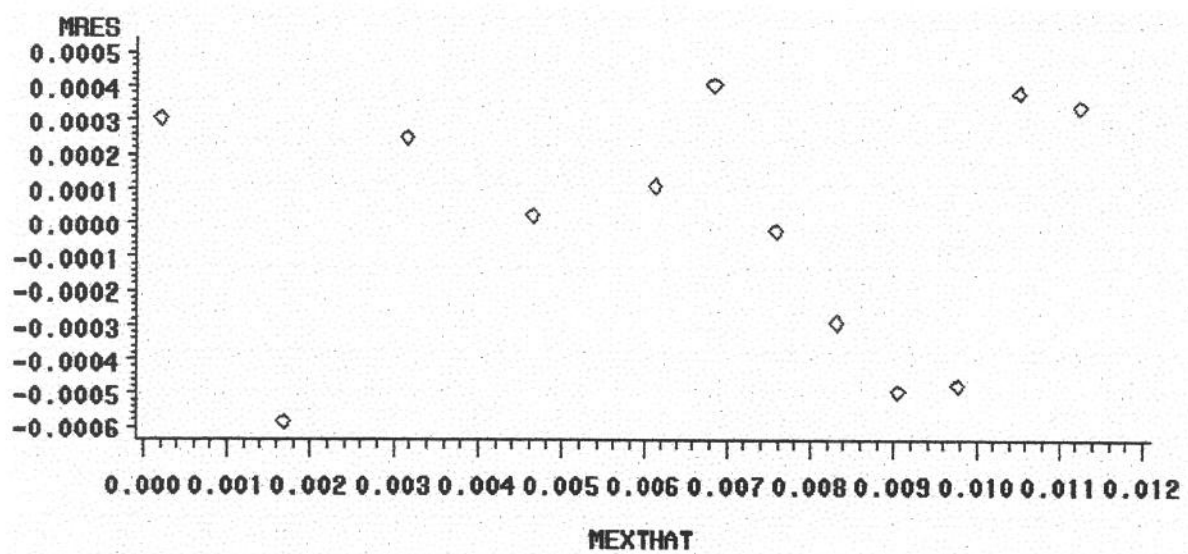


Fig.H.1_3_c.Gráfico de dispersão - ensaio 13

d) Gráfico de ajuste

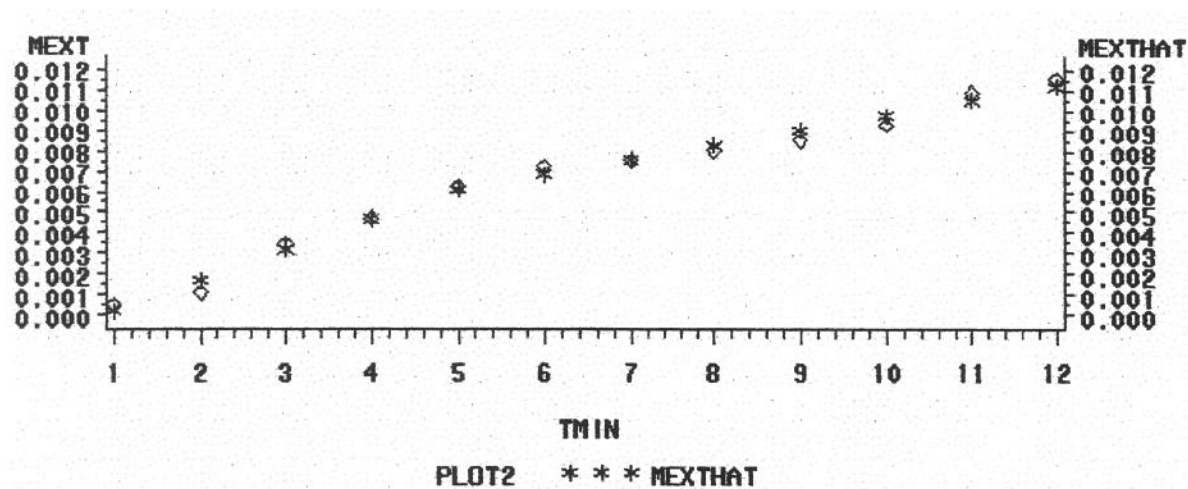


Fig.H.1_3_d.Gráfico de ajuste - ensaio 13

H.1_4. Ensaio 15 (200 bar/30°C)

a) Regressão linear

Ensaio cinetico_Exp.15: 200 bar / 30oC, Simone 65
10:11 Wednesday, October 4, 2000

Model: MODEL1

Dependent Variable: MEXT

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.57157	0.28579	3663.862	0.0001
Error	9	0.00070	0.00008		
C Total	11	0.57227			
Root MSE		0.00883	R-square	0.9988	
Dep Mean		0.42151	Adj R-sq	0.9985	
C.V.		2.09529			

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.056016	0.00956422	-5.857	0.0002
TMIN	1	0.001448	0.00004737	30.562	0.0001
AL1	1	-0.000531	0.00006079	-8.733	0.0001

Ensaio cinetico_Exp.15: 200 bar / 30oC, Simone 66
10:11 Wednesday, October 4, 2000

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTTHAT	MRES
1	60	0.0333	0	0.03084	0.002456
2	120	0.1142	0	0.11770	-0.003504
3	180	0.2043	0	0.20456	-0.000264
4	240	0.2925	0	0.29142	0.001075
5	300	0.3552	36	0.35917	-0.003973
6	360	0.4107	96	0.41418	-0.003479
7	420	0.4606	156	0.46919	-0.008586
8	480	0.5449	216	0.52419	0.020708
9	540	0.5860	276	0.57920	0.006801
10	600	0.6344	336	0.63421	0.000195
11	660	0.6790	396	0.68921	-0.010212
12	720	0.7430	456	0.74422	-0.001218

b) Regressão não linear

Ensaio cinetico_Exp.15: 200 bar / 30oC, Simone 64
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton					
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.056016	0.001448	-0.000531	264.000000	0.000702
1	-0.055850	0.001446	-0.000530	264.669178	0.000702
2	-0.055850	0.001446	-0.000530	264.670721	0.000702

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	2.7036026037	0.6759006509
Residual	8	0.0007019263	0.0000877408
Uncorrected Total	12	2.7043045300	

(Corrected Total) 11 0.5722732292

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.0558500	0.011472192	-0.08230518	-0.02939482
B1	0.0014462	0.000069818	0.00128517	0.00160717
B2	-0.0005298	0.000073857	-0.00070009	-0.00035946
KNOT1	264.670721	21.68054599	214.6748104	314.6666325

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
ffffffffff	1	-0.912870929	0.8629489273	0.469832664
ffff		1	-0.945313187	-0.697032639
			1	0.491093115
				1

c) Gráfico de dispersão

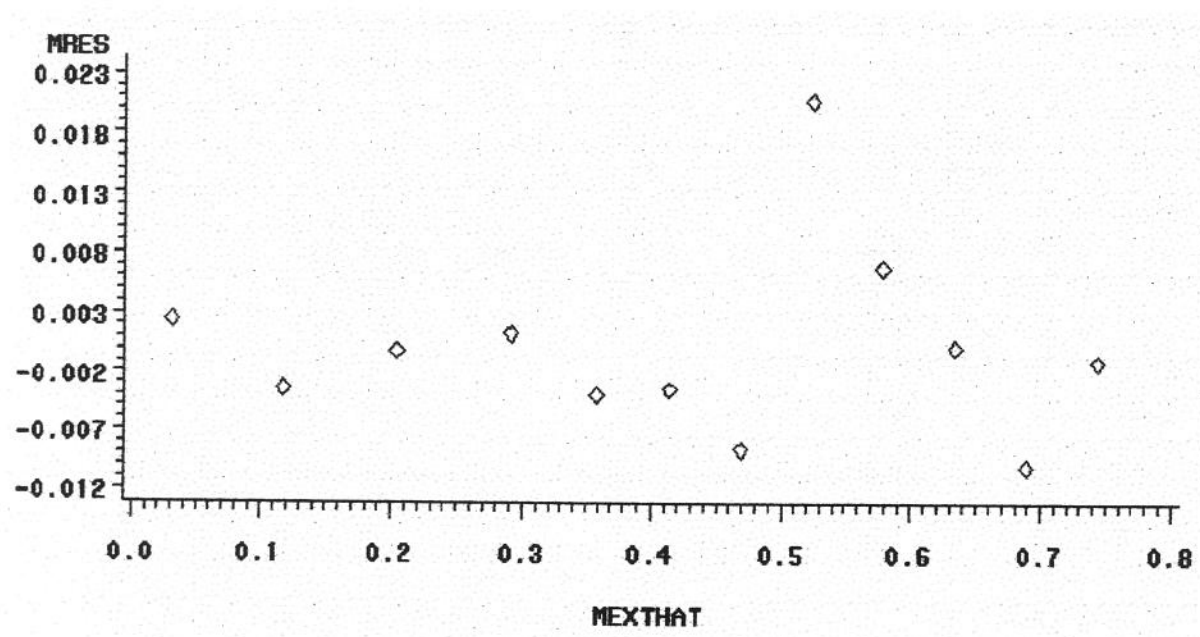


Fig.H.1_4_c.Gráfico de dispersão - ensaio 15

d) Gráfico de ajuste

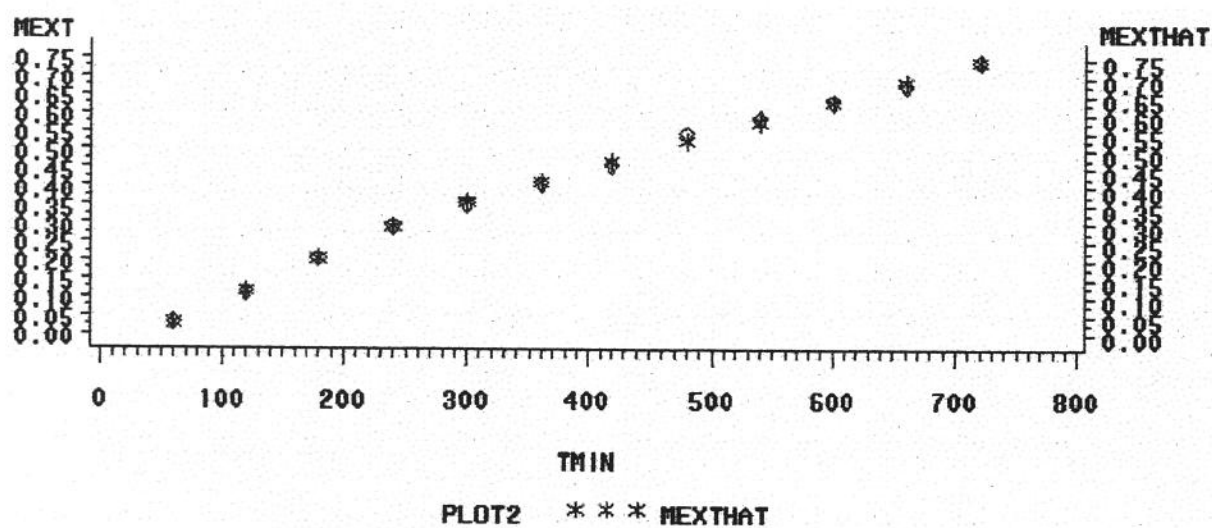


Fig.H.1_4_d.Gráfico de ajuste - ensaio 15

H.1_5. Ensaio 16 (200 bar/30°C)**a) Regressão linear**

Ensaio cinetico_Exp.16: 200 bar / 30oC, Simone 79
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

Model: MODEL1

Dependent Variable: MEXT

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of	Mean	F Value	Prob>F
		Squares	Square		
Model	2	0.65988	0.32994	1149.345	0.0001
Error	9	0.00258	0.00029		
C Total	11	0.66247			

Root MSE	0.01694	R-square	0.9961
Dep Mean	0.41287	Adj R-sq	0.9952
C.V.	4.10377		

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter	Standard	T for H0:	Prob > T
		Estimate	Error	Parameter=0	
INTERCEP	1	-0.084566	0.01460824	-5.789	0.0003
TMIN	1	0.001408	0.00005449	25.833	0.0001
AL1	1	-0.000551	0.00009541	-5.777	0.0003

Ensaio cinetico_Exp.16: 200 bar / 30oC, Simone 80
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTHAT	MRES
1	60	0.0296	0	-0.00011	0.029709
2	120	0.0633	0	0.08435	-0.021047
3	180	0.1376	0	0.16880	-0.031204
4	240	0.2617	0	0.25326	0.008440
5	300	0.3502	0	0.33772	0.012483
6	360	0.4235	0	0.42217	0.001327
7	420	0.4817	37	0.48624	-0.004536
8	480	0.5403	97	0.53762	0.002678
9	540	0.5921	157	0.58901	0.003092
10	600	0.6419	217	0.64039	0.001505
11	660	0.6931	277	0.69178	0.001319
12	720	0.7394	337	0.74317	-0.003767

b) Regressão não linear

Ensaio cinetico_Exp.16: 200 bar / 30oC, Simone 74
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton					
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.084566	0.001408	-0.000551	383.000000	0.002584
1	-0.084447	0.001407	-0.000551	383.720076	0.002584
2	-0.084447	0.001407	-0.000551	383.719765	0.002584

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	2.7053894535	0.6763473634
Residual	8	0.0025835065	0.0003229383
Uncorrected Total	12	2.7079729600	

(Corrected Total) 11 0.6624663467

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.0844467	0.016729611	-0.12302559	-0.04586774
B1	0.0014068	0.000071596	0.00124171	0.00157191
B2	-0.0005512	0.000101252	-0.00078473	-0.00031775
KNOT1	383.71976	38.062164199	295.9474102	471.4921198

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
ffffffffff	1	-0.898717034	0.6354889093	0.3794188183
ffff		1	-0.707106781	-0.592797059
			1	-0.030307331
				1

c) Gráfico de dispersão

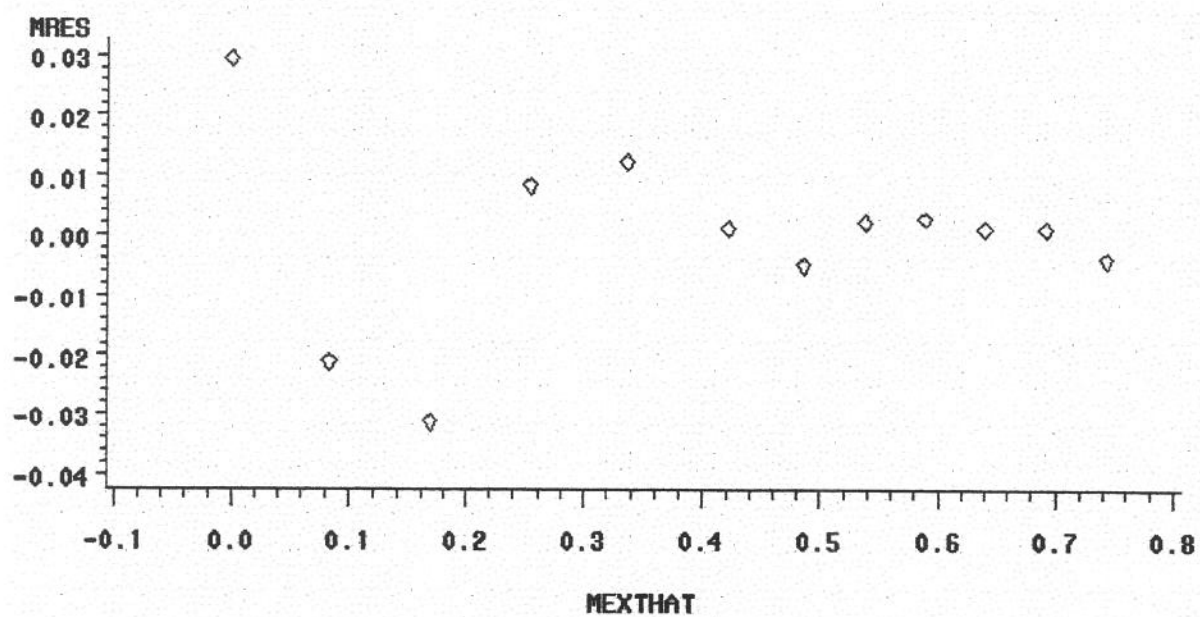


Fig.H.1_5_c.Gráfico de dispersão - ensaio 16

d) Gráfico de ajuste

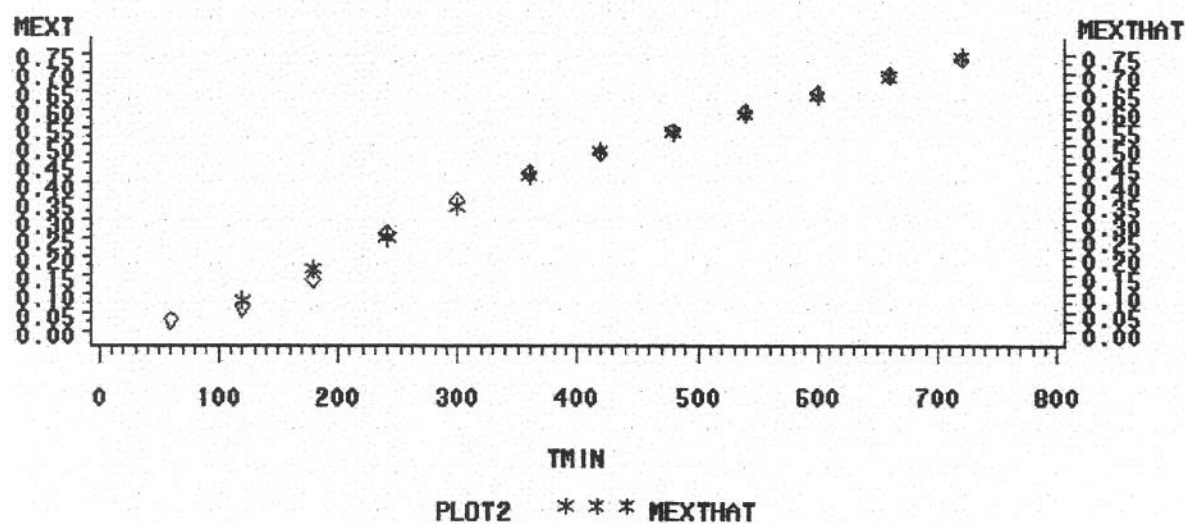


Fig.H.1_5_d.Gráfico de ajuste - ensaio 16

H.1_6. Ensaio 20 (200 bar/30°C)**a) Regressão linear**

Ensaio cinetico_Exp.20: 200 bar / 30oC, Simone 84
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

Model: MODEL1

Dependent Variable: MEXT

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.58879	0.29439	652.798	0.0001
Error	9	0.00406	0.00045		
C Total	11	0.59285			
Root MSE		0.02124	R-square	0.9932	
Dep Mean		0.38228	Adj R-sq	0.9916	
C.V.		5.55519			

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.096840	0.02044330	-4.737	0.0011
TMIN	1	0.001403	0.00008784	15.974	0.0001
AL1	1	-0.000524	0.00012711	-4.119	0.0026

Ensaio cinetico_Exp.20: 200 bar / 30oC, Simone 85
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTHAT	MRES
1	60	0.0240	0	-0.01265	0.036652
2	120	0.0271	0	0.07154	-0.044436
3	180	0.1442	0	0.15572	-0.011525
4	240	0.2497	0	0.23991	0.009787
5	300	0.3335	0	0.32410	0.009399
6	360	0.3919	43	0.38578	0.006124
7	420	0.4364	103	0.43855	-0.002149
8	480	0.4955	163	0.49132	0.004177
9	540	0.5260	223	0.54410	-0.018097
10	600	0.6012	283	0.59687	0.004330
11	660	0.6534	343	0.64964	0.003756
12	720	0.7044	403	0.70242	0.001983

b) Regressão não linear

Ensaio cinetico_Exp.20: 200 bar / 30oC, Simone 86
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton					
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.096840	0.001403	-0.000524	317.000000	0.004059
1	-0.096780	0.001403	-0.000523	317.321065	0.004059
2	-0.096780	0.001403	-0.000523	317.321445	0.004059

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	2.3423968489	0.5855992122
Residual	8	0.0040587211	0.0005073401
Uncorrected Total	12	2.3464555700	

(Corrected Total) 11 0.5928454625

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.0967800	0.023623593	-0.15125663	-0.04230337
B1	0.0014027	0.000118713	0.00112891	0.00167642
B2	-0.0005234	0.000138296	-0.00084230	-0.00020447
KNOT1	317.3214448	50.162117079	201.64627943	432.99661021

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
ffffffffff	1	-0.904534034	0.77644756	0.398050388
ffff		1	-0.858395075	-0.620930448
			1	0.224321022
				1

c) Gráfico de dispersão

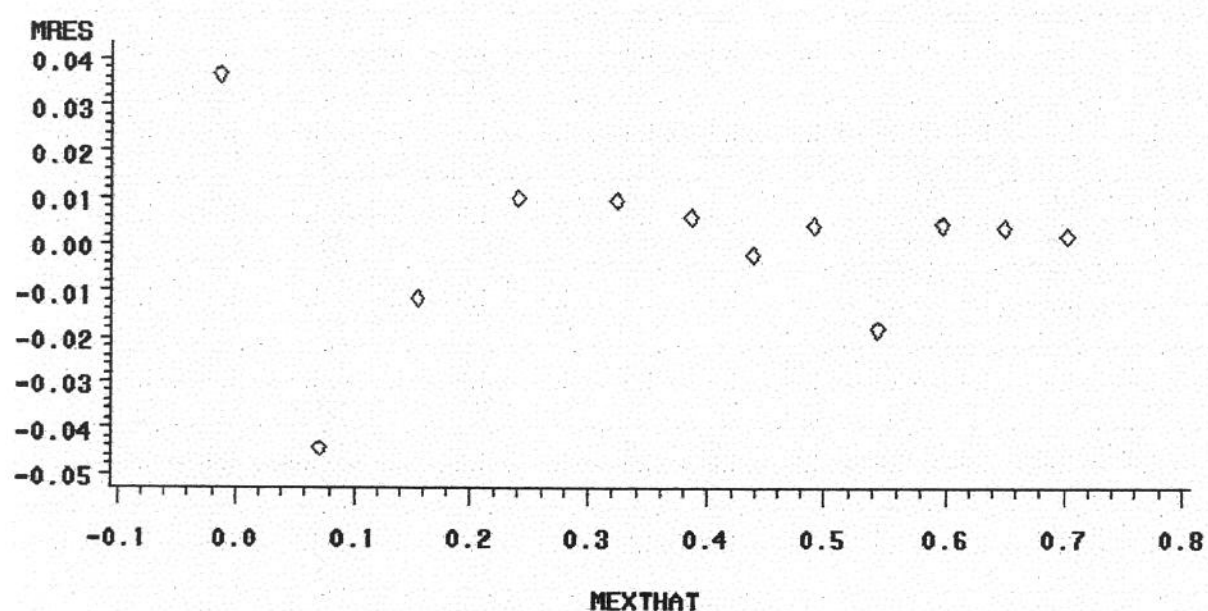


Fig.H.1_6_c.Gráfico de dispersão - ensaio 20

d) Gráfico de ajuste

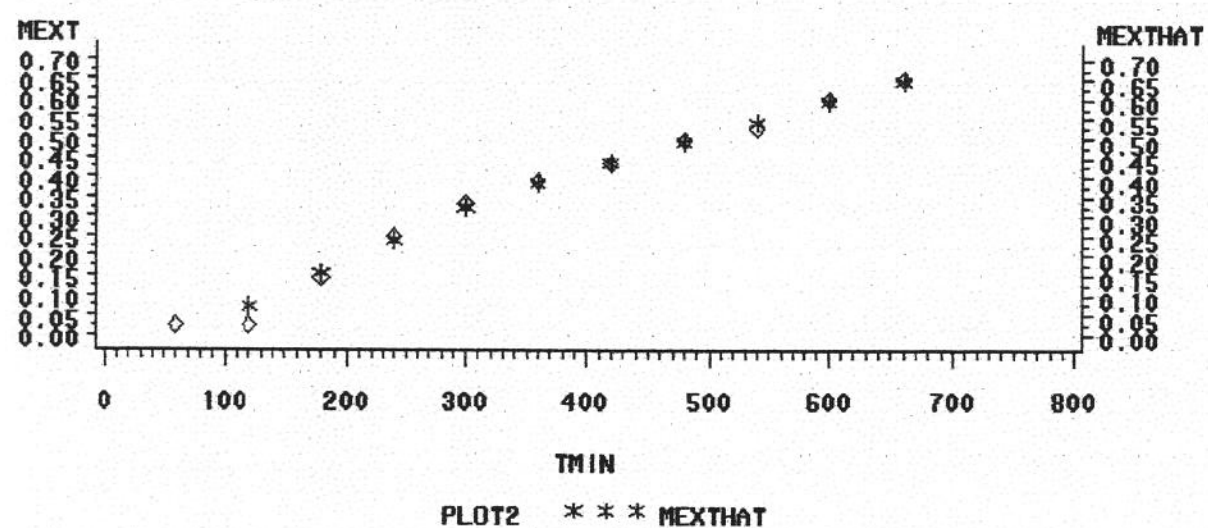


Fig.H.1_6_d.Gráfico de ajuste - ensaio 20

H.1_7. Ensaio 21 (200 bar/30°C)**a) Regressão linear**

Ensaio cinetico_Exp.21: 200 bar / 30oC, Simone 92
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

Model: MODEL1

Dependent Variable: MEXT

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.80747	0.40373	1042.590	0.0001
Error	9	0.00349	0.00039		
C Total	11	0.81095			
Root MSE		0.01968	R-square	0.9957	
Dep Mean		0.50841	Adj R-sq	0.9947	
C.V.		3.87059			

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.098164	0.01844103	-5.323	0.0005
TMIN	1	0.001886	0.00007664	24.612	0.0001
AL1	1	-0.001064	0.00011542	-9.218	0.0001

Ensaio cinetico_Exp.21: 200 bar / 30oC, Simone 93
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTHAT	MRES
1	60	0.0357	0	0.01502	0.020684
2	120	0.0864	0	0.12820	-0.041795
3	180	0.2692	0	0.24138	0.027825
4	240	0.3417	0	0.35455	-0.012855
5	300	0.4736	0	0.46773	0.005866
6	360	0.5522	28	0.55112	0.001077
7	420	0.5988	88	0.60046	-0.001664
8	480	0.6464	148	0.64981	-0.003405
9	540	0.6944	208	0.69915	-0.004746
10	600	0.7645	268	0.74849	0.016012
11	660	0.7973	328	0.79783	-0.000529
12	720	0.8407	388	0.84717	-0.006470

b) Regressão não linear

Ensaio cinetico_Exp.21: 200 bar / 30oC, Simone 94
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton					
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.098164	0.001886	-0.001064	332.000000	0.003485
1	-0.098010	0.001885	-0.001063	332.365557	0.003485
2	-0.098010	0.001885	-0.001063	332.365770	0.003485

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	3.9092135159	0.9773033790
Residual	8	0.0034850541	0.0004356318
Uncorrected Total	12	3.9126985700	

(Corrected Total) 11 0.8109501692

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.0980100	0.021890522	-0.14849012	-0.04752988
B1	0.0018852	0.000110004	0.00163149	0.00213884
B2	-0.0010634	0.000128151	-0.00135890	-0.00076786
KNOT1	332.36576	23.35147959	278.51664153	386.2148975

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
ffffffffff	1	-0.904534034	0.77644756	0.4502608461
ffff		1	-0.858395075	-0.674982713
			1	0.2974120497
				1

c) Gráfico de dispersão

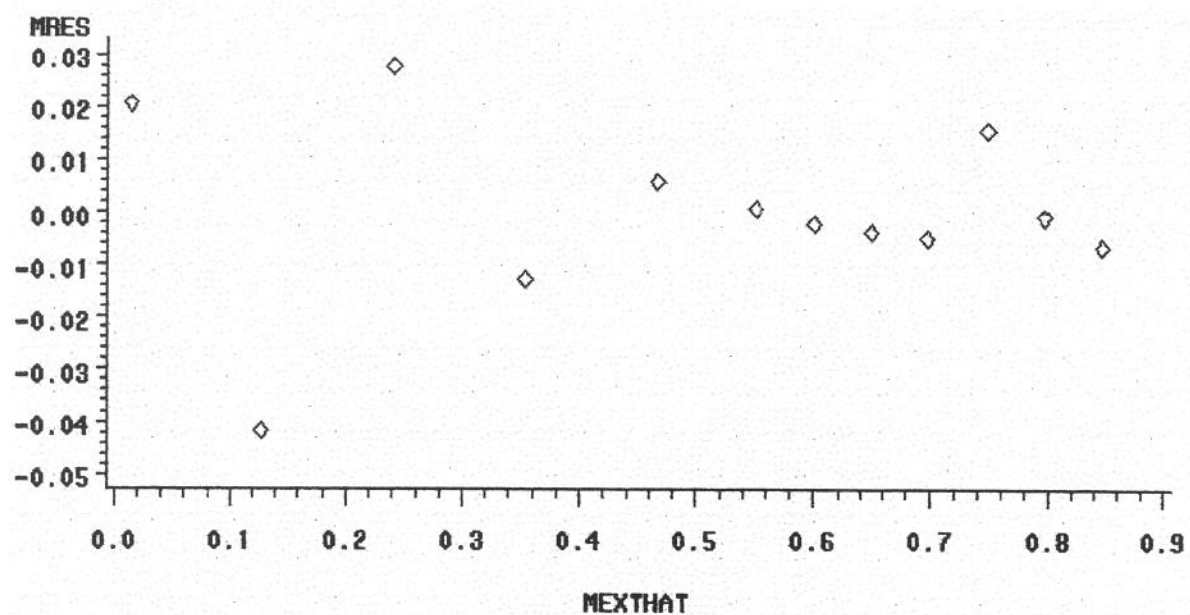


Fig.H.1_7_c.Gráfico de dispersão - ensaio 21

d) Gráfico de ajuste

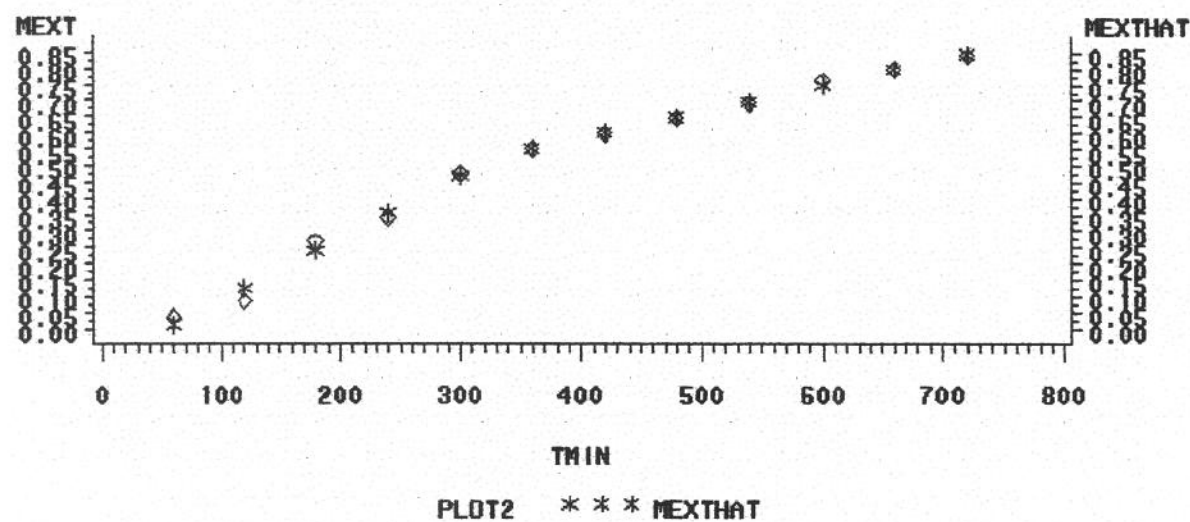


Fig.H.1_7_d.Gráfico de ajuste - ensaio 21

H.1_8. Ensaio 23 (200 bar/30°C)

a) Regressão linear

Ensaio cinetico_Exp.23: 200 bar / 30oC, Simone 98
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

Model: MODEL1

Dependent Variable: MEXT

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.54757	0.27379	989.352	0.0001
Error	9	0.00249	0.00028		
C Total	11	0.55007			
Root MSE		0.01664	R-square	0.9955	
Dep Mean		0.39648	Adj R-sq	0.9945	
C.V.		4.19572			

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.070134	0.02229155	-3.146	0.0118
TMIN	1	0.001483	0.00013929	10.646	0.0001
AL1	1	-0.000524	0.00015853	-3.308	0.0091

Ensaio cinetico_Exp.11: 200 bar / 30oC, Simone 99
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTTHAT	MRES
1	60	0.0334	0	0.01884	0.014561
2	120	0.0787	0	0.10781	-0.029112
3	180	0.2113	0	0.19679	0.014515
4	240	0.2665	44	0.26268	0.003818
5	300	0.3171	104	0.32019	-0.003089
6	360	0.3780	164	0.37769	0.000305
7	420	0.4287	224	0.43520	-0.006501
8	480	0.4777	284	0.49271	-0.015007
9	540	0.5758	344	0.55021	0.025587
10	600	0.6053	404	0.60772	-0.002419
11	660	0.6754	464	0.66523	0.010174
12	720	0.7099	524	0.72273	-0.012832

b) Regressão não linear

Ensaio cinetico_Exp.11: 200 bar / 30oC, Simone 100
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

Non-Linear Least Squares Iterative Phase
 Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.070134	0.001483	-0.000524	196.000000	0.002491
1	-0.070100	0.001482	-0.000524	196.111959	0.002491
2	-0.070100	0.001483	-0.000524	196.111936	0.002491

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	2.4339628768	0.6084907192
Residual	8	0.0024906032	0.0003113254
Uncorrected Total	12	2.4364534800	

(Corrected Total) 11 0.5500650767

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.0701000	0.026952290	-0.132252692	-0.00794731
B1	0.0014825	0.000207941	0.001002982	0.00196202
B2	-0.0005241	0.000211379	-0.001011556	-0.00003667
KNOT1	196.11193	42.877425009	97.235462264	294.9884088

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.9258201	0.9107651111	0.4806963485
B1	-0.9258201	1	-0.983738754	-0.704274128
B2	0.9107651111	-0.983738754	1	0.6066837839
KNOT1	0.4806963485	-0.704274128	0.6066837839	1

c) Gráfico de dispersão

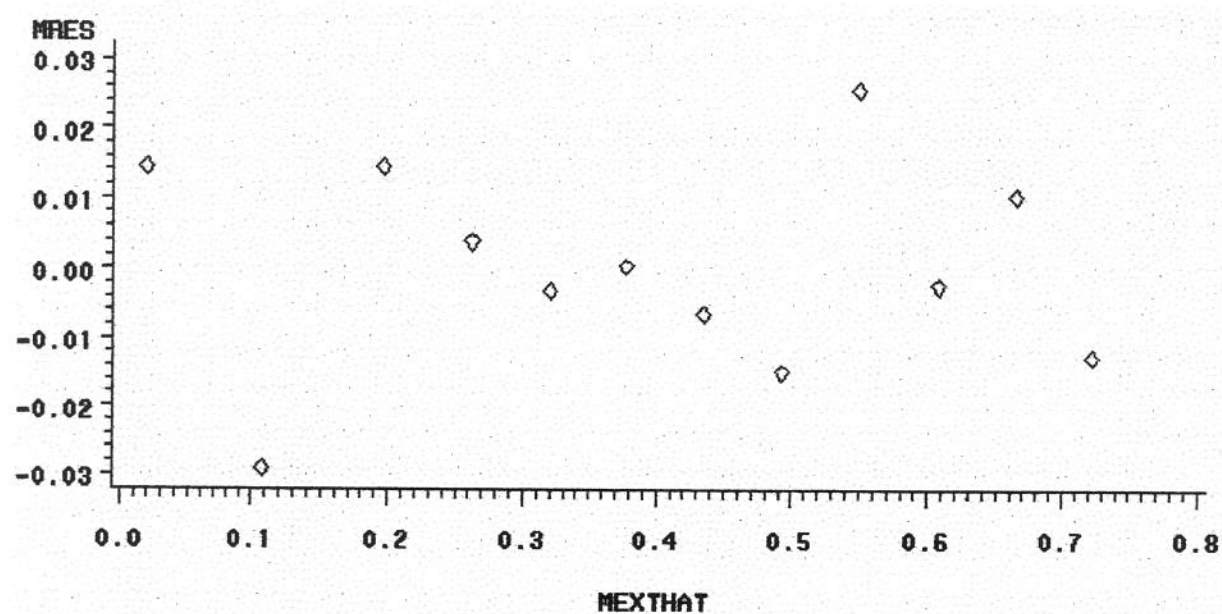


Fig.H.1_8_c.Gráfico de dispersão - ensaio 23

d) Gráfico de ajuste

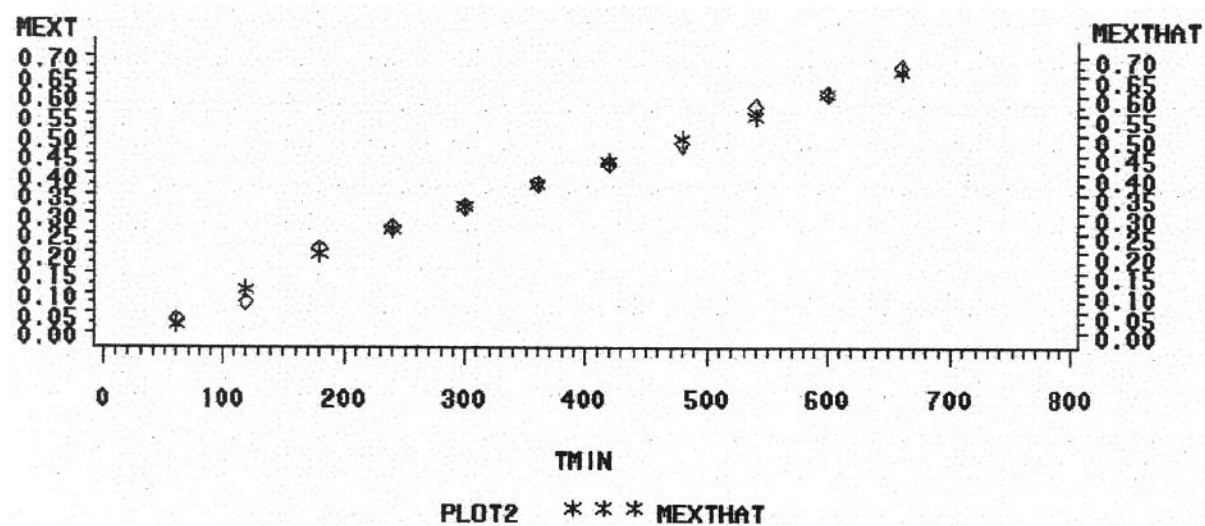


Fig.H.1_8_d.Gráfico de ajuste - ensaio 23

H.1_9. Ensaio 25 (200 bar/30°C)

a) Regressão linear

Ensaio cinetico_Exp.25: 200 bar / 30oC, Simone 106
10:11 Wednesday, October 4, 2000

Model: MODEL1

Dependent Variable: MEXT

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.69853	0.34927	992.766	0.0001
Error	9	0.00317	0.00035		
C Total	11	0.70170			
Root MSE		0.01876	R-square	0.9955	
Dep Mean		0.43775	Adj R-sq	0.9945	
C.V.		4.28478			

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.080650	0.01587007	-5.082	0.0007
TMIN	1	0.001478	0.00005775	25.592	0.0001
AL1	1	-0.000666	0.00010564	-6.306	0.0001

Ensaio cinetico_Exp.25: 200 bar / 30oC, Simone 107
10:11 Wednesday, October 4, 2000

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTHAT	MRES
1	60	0.0350	0	0.00802	0.026980
2	120	0.0715	0	0.09669	-0.025191
3	180	0.1563	0	0.18536	-0.029061
4	240	0.2986	0	0.27403	0.024568
5	300	0.3669	0	0.36270	0.004198
6	360	0.4494	0	0.45137	-0.001973
7	420	0.5135	24	0.52406	-0.010555
8	480	0.5781	84	0.57275	0.005346
9	540	0.6266	144	0.62145	0.005146
10	600	0.6803	204	0.67015	0.010147
11	660	0.7171	264	0.71885	-0.001753
12	720	0.7597	324	0.76755	-0.007852

b) Regressão não linear

Ensaio cinetico_Exp.25: 200 bar / 30oC, Simone 108
 10:11 Wednesday, October 4, 2000

Non-Linear Least Squares Iterative Phase
 Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.080650	0.001478	-0.000666	396.000000	0.003166
1	-0.080433	0.001476	-0.000666	396.980409	0.003166
2	-0.080433	0.001476	-0.000666	396.980269	0.003166

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	2.9980328939	0.7495082235
Residual	8	0.0031659861	0.0003957483
Uncorrected Total	12	3.0011988800	

(Corrected Total) 11 0.7016981300

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval
			Lower Upper
B0	-0.0804333	0.018519769	-0.12314041 -0.03772626
B1	0.0014764	0.000079257	0.00129366 0.00165920
B2	-0.0006661	0.000112087	-0.00092457 -0.00040762
KNOT1	396.9802688	34.873299194	316.56152081 477.39901679

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.898717034	0.6354889093	0.4200401995
B1	-0.898717034	1	-0.707106781	-0.63797792
B2	0.6354889093	-0.707106781	1	0.0336819335
KNOT1	0.4200401995	-0.63797792	0.0336819335	1

c) Gráfico de dispersão

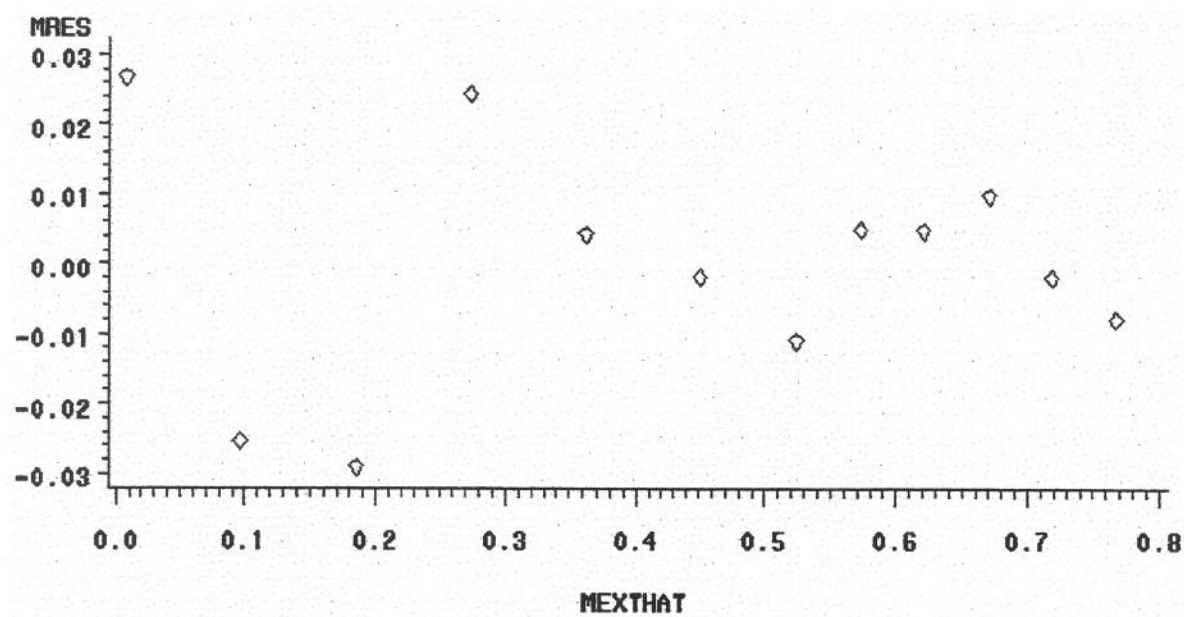


Fig.H.1_9_c.Gráfico de dispersão - ensaio 25

d) Gráfico de ajuste

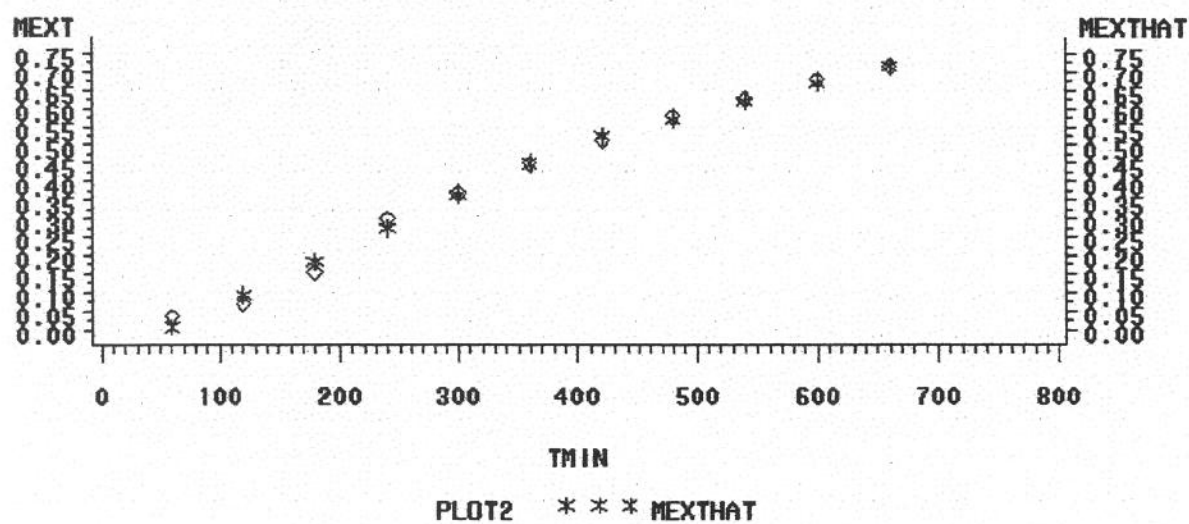


Fig.H.1_9_d.Gráfico de ajuste - ensaio 25

H.1_10. Ensaio 26 (200 bar/30°C)

a) Regressão linear

Ensaio cinetico_Exp.Y*: 200 bar / 30oC, Simone 17
15:32 Tuesday, August 22, 2000

Model: MODEL1

Dependent Variable: MEXT

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.19052	0.09526	840.239	0.0001
Error	7	0.00079	0.00011		
C Total	9	0.19131			
Root MSE		0.01065	R-square	0.9959	
Dep Mean		0.23928	Adj R-sq	0.9947	
C.V.		4.44982			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.027858	0.00804581	-3.462	0.0105
TMIN	1	0.000814	0.00002529	32.195	0.0001
AL1	1	-0.000142	0.00016915	-0.841	0.4284

Ensaio cinetico_Exp.Y*: 200 bar / 30oC, Simone 18
15:32 Tuesday, August 22, 2000

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTTHAT	MRES
1	60	0.0332	0	0.02100	0.012203
2	120	0.0708	0	0.06985	0.000948
3	180	0.1089	0	0.11871	-0.009807
4	240	0.1497	0	0.16756	-0.017862
5	300	0.2288	0	0.21642	0.012383
6	360	0.2590	0	0.26527	-0.006271
7	420	0.3189	0	0.31413	0.004774
8	480	0.3666	0	0.36298	0.003619
9	540	0.4083	25	0.40828	0.000019
10	600	0.4486	85	0.44861	-0.000005

b) Regressão não linear

Ensaio cinetico-Y*: 200 bar / 30oC, Simone 19
15:32 Tuesday, August 22, 2000

Non-Linear Least Squares Iterative Phase
Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.027858	0.000814	-0.000142	515.000000	0.000794
1	-0.027854	0.000814	-0.000143	515.249413	0.000794
2	-0.027854	0.000814	-0.000143	515.248434	0.000794

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	0.76306465179	0.19076616295
Residual	6	0.00079358821	0.00013226470
Uncorrected Total	10	0.76385824000	

(Corrected Total) 9 0.19130905600

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic Confidence Interval	Asymptotic 95 % Lower Upper
B0	-0.0278536	0.00896123	-0.04978092	-0.00592623
B1	0.0008142	0.00002958	0.00074186	0.00088660
B2	-0.0001426	0.00027268	-0.00080979	0.00052467
KNOT1	515.24843	132.26863020	191.598521	838.89834661

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.891132789	0.0966569219	0.244956835
B1	-0.891132789	1	-0.108465229	-0.38467967
B2	0.0966569219	-0.108465229	1	-0.74073061
KNOT1	0.244956835	-0.38467967	-0.740730611	1

c) Gráfico de dispersão

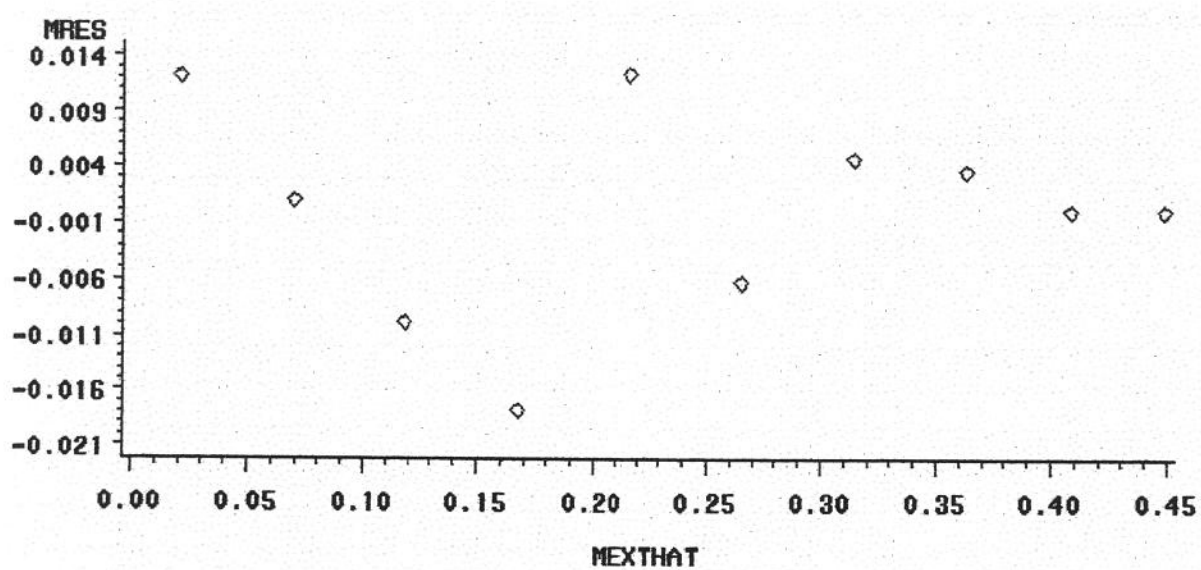


Fig.H.1_10_c.Gráfico de dispersão - ensaio 26

d) Gráfico de ajuste

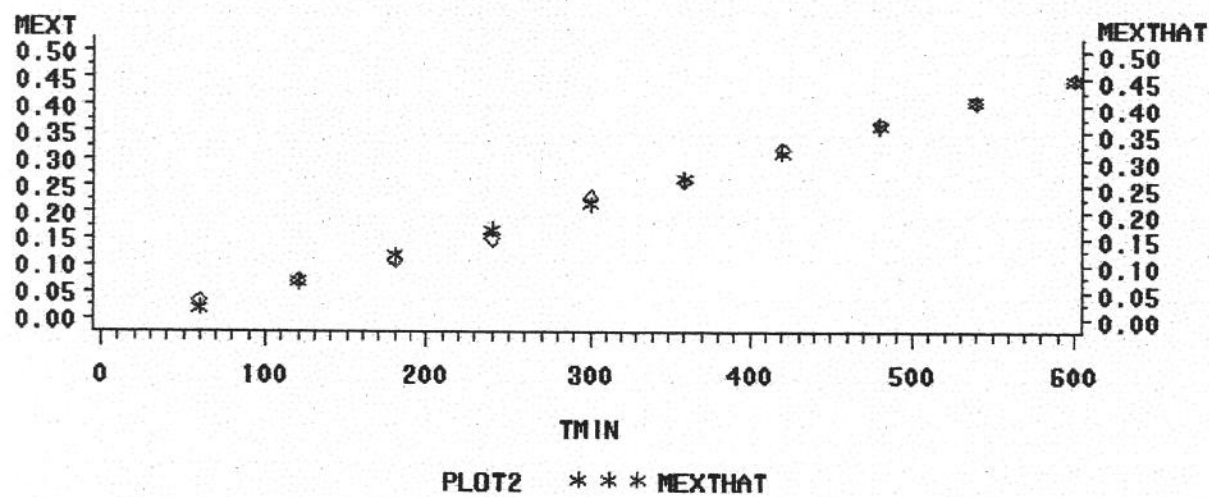


Fig.H.1_10_d.Gráfico de ajuste - ensaio 26

H.2. EXTRAÇÃO DOS GLICOSÍDEOS

Os resultados obtidos no programa SAS relativos aos ensaios 14, 17, 18 e 19, tanto para regressão linear quanto para não-linear, são apresentados a seguir.

H.2_1. Ensaio 14 (120 bar/16°C)

a) Regressão linear

Ensaio cinetico_Exp.14: 120 bar / 16oC, Simone 19
10:47 Thursday, October 5, 2000

Model: MODEL1

Dependent Variable: MEXT

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.08663	0.04332	516.092	0.0001
Error	7	0.00059	0.00008		
C Total	9	0.08722			

Root MSE	0.00916	R-square	0.9933
Dep Mean	0.36425	Adj R-sq	0.9913
C.V.	2.51511		

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.069857	0.02027329	-3.446	0.0108
TMIN	1	0.001292	0.00007281	17.746	0.0001
AL1	1	-0.000998	0.00009003	-11.084	0.0001

Ensaio cinetico_Exp.14: 120 bar / 16oC, Simone 20
10:47 Thursday, October 5, 2000

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTHAT	MRES
1	180	0.1554	0	0.16274	-0.007339
2	240	0.2551	0	0.24027	0.014829
3	300	0.3100	0	0.31780	-0.007803
4	360	0.3552	31	0.36440	-0.009202
5	420	0.3838	91	0.38206	0.001738
6	480	0.4062	151	0.39972	0.006477
7	540	0.4206	211	0.41738	0.003216
8	600	0.4421	271	0.43504	0.007055
9	660	0.4516	331	0.45271	-0.001105
10	720	0.4625	391	0.47037	-0.007866

b) Regressão não linear

Ensaio cinetico-Exp.14: 120 bar / 16oC, Simone 23
10:47 Thursday, October 5, 2000

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton					
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.069857	0.001292	-0.000998	329.000000	0.000588
1	-0.069033	0.001288	-0.000995	329.632813	0.000587
2	-0.069033	0.001288	-0.000995	329.634949	0.000587
3	-0.069033	0.001288	-0.000995	329.634949	0.000587

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	1.4134113619	0.3533528405
Residual	6	0.0005873081	0.0000978847
Uncorrected Total	10	1.4139986700	

(Corrected Total) 9 0.0872180450

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic Confidence Interval	Asymptotic 95 % Lower Upper
B0	-0.0690333	0.028560562	-0.13891856	0.00085189
B1	0.0012883	0.000116598	0.00100303	0.00157364
B2	-0.0009946	0.000120690	-0.00128996	-0.00069932
KNOT1	329.63494	14.176087866	94.94728669	364.32261157

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
ffffffffff	1	-0.979795897	0.9465727653	0.6452186008
ffff	-0.979795897	1	-0.966091783	-0.74121625
	0.9465727653	-0.966091783	1	0.5960414052
	0.6452186008	-0.74121625	0.5960414052	1

c) Gráfico de dispersão

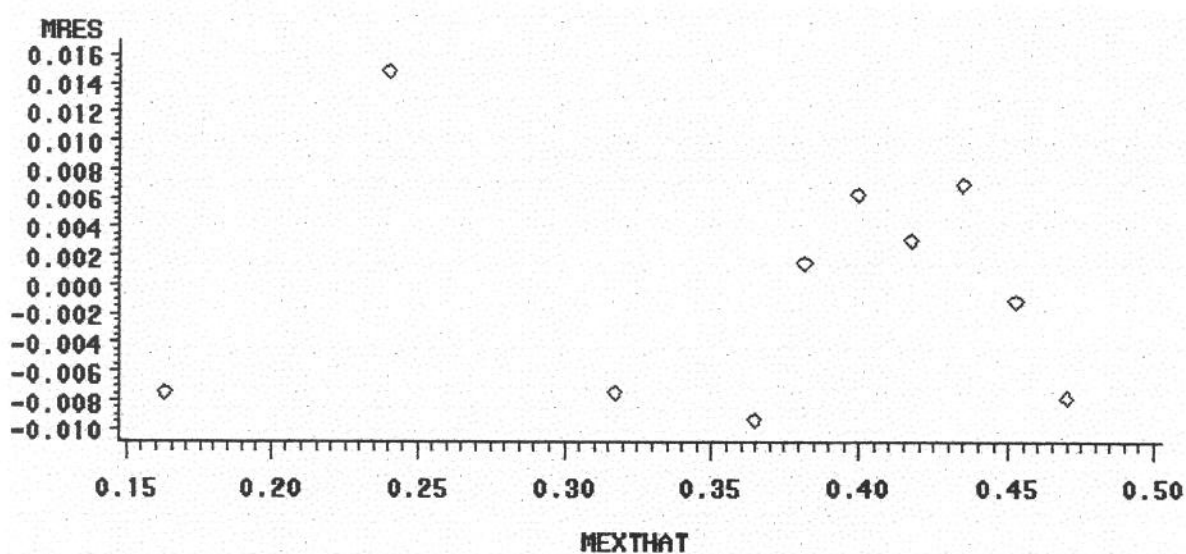


Fig.H.2_1_c.Gráfico de dispersão - ensaio 14

d) Gráfico de ajuste

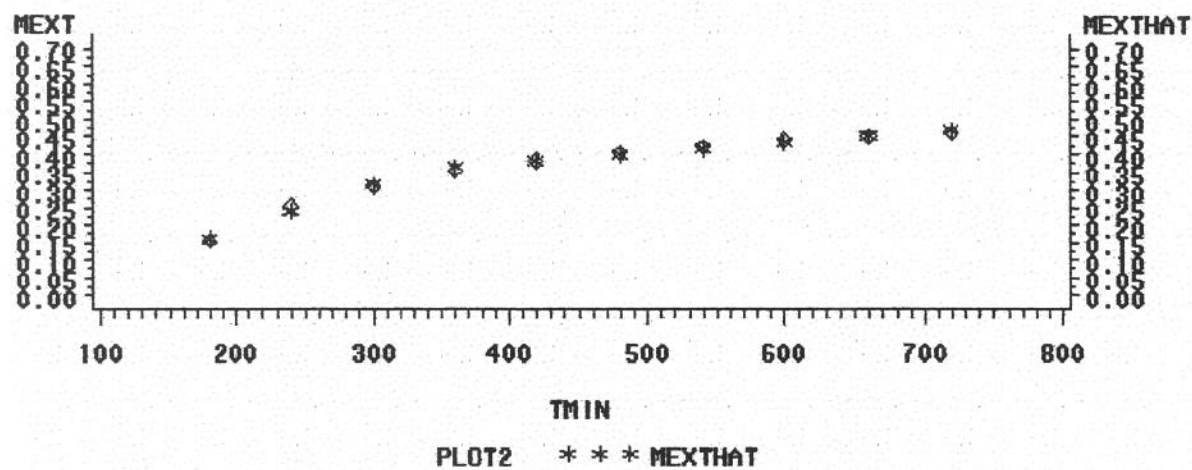


Fig.H.2_1_d.Gráfico de ajuste - ensaio 14

H.2_2. Ensaio 17 (250 bar/16°C)

a) Regressão linear

Ensaio cinetico_Exp.17: 120 bar / 16oC, Simone 36
 10:47 Thursday, October 5, 2000

Model: MODEL1

Dependent Variable: MEXT

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.32062	0.16031	1815.515	0.0001
Error	7	0.00062	0.00009		
C Total	9	0.32124			
Root MSE		0.00940	R-square	0.9981	
Dep Mean		0.46816	Adj R-sq	0.9975	
C.V.		2.00719			

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.478865	0.03424535	-13.983	0.0001
TMIN	1	0.003145	0.00014487	21.712	0.0001
AL1	1	-0.002342	0.00015752	-14.867	0.0001

Ensaio cinetico_Exp.17: 120 bar / 16oC, Simone 37
 10:47 Thursday, October 5, 2000

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTHAT	MRES
1	180	0.0872	0	0.08730	-0.000096
2	240	0.2764	0	0.27602	0.000384
3	300	0.3588	40	0.37106	-0.012261
4	360	0.4254	100	0.41927	0.006132
5	420	0.4657	160	0.46748	-0.001775
6	480	0.5192	220	0.51568	0.003518
7	540	0.5696	280	0.56389	0.005710
8	600	0.6272	340	0.61210	0.015103
9	660	0.6546	400	0.66030	-0.005704
10	720	0.6975	460	0.70851	-0.011011

b) Regressão não linear

Ensaio cinetico-Exp.17: 120 bar / 16oC, Simone 39
 10:47 Thursday, October 5, 2000

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton					
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.478865	0.003145	-0.002342	260.000000	0.000618
1	-0.480400	0.003153	-0.002349	259.701618	0.000618
2	-0.480400	0.003153	-0.002349	259.702559	0.000618
3	-0.480400	0.003153	-0.002349	259.702559	0.000618

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	2.5123620336	0.6280905084
Residual	6	0.0006179064	0.0001029844
Uncorrected Total	10	2.5129799400	

(Corrected Total) 9 0.3212420840

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic Confidence Interval	Asymptotic 95 % Lower Upper
B0	-0.4804000	0.0507406161	-0.60455790	-0.35624210
B1	0.0031533	0.0002391936	0.00256805	0.00373862
B2	-0.0023494	0.0002406131	-0.00293816	-0.00176065
KNOT1	259.702558	6.7080255271	243.2885999	276.1165179

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
ffffffffff	1	-0.989949494	0.9841090327	0.6823809961
ffff		1	-0.994100243	-0.754354832
			1	0.7049466068
				1

c) Gráfico de dispersão

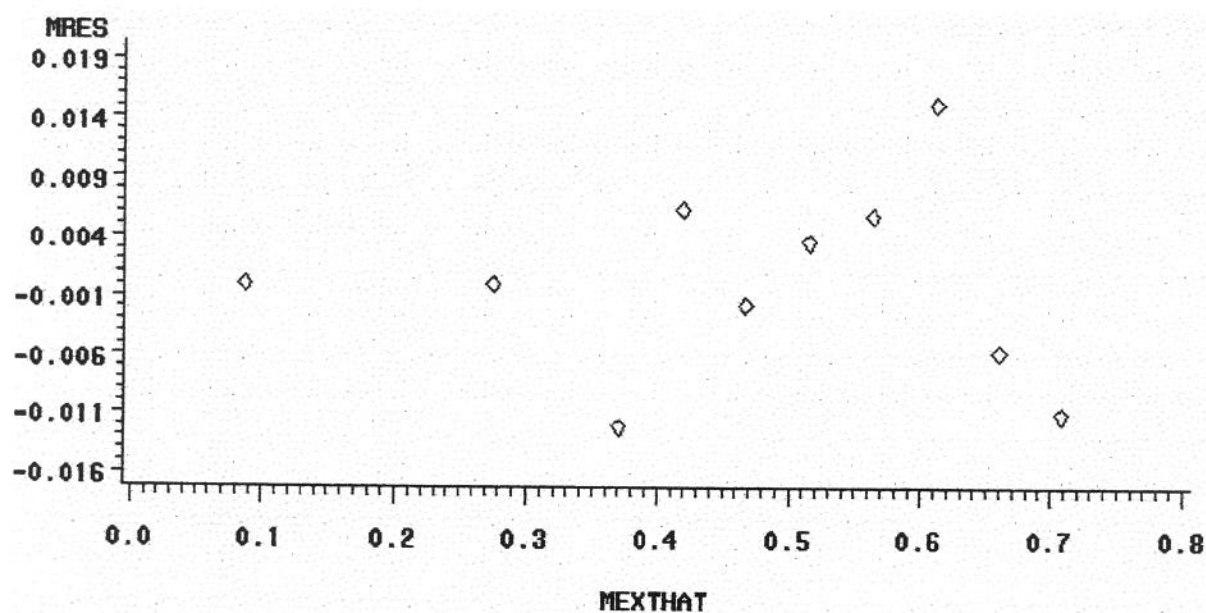


Fig.H.2_2_c.Gráfico de dispersão - ensaio 16

d) Gráfico de ajuste

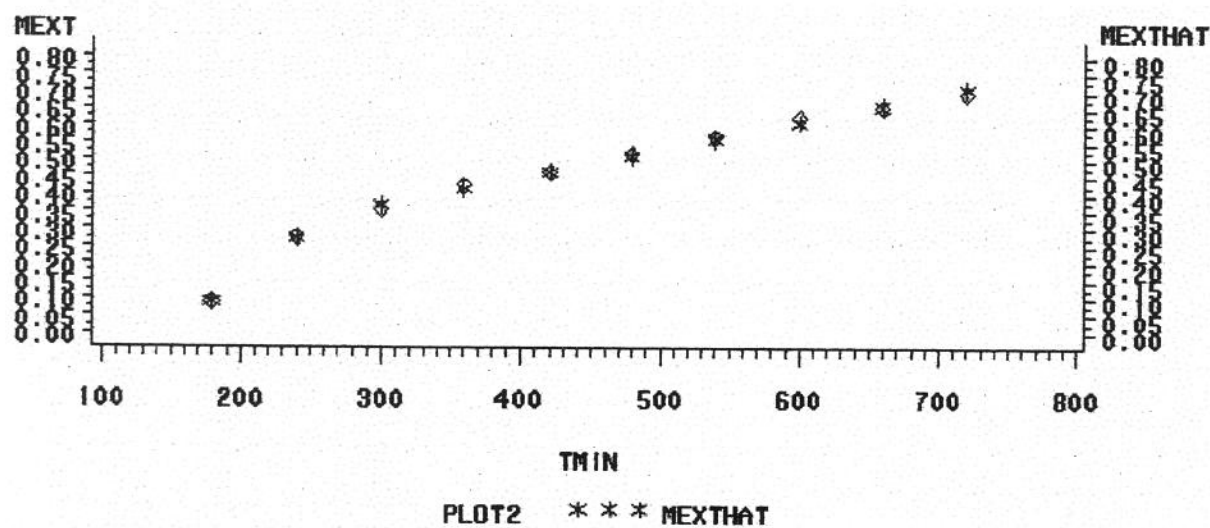


Fig.H.2_2_d.Gráfico de ajuste - ensaio 17

H.2_3. Ensaio 18 (250 bar/10°C)**a) Regressão linear**

Ensaio cinetico_Exp.18: 250 bar / 10oC, Simone 49
 10:47 Thursday, October 5, 2000

Model: MODEL1

Dependent Variable: MEXT

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.02186	0.01093	95.094	0.0001
Error	8	0.00092	0.00011		
C Total	10	0.02278			
Root MSE		0.01072	R-square	0.9596	
Dep Mean		0.11505	Adj R-sq	0.9495	
C.V.		9.31770			

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	0.032050	0.01048820	3.056	0.0157
TMIN	1	0.000178	0.00003088	5.777	0.0004
AL1	1	0.000148	0.00007083	2.090	0.0701

Ensaio cinetico_Exp.22: 250 bar / 10oC, Simone 50
 10:47 Thursday, October 5, 2000

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTHAT	MRES
1	120	0.0468	0	0.05346	-0.006659
2	180	0.0644	0	0.06416	0.000236
3	240	0.0816	0	0.07487	0.006732
4	300	0.0870	0	0.08557	0.001427
5	360	0.0989	0	0.09628	0.002623
6	420	0.1093	0	0.10698	0.002318
7	480	0.1120	0	0.11769	-0.005686
8	540	0.1211	60	0.13727	-0.016171
9	600	0.1751	120	0.15686	0.018245
10	660	0.1845	180	0.17644	0.008060
11	720	0.1849	240	0.19602	-0.011125

b) Regressão não linear

Ensaio cinetico-Exp.18: 250 bar / 10oC, Simone 99
10:47 Thursday, October 5, 2000

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton					
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	0.316830	0.000180	0.000154	492.000000	0.895041
1	0.031661	0.000180	0.000154	492.601113	0.000917
2	0.031661	0.000180	0.000154	492.599214	0.000917

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	
Regression	4	0.16747284664	0.04186821166	
Residual	7	0.00091749336	0.00013107048	
Uncorrected Total	11	0.16839034000		
(Corrected Total)	10	0.02277730727		
Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	0.0316607	0.011651247	0.00410967	0.05921176
B1	0.0001802	0.000036060	0.00009491	0.00026545
B2	0.0001545	0.000092639	-0.00006457	0.00037355
KNOT1	492.59921	99.691810717	256.8636482	728.3347797

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
ffffffffff				
ffff				
B0	1	-0.928476691	0.3614090618	-0.314343593
B1	-0.928476691	1	-0.389249472	0.4509435566
B2	0.3614090618	-0.389249472	1	0.5257205838
KNOT1	-0.314343593	0.4509435566	0.5257205838	1

c) Gráfico de dispersão

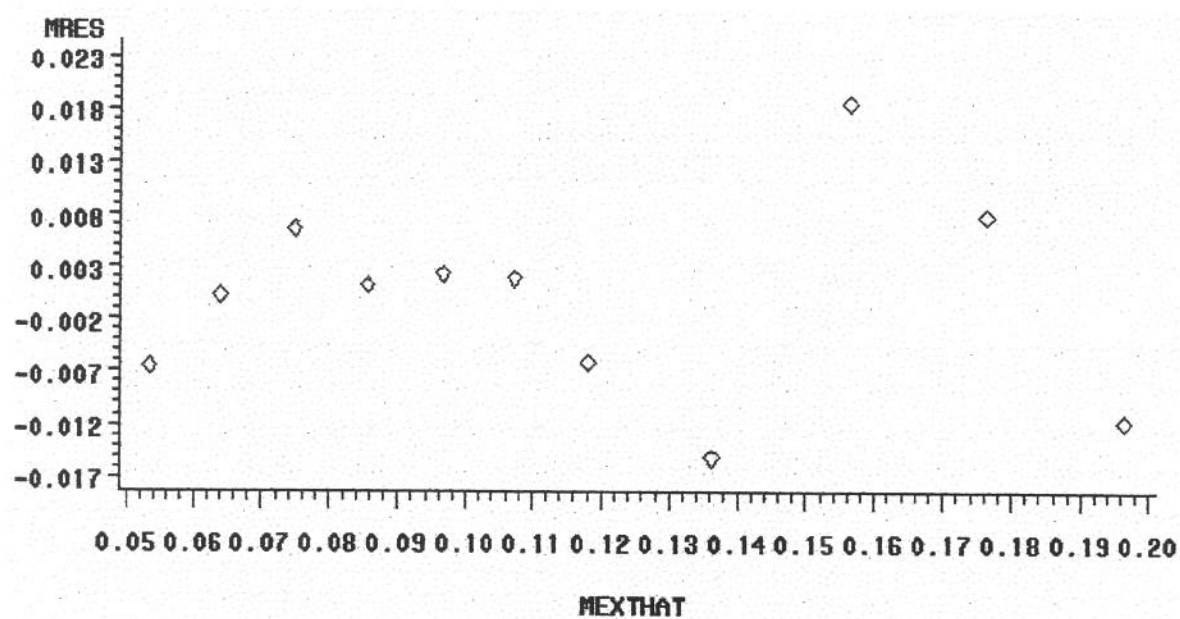


Fig.H.2_3_c.Gráfico de dispersão - ensaio 18

d) Gráfico de ajuste

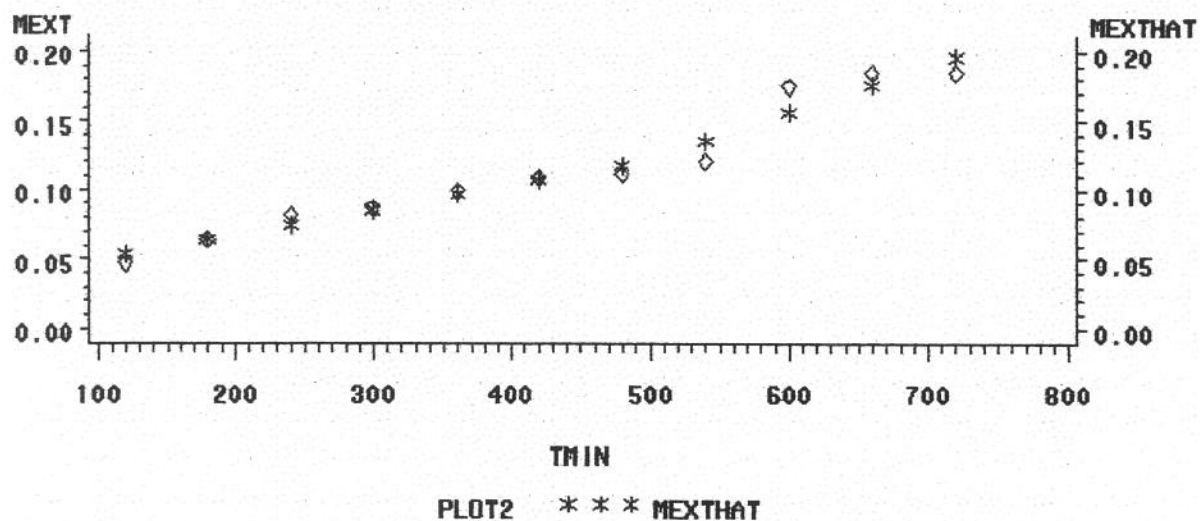


Fig.H.2_3_d.Gráfico de ajuste - ensaio 18

H.2_4. Ensaio 19 (120 bar/10°C)

a) Regressão linear

Ensaio cinetico_Exp.19: 120 bar / 10oC, Simone 107
 10:47 Thursday, October 5, 2000

Model: MODEL1

Dependent Variable: MEXT

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.01473	0.00736	2320.227	0.0001
Error	9	0.000028	3.1735463E-6		
C Total	11	0.01476			

Root MSE	0.00178	R-square	0.9981
Dep Mean	0.04332	Adj R-sq	0.9976
C.V.	4.11261		

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.008247	0.00121718	-6.776	0.0001
TMIN	1	0.000116	0.00000326	35.627	0.0001
AL1	1	0.000379	0.00001795	21.101	0.0001

Ensaio cinetico_Exp.19: 120 bar / 10oC, Simone 108
 10:47 Thursday, October 5, 2000

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTHAT	MRES
1	60	0.0003	0	-0.00128	0.0015756
2	120	0.0032	0	0.00570	-0.0024960
3	180	0.0109	0	0.01267	-0.0017676
4	240	0.0210	0	0.01964	0.0013608
5	300	0.0287	0	0.02661	0.0020892
6	360	0.0334	0	0.03358	-0.0001824
7	420	0.0422	0	0.04055	0.0016460
8	480	0.0450	0	0.04753	-0.0025256
9	540	0.0549	0	0.05450	0.0004028
10	600	0.0632	6	0.06374	-0.0005409
11	660	0.0943	66	0.09343	0.0008657
12	720	0.1227	126	0.12313	-0.0004277

b) Regressão não linear

Ensaio cinetico-Exp.19: 120 bar / 10oC, Simone 117
 10:47 Thursday, October 5, 2000

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT			Method: Gauss-Newton		
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.008247	0.000116	0.000379	594.000000	0.0000286347
1	-0.008278	0.000116	0.000379	594.393726	0.0000285466
2	-0.008278	0.000116	0.000379	594.393207	0.0000285466

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	0.03724271344	0.00931067836
Residual	8	0.00002854656	0.00000356832
Uncorrected Total	12	0.03727126000	
(Corrected Total)	11	0.01475525667	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic Confidence Interval Lower	Asymptotic 95 % Upper
B0	-0.0082778	0.0013723264	-0.01144240	-0.00511316
B1	0.0001163	0.0000040645	0.00010696	0.00012571
B2	0.0003795	0.0000226301	0.00032731	0.00043169
KNOT1	594.39320	5.9803652505	580.6023273	608.1840874

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
ffffffffff	1	-0.888523317	0.1595834986	-0.341149979
ffff		1	-0.179605302	0.5272217076
			1	0.5383825277
				1

c) Gráfico de dispersão

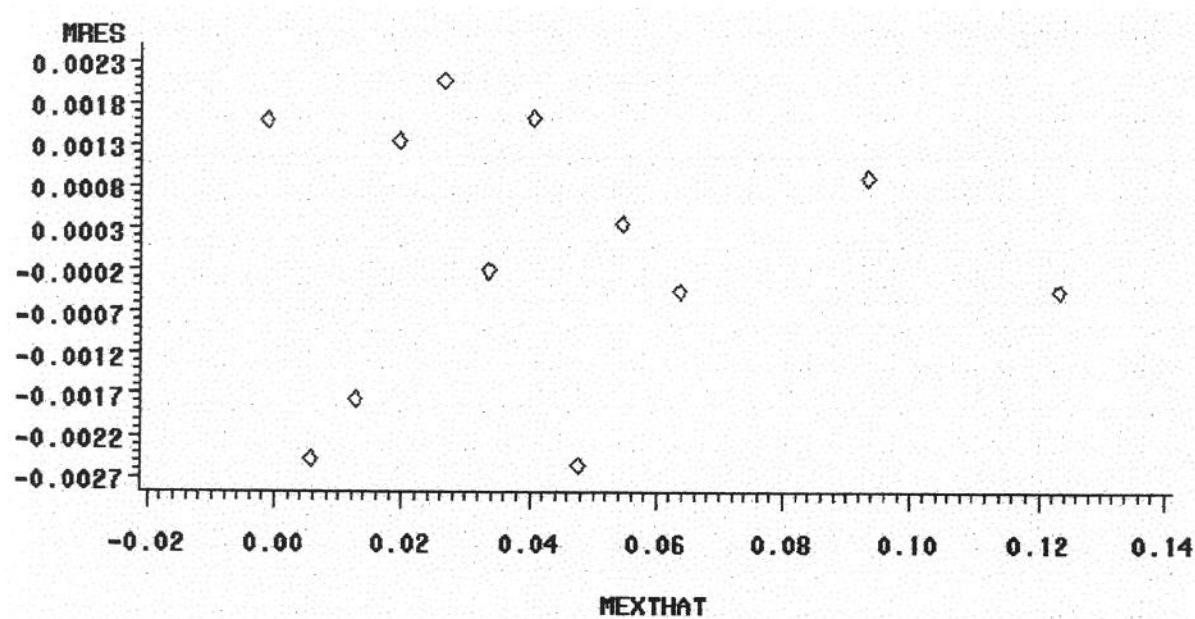


Fig.H.2_4_c.Gráfico de dispersão - ensaio 19

d) Gráfico de ajuste

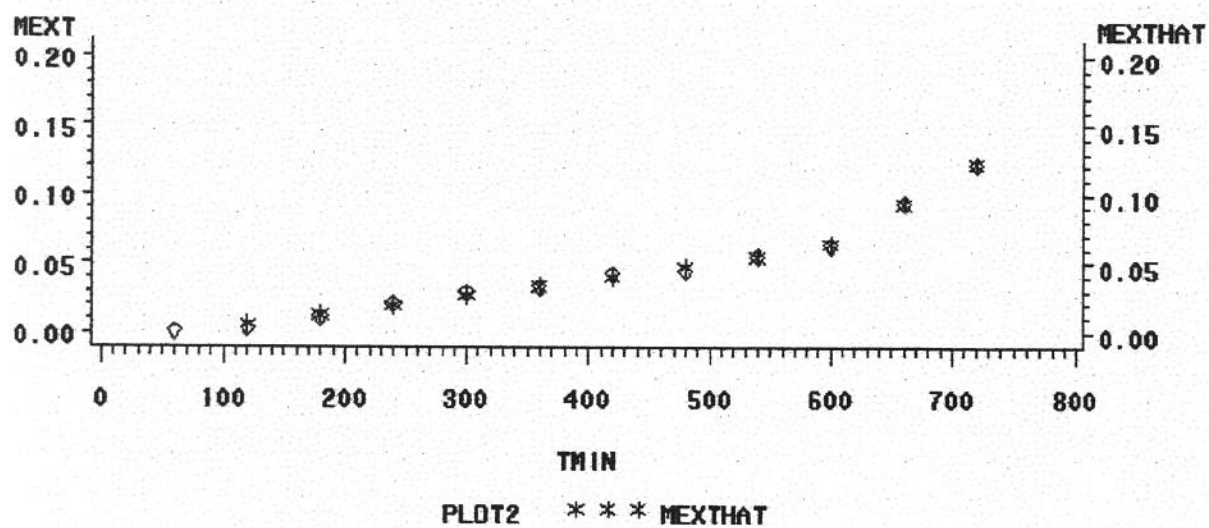


Fig.H.2_4_d.Gráfico de ajuste - ensaio 19