

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS - DEA
Laboratório de Separações Físicas - LASEFI

EXTRAÇÃO DOS GLICOSÍDEOS DA ESTÉVIA COM FLUIDOS PRESSURIZADOS

ANTONIO PASQUEL RUIZ

Ingeniero en Industrias Alimentarias, 1982 (UNAP - Iquitos - PERU)

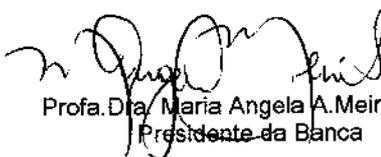
M.Sc. Engenharia de Alimentos, 1992 (UNICAMP)

Orientadora: Profa. Dra. MARIA ANGELA DE ALMEIDA MEIRELES

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Antonio Pasquel Ruiz aprovada pela Comissão Julgadora em 28 de setembro de 1999.

Campinas, 28 de setembro de 1999


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

Tese apresentada à Comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Arquivada na Biblioteca "Zeferino Vaz" – setembro - 1999



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
T. MBO BC/	39.219
PROC.	22.9.199
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	21/10/99
V.º CPD	

CM-00136439-1

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

P265e

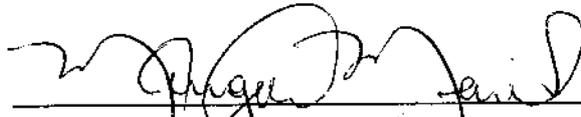
Pasquel Ruiz, Antonio

Extração dos glicosídeos da estévia com fluidos
pressurizados / Antonio Pasquel Ruiz. – Campinas, SP: [s.n.],
1999.

Orientador: Maria Angela de Almeida Meireles
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

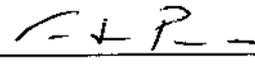
1. Estévia rebaudiana. 2. Glicosídeos. 3. Extração
(Química). 4. Transferência de massa. I. Meireles, Maria
Angela de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



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

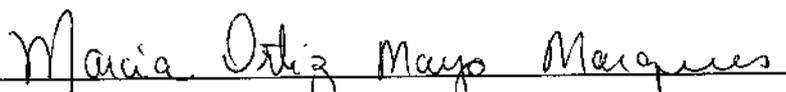
Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles (Membro – Titular)
DEA/FEA/UNICAMP



Prof. Dr. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa (Membro – Titular)
Lab. Tecnologia Supercrítica/EQ/UFRJ-Rio de Janeiro



Prof. Dr. João Alexandre F. da Rocha Pereira (Membro – Titular)
DESQ/FEQ/UNICAMP



Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques (Membro – Titular)
Seção de Fitoquímica/IAC - Campinas

Prof. Dra. Helena Maria André Bolini Cardello (Membro – Suplente)
Dpto.de Alimentos e Nutrição/FCF/UNESP - Araraquara

Prof. Dra. Míriam Dupas Hubinger (Membro – Suplente)
DEA/FEA/UNICAMP

Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.

Albert Einstein (1879-1955)[citado por Carl Sagan em *O mundo assombrado pelos demônios: A ciência vista como uma vela no escuro*, 1996]

DEDICO ESTA TESE

Com todo meu carinho e amor, para meus filhos Wladimir Antonio e Diego Francisco, de nove e seis anos respectivamente, cujas existências e expectativas constituem a força motriz de meu dia a dia.

Com todo amor para a Doris Mercedes, minha mulher, companheira e amiga, que sempre soube estimular meus planos e sonhos e resistiu valentemente os primeiros seis meses deste empreendimento, em que tivemos que lidar com grandes dificuldades de todo tipo, constituindo-se desse modo em suporte imprescindível para enfrentar as tensões cotidianas.

Para minha mãe que com seu amor, sua simplicidade e sua dedicação pelo trabalho, foi e ainda é, fundamental para fazer de mim a pessoa que agora escreve estes parágrafos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento mediante Processo 95/5262-3, do projeto de pesquisa que tem a esta tese como parte integrante, e pela bolsa de doutorado que me foi concedida entre agosto de 1995 e setembro de 1999 mediante o Processo 95/3390-4.

À Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles pela orientação e pelo apoio durante o desenvolvimento dessa Tese.

À Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques do Instituto Agrônomo de Campinas, pela amizade e pela inestimável ajuda na parte analítica dessa Tese.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Pereira da Silva do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da FEA, pelo apoio na utilização do Laboratório de Análise Sensorial da FEA.

Ao Prof. Dr. Ademir José Petenate do Departamento de Estatística do IMECC pelo apoio na avaliação estatística dos dados obtidos no decorrer da pesquisa.

À Profa. Dra. Helena Maria André Bolini Cardello pelo apoio na análise dos resultados obtidos durante a análise sensorial dos produtos.

À Sílvia Regina Mendes Moreschi, mestranda do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá, e à Dra. Joana D'arc Felício de Souza do Laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais e Sanidade do Instituto Biológico de São Paulo, pelo apoio nas análises de CLAE dos extratos glicosídicos.

Aos professores Dr. Antonio José de Almeida Meirelles, Dr. Fernando Pellegrini Pessoa, Dr. João Alexandre F. da Rocha Pereira e Dra. Miriam Dupas Hubinger, membros da Banca Examinadora desta Tese, pelas sugestões para melhorar a qualidade deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da FEA e à Profa. Dra. Maria Regina Wolf Maciel do Departamento de Processos Químicos da FEQ, membros da Banca no meu Exame de Qualificação de Área, pelas valiosas sugestões no início dessa Tese.

Ao Ariovaldo Astini (Ari), técnico do LASEFI, pela cooperação, apoio e ajuda na parte operativa dessa Tese.

Ao Prof. Dr. Lucio Cardozo Filho do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá, ex-colega do LASEFI, por facilitar o contato com seu Departamento para as análises de CLAE dos extratos glicosídicos da estévia.

À Vanessinha, ex-estagiária da Dra. Marcia Marques no Instituto Agronômico de Campinas, pela constante ajuda na parte operativa das análises cromatográficas.

À Alcilene, à Alessandra, à Carmen Müller, ao França, ao Gabriel, à Luiza, à Nadia, e à Vera, companheiras e companheiros de laboratório, pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntos.

À Blanca Díaz, compatriota doutoranda na FCM, pela amizade e pelo apoio, especialmente nos momentos em que estive ausente de minha família.

Aos meus compatriotas Gaspar do IQ, Yurilev do IMECC, Jorge do IFGW, e Oscar e Mari da FEA, pela amizade e companheirismo nesses anos todos do meu doutorado.

CONTEÚDO

BANCA EXAMINADORA.....	III
DEDICO ESTA TESE.....	VII
AGRADECIMENTOS.....	IX
CONTEÚDO.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	17
REVISÃO DE LITERATURA.....	19
ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO DAS FOLHAS DA ESTÉVIA.....	59
EXTRAÇÃO DOS GLICOSÍDEOS DA ESTÉVIA.....	89
EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM CO ₂ PRESSURIZADO NA PERCEPÇÃO SENSORIAL DOS GLICOSÍDEOS DA ESTÉVIA.....	151
CONCLUSÕES GERAIS E RECOMENDAÇÕES.....	169

TESE DE DOUTORADO

Autor: Antonio Pasquel
Título: Extração dos Glicosídeos da Estévia com Fluidos Pressurizados
Orientadora: Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
Departamento de Engenharia de Alimentos – DEA, FEA, Unicamp, Setembro/1999

RESUMO

O forte sabor residual do extrato glicosídico da estévia dificulta o uso dos glicosídeos desta planta como substitutos da sacarose, sendo portanto necessário a remoção total (derivados terpenoides) ou parcial (os próprios glicosídeos) das substâncias associadas a esse sabor residual. O objetivo desse trabalho foi investigar as melhores condições para o pré-tratamento da estévia com dióxido de carbono pressurizado. O processo de extração da estévia foi estudado em três etapas: *i*) o pré-tratamento das folhas usando CO₂ pressurizado, *ii*) a extração dos glicosídeos a partir de folhas pré-tratadas e sem pré-tratamento, *iii*) e a análise sensorial dos extratos glicosídicos.

Foi montada uma unidade de laboratório para extração com fluidos pressurizados com um extrator de 235,9 cm³ e pressão de trabalho de até 350 bar. Foram utilizadas folhas colhidas em 1995 em Maringá (PR). As folhas secas e trituradas da estévia foram extraídas com dióxido de carbono supercrítico e dióxido de carbono líquido comprimido. O planejamento experimental foi baseado em um desenho fatorial completo com 2 níveis em cada um dos 4 fatores em estudo: pressão, temperatura, granulometria e vazão do solvente. A análise estatística dos rendimentos mostrou efeito significativo da temperatura ($p=0,0360$), da pressão ($p=0,0008$) e da interação destas duas variáveis juntas ($p=0,0228$). Por meio de cromatografia em camada delgada e CG-EM determinou-se que o perfil fitoquímico do extrato foi similar em todos os experimentos. Cerca de 55% dos compostos presentes no extrato foram identificados como: sesquiterpenos, ácidos graxos, hidrocarbonetos alifáticos, esteróides e triterpenos.

Os glicosídeos da estévia foram extraídos por dois métodos: *i*) extração com mistura de fluidos pressurizados, e *ii*) extração convencional. Para a primeira técnica se utilizou folhas pré-tratadas com CO₂, enquanto que para a segunda utilizou-se folhas pré-tratadas e folhas sem pré-tratamento. Para o estudo do efeito das variáveis de processo: pressão,

temperatura e co-solvente, foi formulado um plano fatorial fracionado com 2 níveis de pressão, 3 níveis de temperatura e 3 níveis de co-solvente. Os níveis escolhidos foram 120 e 200 bar; 16, 30 e 45°C; e, aproximadamente 9,5% molar de água, etanol e mistura água-etanol (aproximadamente 50:50% molar). As extrações da estévia foram realizadas durante doze horas, e verificou-se que o maior rendimento (3,4% em massa) foi obtido quando se utilizou água como co-solvente a 120 bar e 16°C, seguido de muito longe (0,6%) pelo experimento que usou também água como co-solvente porém a uma pressão de 200 bar e 45°C. Não se encontrou efeitos significativos de nenhuma das variáveis de forma individual para 95% de intervalo de confiança, o que leva a supor que o maior rendimento deve ser função do efeito combinado das três variáveis. Os extratos glicosídicos foram analisados por CLAE, observando-se a presença do esteviosídeo e do rebaudiosídeo A em todos os extratos. Os glicosídeos foram quantificados por espectrofotometria ultravioleta a 210 nm, usando esteviosídeo como padrão de calibração. No caso da extração convencional determinou-se que os rendimentos foram menores que o maior rendimento obtido por extração com mistura de fluidos pressurizados, e verificou-se também, que o rendimento foi maior quando se utilizou folhas de estévia pré-tratadas com CO₂ pressurizado, embora tão pouco exista diferença estatisticamente significativa nesse caso.

Para a análise sensorial dos extratos glicosídicos foi constituído um corpo treinado de provadores através de uma seleção rigorosa dos participantes. A equipe de provadores analisou a intensidade de doçura dos extratos glicosídicos obtidos por extração convencional a partir de folhas de estévia pré-tratadas com CO₂ pressurizado a 200 bar e 30°C, e folhas sem pré-tratamento. Encontrou-se que a potência edulcorante foram iguais para os dois extratos, embora a percepção do sabor residual tenha sido maior no caso do extrato sem pré-tratamento. Muito embora, não tenha sido feita a análise sensorial dos glicosídeos obtidos com a mistura de fluidos pressurizados, supõe-se que a sua qualidade em termos de percepção de doçura e de sabor residual deve ser ainda maior, devido a seu maior conteúdo de rebaudiosídeo A.

Palavras Chave: *Estévia, Glicosídeos, Extração Pressurizada, Extração Supercrítica, Transferência de Massa, Extração em Leito Fixo, Co-solvente, Análise Sensorial.*

DOCTORATE THESIS

Author: Antonio Pasquel
Title: Extraction of Stevia Glycosides with Pressurized Fluids
Major Professor: Dr. Maria Angela de Almeida Meireles
Department of Food Engineering – DEA, FEA, Unicamp, September 1999

ABSTRACT

The strong residual taste of the glycosidic extract of stevia leaves hinders the use of the glycosides from this plant as substitutes for sucrose, being necessary the total removal (terpenoids) or partial (some glycosides) of the substances associated to the residual flavor. The objective of this work was to investigate the best conditions for the pre-treatment of the stevia with pressurized carbon dioxide. The process of stevia extraction was studied in three stages: i) the pre-treatment of the leaves using pressurized CO₂, ii) the extraction of the glycosides using pre-treated leaves and without pre-treatment, iii) and the sensorial analysis of the glycosidic extracts.

A laboratory unit was set up for extraction with fluids pressurized with an extractor of 235,9 cm³ and working pressures of up to 350 bar. Leaves from the 1995 crop were used. The dried and triturated stevia leaves were extracted with pressurized carbon dioxide. The experimental plan used a factorial design with 2 levels of the 4 factors in study: pressure, temperature, particle size and solvent flow rate. The statistical analysis for the yields showed a significant effect of temperature ($p=0.0360$), of pressure ($p=0.0008$) and of the interaction of these two variables ($p=0.0228$). Using thin layer chromatography and CG-EM the phytochemical profile was determined. This profile was similar in all experiments. About 55% of the substances in the extract were identified as sesquiterpenes, fatty acids, aliphatic hydrocarbons, steroids and triterpenes.

The stevia glycosides were extracted with two methods: i) extraction with a mixture of pressurized fluids, and ii) conventional extraction. For the first technique pre-treated leaves were, while for the second pre-treated leaves and leaves without pre-treatment were used. To study the effects of process variables: pressure, temperature and co-solvent, a fractional factorial design was formulated with 2 levels of pressure, 3 levels of temperature,

and 3 levels of co-solvent. The chosen levels were 120 and 200 bar; 16, 30 and 45°C; and, approximately 9.5% molar of water, or ethanol, and a mixture of water-ethanol (approximately 50:50% molar). The extractions of the stevia were accomplished for twelve hours. The largest yield (3.4% mass) was obtained using water as co-solvent at 120 bar and 16°C, followed very far by (0.6%) the experiment that also used water as co-solvent however at a pressure of 200 bar and 45°C.

The effects of the process variables were not significant individually for 95% of confidence interval. Therefore, it is possible that the largest yield is a result of the combined effect of the three variables. The glycosidic extracts were analyzed by HPLC; being observed the presence of the stevioside and of the rebaudioside A in all extracts. The glycosides were quantified by UV spectrophotometer at 210 nm, using stevioside as the standard. In the case of the conventional extraction it was determined that the yields were smaller than the largest yield obtained with the mixture of pressurized fluids, and it was also verified, that the yield was larger when pre-treated leaves were used, although the difference was not statistically significant.

For the sensorial analysis of the glycosidic extracts a trained panel was constituted through a rigorous selection of participants. The panel analyzed the intensity of sweetness of the extracts obtained by conventional extraction using pre-treated leaves and leaves without pre-treatment. The sweetness potency was same for the two extracts, although the perception of the residual taste was larger in the case of the extract obtained from leaves without pre-treatment. Although, the sensorial analysis of the glycosides obtained with the mixture of pressurized fluids was not done, it is probable that their quality in terms of perception of sweetness and of residual taste should be better, due to the larger rebaudioside A content.

Keywords: *Stevia, Glycosides, Pressurized Extraction, Supercritical Extraction, Mass Transfer, Fixed Bed Extraction, Entrainer, Sensorial Analysis*

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, ou simplesmente estévia ao longo desse trabalho, é uma planta originária do Paraguai, onde cresce espontaneamente, e na atualidade é cultivada comercialmente no Brasil, Paraguai, Uruguai, América Central, Estados Unidos, Israel, Tailândia, Inglaterra, Rússia e China.

Em 1900 o químico paraguaio Ovidio Rebaudi, em cuja homenagem Bertoni batizou a planta, estudou as principais características químicas da estévia e conseguiu isolar dois tipos de substâncias: uma extremamente doce e uma outra amarga com as características de aperitivo digestivo. Destas duas foi o princípio edulcorante que mais atenção atraiu e atrai até hoje. As folhas da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni contêm uma complexa mistura de diterpenos labdânicos, triterpenos, estigmasterol, taninos, óleos voláteis e, oito glicosídeos diterpênicos doces: esteviosídeo, esteviolbiosídeo, rebaudiosídeos A, B, C, D e E, e dulcosídeo A. Destes glicosídeos, as folhas contêm basicamente esteviosídeo e rebaudiosídeo A, sendo que este é mais estável, muito mais doce e, com menor sabor amargo que o esteviosídeo. O rebaudiosídeo E é tão doce quanto o esteviosídeo, e o rebaudiosídeo D é tão doce quanto o rebaudiosídeo A, enquanto os outros glicosídeos são menos doces que o esteviosídeo [Cramer & Ikan, 1987; Angelucci, 1979].

A extração convencional desses glicosídeos é feita através de processos combinados de extração sólido-líquido e líquido-líquido, porém os extratos glicosídicos obtidos possuem um marcante sabor residual amargo responsável por muitas das restrições ao uso da estévia. Existem muitas hipóteses para explicar esse sabor residual: Phillips [1987] descreve que através de uma patente europeia de 1985, a Stevia Company reporta que os óleos essenciais, taninos e flavonóides, contribuem para o sabor desagradável da estévia, enquanto Soejarto *et al* [1983] acreditam na responsabilidade das lactonas sesquiterpênicas nesse sabor amargo. Por sua parte, Tsanova *et al* [1991] sugerem que o cariofileno e o espatulenol contribuem decisivamente no sabor desagradável dos produtos derivados da estévia, mas como bem lembra Phillips [1987], não se deve esquecer que o próprio

esteviosídeo e o rebaudiosídeo A têm sua cota de sabor amargo, embora no caso desse último seja significativamente menor que no primeiro.

Tan *et al* [1988] patentearam, no Japão, a extração dos glicosídeos das folhas da estévia utilizando CO₂ supercrítico e um co-solvente, seguido de purificação com resinas de adsorção porosas. Foram utilizados metanol, etanol e acetona como co-solventes. Por sua vez Kienle [1990] patenteou um processo similar nos Estados Unidos. Porém, estas patentes não respondem questões referentes à fenomenologia do processo como tampouco avaliam o efeito do dióxido de carbono durante a extração.

Por outro lado, quando a extração com fluidos supercríticos é comparada com a extração líquida convencional observa-se algumas vantagens às operações de separação convencionais, por exemplo, sua maior rapidez na extração e na separação de fases, devido às especiais características de transferência de massa dos fluidos supercríticos e na vizinhança do seu ponto crítico, pois os coeficientes de difusão binária em misturas fluido supercrítico-soluto de baixa volatilidade são da ordem de 10⁻⁸ m²/s, o que significa ao redor de uma ordem de grandeza maior que para os líquidos e duas ordens de grandeza menor que para gases; e, a extrema facilidade na recuperação dos solventes, recorrendo ao simples mecanismo de despressurização até a pressão ambiente [McHugh & Krukoni, 1994; Brunner, 1994]. Entretanto, é necessário analisar criteriosamente cada processo antes de se propor uma generalização que pode não ser inteiramente exata em alguns casos [McHugh & Krukoni, 1994], e o estudo da cinética de um processo em particular é parte dessa análise criteriosa de maneira a se ter informação útil para o projeto de um processo como a pressão, a temperatura e a quantidade de solvente requerido no processo em questão.

Baseados na informação precedente, a hipótese considerada nesse trabalho é que o CO₂ pressurizado solubiliza e arrasta algumas das substâncias responsáveis pelo sabor e aroma desagradável do extrato; entendendo-se como fluido pressurizado o fluido supercrítico e o fluido abaixo, porém na vizinhança, do seu ponto crítico. Consequentemente, se propôs como objetivo principal o estudo do efeito do dióxido do carbono pressurizado e de dois co-solventes na extração dos glicosídeos da estévia, através da caracterização dos extratos, da determinação de parâmetros cinéticos do processo e da análise sensorial dos extratos glicosídicos.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DE LITERATURA

Conteúdo

ÍNDICE DE FIGURAS	19
ÍNDICE DE TABELAS	20
NOMENCLATURA.....	20
2.1 A ESTÉVIA NO BRASIL E NO MUNDO: UMA CARACTERIZAÇÃO GERAL.....	23
2.1.1 Composição química	23
2.1.2 Principais propriedades da estévia	27
2.1.3 Extração da estévia.....	30
2.2 EXTRAÇÃO COM FLUIDOS PRESSURIZADOS: UMA REVISÃO GERAL.....	31
2.3 MODELAGEM MATEMÁTICA DA EXTRAÇÃO PRESSURIZADA EM LEITOS FIXOS.....	34
2.3.1 Modelos empíricos	36
2.3.2 Modelos em analogia com processos de transferência de calor	40
2.3.3 Modelos baseados em balanços de massa.....	41
2.3.3.1 Considerações básicas sobre a transferência de massa.....	42
2.3.3.2 Modelos baseados em balanços de massa	43
2.4 ALGUMAS CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

Índice de Figuras

Figura 2. 1: Principais glicosídeos da estévia: esteviosídeo e rebaudiosídeo	24
Figura 2. 2: Diagrama de fases de uma substância pura [Rizvi <i>et al</i> , 1987].....	31
Figura 2. 3: Definição da região crítica em uma mistura binária [Brunner, 1994]	32
Figura 2. 4: Diagrama do mecanismo de extração segundo o modelo de Goto.....	49

Índice de Tabelas

Tabela 2. 1: Etapas significativas na pesquisa da estévia.....	27
Tabela 2. 2: Constituintes químicos da estévia.....	28
Tabela 2. 3: Propriedades físico-químicas do esteviosídeo e dos rebaudiosídeos [Cramer & Ikan, 1987].....	29

Nomenclatura

A	:	área de transferência de massa
A ₁ , ... A ₆	:	parâmetros a serem estimados
a _o	:	área interfacial específica
a _p	:	área da partícula
A _x	:	definida na equação (2.41)
B ₁ , ... B ₆	:	parâmetros a serem estimados
C _∞	:	concentração, na fase fluida, das substâncias extraídas
C ₀	:	concentração inicial média das substâncias que podem ser extraídas
C ₁	:	concentração de solutos na solução
C ₁ (sat)	:	concentração de saturação na superfície das partículas sólidas
C _{d1}	:	concentração do soluto após uma difusão rápida
C _{d2}	:	concentração do soluto após uma difusão lenta
C _m	:	concentração média das substâncias que podem ser extraídas da matriz sólida
C _{rs}	:	concentração do soluto na partícula sólida
C _{rs0}	:	C _{rs} no tempo zero
C _w	:	concentração do soluto após a extração convectiva
D	:	difusividade
d _p	:	diâmetro médio da partícula
k	:	coeficiente global de transferência de massa
K	:	constante de adsorção no equilíbrio
k _e	:	coeficiente de transferência de massa externo

k_f	:	coeficiente de transferência de massa na fase fluida
k_s	:	coeficiente de transferência de massa na fase sólida
L	:	distância média de transferência de massa
M	:	massa de extrato
M_0	:	massa de soluto difundido após tempo infinito
m_e	:	massa do extrato
M_s	:	massa do substrato sólido
M_t	:	massa de soluto transferida
N	:	massa de inertes no modelo de Lack
P	:	pressão
q	:	massa de solvente/massa de inertes no modelo de Lack
q_{FER}	:	valor de q durante o período de taxa de extração constante
\dot{q}	:	vazão do solvente
r	:	raio da partícula
Re	:	número de Reynolds
Sc	:	número de Schmidt
T	:	temperatura
t	:	tempo
U	:	velocidade superficial
V	:	volume do leite
V_f	:	volume do fluido
V_p	:	volume da partícula
x_0	:	razão mássica do conteúdo inicial de soluto à matéria prima livre de soluto
Y	:	razão da massa de soluto extraída à massa de matéria prima
y_r	:	solubilidade do soluto no solvente
z	:	distância que o soluto se difunde no sólido

Letras gregas

τ	:	tempo de residência (v/q)
α	:	fração de vazios do leito
ε	:	porosidade do leito
κ	:	constante cinética
ρ_f	:	densidade do solvente
ρ_s	:	densidade do sólido
θ	:	tempo adimensional (t/ τ) no modelo de Goto

2.1 A Estévia no Brasil e no Mundo: Uma Caracterização Geral

Embora a história da estévia remonta ao tempo dos indígenas guaranis, e tenha sido descrita pela primeira vez em 1899 sob o nome de *Eupatorium rebaudianum* sp., no Paraguai, pelo naturalista Moisés S. Bertoni [Bridel & Lavieille, 1931a], aparentemente a primeira descrição detalhada feita no Brasil é a de Pio Corrêa no primeiro volume do seu Dicionário das Plantas Úteis do Brasil editado em 1926 [Alvarez, s.n.t.].

Felippe [1977] descreve que a primeira publicação sobre a estévia, feita na Europa, foi a divulgação, em 1901 no *Kew Bulletin*, dos relatórios e das análises de amostras enviadas pelo Cônsul Britânico em Asuncion. A seguir, em 1905, Bertoni publicou uma tradução em francês dos trabalhos de Rebaudi, porém transferindo a planta do gênero *Eupatorium*, que originalmente ele havia classificado, para o gênero *Stevia*¹, e precisando o nome como *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, como é conhecida hoje em dia [Bridel & Lavieille, 1931a].

Em 1900 o químico paraguaio Ovidio Rebaudi, em cuja homenagem Bertoni batizou a planta, estudou as principais características químicas da estévia e conseguiu isolar dois tipos de substâncias: uma extremamente doce e uma outra amarga com as características de aperitivo digestivo. Destas duas foi o princípio edulcorante que mais atenção atraiu e atrai até hoje. Relata também que as primeiras plantas da estévia foram cultivadas em 1904, na localidade de San Pedro, no Paraguai e que destas plantas foram obtidas as mudas para a sua multiplicação na *Escuela Nacional de Agronomía* do Paraguai entre 1905 e 1906, entanto o primeiro cultivo em uma escala maior (2 hectares) teria sido realizado em 1910 em Porto Bertoni no Alto Paraná [Alvarez, s.n.t.].

2.1.1 Composição química

As folhas da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni contêm uma complexa mistura de diterpenos labdânicos, triterpenos, estigmasterol, taninos, óleos voláteis e, oito glicosídeos

¹ O nome do gênero é uma homenagem ao professor espanhol de Botânica Peter James Esteve morto em 1566 [Phillips, 1987].

diterpênicos doces: esteviosídeo, esteviolbiosídeo, rebaudiosídeos A, B, C, D e E, e dulcosídeo A (ver principais glicosídeos na **Figura 2. 1**)

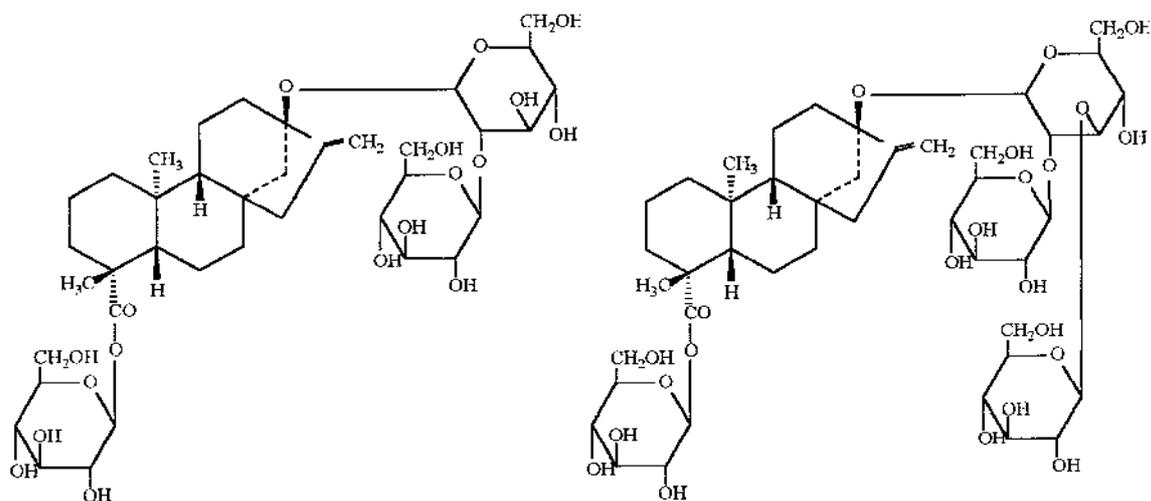


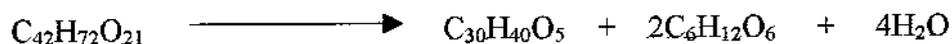
Figura 2. 1: Principais glicosídeos da estévia: esteviosídeo e rebaudiosídeo

Destes glicosídeos, as folhas contêm basicamente esteviosídeo e rebaudiosídeo A, sendo que este é mais estável, muito mais doce e, com menor sabor amargo que o esteviosídeo. O rebaudiosídeo E é tão doce quanto o esteviosídeo, e o rebaudiosídeo D é tão doce quanto o rebaudiosídeo A, enquanto os outros glicosídeos são menos doces que o esteviosídeo [Cramer & Ikan, 1987]. Segundo Phillips [1987] a concentração mássica do esteviosídeo e do rebaudiosídeo A estão entre 43 e 60% e, entre 25 e 33% do total de glicosídeos da estévia, respectivamente.

Para Wood *et al* [1955], a pesquisa química com a estévia teria começado em 1908 com o trabalho de Rasenack, que extraiu das folhas da planta com álcool quente um glicosídeo cristalino que sob hidrólise ácida produz um segundo produto cristalino; e, com o trabalho de Dietrich no ano seguinte, que usou as folhas e os galhos da planta para extrair com água duas frações: uma cristalina, solúvel em álcool e que denominou *eupatorina*, e uma outra amorfa, insolúvel em álcool denominada *rebaudina*, sendo que nenhuma dessas frações foi apropriadamente caracterizada senão até 1931 quando Bridel & Lavielle

reiniciaram as pesquisas com a estévia, mostrando que através de extrações alcóolicas-aquosas das folhas obtiveram um glicosídeo puro e cristalino cerca de 300 vezes mais doce que a sacarose.

Uma revisão mais detalhada do trabalho de Rasenack [1908] mostra que o autor extraiu das folhas da estévia usando 4 a 5 partes de etanol absoluto durante 4 a 5 horas em temperatura moderada, a frio por maceração durante 4 dias, e por percolação, sendo que o processo a frio deu os melhores resultados quanto à extração do princípio doce. Depois precipitou a solução alcoólica com 5 vezes seu peso em éter, separou o precipitado, lavou com 9 partes de éter e uma de etanol absoluto e secou-o. Obteve assim um pó quase branco que foi purificado por dissolução a quente em 2 partes de metanol que ao se resfriar precipitou na forma de cristais, que logo foram tratados com 50 a 60 partes de metanol primeiro, e 100 a 120 partes depois. O produto puro obtido teve um rendimento entre 2,5 a 3% em massa [Angelucci, 1979]. Finalmente, propôs a fórmula $C_{42}H_{72}O_{21}$ para o princípio doce purificado e equacionou a sua hidrólise assim:



Em 1915, Kobert [citado por Felipe, 1977] considerou a eupatorina como sendo uma saponina e supôs a existência de duas destas substâncias na estévia: uma ácida desprovida de sabor doce e outra neutra com sabor doce, sendo que esta última seria a eupatorina de Dietrich. Logo, em 1918, Bertoni [citado por Bridel & Lavieille, 1931a] sugeriu que o nome eupatorina usado por Dietrich fosse alterado para *estevina*, pois Dietrich desconhecia que Bertoni, no seu artigo de 1905, tinha mudado o nome da planta para *Stevia rebaudiana*.

Bridel & Lavieille [1931a, 1931b, 1931c] reportaram várias observações sobre a natureza química dos princípios doces da estévia e, em concordância com as regras estabelecidas na reunião da União Internacional de Química realizada em Copenhague em 1924, mudaram o nome da estevina para esteviosídeo, um glicosídeo diterpênico 300 vezes mais doce que a sacarose (Figura 2. 1), com $C_{38}H_{60}O_{18}$ como fórmula, e apresentaram informações preliminares sobre sua parte glicosídica denominada *esteviol* bem como sobre

sua aglicona com a seguinte fórmula: $C_{20}H_{30}O_3$. A morte prematura de Bridel, em 1931, marcou o fim desse ciclo de pesquisas da estévia.

Na década de 50, um grupo do *National Institute of Health* em Bethesda, Maryland, reiniciou as pesquisas na estrutura do esteviosídeo, confirmando a fórmula estrutural sugerida por Bridel & Lavieille [1931c]: $C_{38}H_{60}O_{18}$; estabelecendo que cada molécula do esteviosídeo contém três moléculas de glicose unidas duas a duas e individualmente à aglicona através de ligações beta: uma unidade de açúcar na função soforosa (2-O-(β -D-glicopiranosil)-D-glicose) unida a um grupo hidroxil alcoólico, e a outra em função glicopiranosose unida a um grupo carboxila [Wood *et al*, 1955; Wood & Fletcher, 1956]. O grupo também propôs estruturas para o esteviol e isoesteviol [Mosettig & Nes, 1955].

O terceiro ciclo de pesquisas importantes sobre a composição química da estévia iniciou-se nos anos 70 por um grupo da Universidade de Hiroshima e por um outro grupo da Universidade de Hokkaido. No primeiro grupo separaram e determinaram a estrutura química dos rebaudiosídeos A, B, C, D e E [Sakamoto *et al*, 1977a; Sakamoto *et al*, 1977b; Kohda *et al*, 1976], enquanto que paralelamente o segundo grupo isolou e determinou a estrutura dos dulcosídeos A e B [Kobayashi *et al*, 1977], sendo que o rebaudiosídeo C mostrou ser idêntico ao dulcosídeo B.

A **Tabela 2. 1** atualizada a partir de Phillips [1987] permite observar uma seqüência cronológica dos acontecimentos mais marcantes na história da pesquisa dos princípios adoçantes da estévia.

Tabela 2. 1: Etapas significativas na pesquisa da estévia

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 proposto 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

2.1.2 Principais propriedades da estévia

A **Tabela 2. 2** apresenta um resumo do perfil fitoquímico, conhecido até agora, da estévia, preparado a partir de uma revisão feita por Kinghorn & Soejarto [1985] e dos trabalhos de Martelli *et al* [1985] e Rahbhandari & Roberts [1983].

De outro lado, Phillips [1987] descreve que através de uma patente europeia de 1985, a Stevia Company afirma que os óleos essenciais, taninos e flavonóides, contribuem para o sabor desagradável da estévia, enquanto Soejarto *et al* [1983] acreditam na responsabilidade das lactonas sesquiterpênicas nesse sabor amargo.

Por sua parte, Tsanova *et al* [1991] sugerem que o cariofileno e o espatulenol contribuem decisivamente no sabor desagradável dos produtos derivados da estévia, mas como bem lembra Phillips [1987], não se deve esquecer que o próprio esteviosídeo e o rebaudiosídeo A tem sua cota de sabor amargo, embora no caso desse último seja significativamente menor que no primeiro.

Tabela 2. 2: Constituintes químicos da estévia

CLASSE	SUBSTÂNCIA (% w/w máximo obtido)
Glicosídeos diterpênicos	Dulcosídeo A (0,029); Esteviolbiosídeo (0,04); Esteviosídeo (7,0); Rebaudiosídeo A (1,43); Rebaudiosídeo B (0,44); Rebaudiosídeo C (0,4); Rebaudiosídeo D (0,03); Rebaudiosídeo E (0,03)
Diterpenos labdânicos	Jhanol (0,0063); Austroinulina (0,06); 6-O-acetilaustroinulina (0,15)
Triterpenos	Acetato de β -amirina (-); Lupeol (-)
Esteróides	β -sitosterol (-); Estigmasterol (-)
Glicosídeos Flavonóides	Rutina (0,0073); Centaureidina (-); Quercitrina (-)
Taninos	Não identificado
Óleos voláteis ^a	
Alcanóis	Octano-3-ol (0,00036); Oct-1-en-3-ol (0,00084)
Aldeídos	Hexan-1-ol (0,0011)
Álcoois aromáticos	Álcool benzílico (0,0012)
Monoterpenos	Canfor (0,0017); 1,8-cineol (0,00084); <i>p</i> -cymeno (0,00084); Geraniol (0,0016); Limoneno (0,0012); Linalol (0,0067); Óxido de linalol (0,0055); α -pineno (0,00048); β -pineno (0,0023); λ -terpineno (0,00024); Terpinen-4-ol (0,0012); α -Terpineol (0,0054)
Sesquiterpenos	λ -cadineno (0,0036); δ -cadineno (0,0012); α -cadinol (0,0017); <i>tert</i> -cadinol (0,0028); α -calacoreno (0,0012); Calameneno (0,0018); β -cariofileno (0,0013); Óxido de cariofileno (0,019); α -copaeno (0,00012); α -cubebeno (0,00012); β -elemeno (0,0006); <i>trans</i> - β -farneseno (0,00054); α -humuleno (0,0029); Nerolidol (0,031); β -selineno (0,0026)

(^a) Porcentagem mássica total: 0,12%

Uma comparação entre os principais glicosídeos da estévia apresentada na **Tabela 2. 3** mostra melhor as semelhanças e diferenças entre estas substâncias.

Tabela 2. 3: Propriedades físico-químicas do esteviosídeo e dos rebaudiosídeos [Cramer & Ikan, 1987]

	P.M.	% em folhas secas	Ponto Fusão (°C)	Rotação Espec. $[\alpha_D^{25}]$: graus	Solubilidade
Esteviosídeo	805	5 – 22	196-198	-39,3 c = 5,7 (H ₂ O)	0,13% em água. Pouco solúvel em etanol e solúvel em dioxano.
Rebaudiosídeo A	966	1,5 – 10	242-244 248-250	-20,8 c = 1 (MeOH)	Solúvel em água, metanol, etanol. Insolúvel em acetona, CHCl ₃ ou éter.
Rebaudiosídeo B	805	0,4	193-195	-45,4 c = 0,96 (MeOH)	Pouco solúvel em metanol.
Rebaudiosídeo C	950	0,4	215-217	-29,9 c = 1 (MeOH)	Pouco solúvel em metanol.
Rebaudiosídeo D	1128	0,03	283-286	-22,7 c = 1 (MeOH)	Pouco solúvel em metanol.
Rebaudiosídeo E	966	0,03	205-207	-34,2 c = 1 (MeOH)	Pouco solúvel em metanol.

Na sua forma pura, o esteviosídeo é um material cristalino branco com ponto de fusão entre 196-198°C, rotação ótica de $-39,3^\circ$ na água e uma composição elementar de C₃₈H₆₀O₁₈ [Wood *et al*, 1955].

O rebaudiosídeo A é mais de 450 vezes mais doce que a sacarose, embora essa potência, como no caso do esteviosídeo, diminua com a concentração. Além disso, o seu sabor é mais perto da sacarose que aquele do esteviosídeo. O sabor amargo persiste, embora em uma intensidade bem menor que no caso do esteviosídeo. Diferentemente do esteviosídeo, o rebaudiosídeo A é totalmente solúvel na água e seu sabor doce não permanece na boca por muito tempo [Morita *et al*, 1978 citado por Cramer & Ikan, 1987].

2.1.3 Extração da estévia

Os processos comerciais são muito pouco conhecidos e encontram-se protegidos por patentes na Europa, Japão e Estados Unidos, principalmente. Da pouca informação divulgada observa-se que a extração dos glicosídeos da estévia inicia-se com uma extração aquosa ou com uma extração alcóolica, seguida de precipitação ou coagulação com filtração, e uma passagem através de resinas de troca iônica antes de uma cristalização e secagem [Phillips, 1987].

Citando outros autores [Yamada, 1980; Dick Fine Chemical, 1981; Sekisui Chemical Ind KK, 1983; Banshu, 1979; Sun Star, 1980; Stevia Company, 1985; Mitsubishi, 1980; Fuji Food KK, 1982; Dynapol, 1983], Phillips [1987] reporta que o aquecimento das folhas da estévia entre 90 e 110°C preferentemente 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, cloroformio, etc., a temperaturas não maiores que 10°C. Embora a água quente seja o solvente preferido devido a sua capacidade para extrair o rebaudiosídeo A, muitas patentes ressaltam as vantagens de solventes orgânicos como etanol, metanol/cloroformio, glicerina, sorbitol ou propileno glicol. 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 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 da refinação 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 ajuda de determinados solventes.

2.2 Extração com Fluidos Pressurizados: Uma Revisão Geral

Embora a literatura especializada seja quase unânime no uso do termo Extração Supercrítica ou Extração com Fluidos Supercríticos¹ 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 (**Figura 2. 2**). Porém existem outras denominações que costumam ser utilizadas na literatura para referir-se à condição fisicoquímica do solvente: gases densos, gases supercríticos, ou gases comprimidos [Pasquel & Meireles, 1998].

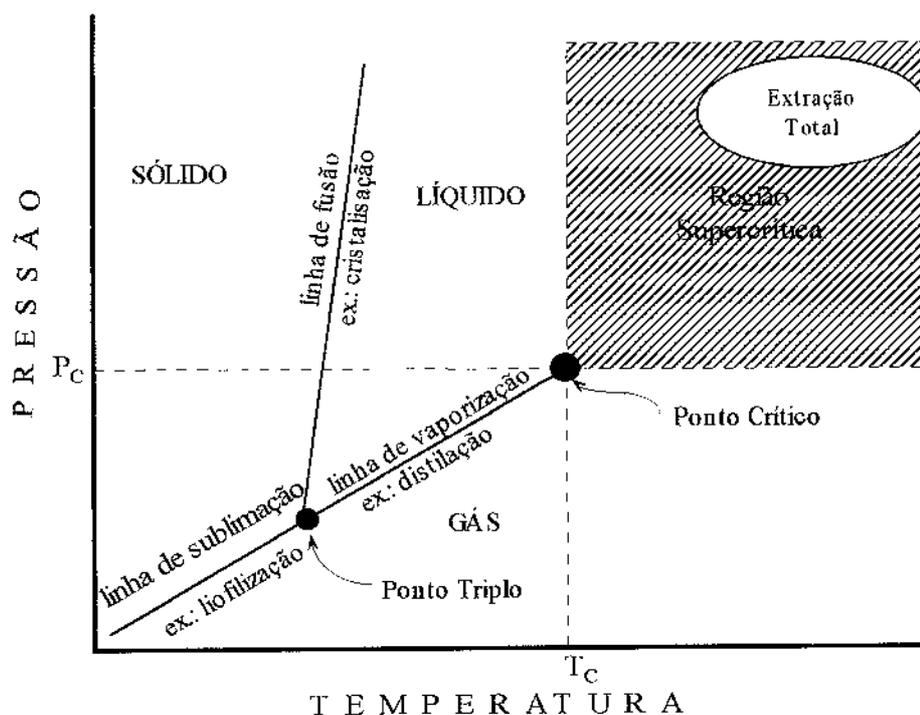


Figura 2. 2: Diagrama de fases de uma substância pura [Rizvi *et al*, 1987]

¹ SFE, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*.

A **Figura 2. 2** permite observar o diagrama de fases de uma substância pura homogênea na forma que é apresentada em qualquer livro de texto de termodinâmica como Winnick [1997], Smith *et al* [1996], Kyle [1992] ou Sandler [1989], por exemplo, com a região supercrítica claramente delimitada. Para o caso de uma mistura de substâncias Brunner [1994] considera a região supercrítica quando as condições de estado da mistura como um todo estão acima do seu ponto crítico, tal que uma mistura binária isotérmica é considerada supercrítica em todas as pressões acima da pressão crítica da mistura e, essa pressão crítica será sempre o limite superior da região de duas fases como se observa na **Figura 2. 3**

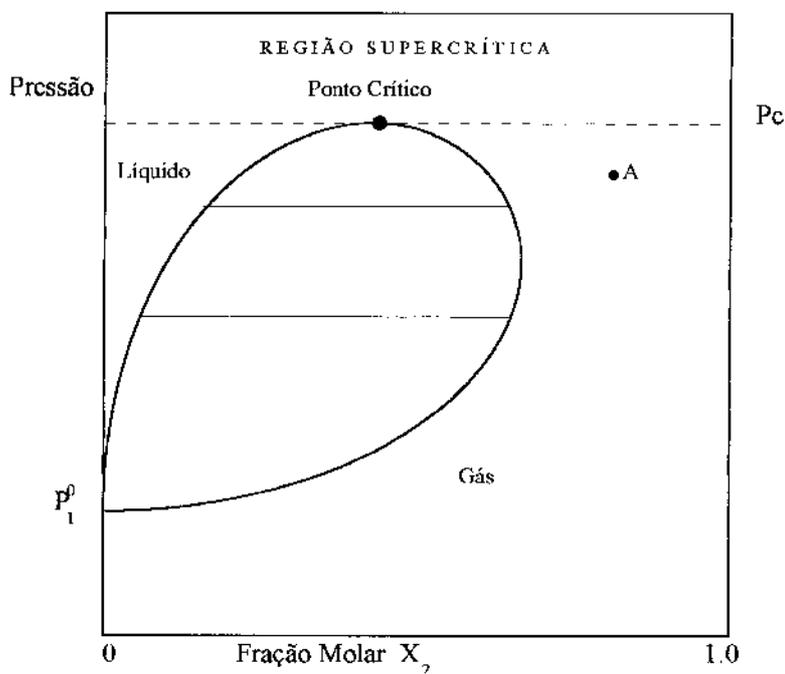


Figura 2. 3: Definição da região crítica em uma mistura binária [Brunner, 1994]

Um dado importante no estudo dos processos de separação com fluidos pressurizados, é a proposta de Zosel [1978] para denominar “*destração*” este processo, sob a consideração que a destilação baseia-se nas diferenças na pressão de vapor entre as substâncias, enquanto a extração baseia-se nas propriedades do soluto que determinam a

interação molecular com as moléculas do solvente e, ambas as características estão presentes nos processos de separação com fluidos pressurizados.

Uma breve passagem pela história dos processos com fluidos pressurizados mostra como pioneiros o trabalho do Barão de Cagniard de la Tour, que em 1822 observou visualmente o ponto crítico de uma substância¹, as pesquisas de meados do século passado do Dr. Thomas Andrews, Vice Presidente do *Queen's College* de Belfast, que em 1869 descreveu em uma palestra na *Royal Society* as propriedades críticas do dióxido de carbono² e o equipamento usado para medi-los, a apresentação de Hannay & Hogarth que em 1879 reportaram, por primeira vez, em um congresso da *Royal Society of London*, a capacidade de um fluido acima de suas condições críticas para dissolver sólidos de pressões de vapor baixas e a dependência da solubilidade dos solutos com a pressão dos fluidos supercríticos e, as pesquisas do Prof. William Ramsay do Departamento de Química da *University College* de Bristol que em 1880 questionou, na *Royal Society*, as conclusões de Hannay & Hogarth em relação à dependência da solubilidade com a pressão nos fluidos supercríticos³ [McHugh & Krukonis, 1994; Brunner, 1994; Taylor, 1996]. Porém, a extração com fluidos pressurizados é ainda uma operação de separação relativamente nova, que usa das singulares propriedades das substâncias na vizinhança do seu ponto crítico, para extrair os componentes da mistura solúveis no solvente pressurizado. Embora nos anos 70 e começo dos 80 pode-se identificar uma espécie de época de ouro no desenvolvimento da extração com fluidos pressurizados, especialmente no campo da indústria de alimentos, com pesquisas importantes nos Estados Unidos e na Europa, particularmente na antiga Alemanha Ocidental, como a série de patentes registradas pelo grupo do Prof. Zosel para descafeinação do café; Rizvi *et al* [1986a] observaram que após o trabalho de Buchner em 1906, sobre a solubilidade de substâncias orgânicas de baixa volatilidade no dióxido de carbono, importantes resultados também foram obtidos entre 1930 e 1960, especialmente no campo da indústria do petróleo, como o processo Rose⁴ desenvolvido nos anos 50. Nesse

¹ De fato, durante muitos anos o ponto crítico foi conhecido pelo nome de ponto de Cagniard de la Tour [McHugh & Krukonis, 1994]

² Os valores apresentados pelo Dr. Andrews foram 30,92°C e 74,0 bar, muito próximos dos 31,1°C e 73,8 bar aceitos atualmente.

³ Foi mostrado posteriormente que o Prof. Ramsay estava errado.

⁴ Residuum Oil Supercritical Extraction, para remover os produtos leves dos resíduos da destilação comercial do petróleo.

mesmo campo da indústria do petróleo bem como na indústria da mineração, e na mesma época, destacam-se os trabalhos do grupo do Prof. Zhuze [Williams, 1981] da então União Soviética.

Se finais dos 70 e começo dos 80 pode ser classificada como o *boom* da extração com fluidos pressurizados, observa-se na mesma época uma claro exagero nas expectativas do público com esta tecnologia, ao extremo de ser apresentada como uma panacéia técnica que resolveria todos os problemas apresentados na destilação e na extração líquida. Esse excesso de otimismo derivou em uma posterior etapa de desconfiança com o não aparecimento dos resultados desejados [McHugh & Krukonis, 1994].

Ajudado por importantes revisões realizadas nos últimos vinte anos [Reverchon, 1997; Chester *et al*, 1996; Taylor, 1996; Hutchenson & Foster, 1995; McHugh & Krukonis, 1994, 1984; Brunner, 1994; Rizvi *et al*, 1986a, 1986b; Williams, 1981; Schneider, 1978; Irani & Funk, 1977], atualmente o interesse por esta tecnologia é mais universalizado, como pode-se deduzir das revisões feitas em anos recentes em outros idiomas diferentes do inglês: Pasquel & Meireles [1998] em espanhol, Wang *et al* [1996] em chinês, Ohtera [1996] em japonês, Simandi *et al* [1995] em húngaro, Sencar-Bozic *et al* [1995] em esloveno, Juhler & Bowadt [1995] em dinamarquês e, Martinez de la Ossa & Galan Serrano [1990a, 1990b] em espanhol, entre outros.

2.3 Modelagem Matemática da Extração Pressurizada em Leitos Fixos

Os processos de extração são controlados pelas condições de operação e pelo pré-tratamento da matriz sólida. Os diferentes modelos relacionam esses parâmetros de diversas maneiras, obtendo coeficientes específicos, como os coeficientes de transferência de massa por exemplo. Esses coeficientes podem ser calculados por métodos independentes ou pelo ajuste dos resultados experimentais ao modelo utilizado [Brunner, 1994].

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. Embora não existam modelos que representem de forma generalizada todos os processos de extração com fluidos

pressurizados, Reverchon [1997] descreve três enfoques diferentes no caso da extração de óleos essenciais, que com alguns ajustes podem se estender facilmente para representar a extração de outros produtos naturais: i) modelos empíricos; ii) modelos baseados em uma analogia com a transferência de calor; e, iii) modelos baseados em balanços diferenciais de massa.

Porém, antes de revisar esses três enfoques é conveniente lembrar a aproximação que faz Brunner [1994] para modelar os processos de extração com fluidos pressurizados como se fossem processos em regime permanente. Seja \dot{M} a quantidade de substância extraída por unidade de tempo t , então:

$$\frac{dM}{dt} = \dot{M} = -M_s \frac{dC_m}{dt} \quad (2.1)$$

onde M é a massa de extrato, M_s é a massa do substrato sólido e C_m é a concentração média das substâncias que podem ser extraídas da matriz sólida. Considerando que as substâncias são primeiro transportadas através do sólido até a interface sólido-fluido e depois até a fase fluida, têm-se:

$$\dot{M} = k_s A (C_m - C_0) \quad (2.2)$$

$$\dot{M} = k_f A (C_0 - C_\infty) \quad (2.3)$$

onde k_s e k_f são os coeficientes de transferência de massa nas fases sólida e fluida respectivamente, C_0 é a concentração inicial média das substâncias que podem ser extraídas, C_∞ é a concentração na fase fluida das substâncias extraídas. Se não existem outras resistências além das resistências na fase fluida e na fase sólida, e não existe transição de fase¹, o coeficiente total de transferência de massa é:

¹ Isto é, o coeficiente de partição é igual a 1.

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_s} + \frac{1}{k_f} \quad (2.4)$$

A concentração média do extrato é obtida por integração da equação (2. 1):

$$\frac{C_m - C_\infty}{C_0 - C_\infty} \approx \exp\left(-\frac{kA}{M_s C_0} t\right) \quad (2.5)$$

e se a resistência na fase sólida controla o processo de transferência de massa, pode ser assumido:

$$\frac{1}{k_f} \ll \frac{1}{k_s} \quad \text{Logo} \quad k \approx k_s$$

A equação (2. 5) só pode representar curvas de extração após o período de taxa de extração constante, desde que para modelar a primeira parte da curva se precisaria de pelo menos um termo a mais, que tome em consideração a relação de equilíbrio na interface.

2.3.1 Modelos empíricos

Zhang *et al* [1998] utilizaram dióxido de carbono supercrítico na extração do óleo da plúmula do trigo, e estudaram os efeitos da pressão (P), temperatura (T), vazão do solvente (\dot{q}) e tempo de extração (t) no rendimento do processo. Os efeitos das variáveis foram representados na forma de três modelos cinéticos que descrevem satisfatoriamente o processo:

$$E = (A_1 + A_2 \ln P) \exp\left(\frac{-B_1 + B_2 P}{t}\right) \quad (2.6)$$

$$E = (A_3 + A_4 \ln P) \exp\left(\frac{-B_3 + B_4 P}{\dot{q}}\right) \quad (2.7)$$

$$E = (A_5 + A_6 \ln P) \exp(B_5 + B_6 TP) \quad (2.8)$$

onde A_1, \dots, A_6 e B_1, \dots, B_6 são parâmetros a determinar-se experimentalmente

Tomando como ponto de partida a solução de Crank [1975] para o caso da difusão molecular com a concentração do soluto constante na superfície de um sólido esférico:

$$1 - \frac{M_t}{M_0} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-Dn^2\pi^2 t/r^2) \quad (2.9)$$

onde M_t é a massa de soluto transferida no tempo t , D é a difusividade, r é o raio da partícula, e M_0 é a massa total de soluto que se difunde após um tempo de contato infinito, o que para efeitos práticos pode ser entendido como o conteúdo inicial de soluto no sólido. Mehr *et al* [1996] utilizaram uma aproximação simplificada da equação (2.9), bastante usada para estudar a cinética da secagem, para modelar a extração da cafeína das sementes do guaraná:

$$1 - \frac{M_t}{M_0} = A_1 - A_2 \exp(-A_3 t) \quad (2.10)$$

onde A_1 , A_2 e A_3 são os parâmetros a serem estimados, $[1 - (M_t/M_0)]$ é a quantidade de cafeína que resta na semente após um tempo t , e A_3 é igual a $(\pi^2 D/r^2)$ para uma partícula esférica.

Ferreira *et al* [1993], embora não utilizaram um modelo matemático no sentido estrito do termo, para representar as curvas de extração, determinaram três parâmetros cinéticos importantes na extração do óleo essencial da pimenta do reino com CO₂ subcrítico: i) as concentrações de equilíbrio; ii) as taxas de extração durante o período de taxa de extração constante; e, iii) a duração do período de taxa constante de extração nas diferentes condições experimentais.

Barton *et al* [1992] utilizaram o raciocínio da reação química, descrita nesse capítulo, para avaliar a extração pressurizada da oleoresina da baunilha. No lugar das expressões de transferência de massa e de equilíbrio, apresentaram uma constante da cinética de reação, supondo que a taxa de extração era proporcional à concentração de oleoresina deixada na partícula sólida (C_{rs}). Conseqüentemente eles propuseram uma equação diferencial representativa do processo:

$$\frac{dC_{rs}}{dt} = -\kappa C_{rs} \quad (2.11)$$

Se essa equação é integrada quando $t = 0$ e $C_{rs} = C_{rs0}$ obtêm-se:

$$C_{rs} = C_{rs0} \exp(-\kappa t) \quad (2.12)$$

onde κ é a constante cinética e C_{rs0} é C_{rs} no tempo zero; e, se a difusão interna na partícula é a etapa que controla o processo, consideraram legítimo supor que,

$$\kappa = \frac{Da_p}{V_p z} \quad (2.13)$$

onde A_p/V_p é a relação superfície/volume da partícula, e z é a distância que o soluto se difunde através da partícula sólida.

Na extração pressurizada das rizomas de gengibre com dióxido de carbono, Kandiah & Spiro [1990] modelaram o processo com uma equação empírica utilizada por So &

MacDonald [1986] para o caso da extração do óleo de colza, e rearranjada por Spiro & Kandiah [1989]:

$$\frac{C_{\infty} - C}{C_{\infty}} = \left(\frac{C_{d1}}{C_{\infty}} \right) \exp(-k_{d1}t) + \left(\frac{C_{d2}}{C_{\infty}} \right) \exp(-k_{d2}t) \quad (2.14)$$

$$C_{\infty} = C_w + C_{d1} + C_{d2} \quad (2.15)$$

onde C_w , C_{d1} e C_{d2} são as concentrações do soluto após uma etapa inicial de “lavagem”, uma difusão rápida e uma difusão lenta, respectivamente. As constantes de difusão respectivas das duas últimas etapas de difusão são k_{d1} e k_{d2} .

Em 1989 Naik *et al* utilizaram uma equação empírica tipo Langmuir para representar seus resultados em função do tempo, na extração do óleo essencial de cravo, gengibre, cardamomo¹ e sândalo, usando CO₂ líquido:

$$Y = \frac{Y_{\infty}t}{B + t} \quad (2.16)$$

onde Y é o rendimento, t é o tempo de extração, Y_{∞} é Y após um tempo infinito de extração. Eles encontraram que a maioria dos vegetais utilizados eram bem representados por essa expressão. Neste caso, Y é a relação da percentagem extraída à massa de material sólido inicialmente colocado na coluna de extração.

¹ Planta medicinal do sudeste asiático cujas sementes são utilizadas como especiaria. Os frutos são de sabor um tanto picante.

2.3.2 Modelos em analogia com processos de transferência de calor

Nesses modelos a extração pressurizada é analisada como um fenômeno similar ao de transferência de calor, considerando-se cada partícula sólida como um corpo quente que perde calor com o tempo, e supondo que as substâncias a serem extraídas encontram-se uniformemente distribuídas na partícula sólida [Reverchon, 1997]. A partir da segunda lei de Fick, restringida para o caso de difusão unicamente radial, com o coeficiente de difusão constante:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad (2.17)$$

que ao utilizar a transformação $u = C \cdot r$ converte-se em:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial r^2} \quad (2.18)$$

Crank [1975] utilizou transformadas de Laplace para encontrar a massa de uma substância que se difunde através de uma partícula que mantém constante sua concentração na superfície:

$$1 - \frac{M_t}{M_0} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-Dn^2\pi^2 t / r^2)$$

onde M_t é a massa de soluto difundida no tempo t , e M_∞ é a massa total de soluto que se difunde após um tempo de contato infinito, o que para efeitos práticos pode ser entendido como o conteúdo inicial de soluto a ser extraído.

Reverchon *et al* [1993] utilizaram este modelo, e encontraram que representa bem a extração do óleo essencial de alecrim, manjerona e manjeriço, em um processo descrito por cinco etapas em série: i) difusão do CO_2 através de um filme de fluido pressurizado ao

redor da partícula sólida; ii) penetração do CO₂ e difusão na partícula; iii) solubilização das substâncias; iv) difusão das substâncias solubilizadas através do sólido; v) difusão das substâncias através do filme de fluido pressurizado na superfície da partícula sólida. Para que o modelo formulado para uma única partícula seja válido no leito inteiro estimaram o número de partículas segundo a equação:

$$n_p = \frac{6V(1 - \varepsilon)}{\pi d_p^3} \quad (2.19)$$

onde V é o volume do leito, ε é a porosidade do leito, e d_p é o diâmetro das partículas esféricas; e utilizaram uma correlação semiempírica proposta por Tan *et al* [1988] para estimar o coeficiente de transferência de massa sólido-fluido:

$$Sh = 0,38 Re^{0,83} Sc^{1/3} \quad (2.20)$$

sendo Sh o número de Sherwood

$$Sh = \frac{2r_p k_e}{D_e} \quad (2.21)$$

onde k_e é o coeficiente de transferência de massa externo e D_e é a difusividade no filme ao redor da partícula sólida.

Um modelo similar ao anterior foi aplicado por Bartle *et al* [1990] para modelar a extração de 1-8 cineole a partir das folhas do alecrim com resultados aceitáveis.

2.3.3 Modelos baseados em balanços de massa

Uma terceira forma de modelar a extração de substâncias a partir de leitos fixos de substratos sólidos é determinar coeficientes de transferência de massa através do ajuste da curva de extração e de balanços de massa em um volume de controle.

O sistema de extração envolve uma fase sólida global e uma fase fluida. Essa fase fluida compreende o fluido pressurizado e os solutos dissolvidos nele, entretanto a fase sólida permanece dentro da coluna de extração e o fluido é passado através dele. A transferência de massa acontece entre essas duas fases e é representada por um balanço de massa para as substâncias transferidas e pelas relações de equilíbrio de fases, sendo que os parâmetros de operação e as condições do pré-tratamento do sólido controlam o processo [Brunner, 1994].

2.3.3.1 Considerações básicas sobre a transferência de massa

A descrição da transferência de massa envolve um modelo matemático baseado em uma hipótese básica ou “lei” que pode ser apresentada de duas formas: uma fundamental conhecida como lei de Fick que utiliza o coeficiente de difusão “D”,

$$V_f \frac{dC_1}{dt} = A \left(\frac{D}{L} \right) [C_1(\text{sat}) - C_1] \quad (2.22)$$

onde V_f é o volume da solução, A é a área total das partículas sólidas, $C_1(\text{sat})$ é a concentração de saturação na superfície das partículas sólidas, C_1 é a concentração na solução. L , a distância média de transferência de massa ou a espessura do filme não é só função do escoamento e da viscosidade mas também do próprio coeficiente de difusão. A segunda forma que, embora não tenha um nome específico, envolve o coeficiente de transferência de massa “ k ” e é mais relacionada com os trabalhos de engenharia.

$$V_f \frac{dC_1}{dt} = A j_1 = -AD \frac{dC_1}{dz} = Ak [C_1(\text{sat}) - C_1] \quad (2.23)$$

Se no primeiro caso a variável a determinar normalmente é a distância L , nessa segunda, k se mede experimentalmente.

Uma terceira forma de correlacionar os dados de um processo de transferência de massa, embora pouco utilizada e questionável por considerar a constante κ como uma função de fatores químicos quando é reconhecida sua dependência de fatores físicos, é considerar como se estivesse acontecendo uma reação química reversível de primeira ordem:

$$\frac{dC_1}{dt} = \kappa C_1(\text{sat}) - \kappa C_1 \quad (2.24)$$

onde $\kappa C_1(\text{sat})$ é a taxa de dissolução do soluto e κC_1 é a taxa de precipitação.

Em uma terminologia que poderia ser chamada de clássica, as duas primeiras formas são conhecidas por *difusão* e *convecção mássica*, respectivamente. Entretanto, alguma literatura especializada, como Cussler [1997] por exemplo, denomina indistintamente como *difusão* todas as três formas acima descritas.

A transferência de massa, como a transferência de calor, depende das condições de estado, sendo a pressão uma variável de particular importância no caso da extração com fluidos pressurizados.

2.3.3.2 Modelos baseados em balanços de massa

Dois enfoques diferentes podem ser adotados na modelagem baseada no fenômeno da transferência de massa com fluidos pressurizados: quando a solubilidade de equilíbrio ou a difusão externa são as etapas limitantes do processo, ou quando essa etapa limitante é a difusão interna.

Todos os modelos baseados em balanços de massa propostos na literatura tem algumas considerações comuns: inexistência de dispersão axial, densidade e vazão do solvente constantes ao longo do leito, e extrato constituído por uma única substância [Reverchon, 1997].

Sovová [1994] e Sovová *et al* [1994] ampliaram o modelo de Lack [Lack, 1985 citado por Sovová, 1994] para modelar a extração do óleo de sementes moídas utilizando

CO₂ supercrítico. O modelo descreve quando um solvente escoar axialmente com velocidade superficial U através de um leito fixo cilíndrico. O solvente não contém soluto na entrada do extrator e a pressão e a temperatura são constantes. O leito fixo é homogêneo em relação ao tamanho das partículas e à distribuição inicial do soluto. O soluto está contido nas células das plantas, protegido pelas paredes celulares; porém, parte dessas paredes são rompidas durante a moagem, de modo que parte do soluto é exposto diretamente ao solvente, logo a massa do soluto contida inicialmente na fase sólida é constituída por uma parte de fácil acesso que é extraída convectivamente, e uma outra parte de difícil acesso contida no interior das partículas da fase sólida que é extraída por difusão. O ponto de partida do modelo é um balanço de massa para um elemento diferencial do leito:

$$-\rho_s(1-\varepsilon)\frac{\partial x}{\partial t} = J(x, y) \quad (2.25)$$

$$\rho_f \varepsilon \frac{\partial y}{\partial t} + \rho_f U \frac{\partial y}{\partial h} = J(x, y) \quad (2.26)$$

A densidade das partículas do leito e a densidade do solvente são ρ_s e ρ_f respectivamente. Se a vazão do solvente é suficientemente elevada e o comprimento do leito é desenhado como para que o acúmulo seja muito pequeno, então, na maioria dos casos o primeiro termo do balanço na equação (2.26) é desprezível e, as equações de balanço são resolvidas com as seguintes condições:

$$x(h, t = 0) = x_0 \quad y(h = 0, t) = 0 \quad (2.27)$$

A introdução das seguintes variáveis adimensionais,

$$r = \frac{x}{x_k} \quad Y = 1 - \frac{y}{y_r} \quad z = \frac{k_f a_o}{U} h \quad \tau = \frac{k_f a_o \rho y_r}{(1 - \epsilon) \rho_s x_k} t \quad (2.28)$$

nas equações de balanço e nas condições inicial e de contorno deriva nas expressões:

$$\frac{\partial r}{\partial \tau} = \frac{\partial Y}{\partial z} = J^*(r, Y) \quad r(z, \tau = 0) = r_o \quad Y(z = 0, \tau) = 1 \quad (2.29)$$

onde

$$J^*(r, Y) = \frac{J(x, y)}{k_f a_o \rho y_r} \quad (2.30)$$

Feitas algumas considerações adicionais o conjunto de equações diferenciais é resolvido e o modelo apresentado na forma seguinte:

Para o período de taxa de extração constante,

$$e = \frac{m_e}{N} = q y_r [1 - \exp(-Z)] \quad \text{quando } q < q_m \quad (2.31)$$

$$Z = \frac{k_f a_o \rho}{\dot{q}(1 - \epsilon) \rho_s} \quad (2.32)$$

$$q = \frac{m_{sol}}{N} = \frac{m_{solvente}}{N} \quad (2.33)$$

Para o período de taxa decrescente de extração,

$$e = \frac{m_e}{N} = y_r [q - q_m \exp(z_w - Z)] \quad \text{quando } q_m \leq q < q_n \quad (2.34)$$

$$q_m = \frac{x_o - x_k}{y_r Z} \quad (2.35)$$

Para o período controlado pela difusão quando $q \geq q_n$,

$$e = \frac{m_e}{N} = x_o - \frac{y_r}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp\left(\frac{W x_o}{y_r}\right) - 1 \right] \exp[W(q_m - q)] \frac{x_k}{x_o} \right\} \quad (2.36)$$

$$W = \frac{k_s a_o}{\dot{q}(1 - \varepsilon)} \quad (2.37)$$

onde m_e é a massa de extrato, N é a massa de matéria prima isenta de solutos, y_r é a solubilidade do soluto no solvente em massa de extrato/massa de solvente, $k_s a_o$ é o coeficiente volumétrico de transferência de massa no solvente em s^{-1} , $k_s a_o$ é o coeficiente volumétrico de transferência de massa no sólido em s^{-1} , q_m é o valor de q no final do período de extração convectiva, x_o é a relação da massa inicial de soluto pela massa de matéria prima livre de solutos, x_k é definido pela equação (2.35), \dot{q} é a vazão do solvente, em g/s.

Para o caso em que as partículas da matriz sólida são porosas, trabalhando com CO_2 supercrítico para extrair compostos de elevado peso molecular de carvão ativado e de solo em leito fixo, Madras *et al* [1994] continuaram a linha de raciocínio de Goto *et al* [1993] e Peker *et al* [1992] entre outros e, modelaram o processo extrativo de modo mais sofisticado, sem usar qualquer parâmetro ajustável, sob as seguintes suposições: i) o

sistema é isotérmico; ii) os gradientes de concentração radial são desprezíveis; iii) as propriedades físicas do fluido são constantes; iv) o escoamento é axial; v) existe equilíbrio local nos poros; e, resolveram usando a técnica de colocação ortogonal.

Goto *et al* [1993] propuseram um modelo para o estudo da extração do óleo essencial das folhas da hortelã. Esse modelo baseou-se em três suposições básicas:

- 1) As folhas de hortelã são sólidos porosos que contêm óleos essenciais e lipídios,
- 2) Os óleos essenciais são extraídos das folhas por um mecanismo similar à dessorção a partir de uma matriz sólida onde os óleos essenciais estão associados com os lipídios, e
- 3) Os óleos essenciais dissolvidos no fluido supercrítico no interior da molécula sólida atingem a superfície exterior por um mecanismo difusivo, para depois serem arrastados pelo solvente em movimento

O modelo de Goto é baseado num balanço diferencial de massa ao longo de uma seção do extrator, sendo que esse volume de controle é um leito constituído de partículas tipo placa plana com uma concentração inicial do soluto, $C_{s,0}$, em cada partícula de folha e, o leito é inicialmente livre do solvente. Matematicamente o modelo de Goto é expresso pela equação:

$$x(\theta) = A_x [\exp(a_1 \theta) - \exp(a_2 \theta)] \quad (2.38)$$

que representa o comportamento da concentração adimensional ($x = C/C_0$) de soluto no efluente como uma função exponencial do tempo, da porosidade da partícula (ϵ), da fração de vazios do leito (α), do coeficiente combinado de transferência de massa (k_p) e da constante de adsorção no equilíbrio (K). Na equação (2.38):

$$a_1 = \frac{1}{2} \left(-b + \sqrt{b^2 - 4c} \right) \quad (2.39)$$

$$a_2 = \frac{1}{2} \left(-b - \sqrt{b^2 - 4c} \right) \quad (2.40)$$

$$A = \frac{(1-\alpha)\phi}{[\varepsilon + (1-\varepsilon)K]\alpha(a_1 - a_2)} \quad (2.41)$$

$$b = \frac{\phi}{\varepsilon + (1-\varepsilon)K} + \frac{1}{\alpha} + \frac{\phi(1-\alpha)}{\alpha} \quad (2.42)$$

$$c = \frac{\phi}{[\varepsilon + (1-\varepsilon)K]\alpha} \quad (2.43)$$

onde $\phi = k_p \tau$ é o coeficiente combinado adimensional de transferência de massa adimensionalizado pelo tempo de residência τ dado como a relação do volume total do leito pela vazão volumétrica nas condições do extrator, C é a concentração do soluto no solvente no volume vazio do leito (ver **Figura 2. 4**), C_i é a concentração do soluto nos poros da partícula, C_s é a concentração do soluto na partícula e C_0 é a concentração total do soluto.

O ponto de partida para a obtenção do modelo de Goto apresentado no conjunto de equações da (2. 38) a (2. 43) é um balanço de massa do soluto no solvente para um elemento diferencial do leito fixo:

$$\alpha \frac{\partial C}{\partial t} + \frac{C}{\tau} = -(1-\alpha)k_f a_p [C - (C_i)_{y=h}] \quad (2.44)$$

onde a espessura de cada placa plana que forma o leito é $2h$ e, a área superficial específica $a_p = 1/h$. Um outro balanço para o soluto contido nos poros das placas planas que constituem o leito que serve como volume de controle é:

$$\varepsilon \frac{\partial C_i}{\partial t} = D_e \frac{\partial^2 C_i}{\partial y^2} - (1-\varepsilon) \frac{\partial C_s}{\partial t} \quad (2.45)$$

A Figura 2. 4 mostra um esquema do mecanismo de extração dos solutos das folhas segundo o modelo de Goto.

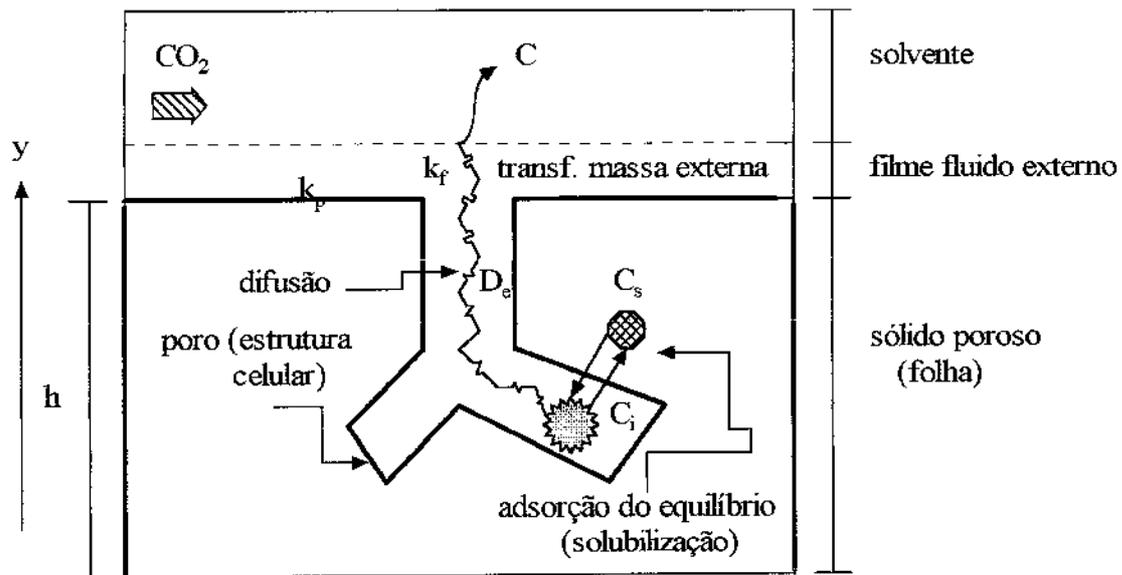


Figura 2. 4: Diagrama do mecanismo de extração segundo o modelo de Goto

Adimensionalizando as equações de balanço ((2. 44) e (2. 45)) obtém-se:

$$\frac{dx}{d\theta} + \frac{x}{\alpha} = -\frac{\phi(1-\alpha)}{\alpha} \left(x - \frac{x_s}{K} \right) \quad (2.46)$$

$$\frac{dx_s}{d\theta} = \frac{\phi \left(x - \frac{x_s}{K} \right)}{\left(\frac{\varepsilon}{K} + (1-\varepsilon) \right)} \quad (2.47)$$

com as seguintes condições iniciais:

$$x(\theta = 0) = 0 \qquad x_s(\theta = 0) = \frac{K}{[\varepsilon + (1-\varepsilon)K]}$$

onde

$$x = \frac{C}{C_0} \qquad x_s = \frac{\bar{C}_s}{C_0} \qquad \theta = \frac{t}{\tau} \qquad \phi = k_p a_p \tau$$

Finalmente, a resolução analítica das equações (2. 46) e (2. 47) deriva no modelo de Goto:

$$x(\theta) = A_x [\exp(a_1 \theta) - \exp(a_2 \theta)]$$

2.4 Algumas Conclusões

A *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni é uma planta originária do Paraguai que hoje em dia é cultivada em diferentes lugares do mundo e começou a ser estudada desde início desse século, devido a seus princípios edulcorantes. São oito os glicosídeos que atualmente se conhecem, graças basicamente às pesquisas de Rebaudi [1900, citado por Alvarez, s.n.t.] e Rasenack [1908, citado por Wood *et al*, 1955] de maneira isolada a inícios do século, e de três grupos importantes de pesquisa entre os anos 30 e 70: Bridel & Lavieille [1931a, 1931b e 1931c], os americanos de Bethesda, Maryland, Wood *et al* [1955], Mosettig & Ness [1955], Wood & Fletcher [1956], e os japoneses Kohda *et al* [1975] e Sakamoto *et al* [1977a e 1977b] da Universidade de Hiroshima e, Kobayashi *et al* [1977] da Universidade de Hokkaido.

As principais pesquisas sobre os processos de extração dos glicosídeos da estévia devem-se a patentes americanas e japonesas de pouca divulgação sobre os detalhes dos mesmos, mas ainda assim é possível se perceber que a extração aquosa é um processo

muito generalizado, existindo porém diferenças nas técnicas de refinação dos extratos que podem ser resumidas como uma extração alcóolica, seguido de precipitação ou coagulação com filtração e uma passagem final por resinas de troca iônica antes de uma cristalização e secagem [Kinghorn & Soejarto, 1985; Phillips, 1987].

A extração com fluidos pressurizados é uma tecnologia estudada desde a segunda década do século passado, porém, foi entre finais dos anos 70 e começos dos 80 deste século que se observou uma espécie de época de ouro no seu desenvolvimento, especialmente no campo da indústria de alimentos, com o descobrimento de importantes aplicações como na descafeinação do café pelo grupo do Prof. Zosel na antiga Alemanha Ocidental [McHugh & Krukonis, 1994].

No campo da extração de produtos naturais usando fluidos pressurizados, existem muitos modelos propostos, fundamentalmente para a extração de óleos essenciais ou de óleo-resinas, que segundo Reverchon [1997] podem ser agrupados em modelos empíricos, modelos baseados numa analogia com os processos de transferência de calor e, modelos baseados em balanços diferenciais de massa. Sendo estes últimos os de maior interesse do ponto de vista de projeto de um processo, destacam entre eles os modelos de Goto [1993] e Madras [1994] que fazem uma analogia com a adsorção, e o modelo de Lack [Sovová, 1994] que é frequentemente utilizado na literatura [França *et al*, 1999].

Referências Bibliográficas

- ALVAREZ, M. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: estado atual do conhecimento. [s.n.t]
- ANGELUCCI, E. **O esteviósido de plantas brasileiras de *Stevia rebaudiana* Bertoni e a potencialidade de seu emprego em alimentos: ensaios em formulações hídricas e carbonatadas.** São Paulo, 1979. 78p. Tese (Doutor em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- BARTLE, K.D.; CLIFFORD, A.A.; HAWTHORNE, S.B.; LANGENFELD, J.J.; MILLER, D.J.; ROBINSON, R.A. A model for dynamic extraction using a supercritical fluid. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.3, p.43- , 1990

- BARTON, P.; HUGHES Jr., R.E.; HUSSEIN, M.M. Supercritical carbon dioxide extraction of peppermint and spearmint. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.5, p.157-162, 1992
- BRIDEL, M.M.M.; LAVIEILLE, R. Le principe à saveur sucrée du Kaà-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bertoni). **Journal de Pharmacie et de Chimie**, 8 série, t. XIV, p.99-113, 1931a
- BRIDEL, M.M.M.; LAVIEILLE, R. Sur le principe sucré du Kaà-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bertoni) II.- L'hydrolyse diastasique du estévioside. **Journal de Pharmacie et de Chimie**, 8 série, t. XIV, p.321-328, 1931b
- BRIDEL, M.M.M.; LAVIEILLE, R. Sur le principe sucré du Kaà-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bertoni) III.- Le stéviol de l'hydrolyse diastasique et l'isostéviol de l'hydrolyse acide. **Journal de Pharmacie et de Chimie**, 8 série, t. XIV, p.369-379, 1931c
- BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes**. Darmstadt (Germany): Steinkopff; New York: Springer, 1994. 387p.
- CHESTER, T.L.; PINKSTON, J.D.; RAYNIE, D.E. Supercritical chromatography and extraction. **Analytical Chemistry**, v.68, n°12, p.487-514, 1996
- CRAMER, B.; IKAN, R. Progress in the chemistry and properties of rebaudiosides. In: GRENBY, T.H. (Ed.) **Developments in Sweeteners 3**. New York: Elsevier, 1987. Chapter 2, p.45-64
- CRANK, J. **The mathematics of diffusion**. 2.ed. Oxford: Clarendon Press, 1975 (reprinted 1992). 414p.
- CUSSLER, E.L. **Diffusion, mass transfer in fluid systems**. 2.ed. New York: Cambridge University Press, 1997, 580p
- FELIPPE, G.M. *Stevia rebaudiana* Bert.: Uma revisão. **Ciência e Cultura**, v.29, p.1240-1248, 1977
- FERREIRA, S R S.; MEIRELES, M.A.A.; CABRAL, F.A. Extraction of essential oil of black pepper with liquid carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v.20, p.121-133, 1993
- 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.

HANNAY, J.B.; HOGARTH, J. On the solubility of solids in gases (preliminary notice).

Proceedings of the Royal Society (London), v.29, p.324-, 1879

HUTCHENSON, K.W.; FOSTER, N.R. Innovations in supercritical fluid science and technology. In: HUTCHENSON, K.W.; FOSTER, N.R (Eds.) **Innovations in supercritical fluid science and technology**, Washington: ACS Symposium Series, 1995. Chapter 1, p.1-31. (608)

IRANI, C.A.; FUNK, E.W. (1977). Separations using supercritical gases. In: **CRC handbook - Recent developments in separation science**, Boca Raton: CRC Press, 1977. 3A: p.171

JUHLER, R.K.; BOWADT, S. Use of supercritical fluid extraction (SFE) in analytical laboratories: An introductory overview. **Dan. Kemi**, v.76, n°5, p.18-23 (Danish), 1995. *Apud: Chemical Abstracts*, v.125: 346234, 1996

KANDIAH M.; SPIRO, M. Extraction of ginger rhizome: kinetic studies with supercritical carbon dioxide. **International Journal of Food Science and Technology**, v.25, p.328-338, 1990

KIENLE, U. **Method of making a natural sweetener based on Stevia rebaudiana, and use thereof**. Int. Cl.⁵ A61K 35/78. U.S. Cl. 424/195.1, 586690 sep. 24, 1990; may 12, 1992. *Chemical Abstracts* n.111, 22442z

KINGHORN, D.A.; SOEJARTO D.D. Stevioside. In: O'BRIEN NABORS, L.; GELARDI R. (Eds.) **Alternative sweeteners**. New York: Marcel Dekker Inc. Second Edition, 1991. Chapter p.157-171

KINGHORN, D.A.; SOEJARTO, D.D. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In: WAGNER, H.; HIKINO, H.; FARNSWORTH N.R. (Eds.) **Economic and medicinal plant research**. Orlando: Academic Press, 1985. Chapter 1, p.1-52

KOBAYASHI, M.; HORIKAWA, S.; DEGRANDI I.H.; UENO, J.; MITSUHASHI H. Dulcosides A and B, new diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. **Phytochemistry**, v.16, p.1405-1408, 1977

KOHDA, H.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; MURAKAMI, K.; TANAKA O. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. **Phytochemistry**, v.15, p.981-983, 1976

- KYLE, B.G. **Chemical and process thermodynamics**. 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1992. 567p
- MADRAS, G.; THIBAUD, C.; ERKEY, C.; AKGERMAN, A. Modeling of supercritical extraction of organics from solid matrices. **AIChE Journal**, v.40, n.5, p.777-785, 1994.
- MARTELLI, A.; FRATTINI, C.; CHIALVA, F. Unusual essential oils with aromatic properties-I.- Volatile components of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Sabor and Fragrance Journal**, v.1, p.3-7, 1985
- MARTINEZ DE LA OSSA, E.; GALAN SERRANO, M.A. Extracción con fluidos supercríticos: I.- Fundamentos. **Ingeniería Química**, Julio, p.169-175, 1990a
- MARTINEZ DE LA OSSA, E.; GALAN SERRANO, M.A. Extraction con fluidos supercríticos: II.- Termodinámica del equilibrio de fases. **Ingeniería Química**, Agosto, p.125-131, 1990b
- McHUGH M.A.; KRUKONIS, V.J. **Supercritical fluid extraction - principles and practice**. 2. ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994. 512p
- MEHR, C.B.; BISWAL, R.N.; COLLINS, J.L.; COCHRAN, H.D. Supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from guaraná. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.9, p.185-191, 1996
- MOSETTIG, E.; NES, W.R. Stevioside II: The structure of the aglucon. **Journal of Organic Chemistry**, v.20, p.884-889, 1955
- NAIK, S.N.; LENTZ, H.; MAHESHWARI, R.C. Extraction of perfumes and saviors from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid-vapor equilibrium conditions. **Fluid Phase Equilibria**, v.49, p.115-126, 1989
- OHTERA, N. Supercritical extraction in food industries. **Kagaku Sochi**, v.38, n°3, p.49-55 (Japanese), 1996. *Apud*: **Chemical Abstracts** v.124: 200341, 1996
- PASQUEL, A.; MEIRELES, M.A.A. Extracción supercrítica: principios fundamentales. **Conocimiento**, Iquitos (Perú), v.4, n°1, p.131-162, 1998
- PEKER, H.; SRINIVISAN, M.P.; SMITH, J.M.; McCOY, B.J. Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide. **AIChE Journal**, v.38, n.5, p.761-770, 1992

- PHILLIPS, K.C. Stevia: steps in developing a new sweetener. In: GRENBY, T.H. (Ed.) **Developments in sweeteners 3**. New York: Elsevier, 1987. Chapter 1, p.1-43
- RAJBHANDARI, A.; ROBERTS, M.F. The flavonoids of *Stevia rebaudiana*. **Journal of Natural Products**, v.46, n°2, p.194-195, 1983
- REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.10, p.1-37, 1997
- REVERCHON, E.; DONSI, G.; OSSÉO, L.S. Modeling of supercritical fluid extraction from herbaceous matrices. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v.32, p.2721-2726, 1993
- RIZVI, S.S.H.; DANIELS, J.A.; BENADO, A.L.; ZOLLWEG, J.A. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. **Food Technology**, v.40, n°7, p.57-64, 1986a
- RIZVI, S.S.H.; DANIELS, J.A.; BENADO, A.L.; ZOLLWEG, J.A. Supercritical fluid extraction: operating principles and food applications. **Food Technology**, v.40, n°6, p.55-65, 1986b
- SAKAMOTO, I.; YAMASAKI, K.; TANAKA, O. Application of ^{13}C NMR spectroscopy to chemistry of natural glycosides: rebaudioside-C, a new sweet diterpene glycoside of *Stevia rebaudiana*. **Chem. Pharm. Bull.**, v.25, n°4, p.844-846, 1977a
- SAKAMOTO, I.; YAMASAKI, K.; TANAKA, O. Application of ^{13}C NMR spectroscopy to chemistry of plant glycosides: rebaudiosides-D and -E, new sweet diterpene-glucosides of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Chem. Pharm. Bull.**, v.25, n°12, p.3437-3439, 1977b
- SANDLER, S.I. **Chemical and engineering thermodynamics**. 2.ed. Singapore: John Wiley & Sons, 1989. 622p
- SCHNEIDER, G.M. Physicochemical principles of extraction with supercritical gases. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v.17, n°10, p.716-727, 1978
- SENCAR-BOZIC, P.; SRCIC, S.; KNEZ, Z. Applicability of supercritical fluids in processing of pharmaceuticals. **Farm. Vestn (Ljubljana)**, v.46, n°3-4, p.329-340 (Slovenian), 1995. *Apud: Chemical Abstracts* v.124: 241840, 1996

- SIMANDI, B.; SAWINSKY, J.; RONYAL, E.; KEMENY, S.; DEAK, A. Extraction and processing of vegetable oils using supercritical solvents. **Olaj. Szappan, Kozmet**, v.45, nº1, p.15-24 (Hungarian), 1996. *Apud: Chemical Abstracts* v.124: 287309, 1996
- SMITH, J.M.; VAN NESS, H.C.; ABBOTT, M.M. **Introduction to chemical engineering thermodynamics**. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 1996. 763p
- SO, G.C.; MACDONALD, D.G. Kinetics of oil extraction from canola (rapeseed). **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v.64, february, p.80-86, 1986
- 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.**, v.37, p.71-79, 1983
- 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
- SOVOVÁ, H.; KOMERS, R.; KUČERA, J.; JEŽ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil. **Chemical Engineering Science**, v.49, n.15, p.2499-2505, 1994
- SPIRO M.; KANDIAH M. Extraction of ginger rhizome: kinetic studies with acetone. . **International Journal of Food Science and Technology**, v.24, p.589-600, 1989
- TAN, S.; SHIBUTA, Y.; TANAKA, O. Isolation of sweetener from *Stevia rebaudiana*. *Jpn. Kokai* 63,177,764, 7p., 1988. *Apud: Chemical Abstracts*, v.110: 230444s
- TAYLOR, L.T. **Supercritical fluid extraction**. New York: John Wiley & Sons, 1996. 181p
- TSANAVA, V.P.; SARDZHVELADZE, G.P.; KHAREBAVA, L.G. Effect of technological procedures on the composition of volatile substances in *Stevia rebaudiana*. **Subtrop. Kul't**, v.3, p.64-70, 1991. *Apud: Chemical Abstracts*, v.116, 116: 82387g
- WANG, Z.; XU, N.; SHI, J. Applications of supercritical fluid technique in the pharmaceutical industry. I.- Extraction of pharmaceutical and analysis. **Huagong Jinzhan**, nº2, p.32-35 (Chinese), 1996. *Apud: Chemical Abstracts* v.125: 308746, 1996

- WILLIAMS, D.F. Extraction with supercritical gases. **Chemical Engineering Science**, v.36, nº11, p.1769-1788, 1981
- WINNICK, J. **Chemical engineering thermodynamics**. New York: John Wiley & Sons, 1997. 702p
- WOOD, JR. H.B.; ALLERTON, R.; DIEHL, H.W.; FLETCHER, JR. H.G. Stevioside I: The structure of the glucose moieties. **Journal of Organic Chemistry**, v.20, p.875-883, 1955
- WOOD, JR. H.B.; FLETCHER, JR. H.G. Stevioside III: The anomeric 2,3,4,6-terra-O-acetyl-1-omesitoyl-D-glucopyranoses and their behavior with alkali. **Journal of American Chemical Society**, v.78, p.207-210, 1956
- ZHANG, X.W.; SUN, T.; SUN, Z.Y.; LIU, X.; GU, D.X.; ZENG, X.Y. Supercritical carbon dioxide extraction of wheat plumule oil. **Journal of Food Engineering**, v.37, p.103-110, 1998
- ZOSEL, K. Separation with supercritical gases: practical applications. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v.17, nº10, p.702-709, 1978

CAPÍTULO 3

ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO DAS FOLHAS DA ESTÉVIA

Conteúdo

ÍNDICE DE FIGURAS	60
ÍNDICE DE TABELAS	60
RESUMO	61
3.1 INTRODUÇÃO	63
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	64
3.2.1 Matéria prima	64
3.2.2 Equipamento de extração.....	65
3.2.2.1 Testes preliminares	65
3.2.2.2 Aspectos operacionais dos testes preliminares	66
3.2.2.3 Montagem da linha de extração	66
3.2.2.4 Aspectos operacionais da linha de pré-tratamento	68
3.2.3 Análise dos extratos	69
3.2.3.1 Cromatografia em camada delgada.....	69
3.2.3.2 Cromatografia gasosa.....	69
3.2.4 Planejamento experimental e análise de dados	70
3.2.4.1 Testes preliminares	70
3.2.4.2 Testes finais.....	71
3.2.4.3 Análise dos dados	71
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	71
3.3.1 Testes preliminares.....	71
3.3.2 Influência dos parâmetros de processo nos testes realizados na unidade 2	74
3.3.3 Caracterização dos extratos	75
3.4 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
Apêndice 3. 1: Aspectos operacionais no estudo do pré-tratamento.....	81
Apêndice 3. 2: Planejamento experimental para o estudo do pré-tratamento.....	84
Apêndice 3. 3: Análise das vazões no estudo do pré-tratamento	85
Apêndice 3. 4: Análise estatística no estudo do pré-tratamento	88

Índice de Figuras

Figura 3. 1: Diagrama da unidade experimental 1 [Monteiro <i>et al</i> , 1997]	65
Figura 3. 2: Diagrama da Unidade Experimental 2.....	67

Índice de Tabelas

Tabela 3. 1: Condições operacionais para os testes preliminares.....	70
Tabela 3. 2: Massa de extrato em função da massa de CO ₂ utilizado	72
Tabela 3. 3: Porcentagem mássica de extrato no fatorial 2 ⁽⁴⁻⁰⁾	74
Tabela 3. 4: Composição química do extrato da estévia com CO ₂ pressurizado	76

RESUMO

O forte sabor residual do extrato glicosídico da estévia dificulta o uso dos glicosídeos desta planta como substitutos da sacarose, sendo portanto necessária a remoção total (derivados terpenoides) ou parcial (os próprios glicosídeos) das substâncias associadas a esse sabor residual. O objetivo desse trabalho foi investigar as melhores condições para o pré-tratamento da estévia com dióxido de carbono pressurizado.

Foi montada uma unidade de bancada para extração usando fluidos pressurizados com um extrator de 235,9 cm³ e pressão de trabalho de até 350 bar, com a finalidade de se estudar o pré-tratamento das folhas da estévia. Foram utilizadas folhas colhidas em 1995 em Maringá (PR). As folhas secas e trituradas da estévia foram processadas com dióxido de carbono supercrítico e dióxido de carbono como líquido comprimido. O planejamento experimental foi baseado em um desenho fatorial completo de 2 níveis em cada um dos 4 fatores em estudo: pressão, temperatura, granulometria e vazão do solvente.

A análise estatística dos rendimentos mostrou efeito significativo da temperatura ($p=0,0360$), da pressão ($p=0,0008$) e destas duas variáveis juntas ($p=0,0228$), quando é avaliado o plano experimental na sua totalidade. Se o experimento 8 que teve rendimento zero for desconsiderado na análise estatística, observa-se efeito significativo só da pressão ($p=0,0026$) e da interação entre pressão e temperatura ($p=0,0426$).

Por meio de cromatografia em camada delgada e CG-EM encontrou-se que o perfil fitoquímico do extrato é similar em todos os experimentos, podendo-se estabelecer que pouco mais do 55% do extrato obtido está constituído por cinco classes de compostos: sesquiterpenos, ácidos graxos, hidrocarbonetos alifáticos, esteróides e triterpenos.

Palavras Chave: *Estevia, Extração Pressurizada, Extração Supercrítica.*

3.1 Introdução

A *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni é também conhecida como erva doce. Sua distribuição no continente americano vai do sudoeste dos Estados Unidos ao nordeste da Argentina, passando pelo México, pela América Central, pelos Andes sulamericanos e pelas montanhas do Brasil [Phillips, 1987]. A estévia é também cultivada no sudeste asiático, no Japão, na China e em Israel.

O extrato da estévia é usado como adoçante em muitos países latino-americanos e asiáticos, especialmente no Paraguai e no Japão. Nesse último, o uso é ainda mais amplo desde os anos setenta. Nos Estados Unidos, recentemente foi autorizado o comércio e importação da estévia ou seu extrato, desde que eles sejam etiquetados explicitamente como um suplemento dietético, ou usados como ingrediente de um suplemento dietético. O extrato das folhas da estévia contém várias substâncias químicas chamadas glicosídeos, com gosto doce, mas que não contribuem caloricamente para a dieta. Foram descritos oito desses compostos: esteviosídeo, esteviolbiosídeo, rebaudiosídeos A, B, C, D, e E, e dulcosídeo A, sendo que o mais importante deles quantitativamente é o Esteviosídeo. Os glicosídeos da estévia pertencem ao grupo dos adoçantes naturais descobertos na última metade desse século.

Desde que a extração dos glicosídeos da estévia é dificultada por outras substâncias químicas contidas nas folhas da estévia, é muito importante o pré-tratamento das mesmas, bem como se conhecer a sua cinética, i.e., a informação sobre a presença e a quantidade de substâncias indesejáveis é fundamental para o sucesso na extração dos glicosídeos. O pré-tratamento é então a primeira etapa do processo para se extrair os glicosídeos diterpênicos das folhas da estévia.

Considerando-se que os processos convencionais de extração não conseguem resolver o problema do sabor residual amargo do extrato da estévia, foram levantadas algumas hipóteses para explicá-lo. De acordo com Phillips [1987], uma patente da Stevia Company sugere que os óleos essenciais voláteis, taninos e flavonóides contribuem para os sabores desagradáveis associados com o extrato da estévia. Por outro lado, Soejarto *et al* [1983] sugerem que o gosto amargo provavelmente deve-se a lactonas sesquiterpênicas, e

Tsanava *et al* [1991] reportaram que diminuindo as concentrações de cariofileno e espatulenol conseguiram minimizar o sabor e aroma amargo e levemente desagradável do extrato da estévia.

Baseado no descrito acima, este trabalho estudou a possibilidade de se usar o dióxido de carbono para se extrair algumas das substâncias indesejáveis presentes nas folhas da estévia. Embora não se deva esquecer que o próprio esteviosídeo contribui para o sabor desagradável do extrato com uma nota amarga [Phillips, 1987].

Por outro lado, o projeto de uma planta de extração precisa ter informação confiável sobre a cinética da transferência de massa durante o pré-tratamento das folhas, o que permitirá a determinação das melhores condições operacionais.

A extração de produtos naturais com fluidos pressurizados foi intensamente estudada nas últimas décadas [Ferreira *et al*, 1999; França *et al*, 1999; Monteiro *et al*, 1997; Eggers, 1996; McHugh & Krukonis, 1994; Brunner, 1994; Moyler, 1993; Ferreira *et al*, 1993, entre outros]. Apesar de Tan *et al* [1988] e Kienle [1990] terem patenteado no Japão e nos Estados Unidos, respectivamente, dois processos para extrair os glicosídeos das folhas da estévia usando CO₂ e Liu *et al* [1997] terem investigado a extração dos adoçantes da estévia com fluidos subcríticos, não existem maiores informações sobre a cinética do processo nem sobre o perfil fitoquímico das substâncias que podem ser extraídas com CO₂ além daquelas recentemente apresentadas por Pasquel *et al* [1998, 1999], que estudaram a extração das folhas da estévia com CO₂ pressurizado como uma etapa de pré-tratamento antes da extração dos glicosídeos.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Matéria prima

Folhas e flores secas de estévia, colheita 1995, foram compradas na cidade de Maringá (PR), tendo sua umidade determinada pelo método de destilação de tolueno [Jacob, 1973]. As folhas e flores secas foram limpas, selecionadas e empacotadas em sacos

plásticos e, armazenadas a temperatura ambiente (20 a 32°C). O dióxido de carbono foi doado pela White Martins da cidade de Campinas em cilindros sifonados de 25 kg.

3.2.2 Equipamento de extração

3.2.2.1 Testes preliminares

Por não existir nenhuma informação sobre a extração das folhas da estévia com CO₂ pressurizado, além daquelas patenteadas por Kienle [1990], foi necessária a realização de alguns testes preliminares que proporcionassem um ponto de partida para a pesquisa. O objetivo destes testes preliminares foi determinar os níveis mais apropriados das variáveis operacionais (pressão, temperatura, vazão e granulometria) a serem utilizadas no projeto experimental para o estudo do pré-tratamento das folhas da estévia. Nesta etapa foi utilizado o equipamento descrito por Monteiro *et al* [1997] (**Figura 3. 1**).

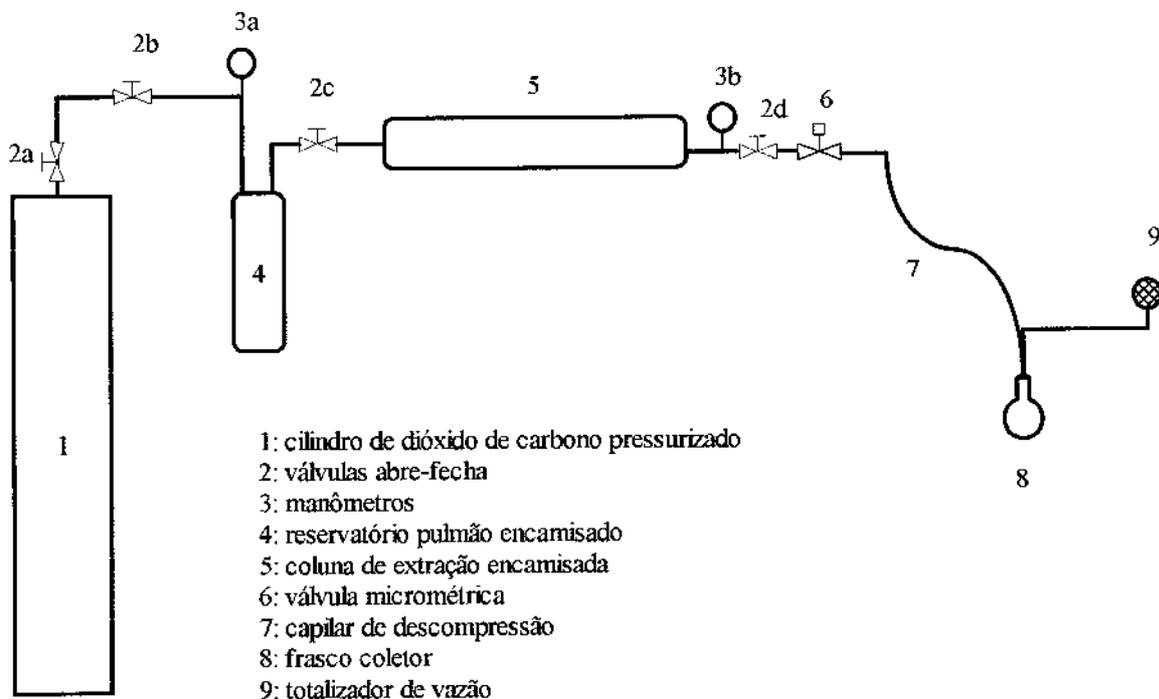


Figura 3. 1: Diagrama da unidade experimental 1 [Monteiro *et al*, 1997]

3.2.2.2 Aspectos operacionais dos testes preliminares

Cento e dezoito gramas ($\pm 2g$) de folhas de estévia secas e trituradas na granulometria descrita na **Tabela 3. 1** foram empacotadas manualmente no extrator (aço inox 316; 60,50 cm de comprimento e 2,16 cm de diâmetro) da Unidade Experimental 1, evitando-se uma compactação excessiva do leito que dificultaria o escoamento do solvente, e uma compactação desigual que daria origem ao aparecimento de caminhos preferenciais. O fato de se colocar a matéria prima diretamente no cilindro extrator garante uma melhor qualidade do empacotamento e minimiza a formação dos citados caminhos preferenciais do solvente. A seguir, o extrator foi instalado na Unidade Experimental 1. Os banhos termostáticos (Tecnal TE184) que controlam a temperatura do reservatório pulmão e do extrator foram ligados. Quando a temperatura no banho do extrator atinge a temperatura de trabalho, deixa-se transcorrer uma hora e a seguir abre-se a válvula 2c para pressurizar o sistema. Após se alcançar a pressão de trabalho e transcorrer o período estático estabelecido, se inicia a extração abrindo-se as válvulas 2d e 6. Após passar pela válvula micrométrica o dióxido de carbono contendo diversos solutos solubilizados é expandido em uma serpentina de aço inox com 1,5 m de comprimento, antes da coleta do extrato em frascos de vidro transparente de 20 mL, no ponto 8 na unidade experimental da **Figura 3. 1**. O dióxido de carbono separado dos solutos passa por um medidor de vazão e sai para a atmosfera. Os extratos foram analisados gravimetricamente e por cromatografia de camada delgada, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

3.2.2.3 Montagem da linha de extração

A **Figura 3. 2** mostra a Unidade experimental 2 que foi montada para ser utilizada no estudo do pré-tratamento das folhas da estévia. Essa nova Unidade se fez necessária pois na Unidade Experimental 1 (**Figura 3. 1**), não tinha nenhum componente para aumentar a pressão de trabalho e só podia operar na pressão máxima de 80 bar, derivada da pressão do cilindro de CO₂ junto com o aquecimento do mesmo, além do que a coluna de extração tampouco tinha sido projetada para resistir pressões maiores a 80 bar. Logo, as mudanças

principais nesse novo equipamento são a incorporação de uma bomba de alta pressão e uma coluna de extração capaz de trabalhar até 450 bar.

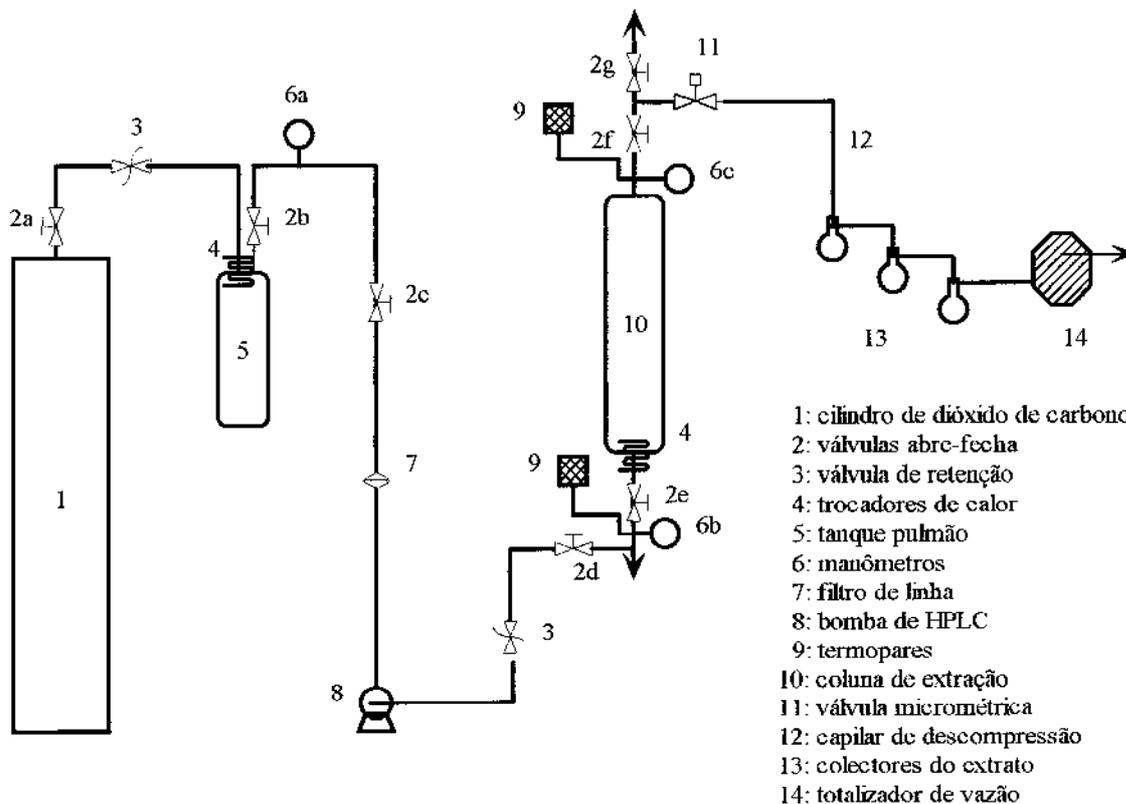


Figura 3. 2: Diagrama da Unidade Experimental 2

A Unidade 2 possui os seguintes componentes principais: célula de extração (saquinhos de nylon de 40 cm de comprimento e 3,3 cm de diâmetro), bomba de alta pressão (Thermo Separation Products modelo constaMetric 3200), banhos termostáticos programáveis (PolyScience modelo 9110), medidor de vazão (Sierra Instruments modelo Top Trak de 0 a 5 L/min) e totalizador de vazão (MG-2 de 0,333 L/min a 50 L/min).

Outros componentes complementares são um cilindro sifonado com CO₂ da White Martins de Campinas, cilindro pulmão encamisado de aço inox, manômetros (Record de

500 bar precisão 0,5% e Tebrasma de 100 bar precisão 0,5%), registrador de temperatura (Robert Shaw T4WM), válvula micrométrica (Whitey SS-22RF4), válvula de segurança (Nupro modelo SS-4R3A5) e válvulas abre-fecha (Detroit 1AV).

3.2.2.4 Aspectos operacionais da linha de pré-tratamento

Oitenta e três gramas ($\pm 2g$) de folhas secas trituradas a 10/24 mesh ou 80 $\pm 4g$ de folhas secas trituradas a 8/10 mesh, foram empacotadas manualmente num saquinho de nylon, evitando-se uma compactação excessiva e desigual. É muito difícil se manter um padrão de empacotamento que evite caminhos preferenciais do solvente. A seguir o saquinho foi introduzido na coluna de extração da Unidade Experimental 2, que foi instalado como na **Figura 3. 2**, abrindo-se unicamente a sua tampa superior. Os banhos termostáticos que controlam a temperatura do tanque pulmão, da bomba e da coluna de extração são ligados até se atingir a temperatura de trabalho. Com a finalidade de se estabelecer o equilíbrio térmico na célula de extração, deixa-se transcorrer pelo menos três horas antes de se iniciar a pressurização do sistema. A seguir abrem-se as válvulas 2a e 2b e se observa a pressão no manômetro 6a. Dependendo da temperatura ambiente e da quantidade de CO₂ no cilindro 1, essa leitura deve variar entre 58 e 72 bar. A abertura das válvulas 2c, 2d e 2e serve para pressurizar a coluna de extração. Quando a pressão de trabalho é alcançada nos manômetros 6b e 6c, abrem-se as válvulas de saída 2f e 11 de maneira tal a manter uma vazão constante, que deve ser verificada com o totalizador de vazão. A válvula micrométrica deve ser aquecida para compensar o calor perdido durante a depressurização que acontece nesse ponto, evitando-se desse modo o congelamento dessa válvula e do restante da tubulação. Após passar pela válvula micrométrica, o dióxido de carbono contendo diversos solutos solubilizados é expandido num capilar de decompressão de aço inox de 1 m de comprimento antes da coleta do extrato em frascos de vidro de 20 mL. O dióxido de carbono separado dos solutos passa por uma coluna de Porapak Q que retêm os voláteis não separados na coleta do extrato antes de passar através de um medidor de vazão e sair para a atmosfera. Após 12 horas conclui-se a extração. No

Apêndice 3. 1 encontra-se uma descrição detalhada do funcionamento da Unidade Experimental 2 (**Figura 3. 2**).

Devido a problemas de tempo e disponibilidade de saquinhos de empacotamento do tamanho adequado, o leito foi completado com esferas de vidro, que por serem de tamanho diferente da granulometria do leito de estévia, formaram um leito fixo com duas porosidades diferentes. Essa circunstância deve ter contribuído para formar caminhos preferenciais do solvente no leito de folhas de estévia e ser parcialmente responsável pela diminuição do rendimento do extrato.

3.2.3 Análise dos extratos

3.2.3.1 Cromatografia em camada delgada

Para efeitos de se obter uma informação preliminar sobre a composição do extrato obtido das folhas da estévia durante os testes preliminares, foi realizada uma análise de cromatografia em camada delgada utilizando-se placas de sílica gel (Merck, lote PF254336) eluídas com a mistura 80:20 em volume de benzina de petróleo (Merck 99,99%):acetato de etila (Merck 99,99%) e solução de anisaldeído como revelador.

3.2.3.2 Cromatografia gasosa

Para a cromatografia gasosa foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu, QP5000), dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-1 (100% metil siloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), He como gás de arraste (1,7 mL/min), injetor a 240°C, detector a 230°C. As amostras foram diluídas em acetato de etila (5 mg/mL), injetando-se 1 μ L na seguinte programação: 70°C - 280°C, 8°C/min, 280°C (35 min). A identificação das substâncias foi baseada na análise comparativa de seus espectros de massas com o banco de dados de CG-EM (Wiley Lib.) e a literatura. Além dos dados da

literatura, a identificação dos esteróides foi conduzida através da injeção de padrões: estigmasterol, α e β -sitosterol.

3.2.4 Planejamento experimental e análise de dados

3.2.4.1 Testes preliminares

As condições experimentais avaliadas encontram-se na **Tabela 3. 1** dois níveis de pressão, três níveis de temperatura, três níveis de granulometria e três níveis de período estático. Utilizou-se uma única vazão de solvente de 2 L/min ($3,53 \pm 0,06$ g CO₂/min) na temperatura e pressão ambiente.

Tabela 3. 1: Condições operacionais para os testes preliminares

Teste	Pressão ¹ (bar) $\pm 0,5$	Temperatura (°C) $\pm 0,05$	Granulometria (mesh)	Período Estático ² (min)	Observações
2	70,0	15,0	-16 + 35	60	
3	80,0	25,0	-16 + 35	60	
4	80,0	25,0	-16 + 35	0	
5	80,0	25,0	-16 + 35	120	
7	80,0	25,0	-16 + 35	0	Rep. N°4: 6h de extração
8	80,0	40,0	-35 + 48	0	5h de extração
9	80,0	25,0	-35 + 48	0	Ensaio interrompido após 9h
10	80,0	25,0	-6 + 16	0	

¹ Os níveis de pressão e temperatura foram definidos de acordo com as limitações do equipamento.

² *Período estático*: é o tempo transcorrido entre o momento em que são atingidas as condições de pressão e temperatura desejadas e a abertura da válvula de saída do extrator.

3.2.4.2 Testes finais

Após aproximadamente um mês de testes da Unidade Experimental 2 (**Figura 3. 2**), com base nos resultados dos testes preliminares e, respeitando-se a capacidade de operação dessa Unidade 2 (particularmente a vazão máxima das bombas)¹, bem como tentando minimizar os desperdícios da matéria prima, foi formulado um plano fatorial completo 2^4 sem repetição e com as seguintes variáveis: temperatura (25 e 40°C), pressão (80 e 200 bar), vazão do solvente (aproximadamente 1,0 e 1,5 L/min na pressão e temperatura ambiente) e granulometria (10/24 e 8/10 mesh). Os dois níveis de temperatura referem-se aos valores registrados no banho termostático que controla a temperatura do extrator. O plano fatorial e seus detalhes estão descritos no **Apêndice 3. 2**.

3.2.4.3 Análise dos dados

A análise de variância para o parâmetro rendimento mássico do extrato (massa de extrato/massa inicial da matéria prima), em função das variáveis em estudo foi feito com o SAS versão 6.12.

3.3 Resultados e Discussões

3.3.1 Testes preliminares

A **Tabela 3. 2** apresenta os resultados obtidos nos testes preliminares, como quantidade total de extrato obtido em cada experimento em função da massa de material sólido utilizado, bem como em relação ao consumo de CO₂. Observa-se que existe uma relação direta entre ambas variáveis.

¹ Foi observado que as bombas apresentam dificuldades para manter a eficiência a 200 bar e vazões muito acima de 1,5 L/min.

Da **Tabela 3. 1** observa-se que com exceção do experimento 2 que usa 70 bar, todos os outros foram realizados a 80 bar, logo ao comparar-se esse experimento 2 com todos os outros experimentos, percebe-se que o rendimento aumenta quando a pressão aumenta de 70 para 80 bar. Da comparação dos experimentos 8 a 40°C e 9 a 25°C observa-se que ao aumentar a temperatura, mantendo as outras variáveis fixas, o rendimento diminui sensivelmente, devido provavelmente à menor densidade do CO₂. Mesmo que não tenha sido feito um tratamento completo para o efeito da vazão, quando diminui de 2 a 1 L/min, a quantidade de extrato obtida é muito pequena. Os experimentos 4 (16/35 mesh), 9 (35/48 mesh) e 10 (6/16 mesh) proporcionam informação conflitante sobre o efeito da granulometria: enquanto o rendimento com 16/35 mesh é maior que com 35/48 mesh, o rendimento com 6/16 mesh (contrariamente ao esperado) fica entre os dois para 9 horas de extração.

Tabela 3. 2: Massa de extrato em função da massa de CO₂ utilizado

Teste	Rendimento do extrato (% mássica) ^a	Massa de Extrato (g)/Massa de CO ₂ utilizado (g) ^b				
		T e m p o d e E x t r a ç ã o (min)				
		0 a 180	181 a 360	Acumulado a 360	Acumulado a 540	Acumulado a 720
2	< 1	0,00151	0,00079	0,00112	0,00091	0,00075
3	1,4	0,00153	0,00155	0,00154	0,00124	0,00111
4	1,6	0,00114	0,00125	0,00119	0,00148	0,00122
5	1,2	0,00181	0,00121	0,00145	0,00128	0,00093
7	> 1	0,00237	0,00080	0,00148	^c	^c
8	<<< 0,01	-	-	-	-	-
9	< 1	0,00092	0,00079	0,00079	0,00079	^d
10	< 1,2	0,00126	0,00103	0,00103	0,00106	0,00092

^a Os erros de propagação são da ordem de 10⁻²

^b O CO₂ foi considerado um gás ideal nas condições de medida da vazão do solvente. Os erros de propagação são da ordem de 10⁻⁵

^c Seis horas de extração.

^d Nove horas de extração.

Finalmente, dos experimentos 3 (1 hora), 4 (0 horas) e 5 (2 horas), observa-se que o rendimento decresce na medida em que o período estático aumenta, sendo que o maior rendimento ocorreu quando esse período foi zero, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa numa hipótese do período estático como única variável.

A discussão acima permitiu sugerir os níveis (valores) a serem utilizados para o estudo do efeito do pré-tratamento das folhas da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. É importante ressaltar, também, que existe perda do material extraído, tanto na tubulação devido à viscosidade do extrato, como também foi notado que ocorre uma pequena perda das substâncias que são arrastadas pelo solvente na saída.

A análise da composição química dos extratos demonstrou a predominância de hidrocarbonetos alifáticos de peso molecular elevado, sugerindo a presença das seguintes substâncias: β -citronelol, 2-heptanona, ácido decanóico, octadecanal, tetradecano, pentadecano, farnesol e eicosano. Não foi observada fração significativa de óleo essencial, apesar de ter sido detectada a presença de algumas substâncias mais leves (β -citronelol, farnesol e 2-heptanona).

A discussão dos resultados obtidos nos testes preliminares permitiu fazer as seguintes sugestões úteis para se planejar o estudo do pré-tratamento das folhas secas da estévia com CO₂ pressurizado:

- i) O rendimento do extrato cai com o aumento do período estático.
- ii) As temperaturas poderiam ser de 25°C (que mostrou os melhores resultados quantitativos no caso do CO₂ líquido) e de 40°C para pressões acima de 150 bar (uma vez que para pressões menores os resultados não foram satisfatórios nessa temperatura).
- iii) As pressões poderiam ser de 80 bar (que mostrou os melhores resultados quantitativos no caso do CO₂ líquido) e entre 200 e 300 bar para um pré-tratamento mais drástico.
- iv) A vazão do solvente poderia ser de 2 L/min, já testada com bons resultados, e outra maior que poderia ser de 3 ou 4 L/min, uma vez que com 1 L/min o rendimento foi extremadamente baixo.

- v) A granulometria poderia ser de 16/35 mesh e 8/16 mesh.
- vi) O perfil fitoquímico do extrato não muda nas diferentes condições experimentais testadas.

3.3.2 Influência dos parâmetros de processo nos testes realizados na unidade 2

A **Tabela 3. 3** apresenta, na sua última coluna, a porcentagem mássica de extrato obtido após doze horas de extração das folhas da estêvia com CO₂ pressurizado, nas condições experimentais do planejamento fatorial detalhado no **Apêndice 3. 2**.

Tabela 3. 3: Porcentagem mássica de extrato no fatorial 2⁽⁴⁻⁰⁾

Teste	Temperatura (°C) ± 0,1	Pressão (bar) ± 1	Vazão		Mesh	Rendimento do Extrato (% massa) ± 0,01
			(L/min) ± 0,05	(g/min) ± 0,04		
1	40,0	200	1,50	2,49	-8+10	1,29
2	40,0	200	1,50	2,47	-10+24	0,79
3	40,0	200	1,00	1,69	-8+10	0,60
4	40,0	200	1,00	1,78	-10+24	0,69
5	40,0	80	1,50	2,50	-8+10	0,04
6	40,0	80	1,50	2,45	-10+24	0,07
7	40,0	80	1,00	1,70	-8+10	0,04
8	40,0	80	1,00	1,70	-10+24	--
9	25,0	200	1,50	2,64	-8+10	0,93
10	25,0	200	1,50	2,49	-10+24	0,75
11	25,0	200	1,00	1,73	-8+10	0,97
12	25,0	200	1,00	1,75	-10+24	0,60
13	25,0	80	1,50	2,50	-8+10	0,52
14	25,0	80	1,50	2,52	-10+24	0,52
15	25,0	80	1,00	1,74	-8+10	0,42
16	25,0	80	1,00	1,77	-10+24	0,76

Observa-se da **Tabela 3. 3** que os experimentos 1, 11 e 9, todos na mesma pressão de 200 bar, apresentam os maiores rendimentos de extrato e que o maior rendimento foi obtido no experimento 1 realizado a 40°C, 200 bar, 2,49 g CO₂/min e 8/10 mesh.

Foi feita uma análise estatística (**Apêndice 3. 3**) para verificar se existe diferença significativa entre os valores das vazões mássicas correspondentes às vazões volumétricas de 1,0 L/min. Análise similar foi feita com as vazões mássicas correspondentes às vazões volumétricas de 1,5 L/min. Verificada a existência de diferença significativa entre os dados integrantes de cada um dos dois níveis de vazão volumétrica selecionados, a vazão foi tratada como uma co-variável.

Os resultados da **Tabela 3. 3** foram analisados estatisticamente com e sem o experimento 8, onde não se conseguiu extrair nada. Quando o experimento 8 é considerado, a média dos rendimentos foi de 0,56% ± 0,09. Considerando-se a vazão como uma co-variável e todas as interações entre as variáveis, observa-se efeito significativo no rendimento da temperatura (p=0,0360), da pressão (p=0,0008) e destas duas variáveis juntas (p=0,0228). Ao desconsiderar o experimento 8 observam-se mudanças nos resultados da análise estatística. A média dos rendimentos aumenta para (0,60 ± 0,09)% mássico. Considerando-se a vazão como uma co-variável e as interações entre as três variáveis, observa-se efeito significativo só da pressão (p=0,0026) e da combinação da pressão com a temperatura (p=0,0426). No **Apêndice 3. 4** está amplamente detalhada essa análise.

Valores numéricos ligeiramente diferentes dessa análise estatística foram descritos numa publicação anterior (Pasquel *et al*, 1998) para o mesmo plano experimental. Essa diferença se explica porque naquela análise a vazão foi considerada como variável e também foram consideradas só as interações entre duas variáveis.

3.3.3 Caracterização dos extratos

A análise conjunta da cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) dos extratos de estévia obtidos no pré-tratamento, demonstram um perfil fitoquímico semelhante para todas as condições experimentais testadas. A análise mais detalhada da composição química (**Tabela 3. 4**) foi

realizada com os extratos obtidos nos experimentos a 200 bar, 40°C, 8/10 mesh e 2,486 g/min¹, demonstrando-se a presença de substâncias pertencentes à classe de sesquiterpenos, ácidos graxos, etc.; e a predominância de substâncias de peso molecular elevado.

Tabela 3. 4: Composição química do extrato da estévia com CO₂ pressurizado

CLASSE	CONSTITUINTES	% (massa)
Sesquiterpenos		
	Espatulenol	1,49
Ácidos Graxos		
	Ácido decanóico	3,35
	Ácido 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)	14,10
Não Identificados		44,14

¹ Experimento 1 na Tabela 3.3

Observa-se através do padrão de fragmentação de seus espectros de massas, a presença de outras substâncias pertencentes a classe dos triterpenos pentacíclicos e hidrocarbonetos alifáticos. A comparação dos espectros de massas destes compostos com a literatura [McLafferty & Stauffer, 1989; Budzikiewics *et al*, 1964; Budzikiewics *et al*, 1963; Djerassi *et al*, 1962] e co-injeção de padrões (estigmasterol e α e β -sitosterol), permitiu detectar a presença de esteróides, representados por stigmasterol (peso molecular: 412) e β -sitosterol (peso molecular: 414) e de três triterpenos pentacíclicos: α/β -amirina (peso molecular: 426), acetato de β -amirina (peso molecular : 468), lupeol (peso molecular: 426).

De acordo com a Kinghorn & Soejarto [1985], as folhas secas de estévia contêm aproximadamente 42% de constituintes solúveis em água. Parte importante desses constituintes são os responsáveis pelo princípio doce, onde se concentra grande parte dos trabalhos de isolamento e elucidação descritos na literatura [Kinghorn & Soejarto, 1985; Nikolova-Damyanova *et al*, 1994]. Adicionalmente a estes glicosídeos diterpênicos, a planta contém óleo essencial, constituído por mono e sesquiterpenos, diterpenos labdânicos, triterpenos, esteróides, flavonóides, etc.

Diante destes dados conclui-se que os extratos obtidos no pré-tratamento apresentam, em comum, cinco classes de compostos: sesquiterpenos, ácidos graxos, hidrocarbonetos alifáticos, esteróides e triterpenos.

3.4 Conclusões

O extrato da estévia é um fluido muito viscoso que escoar com muita dificuldade pela tubulação, o que deu origem a constantes entupimentos durante a extração. Para se evitar esse entupimento foi necessário aquecer a válvula micrométrica até temperaturas da ordem dos 100°C, embora esse aquecimento escureça e provavelmente degrade algumas substâncias presentes no extrato.

Os rendimentos de extrato indicam efeito significativo da temperatura ($p=0,0360$), da pressão ($p=0,0008$) e da interação destas duas variáveis juntas ($p=0,0228$). Ao desconsiderar o experimento 8 observa-se efeito significativo só da pressão ($p=0,0026$) e da

interação da pressão com a temperatura ($p=0,0426$). Encontrou-se que a maior quantidade de extrato obtida durante o pré-tratamento das folhas da estévia com CO₂ pressurizado acontece a 200 bar, 40°C, 2,49 gCO₂/min e -8+10 mesh.

Referências Bibliográficas

- BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes**. Darmstadt (Germany): Steinkopff; New York: Springer, 1994. 387p
- BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C.; WILLIAMS, D.H. **Structure elucidation of natural products by mass spectrometry**. San Francisco: Holden-Day, 1964
- BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J.M.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. **Journal of the American Chemical Society**, v.85, nº.22, p.3688-3699, 1963
- DJERASSI, C.; BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J.M. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. Unsaturated pentacyclic triterpenoids. **Tetrahedron Letters**, nº.7, p.263-270, 1962
- EGGERS, R. Supercritical fluid extraction of oilseeds/lipids in natural products. In: KING, J.W.; LIST, G.R. (ed.) **Supercritical fluid technology in oil and lipid chemistry**. Champaign (USA): AOCS Press, 1996. 3:35-64
- FERREIRA, S.R.S.; NIKOLOV, Z.L.; DORAISWAMY, MEIRELES, M.A.A.; PETENATE, A.J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.)essential oil. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.14, p.235-245, 1999
- 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. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.14, p.247-256, 1999
- JACOBS M. B. **The chemical analysis of foods and food products**. 3 ed., New York: Robert Krieger Publishing Co. p.21-23, 1973

- KIENLE, U. **Method of making a natural sweetener based on *Stevia rebaudiana*, and use thereof.** Int. Cl.⁵ A61K 35/78. U.S. Cl. 424/195.1, 586690 sep. 24, 1990; may 12, 1992. Chemical Abstracts n.111, 22442z
- KINGHORN, D.A.; SOEJARTO, D.D. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In: WAGNER, H.; HIKINO, H.; FARNSWORTH N.R. (Eds.) **Economic and medicinal plant research**. Orlando: Academic Press, 1985. Chapter 1, p.1-52
- LIU, J.; ONG, C.P.; LI, S.F.Y. Subcritical fluid extraction of stevia sweeteners from *Stevia rebaudiana*. **Journal of Chromatographic Science**, v.35, september, p.446-450, 1997
- McHUGH M.A.; KRUKONIS, V.J. **Supercritical fluid extraction - principles and practice**. 2 ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994. 512p
- McLAFFERTY, F.W.; STAUFFER, D.B. **The Wiley/NBS registry of mass spectral data**. New York: John Wiley & Sons, Vol.1-7,1989
- MONTEIRO, A.R.; MEIRELES, M.A.A.; MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J. Extraction of the soluble material from the shells of the bacuri fruit (*Platonia insignis* Mart) with pressurized CO₂ and other solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.11, p.91-102, 1997
- MOYLER, D.A. Extraction of flavours and fragrances with compressed CO₂. In: KING M.B.; BOTT, T.R. (ed.) **Extraction of natural products using near-critical solvents**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1993. 6:140-183
- 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
- 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. In: MEETING ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 6, 1999, Nottingham, United Kingdom. **Proceedings**. Nottingham: International Society for the Advancement of Supercritical Fluids, 1999, p.501-506

- PASQUEL, A.; MEIRELES, M.A.A.; MARQUES, M.O.M. Extracción con CO₂ presurizado como etapa previa a la extracción de los glicósidos de la estévia. In: II CONGRESO IBEROAMERICANO DE INGENIERIA DE ALIMENTOS. Bahía Blanca (Argentina): Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo – CYTED, 1998. Trabajo 87. CD-ROM
- PHILLIPS, K.C. Stevia: steps in developing a new sweetener. In: GRENBY, T.H. (Ed.) **Developments in sweeteners 3**. New York: Elsevier, 1987. Chapter 1, p.1-43
- 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.**, v.37, p.71-79, 1983
- TAN, S.; SHIBUTA, Y.; TANAKA, O. Isolation of sweetener from *Stevia rebaudiana*. *Jpn. Kokai* 63,177,764, 7p., 1988. *Apud: Chemical Abstracts*, v.110: 230444s
- TSANAVA, V.P.; SARDZHVELADZE, G.P.; KHAREBAVA, L.G. Effect of technological procedures on the composition of volatile substances in *Stevia rebaudiana*. **Subtrop. Kul't**, v.3, p.64-70, 1991. *Apud: Chemical Abstracts*, v.116, 116: 82387g

Apêndice 3. 1: Aspectos operacionais no estudo do pré-tratamento

A seguir descreve-se de maneira completamente detalhada, o funcionamento da Unidade Experimental 2, construída como parte dessa pesquisa e utilizada no estudo do pré-tratamento das folhas da estévia:

- Abrem-se as válvulas 2a e 2b do cilindro 1 e do cilindro pulmão 5 na **Figura 3. 2**, e se observa a pressão no manômetro 6a. Dependendo da temperatura ambiente e da quantidade de CO₂ no cilindro, essa leitura deve variar entre 58 e 72 bar.
- A amostra previamente preparada na forma de folhas trituradas de estévia, com uma granulometria pré-estabelecida, empacotadas dentro de uma célula de aço inox de 37,50 cm de comprimento e 2,83 cm de diâmetro; é colocada dentro do cilindro extrator, 10, abrindo-se unicamente a sua tampa superior.
- Ligam-se os três banhos termostáticos, e se fixam as temperaturas desejadas para cada componente ligado aos banhos.
- A temperatura dos banhos ligados ao cilindro 5 e aos cabeçotes da bomba 8, preferencialmente deve estar pelo menos um grau abaixo de zero. Isto com a finalidade de se aumentar a eficiência da bomba, evitando-se cavitação.
- A temperatura do banho que refrigera o cilindro 10 é geralmente uma variável da pesquisa em andamento.
- Quando são alcançadas as condições de temperatura desejadas inicia-se a pressurização do sistema em três etapas:
 - i) A bomba 8 é ligada¹ com as válvulas da unidade abertas só até a válvula 2b, de modo a fazer-se a leitura da pressão antes de introduzir o solvente. Essa leitura deve dar zero, independente das unidades de medida que estejam sendo usadas. Se a leitura não dá zero procede-se a um ajuste manual, usando-se uma chave de fenda pequena, na parte posterior da bomba:
No extremidade superior esquerda da parte traseira, onde existe um pequeno retângulo vertical identificado por ZERO ADJ, que por sua vez contém dois

¹O botão de liga/desliga fica no canto inferior direito da parte dianteira da bomba.

retângulos horizontais menores de cor azul com um pequeno parafuso de metal em cada um deles. Essas formas azuis parafusadas são identificadas pelos nomes de FINE e COARSE, e o ajuste a zero da bomba é feita nesses parafusos.

A seguir, e durante aproximadamente 3 minutos são abertas todas as válvulas da unidade, além da válvula de purga da bomba, com a finalidade de eliminar-se o ar que poderia existir no sistema.

- ii) Transcorridos os três minutos fecham-se as válvulas 2e, 2f, 2g e 11 da unidade, e usando a vazão máxima da bomba pressuriza-se a linha até uma pressão de aproximadamente 50% acima da pressão de trabalho.
 - iii) Finalmente, pressuriza-se a coluna extratora (10) abrindo a válvula 2e.
- Quando a pressão de trabalho é alcançada nos manômetros 6b e 6c, e transcorrido o tempo estático previsto no experimento, abrem-se as válvulas de saída 2f e 11 de maneira tal a manter uma vazão constante, que deve ser verificada com o totalizador de vazão 13. A válvula micrométrica (11) deve ser aquecida para compensar o calor perdido durante a despressurização que acontece nesse ponto, evitando desse modo o congelamento dessa válvula e do resto da tubulação até os recipientes de coleta (12).
 - O que sai do cilindro extrator (10) e chega até o frasco coletor (12) é uma mistura multicomponente de CO₂ e as diferentes substâncias que constituem o extrato. Por despressurização simples, o CO₂ junto com alguns voláteis é separado do extrato, seguindo para os frascos de coleta adicional, onde são colocados adsorventes como carvão ativo, sílica e porapak Q que retém esses componentes mais leves. O CO₂ puro vai passar através do medidor de vazão antes de deixar o sistema.
 - Periodicamente são coletadas amostras. Elas são pesadas, etiquetadas, lacradas e armazenadas a temperaturas de congelamento.
 - Deve-se tomar muito cuidado com a variação da vazão e da pressão, de maneira a estar sempre pronto para se fazer ajustes manuais através da válvula 11, quando o sistema afasta-se das condições experimentais pré-estabelecidas.

- Alcançado o tempo pré-estabelecido de extração são desligadas as bombas e os banhos e fecha-se a válvula 2e, de modo a evitar a entrada de mais CO₂ no cilindro extrator (10), aumentando-se lentamente a abertura das válvulas de saída 2f e 11, de maneira tal a se manter a vazão de trabalho mesmo durante a despressurização do sistema. Quando todo o CO₂ da linha é retirado, retiram-se os últimos frascos coletores, que após pesados, tampados e lacrados, são guardados em temperatura igual ou menor do que zero. Os adsorventes colocados nos frascos de coleta adicional são lavados com um solvente orgânico para retirar deles as substâncias de interesse.
- Abre-se a tampa superior do cilindro extrator (10) e retira-se a matéria prima nele colocada.
- A seguir, usando uma bomba peristáltica a tubulação é lavada com aproximadamente 200 mL de álcool etílico. Finalmente deixa-se passar CO₂ à pressão do cilindro por aproximadamente dez minutos, de forma a eliminar os traços de álcool da linha.

Apêndice 3. 2: Planejamento experimental para o estudo do pré-tratamento

Foi utilizado o módulo Experimental Design do software comercial Statistica 6.0 para a formulação do plano fatorial descrito a seguir.

<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>
Temperatura	25 e 40°C
Pressão	80 e 200 bar
Vazão	1,0 e 1,5 L/min (P e T ambiente)
Granulometria	10/24 e 8/10 mesh

Experimento	Temperatura (°C) ± 0,05	Pressão (bar) ± 1	Vazão (Lmin ⁻¹) ± 0,05	Granulometria (mesh)
4	40,0	200	1,0	-10+24
7	40,0	80	1,0	-8+10
14	25,0	80	1,5	-10+24
6	40,0	80	1,5	-10+24
12	25,0	200	1,0	-10+24
11	25,0	200	1,0	-8+10
13	25,0	80	1,5	-8+10
3	40,0	200	1,0	-8+10
1	40,0	200	1,5	-8+10
8	40,0	80	1,0	-10+24
15	25,0	80	1,0	-8+10
10	25,0	200	1,5	-10+24
5	40,0	80	1,5	-8+10
16	25,0	80	1,0	-10+24
2	40,0	200	1,5	-10+24
9	25,0	200	1,5	-8+10

Apêndice 3. 3: Análise das vazões no estudo do pré-tratamento

De acordo com o Apêndice 3. 1 optou-se pelo estudo de duas vazões volumétricas: 1,0 e 1,5 L/min de solvente nas condições de pressão e temperatura ambiente. Porém não foi possível se manter essas vazões de maneira exata, registrando-se as seguintes medidas no caso da vazão prevista de 1,0 L/min:

	<i>Medidos</i>		<i>Programados</i>	
Teste 4	1,05 L/min	1,78 g/min	1,00 L/min	1,69 g/min
Teste 7	1,01	1,70	1,00	1,68
Teste 12	1,03	1,75	1,00	1,70
Teste 11	1,02	1,73	1,00	1,70
Teste 3	1,00	1,69	1,00	1,69
Teste 8	1,01	1,70	1,00	1,69
Teste 15	1,03	1,74	1,00	1,69
Teste 16	1,04	1,77	1,00	1,70
Média		1,73		1,69
Variância		0,001		0,00004
Desvio Padrão		0,03		0,007
Erro Padrão		0,01		0,002
Nível de confiança (95%)		0,03		0,005

Isto é, no caso das vazões medidas, o intervalo de confiança dos valores num nível de 95% de confiança é:

$$1,73 - 0,03 \leq x \leq 1,73 + 0,03$$

$$1,70 \leq x \leq 1,76$$

sendo que o menor valor medido (1,69) e o maior valor medido (1,78) ficam fora desse intervalo. Isso significa que o conjunto de dados de vazão mássica medidos não poderiam ser consideradas como uma única condição experimental.

No caso das vazões programadas e supondo que não teriam existido as variações das vazões volumétricas, teriam-se as vazões mássicas correspondentes:

$$1,692 - 0,005 \leq \bar{x} \leq 1,692 + 0,005$$

$$1,69 \leq \bar{x} \leq 1,70$$

No caso das vazões previstas de 1,5 L/min acontece uma situação similar. Os valores medidos e os que teriam sido medidos se não existisse a variação da vazão volumétrica são apresentados a seguir:

	<i>Medidos</i>		<i>Programados</i>	
Teste 14	1,49 L/min	2,52 g/min	1,50 L/min	2,54 g/min
Teste 6	1,45	2,45	1,50	2,54
Teste 13	1,48	2,50	1,50	2,54
Teste 1	1,48	2,49	1,50	2,52
Teste 10	1,47	2,49	1,50	2,54
Teste 5	1,48	2,50	1,50	2,53
Teste 2	1,46	2,47	1,50	2,54
Teste 9	1,55	2,64	1,50	2,55
Média		2,51		2,54
Variância		0,003		0,00007
Desvio Padrão		0,06		0,009
Erro Padrão		0,02		0,003
Nível de confiança (95%)		0,05		0,007

Isto é, no caso das vazões medidas, o intervalo de confiança dos valores num nível de 95% de confiança é:

$$2,51 - 0,05 \leq \bar{x} \leq 2,51 + 0,05$$

$$2,46 \leq \bar{x} \leq 2,56$$

sendo que o menor valor medido (2,45) e o maior valor medido (2,64) ficam fora desse intervalo. Isso significa que o conjunto de dados de vazão mássica medidos não poderiam ser consideradas como uma única condição experimental.

Análise similar para o caso das vazões programadas da resultado parecido que aquele obtido no caso de 1,0 L/min.

Apêndice 3. 4: Análise estatística no estudo do pré-tratamento

Foi utilizada a opção de análise do módulo Experimental Design do software comercial Statistica 6.0 para se fazer a análise experimental do plano formulado no **Apêndice 3. 2**.

Optou-se por separar as análises em duas seções: plano completo e plano sem o experimento 8 que teve rendimento zero.

Apêndice 3.4.1: Considerando o plano experimental na sua totalidade.

	Temperatura (°C)		Pressão (bar)		Granulometria (mesh)		Temperatura-Pressão			
	25	40	80	200	10/24	8/10	25/80	25/200	40/80	40/200
Média %Extr	0,6838	0,4400	0,2963	0,8275	0,5225	0,6013	0,5550	0,8125	0,0375	0,8425
Efeito	-0,2438 ±		0,5313 ±		0,0788 ±		0,2738 ±			
p	0,036		0,0008		0,4306		0,0228			
Signif.	Sim		Sim		Não		Sim			

Apêndice 3.4.2: Desconsiderando-se o experimento 8 do plano experimental.

	Temperatura (°C)		Pressão (bar)		Granulometria (mesh)		Temperatura-Pressão			
	25	40	80	200	10/24	8/10	25/80	25/200	40/80	40/200
Média %Extr	0,6838	0,4488	0,3050	0,8275	0,5213	0,6013	0,5550	0,8125	0,0550	0,8425
Efeito	-0,235 ±		0,5225 ±		0,0800 ±		0,265 ±			
P	0,0620		0,0026		0,4708		0,0426			
Signif.	Não		Sim		Não		Sim			

CAPÍTULO 4

EXTRAÇÃO DOS GLICOSÍDEOS DA ESTÉVIA

Conteúdo

ÍNDICE DE FIGURAS	90
ÍNDICE DE TABELAS	91
NOMENCLATURA.....	91
RESUMO	93
4.1 INTRODUÇÃO.....	95
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	97
4.2.1 Matéria prima e outros materiais.....	97
4.2.2 Porosidade das partículas e do leite.....	97
4.2.3 Equipamento para a extração com fluidos pressurizados.....	98
4.2.4 Procedimento experimental: extração pressurizada.....	99
4.2.5 Procedimento experimental: extração convencional.....	100
4.2.6 Análise dos extratos glicosídicos.....	101
4.2.6.1 Espectrofotometria ultra violeta.....	101
4.2.6.2 Cromatografia dos extratos glicosídicos.....	101
4.2.7 Cinética da transferência de massa.....	102
4.2.8 Predição de propriedades dos constituintes do extrato.....	103
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	105
4.3.1 Caracterização da matéria prima e do leite.....	105
4.3.2 Pré-tratamento da estévia com dióxido de carbono pressurizado.....	105
4.3.3 Extração dos glicosídeos com fluidos pressurizados.....	107
4.3.4 Avaliação do rendimento na extração convencional dos glicosídeos.....	111
4.3.5 Análise da composição química dos extratos glicosídicos.....	111
4.3.6 Modelagem da transferência de massa para a etapa de pré-tratamento.....	114
4.3.6.1 Estimativa da concentração de equilíbrio.....	115
4.3.6.2 Escolha do modelo.....	116
4.4 CONCLUSÕES.....	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122

Apêndice 4. 1: Procedimento para operação da unidade de extração.....	125
Apêndice 4. 2: Plano experimental para a extração dos glicosídeos da estévia	128
Apêndice 4. 3: Extração convencional dos glicosídeos da estévia	129
Apêndice 4. 4: Quantificação dos glicosídeos da estévia por espectrofotometria U.V.	131
Apêndice 4. 5: Programas SAS para a análise da cinética da extração	133
Apêndice 4. 6: Dados experimentais do pré-tratamento da estévia	139
Apêndice 4. 7: Dados experimentais da extração dos glicosídeos da estévia	142
Apêndice 4. 8: Estatística descritiva dos rendimentos mássicos obtidos na extração dos glicosídeos da estévia utilizando mistura de fluidos pressurizados	149

Índice de Figuras

Figura 4. 1: Diagrama da unidade experimental	98
Figura 4. 2: Curvas de extração relativos ao pré-tratamento a 200 bar, 30°C e 2,89 g CO ₂ /min, da estévia triturada a 10/24mesh	106
Figura 4. 3: Curvas de extração dos glicosídeos da estévia durante 12 horas, vazão média de 2,96 g CO ₂ /min (A=água, E=etanol, EA=mistura 50:50% molar de etanol e água).....	108
Figura 4. 4: Cromatograma do esteviosídeo padrão a 210 nm, com mistura metanol:acetonitrila (85:15) a 1,5 L/min	112
Figura 4. 5: Cromatograma do rebaudiosídeo A padrão a 210 nm, com mistura metanol:acetonitrila (85:15) a 1,5 L/min	113
Figura 4. 6: Cromatograma do extrato glicosídico obtido com mistura de fluidos pressurizados a 120 bar, 16°C, 9,5% molar de água como co-solvente e 2,96 g/min.....	113
Figura 4. 7: Cromatograma do extrato glicosídico obtido por extração convencional a partir de folhas de estévia pré-tratadas com CO ₂ a 200 bar e 30°C.....	114
Figura 4. 8: Ajuste da curva de extração pelo modelo de Lack a 200 bar, 30°C, 10/24 mesh, 2,91 g CO ₂ /min.....	120

Índice de Tabelas

Tabela 4. 1: Parâmetros da transferência de massa para o pré-tratamento (200 bar e 30°C)	107
Tabela 4. 2: Parâmetros da transferência de massa na extração dos glicosídeos com misturas pressurizadas CO ₂ /co-solvente a 2,96 ± g/min	110
Tabela 4. 3: Comparativo das proporções de esteviosídeo e rebaudiosídeo A extraídas	112
Tabela 4. 4: Principais propriedades dos constituintes do extrato da estévia	115
Tabela 4. 5: Adimensionais e coeficientes de transferência de massa	116
Tabela 4. 6: Coeficientes de transferência de massa na etapa de pré-tratamento.....	121

Nomenclatura

A	:	área da seção transversal do leito
a	:	área de transferência de massa
CER	:	taxa de extração constante
D _{AB}	:	coeficiente de difusão binário
d _p	:	diâmetro médio das partículas
FER	:	taxa de extração decrescente
g	:	força de gravidade
Gr _m	:	Grashof mássico
h	:	altura do leito
J	:	taxa de transferência de massa
k _{ya}	:	coeficiente de transferência de massa em s ⁻¹
k _y = k _{ya} d _p	:	coeficiente de transferência de massa em m/s
M _{CER}	:	taxa de transferência de massa por unidade de seção transversal do leito durante o período de taxa de extração constante
N	:	massa de inertes no modelo de Lack
P _c	:	pressão crítica
PM	:	peso molecular
q	:	massa de solvente/massa de inertes no modelo de Lack
q̇	:	vazão do solvente

q_{FER}	:	valor de q durante o período de taxa de extração constante
R_{CER}	:	rendimento durante o período de taxa de extração constante
Re	:	número de Reynolds
R_{Total}	:	rendimento total do processo
Sc	:	número de Schmidt
T_b	:	temperatura normal de ebulição
T_c	:	temperatura crítica
t_{CER}	:	duração do período de taxa de extração constante
v	:	velocidade intersticial ($= U/\epsilon$)
U	:	velocidade superficial ($= \dot{q}/(A\rho_f)$)
V_c	:	volume crítico
V_i	:	volume molar
X	:	razão mássica do soluto na fase sólida
Y	:	razão mássica do soluto na fase fluida
Y^*	:	solubilidade do soluto no solvente
Y_{CER}	:	concentração do soluto na fase fluida na saída do leito durante o período de taxa de extração constante
Y_o	:	concentração do soluto na fase fluida na entrada do leito

Letras gregas

ρ_{CO_2}	:	densidade do dióxido de carbono
η_{CO_2}	:	viscosidade dinâmica do dióxido de carbono
$\overline{\Delta Y}$:	diferença média de concentração do soluto no leito
ω	:	fator acêntrico
ϵ	:	porosidade
ρ_f	:	densidade da fase fluida
ρ_s	:	densidade da fase sólida

RESUMO

Os glicosídeos da estévia foram extraídos por dois métodos: i) extração com mistura de fluidos pressurizados, e ii) extração convencional. Para a primeira técnica se utilizaram unicamente folhas pré-tratadas com CO₂, enquanto que para a segunda foram utilizadas folhas pré-tratadas e folhas sem pré-tratamento. Para o estudo do efeito das variáveis de processo: pressão, temperatura e co-solvente, foi formulado um plano experimental para se avaliar 2 níveis de pressão, 3 níveis de temperatura e 3 níveis de co-solvente. Os níveis escolhidos foram 120 e 200 bar; 16, 30 e 45°C; e, aproximadamente 9,5% molar de água, etanol e 9,5% de uma mistura água:etanol (aproximadamente 50% molar de água e 50% molar de etanol). As extrações da estévia foram realizadas durante doze horas, e verificou-se que o maior rendimento (3,38% em massa) foi obtido quando se utilizou-se água como co-solvente a 120 bar e 16°C, seguido de muito longe (0,59%) pelo experimento que usou também água como co-solvente porém a uma pressão de 200 bar e 45°C. Não se encontraram efeitos significativos de nenhuma das variáveis de forma individual para 95% de intervalo de confiança, o que leva a supor que o maior rendimento deve ser função do efeito combinado das três variáveis. Os extratos glicosídicos foram analisados por CLAE, observando-se a presença do esteviosídeo e do rebaudiosídeo A em todos os extratos. Os glicosídeos foram quantificados por espectrofotometria ultravioleta a 210 nm, usando esteviosídeo como padrão de calibração. No caso da extração convencional determinaram-se que os rendimentos são menores que o maior rendimento obtido por extração com mistura de fluidos pressurizados, e verificou-se também, que o rendimento é maior quando se utiliza folhas de estévia pré-tratadas com CO₂ pressurizado, embora tão pouco exista diferença estatisticamente significativa nesse caso.

Palavras Chave: *Estévia, Extração Supercrítica, Co-solvente, Transferência de Massa.*

4.1 Introdução

Em 1900 o químico paraguaio Ovidio Rebaudi, em cuja homenagem Bertoni batizou a planta, estudou as principais características químicas da estévia e conseguiu isolar dois tipos de substâncias: uma extremamente doce e uma outra amarga com as características de aperitivo digestivo. Destas duas foi o princípio edulcorante que mais atenção atraiu e atrai até hoje. As folhas da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni contêm uma complexa mistura de diterpenos labdânicos, triterpenos, estigmasterol, taninos, óleos voláteis e, oito glicosídeos diterpênicos doces: esteviosídeo, esteviolbiosídeo, rebaudiosídeos A, B, C, D e E, e dulcosídeo A. Destes glicosídeos, as folhas contêm basicamente esteviosídeo e rebaudiosídeo A, sendo que este é mais estável, muito mais doce e, com menor sabor amargo que o esteviosídeo. O rebaudiosídeo E é tão doce quanto o esteviosídeo, e o rebaudiosídeo D é tão doce quanto o rebaudiosídeo A, enquanto os outros glicosídeos são menos doces que o esteviosídeo [Cramer & Ikan, 1987].

A extração convencional desses glicosídeos é feita através de processos combinados de extração sólido-líquido e líquido-líquido, porém os extratos glicosídicos obtidos possuem um marcante sabor residual amargo, responsável por muitas das restrições ao uso da estévia. Existem muitas hipóteses para explicar esse sabor residual: Phillips [1987] descreve que através de uma patente europeia de 1985, a Stevia Company reporta que os óleos essenciais, taninos e flavonóides presentes nas folhas da estévia, contribuem para o sabor desagradável da estévia, enquanto Soejarto *et al* [1983] acreditam que as lactonas sesquiterpênicas são responsáveis por este sabor amargo. Por sua vez, Tsanava *et al* [1991] sugerem que o cariofileno e o espatulenol contribuem decisivamente para o sabor desagradável dos produtos derivados da estévia, mas como bem lembra Phillips [1987], não se deve esquecer que tanto o esteviosídeo quanto o rebaudiosídeo A têm sua cota de sabor amargo, embora no caso desse último seja significativamente menor que no primeiro.

Tan *et al* [1988] patentearam, no Japão, o processo de extração dos glicosídeos das folhas da estévia utilizando CO₂ supercrítico e um co-solvente, seguido de purificação com resinas de adsorção porosas. Foram utilizados metanol, etanol e acetona como co-solventes. Por sua vez Kienle [1990] patenteou um processo similar nos Estados Unidos. Baseados na

informação anterior, a hipótese inicialmente considerada nesse trabalho é que o CO₂ pressurizado solubiliza algumas das substâncias responsáveis pelo gosto e aroma desagradáveis do extrato.

Segundo Alvarez [s.n.t.], todos os processos de extração convencional dos glicosídeos das folhas da estévia descritos na literatura seguem uma metodologia similar:

- i) As folhas são extraídas com água ou com álcoois a quente, por infusão ou percolação, obtendo-se um extrato de cor marrom escuro, contendo todos os princípios ativos, pigmentos foliares, polissacarídeos solúveis e outras impurezas. Em alguns processos, as folhas são previamente desengorduradas com solventes apolares, como o cloroformio ou o hexano. Esta etapa elimina os óleos essenciais, lípidios, clorofila e outros componentes apolares.
- ii) Clarificação do extrato ou remoção do máximo de impurezas, de maneira a se obter um xarope claro contendo os princípios adoçantes. Pode-se distinguir até seis métodos para essa clarificação:
 - Os que utilizam Ca(OH)₂, ou sais de Al, Fe e Mg como agente precipitante das impurezas, seguido de deionização através de resinas trocadoras de íons.
 - Os que utilizam somente íons metálicos como coagulantes do extrato aquoso: CaCO₃ em H₂O₂, Sn em meio alcalino, CaCl₂, AlCl₃, FeCl₂, Ca(OH)₂ + CO₂, e MgCO₃ ou Mg(OH)₂ com aeração são os mais usados.
 - Os que utilizam somente resinas trocadoras de íons ou resinas adsorventes para a descoloração do extrato.
 - Os que utilizam a eletrólise com eletrodos de alumínio em meio contendo NaCl ou meio com Al₂(SO₄)₃ ou AlCl₃ como condutores, ou ainda uma composição de eletrólise, eletrodialise e tratamento com resinas trocadoras de íons.
 - Os que clarificam o extrato aquoso com solventes orgânicos como os álcoois de 4 a 8 carbonos e cristalização em metanol.
 - Os que coagulam e decantam as impurezas com polieletrólitos.

- iii) A solução do extrato é concentrada e redissolvida em metanol para proceder a cristalização dos glicosídeos. A recristalização é feita no mesmo solvente obtendo-se esteviosídeo quase puro.

Particular interesse apresenta a extração dos rebaudiosídeos além do Esteviosídeo. Uma patente japonesa da Maruzen Chem.Co. [1982], descrita por Alvarez [s.n.t.], explica que o extrato clarificado é tratado com álcoois de 3 a 6 carbonos, solubilizando o esteviosídeo e permanecendo o rebaudiosídeo A na fração insolúvel.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Matéria prima e outros materiais

Folhas e flores secas de estévia, colheita 1995, foram compradas na cidade de Maringá (PR), tendo sua umidade determinada pelo método de destilação de tolueno [Jacob, 1973] e seu conteúdo de glicosídeos estimado pelo método de fenol sulfúrico para carboidratos totais [Alvarez *et al.*, 1986]. As folhas e flores secas foram limpas, selecionadas e empacotadas em sacos plásticos e, armazenadas a temperatura ambiente (20 a 32°C).

O dióxido de carbono foi doado pela empresa White Martins em cilindros sifonados de 25 kg. O etanol utilizado como co-solvente foi etanol absoluto da Merck (P.A. 99,9%), enquanto o etanol utilizado para a limpeza da unidade experimental foi etanol a 95%. Também foi utilizado álcool isobutílico (Merck P.A., 99,9% de pureza), metanol (Merck P.A., 99,9% de pureza), acetona (Merck P.A., 99,8% de pureza) e sílica gel (Merck lote PF254336).

4.2.2 Caracterização das partículas e do leito

A densidade das folhas trituradas, medida no Instituto de Química da UNICAMP utilizando-se picnometria de He (Multivolume Picnometer 1305).

A porosidade do leito foi calculada com as medidas de densidade real das partículas e a densidade aparente do leito, medida como a massa de sólidos necessária para empacotar a célula de extração. O diâmetro médio das partículas, d_p , foi calculado segundo metodologia descrita por Corrêa [1994],

4.2.3 Equipamento para a extração com fluidos pressurizados

A Figura 4. 1 mostra a unidade experimental utilizada, que é uma modificação do equipamento descrito por Pasquel *et al* [1999] para o estudo do pré-tratamento das folhas da estêvia com CO₂ pressurizado. A unidade experimental inclui uma linha de co-solvente controlada por uma bomba dosadora, e a alimentação do solvente feita no topo do extrator.

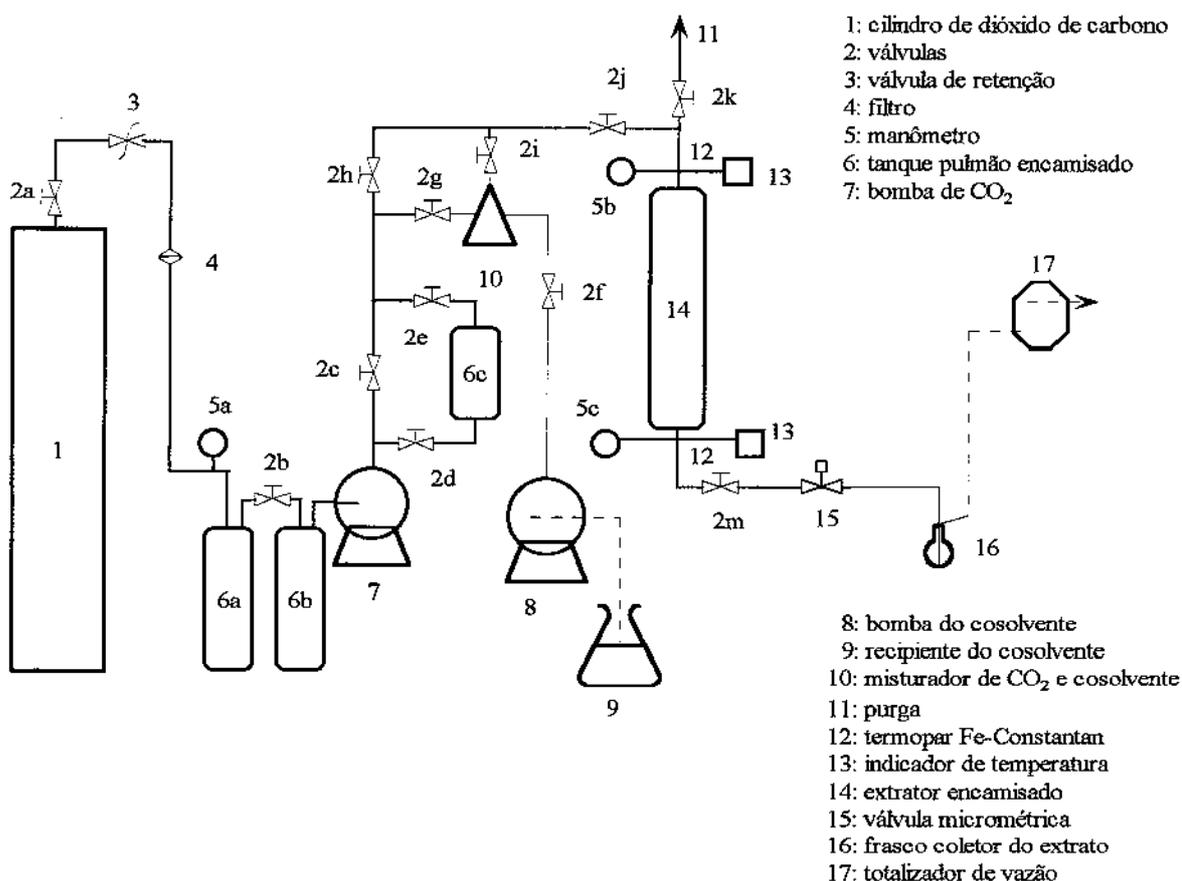


Figura 4. 1: Diagrama da unidade experimental

4.2.4 Procedimento experimental: extração pressurizada

Aproximadamente 64 ± 3 g das folhas secas da estévia, trituradas a 10/24 mesh foram empacotadas na célula de extração (aço inox 316; 37,50 cm de comprimento e 2,83 cm de diâmetro), e a seguir a célula foi colocada dentro do extrator (**Figura 4. 1**). Quando a coluna de extração alcança os 30°C, em cerca de pelo menos 3 horas abrem-se as válvulas 2a, 2b, 2c, e 2h para pressurizar o sistema com CO₂. Após alcançar a pressão de 200 bar, se inicia a extração abrindo-se as válvulas 2j, 2m e 15. Após passar pela válvula micrométrica o dióxido de carbono contendo os solutos solubilizados sofre uma expansão adicional em uma serpentina de aço inox (1/16 polegadas de diâmetro). O extrato é coletado em frascos de vidro de 20 mL. O dióxido de carbono separado dos solutos passa por uma coluna de Porapak Q que retêm os voláteis não retidos no frasco de coleta, e que depois são recuperados, antes de passar através de um medidor de vazão e sair para a atmosfera. Foram coletadas amostras a cada 60 minutos, e após 12 horas de extração conclui-se o pré-tratamento das folhas. As condições do pré-tratamento foram (200 bar, 30°C, $2,89 \pm 0,4$ g/min e 12 horas de extração) selecionadas de acordo com resultados anteriores [Pasquel *et al*, 1999 e Pasquel *et al*, 1998]

Para a extração dos glicosídeos foi usado o material submetido ao pré-tratamento. A célula de extração foi adaptada ao extrator. O procedimento experimental é semelhante ao descrito anteriormente. Após atingir a temperatura de trabalho desejada na célula de extração em cerca de pelo menos 3 horas, pressuriza-se o sistema com a mistura CO₂/co-solvente mantendo-se fechadas as válvulas 2d, 2e, 2h e 2j. Quando se atinge a pressão desejada e transcorrido o período estático fixado inicia-se a extração como no item anterior. Foram coletadas amostras a cada 30 minutos, e após 12 horas de extração conclui-se a extração dos glicosídeos.

Um roteiro detalhado do procedimento para a operação da unidade de extração encontra-se no **Apêndice 4. 1**.

Para o estudo do efeito das variáveis de processo: pressão, temperatura e co-solvente, foi formulado um plano experimental incluindo 2 níveis de pressão, 3 níveis de temperatura e 3 níveis de co-solvente. Os níveis escolhidos foram 120 e 200 bar; 16, 30 e

45°C; e, aproximadamente 9,5% molar de água ou etanol ou mistura água-etanol (aproximadamente 50:50% molar de cada). O plano experimental detalhado é apresentado no **Apêndice 4. 2**

O tempo de extração foi fixado em 12 horas, mantendo-se assim o mesmo tempo utilizado na etapa do pré-tratamento das folhas com CO₂ pressurizado. A vazão de extração foi fixada como a máxima que poderia ser atingida pela unidade de extração na maior pressão de trabalho. Das três temperaturas de teste, a mais baixa foi escolhida como aquela que pode ser mantida no equipamento sem oscilações devido à temperatura ambiente nessa época do ano, e a maior foi escolhida considerando-se as variações da eficiência da bomba por efeito da mudança da temperatura ambiente com a temperatura de trabalho. As pressões foram escolhidas em relação à temperatura, de maneira a garantir CO₂ líquido e CO₂ supercrítico.

4.2.5 Procedimento experimental: extração convencional

Foi realizada a extração convencional dos glicosídeos da estévia a partir de folhas secas trituradas previamente pré-tratadas com CO₂ pressurizado e de folhas sem pré-tratamento, utilizando-se a metodologia descrita nos trabalhos de Alvarez & Couto [1984] e Goto [1997]. Essa metodologia encontra-se detalhada no **Apêndice 4. 3**. As folhas de estévia foram extraídas com água quente durante uma hora (iniciou-se com água fervente e deixou-se na temperatura ambiente entre 25 a 30°C). Em seguida o extrato aquoso foi filtrado e misturado com álcool isobutílico (Merck P.A., 99,9% pureza) numa proporção de 60:40 em volume de extrato:álcool. Após a separação o extrato butanólico foi centrifugado (Sollvall, RT 600D), aquecido a 60°C e passado através de um leito de carvão ativo para eliminar impurezas. A seguir o extrato é concentrado num rotaevaporador (Tecnal, TE 120) e redissolvido em metanol (Merck P.A., 99,9% pureza) até a cristalização dos glicosídeos. Esta primeira fração de cristais foi lavada com metanol (Merck P.A., 99,9% pureza) e seca em estufa com circulação de ar (Fanem, 50 a 300°C). A água mãe da cristalização foi concentrada novamente e extraída com acetona (Merck P.A., 99,8% pureza) agitando-se

manualmente de forma intensa e vigorosa, e o precipitado lavado com acetona anidra¹, deixado secar em estufa com circulação de ar, redissolvido em metanol para cristalizar, filtrado usando papel de filtro comum, lavado com metanol e seco em estufa com circulação de ar.

4.2.6 Análise dos extratos glicosídicos

4.2.6.1 Espectrofotometria ultra violeta

A quantificação dos glicosídeos foi realizada mediante espectrofotometria ultra violeta (espectrofotômetro Hitachi U-2000, duplo feixe, entre 1100 e 190 nm, com lâmpada de iodeto de tungstênio para o campo visível e de deutério no campo ultra violeta). Os extratos que continham água foram desidratados por evaporação simples em chapa de aquecimento. A seguir, os extratos sólidos foram redissolvidos em quantidades conhecidas de água, de modo que a leitura da absorbância para qualquer concentração não excedesse a unidade. Embora o esteviosídeo apresente maior absorção perto dos 200 nm, optou-se por utilizar um comprimento de onda de 210 nm para minimizar os erros de medida, uma vez que o limite do equipamento utilizado era de 190 nm, e também porque esse comprimento é amplamente utilizada na literatura [Nikolova-Damyanova *et al.*, 1994].

A curva de calibração com 10 pontos foi feita usando-se uma amostra comercial de esteviosídeo a 95% (Steviafarma Industrial, Maringá, PR) diluído em água. Detalhes do processo de quantificação encontram-se descritos no **Apêndice 4. 4**

4.2.6.2 Cromatografia dos extratos glicosídicos

Os extratos glicosídicos das folhas da estévia foram analisadas por cromatografia de camada delgada no Laboratório de Produtos Naturais da Seção de Fitoquímica do Centro de

¹ Para preparar a acetona anidra se utiliza 10% massa/volume de sulfato de sódio anidro (1g por cada 10 mL). Deve-se tomar especial cuidado para que a umidade do ar não contamine a acetona anidra em preparação.

Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no Laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais e Sanidade do Instituto Biológico de São Paulo, no Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e no Instituto de Química da UNICAMP.

Na cromatografia de camada delgada foram utilizadas placas de sílica gel (Merck, lote PF254336) eluídas com a mistura cloroformio:metanol:água (30:20:4) e metanol:ácido sulfúrico (1:1) como revelador. As amostras foram diluídas em mistura de etanol e hexano, enquanto que o padrão, esteviosídeo a 95% (Steviafarma Industrial, Maringá, PR), foi diluído no próprio solvente de eluição. O cloroformio, o metanol, o ácido sulfúrico, o etanol e o hexano utilizados foram da marca Merck e de grau cromatográfico.

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em um cromatógrafo (Shimadzu LC-6AD), detector espectrofotométrico U.V.:210 nm (Shimadzu SPD-6AV), controlador (Shimadzu SCL-6B) e coluna Shim-Pack CLC-OBS C18 5 μ m, 250 x 4 mm, metanol (Merck, grau CLAE), vazão 1mL/min [Laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais e Sanidade do Instituto Biológico de São Paulo]. Em um cromatógrafo (CG Instrumentos Científicos modelo CG-480C), detector ultravioleta (Jasco, modelo 970 UV), coluna (NH₂ Licrosorb CLAE Technology-Techsphere), 5 μ m, 220 x 4,6 mm, metanol e acetonitrila (Merck, grau CLAE) (85:15), vazão 1,5 mL/min [Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá]. Em um cromatógrafo (Hewlett Packard 1090 II/M Diode array), coluna Bondesil NH₂ 5 μ m, 250 x 4,6 mm, acetonitrila e água (80:20), vazão 0,8 mL/min.

As condições utilizadas para a análise cromatográfica baseiam-se em análises descritas na literatura [Nikolova-Damyanova *et al*, 1994]. Os padrões de Esteviosídeo e rebaudiosídeo A utilizados foram fornecidos pela Steviafarma Industrial de Maringá (PR).

4.2.7 Cinética da transferência de massa

Com os dados experimentais massa de extrato em função do tempo de operação foram calculados os parâmetros de processo para o período de velocidade constante de

extração (CER), usando-se a metodologia de Rodrigues [1996]. O teor de solúveis na fase fluida na saída da coluna (Y_{CER}), a taxa de transferência de massa por unidade de seção transversal do leito (M_{CER}), a duração do período de taxa de extração constante (t_{CER}). Os cálculos foram feitos com o software SAS 6.12 usando os programas descritos no Apêndice 4. 5.

4.2.8 Predição de propriedades dos constituintes do extrato

Usando o método de Le Bass [Reid *et al*, 1987] foram estimados os volumes molares de cada uma das 11 substâncias identificadas no extrato obtido no pré-tratamento das folhas da estévia, e que em conjunto representam 41,8% do total extraído, enquanto que as propriedades críticas foram estimados pelo método de Joback e o fator acêntrico foi estimado com a correlação de Lee-Kessler [Reid *et al*, 1987].

O coeficiente de difusão binário do extrato no CO_2 (D_{AB}) foi estimado usando a correlação de Wilke-Chang [Reid *et al*, 1987], enquanto os números de Reynolds (Re), Schmidt (Sc) e Grashof (Gr) foram calculados com as seguintes expressões:

$$Re = \frac{\rho_{CO_2} d_p v}{\eta_{CO_2}} \quad (4. 1)$$

$$Sc = \frac{\eta_{CO_2}}{D_{AB} \rho_{CO_2}} \quad (4. 2)$$

$$Gr_m = \frac{\rho_{CO_2} d_p g \Delta \rho}{(\eta_{CO_2})^2} \quad (4.3)$$

onde d_p é o diâmetro médio das partículas, calculado segundo a metodologia descrita por Corrêa [1994], η é a viscosidade dinâmica, v é a velocidade intersticial, g é a força da gravidade e $\Delta \rho$ é a diferença entre a densidade do solvente e a densidade da mistura solutos-solvente.

A densidade da mistura CO₂-extrato a 200 bar e 30°C foi estimada com o programa VLMU que usa a equação de Peng-Robinson [Sandler, 1989].

Foi utilizado um valor de coeficiente de transferência de massa, para a etapa de taxa de extração constante, obtido por Monteiro [1999] na extração da oleoresina de gengibre, nas mesmas condições de pressão e temperatura (200 bar e 30°C), em condições muito próximas de vazão (2,89 e 2,99 g/min), porosidade (0,76 e 0,74) e tamanho de partícula (0,98 e 1,02 mm), e acima de tudo, no mesmo equipamento.

Para se estimar a solubilidade (Y^*) foi utilizado o valor médio da taxa de transferência de massa por área de seção transversal do leito no período de velocidade constante (M_{CER}) apresentado na **Tabela 4. 1**:

$$M_{CER} = \overline{\Delta Y} \rho_{CO_2} k_y \quad (4.4)$$

sendo que $\overline{\Delta Y}$ é definido pela seguinte expressão:

$$\overline{\Delta Y} = \frac{(Y^* - Y_o) - (Y^* - Y_{CER})}{\ln\left(\frac{Y^* - Y_o}{Y^* - Y_{CER}}\right)} \quad (4.5)$$

A solubilidade é calculada pela resolução simultânea das equações (4. 4) e (4. 5) com Y^* como a variável em evidência. Para ajustar-se a consistência dimensional entre os

coeficientes de transferência de massa em m/s e em s^{-1} , utiliza-se o diâmetro médio da partícula.

4.3 Resultados e Discussões

4.3.1 Caracterização da matéria prima e do leito

Seguindo o método citado na seção 4.2.1 (página 97), a umidade das folhas foi determinada em $7,0\% \pm 0,1$. A densidade real das folhas e flores secas trituradas a 10/24 mesh foi $1,37 \pm 0,03 \text{ g/cm}^3$, a densidade aparente foi $0,40 \pm 0,02 \text{ g/cm}^3$, a porosidade média de $0,76 \pm 0,02$ e o diâmetro médio foi $0,98 \pm 0,03 \text{ mm}$. A quantidade de glicosídeos da matéria prima foi estimada em $5,0\% \pm 0,1$, baixa para as médias conhecidas de 7,8 a 14,5% (determinadas por CLAE) [Phillips, 1987]. Isto se explica pelo fato da matéria prima não ser composta unicamente de folhas e sim conter flores e partes menores do caule da planta na forma de impurezas, além de ser um material cultivado numa agricultura convencional, sem nenhum cuidado especial.

4.3.2 Pré-tratamento da estévia com dióxido de carbono pressurizado

Observa-se da **Figura 4. 2** e do **Apêndice 4. 6** que as curvas de extração relativas ao pré-tratamento apresentam um período inicial de ajuste que em todos os casos compreende pelo menos as duas primeiras horas do processo. Transcorrido esse tempo inicial as curvas adotam um comportamento próximo ao formato clássico das curvas de extração com fluidos pressurizados: As etapas de extração constante e extração decrescente são claramente diferenciadas, e essa última representa quase a metade do processo, o que se explicaria pela natureza altamente viscosa dos solutos, que dificulta sua difusão através da matriz sólida.

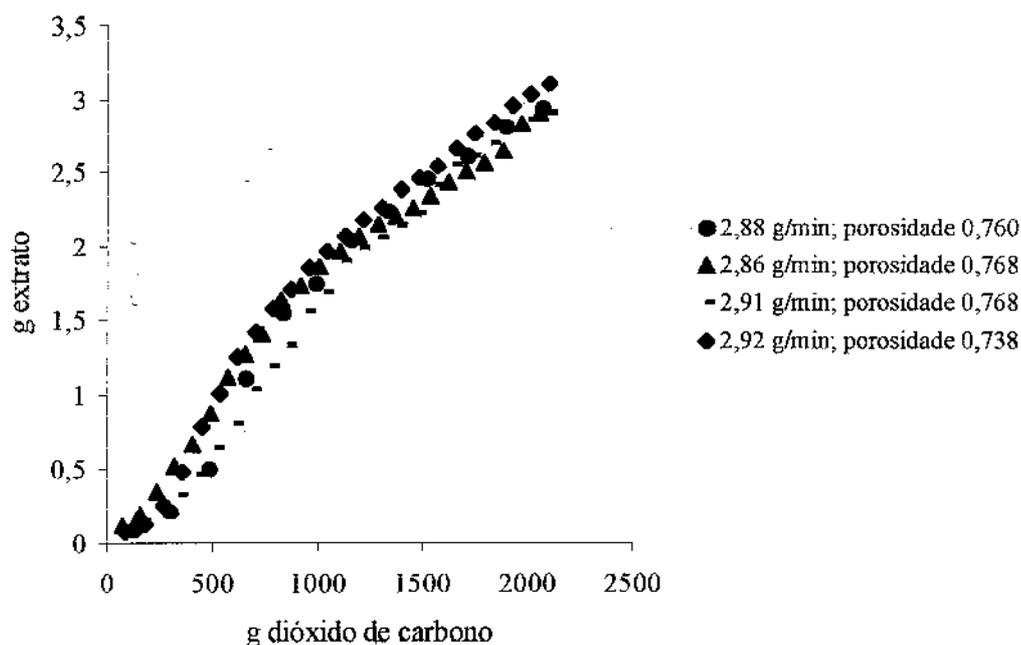


Figura 4. 2: Curvas de extração relativos ao pré-tratamento a 200 bar, 30°C e 2,89 g CO₂/min, da estévia triturada a 10/24mesh

Da Tabela 4. 1 observa-se que a duração do período de taxa de extração constante (t_{CER}) em média representa cerca do 53% do tempo total de extração, a taxa de transferência de massa por unidade de seção transversal do leito (M_{CER}) durante o período de taxa de extração constante (CER) foi $(1,3 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ kg extrato/m²s, enquanto que a concentração dos solutos na fase fluida à saída da coluna de extração (Y_{CER}) foi $(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ kg extrato/kg CO₂ e o rendimento mássico (massa de extrato/massa de folhas colocadas na célula de extração) no mesmo período (R_{CER}) foi $1,9\% \pm 0,3$; enquanto que o rendimento mássico total foi $3,0\% \pm 0,1$.

Tabela 4. 1: Parâmetros da transferência de massa para o pré-tratamento (200 bar e 30°C)

	Vazão (g/min)	ϵ	$M_{CER} \times 10^4$ (kg/m ² s)	$Y_{CER} \times 10^3$ (kg extr/kg CO ₂)	t_{CER} (min)	R_{CER} (% massa)	R_{Total} (% massa)
	2,83	0,76	1,2	1,8	367	1,6	2,9
	2,88	0,76	1,4	1,7	369	1,8	2,9
	2,87	0,73	1,3	1,5	398	1,7	2,8
	2,85	0,74	1,2	1,7	580	2,5	2,9
	2,92	0,74	1,4	1,7	371	1,7	2,9
	2,91	0,77	1,1	1,4	404	1,9	2,9
	2,97	0,76	1,3	1,6	402	2,1	3,2
	2,90	0,77	1,4	1,8	312	1,8	3,2
Média	2,89	0,76	1,3	1,6	383	1,9	3,0
Desvio Padrão	0,04	0,02	0,1	0,2	78	0,3	0,1

Mais de 63% do extrato é obtido durante o período de taxa de extração constante como se observa da comparação dos valores de R_{CER} e R_{total} , o que demonstra a importância da transferência convectiva durante o processo.

4.3.3 Extração dos glicosídeos com fluidos pressurizados

Na escolha dos co-solventes optou-se pelo uso do etanol, da água e da mistura destes dois solventes, para a extração dos glicosídeos das folhas da estévia. O etanol foi escolhido a partir de considerações relativas à tolerância legal de resíduos de solventes orgânicos em insumos para a indústria de alimentos e, à informação de Kienle [1990] que indica um aumento do rendimento da extração quando são utilizados como co-solventes álcoois de até 4 carbonos. A água foi escolhida devido a sua elevada capacidade para solubilizar o rebaudiosídeo A, reconhecidamente o glicosídeo de maior poder adoçante e menor sabor residual.

Na **Figura 4. 3** observa-se a curva de extração dos glicosídeos, com misturas de fluidos pressurizados em função da massa de dióxido de carbono utilizado para cada uma

das condições experimentais testadas. As curvas de extração para cada um dos experimentos são apresentadas no **Apêndice 4. 7**. Nesse conjunto de gráficos resulta sumamente difícil estabelecer afinidades de comportamento das curvas em função de uma ou duas das variáveis estudadas, o que se ratifica pela análise estatística que mostrou que nem a pressão, nem a temperatura, nem os co-solventes, de forma individual, têm efeito significativo no rendimento R_{Total} ou R_{CER} ($p=0,061$; $p=0,072$; $p=0,059$, respectivamente), embora seja evidente que o rendimento mássico de 3,4% no experimento a 120 bar, 16°C e 9,5% molar de água como co-solvente) seja significativamente diferente da média dos rendimentos obtidos (vide **Apêndice 4. 8**).

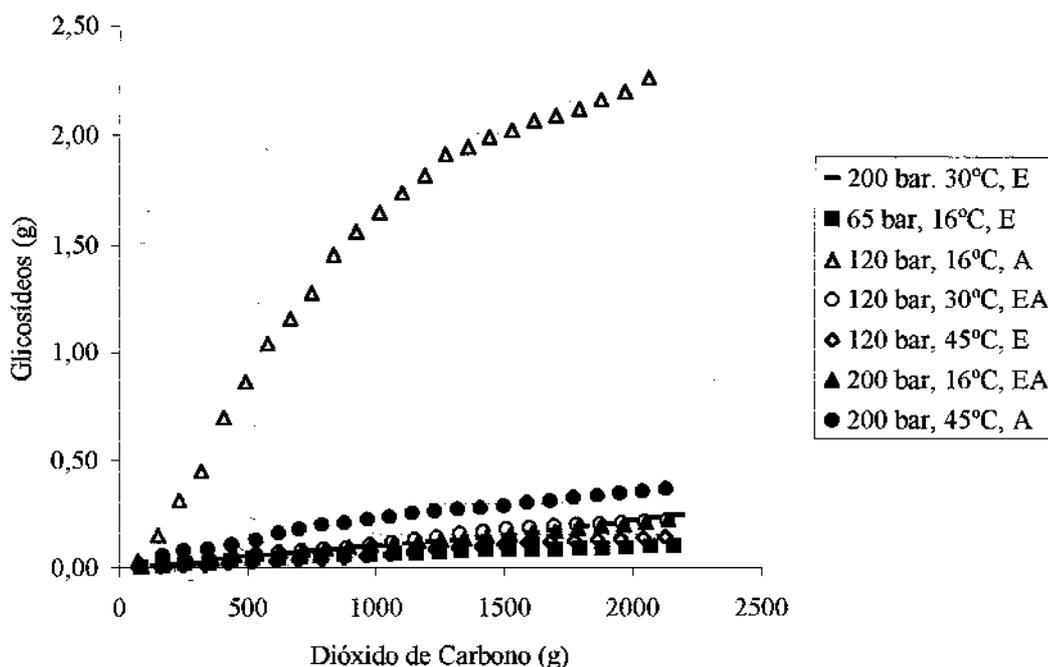


Figura 4. 3: Curvas de extração dos glicosídeos da estévia durante 12 horas, vazão média de 2,96 g CO₂/min (A=água, E=etanol, EA=mistura 50:50% molar de etanol e água)

A inexistência de efeitos significativos de cada uma das variáveis de maneira individual, se explicaria pelo efeito combinado das três variáveis no rendimento total dos

glicosídeos extraídos. Essa hipótese será válida se lembrarmos que a capacidade de solvatação de uma determinada mistura de solventes está relacionada com as forças intermoleculares que atuam entre solvente e co-solvente, entre solvente e soluto e entre co-solvente e soluto, e em especial com a polaridade da mistura [Castellan, 1971 citado por McHugh & Krukonis, 1994]. As moléculas da água sendo mais polares que o etanol, e tendo um momento dipolar permanente maior, devem aumentar de maneira significativa a polaridade da mistura o que certamente aumenta a solubilidade dos glicosídeos nas misturas de CO₂/água. Adicione-se a isto, o efeito de outras prováveis forças de atração como as interações dipolo-dipolo entre as moléculas da água e as dos glicosídeos, interações que segundo McHugh & Krukonis [1994] variam inversamente com a temperatura, e se terá uma explicação plausível para o efeito da temperatura.

Na **Tabela 4. 2** são apresentados os dados relativos à cinética da transferência de massa. A análise estatística mostrou que nem a pressão, nem a temperatura, nem os co-solventes, têm efeito significativo na M_{CER} ($p=0,061$; $p=0,072$; $p=0,059$, respectivamente), na Y_{CER} ($p=0,081$; $p=0,093$; $p=0,077$, respectivamente) nem no t_{CER} ($p=0,072$; $p=0,084$; $p=0,067$, respectivamente embora seja evidente a grande diferença nos valores desses parâmetros.

No experimento a 120 bar, 16°C e água como co-solvente, por exemplo, a taxa de transferência de massa no período de taxa de extração constante (M_{CER}) é entre 7 a 35 vezes maior que nos demais experimentos, e a concentração dos glicosídeos na fase fluída na saída da coluna de extração (Y_{CER}) é entre 8 e 34 vezes maior. Como já foi dito antes, estas diferenças se explicariam pelo efeito combinado das três variáveis nos parâmetros de transferência de massa.

Quando se analisa a duração do período de taxa de extração constante (t_{CER}) na **Tabela 4. 2**, observa-se que esse tempo é da ordem dos 500 min em todos os experimentos exceto nos que foi utilizada água como co-solvente que apresentam um t_{CER} da ordem dos 300 min, o que evidencia que a água junto ao dióxido de carbono solubiliza muito mais rapidamente os glicosídeos da estévia presentes no exterior das partículas que constituem o leite; o que fica mais claro ainda quando se observa que apresentam um maior valor da taxa de transferência de massa por unidade da seção transversal do leite durante o período de taxa de extração constante (M_{CER})

Tabela 4. 2: Parâmetros da transferência de massa na extração dos glicosídeos com misturas pressurizadas CO₂/co-solvente a 2,96 ± g/min

Pressão (bar) ± 1	Temp. (°C) ± 0,5	Co-solvente	M _{CER} × 10 ⁴ (kg/m ² s)	Y _{CER} × 10 ⁴ (kg extr/kg CO ₂)	t _{CER} (min)	R _{CER} (% massa)	R _{Total} (% massa)
200	30	E	0,089 ± 0,002	1,02 ± 0,02	513 ± 35	0,21 ± 0,02	0,03 ± 0,03
120	16	A	1,480 ± 0,030	18,70 ± 0,30	347 ± 21	2,40 ± 0,20	3,40 ± 0,30
120	30	EA	0,102 ± 0,006	1,24 ± 0,03	545 ± 39	0,34 ± 0,03	0,41 ± 0,04
120	45	E	0,083 ± 0,002	1,00 ± 0,02	520 ± 36	0,19 ± 0,02	0,26 ± 0,03
200	16	EA	0,076 ± 0,002	0,91 ± 0,02	540 ± 39	0,28 ± 0,03	0,39 ± 0,04
200	45	A	0,193 ± 0,009	2,27 ± 0,05	286 ± 13	0,33 ± 0,03	0,59 ± 0,06
65	16	E	0,046 ± 0,001	0,55 ± 0,01	427 ± 29	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,01

^a Na coluna de Co-solvente, as letras E representam etanol absoluto, as letras A representam água, e as letras EA representam a mistura etanol-água (50:50% molar)

Na última coluna da **Tabela 4. 2** apresentam-se os rendimentos mássicos (massa de extrato/massa de folhas de estévia pré-tratada) para os glicosídeos obtidos na extração das folhas da estévia, previamente pré-tratadas com CO₂ a 200 bar e 30°C, com misturas CO₂/co-solvente pressurizado. Observa-se que o rendimento foi maior no caso do experimento realizado a 120 bar e 16°C tendo a água como co-solvente, seguido de longe pelo experimento 9 realizado a 200 bar e 45°C, mas ainda com a água como co-solvente. Porém não se encontrou diferença estatisticamente significativa dos efeitos estimados de cada um dos fatores no rendimento (p=0,081 para a pressão, p=0,083 para a temperatura e p=0,063 para o co-solvente).

Da comparação entre os rendimentos na **Tabela 4. 2**, observa-se que o rendimento obtido no experimento realizado a 120 bar e 16°C com água como co-solvente tampouco é resultado do efeito combinado da temperatura com a pressão, ou da temperatura com o co-solvente ou da pressão com o co-solvente, o que deixa como única explicação o efeito combinado das três variáveis.

4.3.4 Avaliação do rendimento na extração convencional dos glicosídeos

O rendimento mássico obtido de $2,60\% \pm 0,01$ de glicosídeos a partir das folhas secas da estévia, pré-tratadas com CO_2 pressurizado a 200 bar e 30°C é ligeiramente maior que os $2,10\% \pm 0,01$ obtidos das folhas sem pré-tratamento, embora não exista diferença significativa entre eles ($p=0,13$).

No experimento com a mistura $\text{CO}_2/\text{água}$ a 120 bar e 16°C obteve-se um rendimento total de glicosídeos 35% maior do que na extração convencional de folhas pré-tratadas e 60% do que das folhas sem qualquer pré-tratamento. O efeito do pré-tratamento na extração convencional é previsível quando se considera que a extração com o dióxido de carbono extrai muitas das substâncias que de outra forma seriam extraídas junto com os glicosídeos, competindo entre eles pelo solvente utilizado.

4.3.5 Análise da composição química dos extratos glicosídicos

Análises de CLAE mostraram que o extrato obtido, e quantificado por espectrofotometria Ultravioleta como esteviosídeo é na verdade uma mistura de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em todos os experimentos. Segundo a **Tabela 4. 3**, no caso do experimento 4¹, que obteve o maior rendimento, a relação média de esteviosídeo:rebaudiosídeo A no extrato é de aproximadamente 3 a 1, o que evidencia que a mistura pressurizada CO_2 -água é capaz de extrair muito mais rebaudiosídeo A que esteviosídeo, referido à extração convencional com solventes orgânico. Se considerar que o rebaudiosídeo A é da ordem de 50% mais doce e tem menos sabor residual que o esteviosídeo, o extrato obtido no experimento 4 constitui um adoçante de melhor qualidade que os obtidos nos processos de extração convencional.

¹ 120bar, 16°C e 9,5% molar de água como co-solvente.

Tabela 4. 3: Comparação das proporções de esteviosídeo e rebaudiosídeo A extraídas

Extrações	Quantidade	
	Esteviosídeo	Rebaudiosídeo A
Experimento 4 com mistura CO ₂ /co-solvente	3	1
Extração convencional		
Folhas pré-tratadas	10	1
Folhas sem pré-tratamento	11	1

A Figura 4. 4 e a Figura 4. 5, mostram os cromatogramas do esteviosídeo e do rebaudiosídeo padrão e, a Figura 4. 6 e a Figura 4. 7 mostram os cromatogramas dos extratos glicosídicos obtidos com a mistura de fluidos pressurizados e com extração convencional, respectivamente, usando sempre como matéria prima, folhas de estévia pré-tratadas com dióxido de carbono pressurizado a 200 bar, 30°C e 2,89 g/min de vazão do solvente.

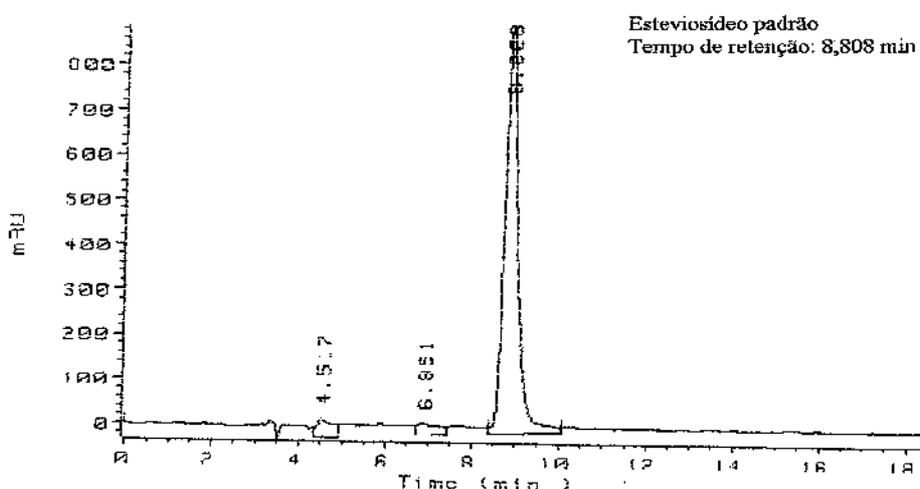


Figura 4. 4: Cromatograma do esteviosídeo padrão a 210 nm, com mistura acetonitrila:água (85:20) a 0,8 L/min

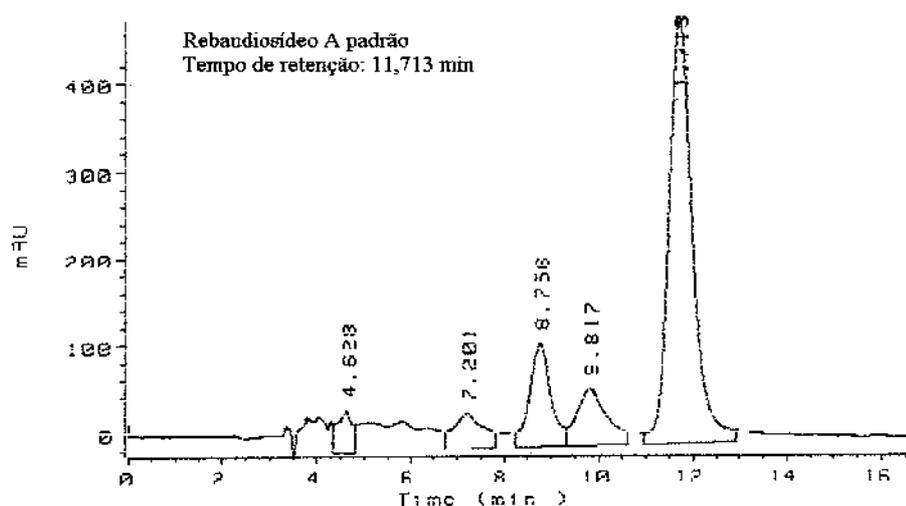


Figura 4. 5: Cromatograma do rebaudiosídeo A padrão a 210 nm, com mistura acetonitrila:água (80:20) a 0,8 L/min

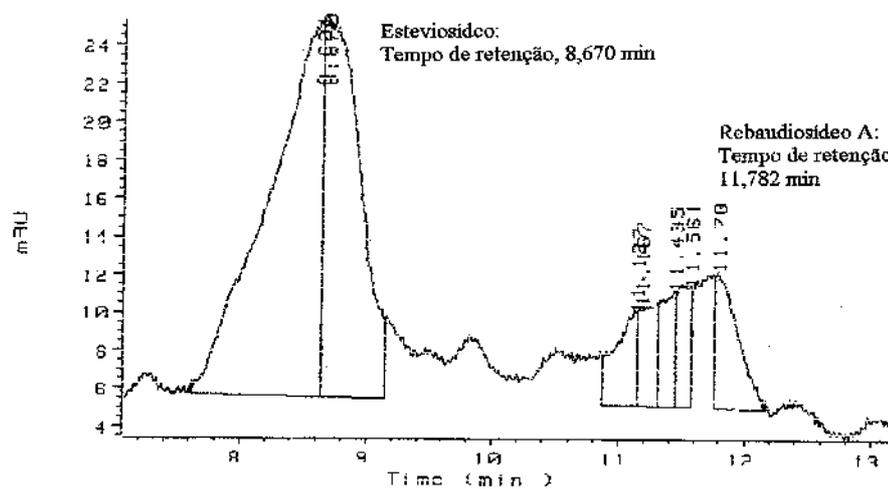


Figura 4. 6: Cromatograma do extrato glicosídico obtido com mistura de fluidos pressurizados a 120 bar, 16°C, 9,5% molar de água como co-solvente e 2,96 g/min

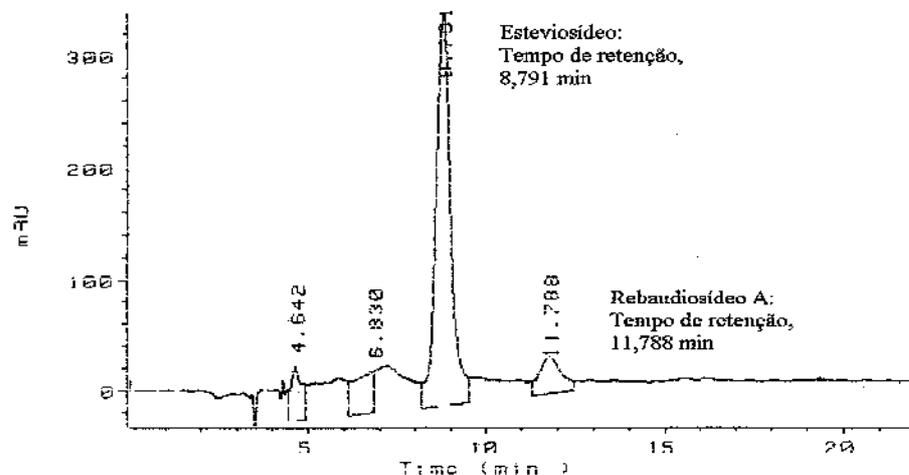


Figura 4. 7: Cromatograma do extrato glicosídico obtido por extração convencional a partir de folhas de estévia pré-tratadas com CO₂ a 200 bar e 30°C

4.3.6 Modelagem da transferência de massa para a etapa de pré-tratamento

A extração de solutos a partir de sólidos naturais, como plantas por exemplo, envolve uma fase sólida global e uma fase fluida. Essa fase fluida compreende o fluido pressurizado e os solutos dissolvidos nele. A transferência de massa acontece entre essas duas fases e é representada por um balanço de massa para as substâncias transferidas e pelas relações de equilíbrio para a transferência de massa na interface entre as fases, sendo que os parâmetros de operação e as condições do pré-tratamento do sólido controlam o processo [Brunner, 1994].

4.3.6.1 Estimativa da concentração de equilíbrio

Na **Tabela 4. 4** observa-se o peso molecular, as propriedades críticas e o volume molar dos constituintes identificados do extrato da estévia, bem como do extrato considerado como uma pseudo substância pura [Pasquel *et al*, 1999].

Tabela 4. 4: Principais propriedades dos constituintes do extrato da estévia

Substância	PM	% massa	V _i (cm ³ /mol)	V _c (cm ³ /mol)	P _c (bar)	T _c (K)	ω
Espatulenol	220,0	3,57	285,7	700	21,1	831	0,778
Acido decanoico	172,3	8,02	253,4	620	22,9	755	0,878
Ác.8,11,14-eicosatrienoico	300,0	7,30	423,6	1066	15,2	1045	1,010
2-metil-octadecano	269,5	6,11	447,7	1109	10,1	796	0,731
Pentacosano	352,0	20,45	562,4	1436	7,6	945	0,718
Octacosano	394,0	20,16	629,0	1604	6,6	1030	0,568
Estigmasterol	412,7	3,90	557,7	1408	9,9	1226	0,913
β-sitosterol	414,7	3,02	519,1	1428	9,6	1219	0,901
α-amirina	426,7	1,63	561,4	1437	10,7	301	0,899
Lupeol	426,0	14,22	564,9	1430	10,6	1255	0,873
Acetato de β-amirina	468,0	11,61	539,2	1390	9,9	1208	0,742
Oleoresina	362,0	100,0	520,2	1323	10,7	1024	0,766

Os valores de Y_{CER} encontram-se na **Tabela 4. 1**, enquanto Y_o é igual a zero na equação (4. 5). A solubilidade foi estimada segundo a metodologia descrita na seção 4.2.8. Os valores obtidos estão na **Tabela 4. 5**.

Tabela 4. 5: Adimensionais e coeficientes de transferência de massa

	$D_{AB} \times 10^8$ (m ² /s)	Re	Sc	$Gr_m \times 10^{-5}$	Gr/Re^2 $\times 10^{-4}$	$k_y \times 10^4$ (m/s)	Y^* (kg extrato/kg CO ₂)
Extrato como pseudo substância pura	1,115	3,15	3,15	7,297	7,333	2,224	0,00195

O valor de Gr/Re^2 acima de 5000 mostra a predominância da convecção natural relativa à convecção forçada [Madelbaum & Bohmn, 1973 citados por Monteiro, 1999] durante o processo, o que ratifica a observação feita na seção 4.2.3 ao analisar-se a relação entre R_{CER} e R_{Total} .

4.3.6.2 Escolha do modelo

Nas duas últimas colunas da **Tabela 4. 1** observa-se o rendimento total (R_{Total}) e o rendimento obtido durante a etapa de taxa de extração constante (R_{CER}) do pré-tratamento, sendo que em média, o R_{CER} representa mais do 63% do rendimento total do processo, evidenciando assim o predomínio da etapa onde são extraídos convectivamente os solutos que se encontram na parte externa das partículas sólidas que constituem o leite. Esta característica do processo coincide com a hipótese principal do modelo de Lack descrita na literatura [Sovova 1994 e Sovová *et al* 1994], usado para descrever a extração com CO₂ supercrítico do óleo de sementes moídas. Este modelo considera o escoamento axial do solvente com velocidade superficial U através de um leito fixo de seção transversal cilíndrica. O solvente é livre de soluto na entrada do extrator e a pressão e a temperatura de operação são constantes. O leito fixo é considerado homogêneo em relação ao tamanho das partículas e à distribuição inicial do soluto. O soluto está contido nas células das plantas, protegido pelas paredes celulares; porém, parte dessas paredes são rompidas durante o processo de preparação do sólido, de modo que parte do soluto é exposto diretamente ao solvente, logo a massa do soluto contida inicialmente na fase sólida é constituída por uma

parte de fácil acesso que é extraída no período de taxa de extração constante, e outra parte de difícil acesso contida no interior das partículas da fase sólida que é extraída no período de taxa de extração decrescente. Para este modelo, um balanço de massa para um elemento diferencial do leito pode ser escrito como:

$$-\rho_s(1-\varepsilon)\frac{\partial X}{\partial t} = J(X, Y) \quad (4.6)$$

$$\rho_f\varepsilon\frac{\partial Y}{\partial t} + \rho_f U\frac{\partial Y}{\partial h} = J(X, Y) \quad (4.7)$$

onde X e Y são a razão mássica do soluto nas fases sólida e fluida respectivamente, t é o tempo, h é o comprimento do leito, ρ_s e ρ_f são a densidade das partículas do leito e a densidade do solvente, respectivamente, ε é a porosidade do leito e J é a taxa de transferência interfacial de massa.

Nas vazões utilizadas neste trabalho, a ordem de grandeza do segundo termo da equação (4.7) é muito maior que o primeiro, o que faz com que este termo possa ser considerado desprezível na solução dessa equação. Considerando as condições inicial e de contorno,

$$X(h, t = 0) = X_0 \quad Y(h = 0, t) = 0 \quad (4.8)$$

e substituindo J(X,Y) pelas expressões apropriadas para cada etapa do processo de extração segundo a resistência à transferência de massa [Sovová, 1994], o modelo é expresso num conjunto de três equações:

Para o período de taxa constante de extração,

$$m_{\text{ex}} = NqY^*[1 - \exp(-Z)] \quad \text{quando } t < t_{\text{CER}} \quad (4.9)$$

Para o período de taxa decrescente de extração,

$$m_{\text{ex}} = NY^*[q - q_{\text{FER}} \exp(z_w - Z)] \quad \text{quando } t_{\text{CER}} \leq t < t_{\text{FER}} \quad (4.10)$$

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

$$m_{\text{ex}} = N \left\langle X_0 - \frac{Y^*}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp \left(\frac{WX_0}{Y^*} \right) - 1 \right] \exp [W(q_m - q)] \frac{X_k}{X_0} \right\} \right\rangle \quad (4.11)$$

onde m_{ex} é a massa de extrato (g), N é a massa de matéria prima livre de soluto, Y^* é a solubilidade do soluto no solvente (g/gCO₂), k_{fa_0} é o coeficiente de transferência de massa na fase fluida (s⁻¹), k_{sa_0} é o coeficiente de transferência de massa na fase sólida (s⁻¹), q_{CER} é o valor de q no final do período de taxa constante de extração, t_{FER} é o período de taxa decrescente de extração, X_0 é a razão mássica inicial de soluto pela matéria livre de soluto, X_k é definido pela equação (4.13), \dot{q} é a vazão do solvente (g/s) e,

$$q = \frac{m_{\text{sol}}}{N} = \frac{m_{\text{solvente}}}{N} \quad (4.12)$$

$$q_{\text{CER}} = \frac{X_0 - X_k}{Y^*Z} \quad (4.13)$$

Nas três equações do modelo as quantidades Z e W são diretamente proporcionais aos coeficientes de transferência de massa:

$$Z = \frac{k_f a_o \rho_f}{\dot{q}(1 - \varepsilon) \rho_s} \quad (4.14)$$

$$W = \frac{k_s a_o}{\dot{q}(1 - \varepsilon)} \quad (4.15)$$

Preditos a solubilidade e o coeficiente de transferência de massa durante o período de taxa de extração constante segundo metodologia descrita na seção 4.2.8, o modelo de Lack foi usado para representar os dados experimentais durante a etapa difusiva do processo. Ao finalizar o período CER, os dados experimentais são ajustados com a equação (4.11). O período de taxa decrescente de extração durante o qual os solutos de fácil acesso se esgotam na base do leito fixo mas continuam no topo, não foi considerado, supondo-se que o período de extração controlado pela difusão inicia-se ao finalizar o período de taxa de extração constante. O coeficiente de transferência de massa é calculados usando-se a equação (4.15) após se ajustar os dados experimentais com o modelo da equação (4.11).

O parâmetro X_0 é igual a 0,0869 (massa inicial de solutos/massa de material isento de solutos) e é considerado constante para todos os experimentos. A matéria livre de soluto foi estimada a partir dos resultados de extrações em equipamento Soxhlet de três dias de duração utilizando hexano como solvente, que mostraram que a quantidade de solutos que podem ser extraídos em condições de polaridade similar ao CO_2 , é de 8% mássico. A concentração de equilíbrio (Y^*), estimada no item anterior, apresenta-se na **Tabela 4.5**. X_k foi calculado a partir dos valores de R_{CER} , e q_{CER} é a vazão que corresponde a t_{CER} determinado para cada experimento (**Tabela 4.1**).

A **Figura 4.8** compara os dados experimentais da curva de extração com os dados calculados usando-se o modelo de Lack [Sovová, 1994] e o coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_f) de Monteiro [1999]. Observa-se que o modelo de Lack representa aceitavelmente os dados experimentais, embora não seja sensível ao período de ajuste que

se observa nos dois primeiros pontos da curva e que significam cerca de duas horas do processo. O modelo não ajusta apropriadamente quando a solubilidade e o coeficiente de transferência de massa no período de taxa de extração constante são variáveis a ser estimadas pelo próprio modelo. Estas limitações do modelo podem ter como causa as simplificações feitas com o objetivo de encontrar-se uma solução analítica para as equações de balanço em que o modelo se sustenta.

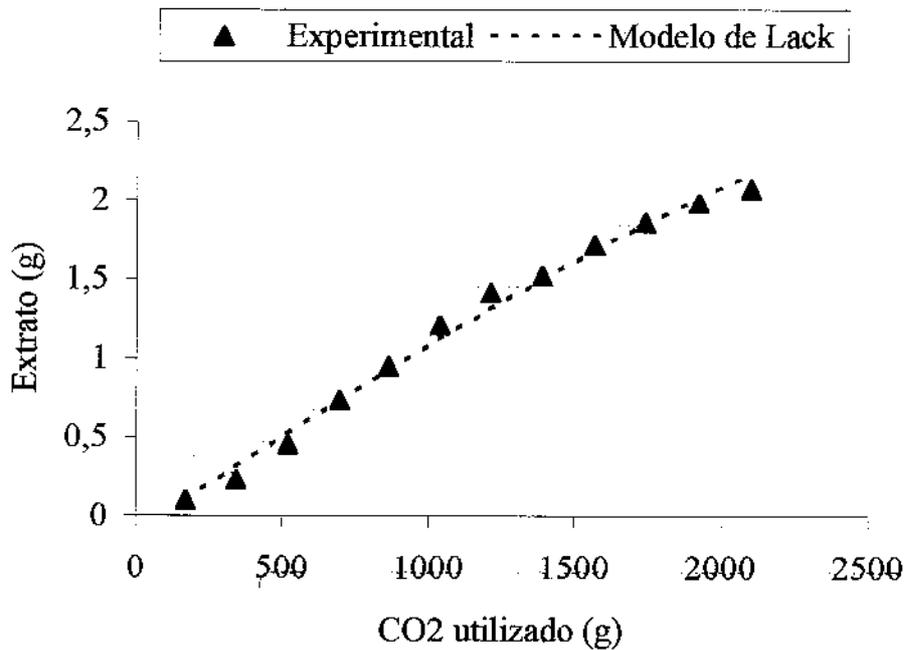


Figura 4. 8: Ajuste da curva de extração pelo modelo de Lack a 200 bar, 30°C, 10/24 mesh, 2,91 g CO₂/min

Na **Tabela 4. 6** apresentam-se nas duas colunas finais, o coeficiente de transferência de massa no período de taxa de extração constante (k_f) e o coeficiente de transferência de massa no período de extração controlado pela difusão (k_s). Este último estimado ajustando-se os dados experimentais ao modelo de Lack [Sovová, 1994]. Como é de esperar-se o

coeficiente na fase sólida é menor que o coeficiente na fase fluida, embora não exista informação na literatura para comparar os resultados obtidos.

Tabela 4. 6: Coeficientes de transferência de massa na etapa de pré-tratamento

Teste	N (g)	X_k	q_m	$k_f \times 10^4$ (m/s)	$k_s \times 10^6$ (m/s)
1	67,2	0,0172	12,91	1,578	1,3644
2	67,4	0,0193	15,50	1,578	1,1037
3	84,5	0,0168	13,21	1,578	1,5983
4	73,6	0,0272	21,81	1,578	0,7457
5	73,6	0,0188	15,23	1,578	1,3989
7	65,3	0,02085	17,81	1,578	0,9267
9	67,4	0,0231	17,74	1,578	0,8996
10	63,7	0,0191	14,07	1,578	1,1575

4.4 Conclusões

Na extração com misturas pressurizadas de CO₂/água, CO₂/água-etanol e CO₂/etanol das folhas da estévia previamente pré-tratadas com CO₂ a 200 bar e 30°C, encontrou-se que o rendimento dos glicosídeos é maior no caso da mistura CO₂/água quando a temperatura é de 16°C e a pressão de 120 bar, embora não se tenha encontrado diferença significativa nos efeitos de nenhuma das variáveis em estudo, no rendimento desses glicosídeos.

O extrato glicosídico obtido nas melhores condições operacionais possui um maior teor de rebaudiosídeo A que os extratos obtidos na extração convencional da estévia, o que significa um aumento no poder adoçante e uma diminuição no sabor residual.

Na extração convencional dos glicosídeos, o rendimento é maior quando se utilizam folhas de estévia pré-tratadas com CO₂ a 200 bar e 30°C em relação às folhas sem nenhum pré-tratamento.

O modelo de Lack utilizado para representar o pré-tratamento das folhas da estévia com dióxido de carbono pressurizado ajusta bem os dados experimentais quando a solubilidade e o coeficiente de transferência de massa na fase fluida são estimados separadamente e introduzidos no modelo.

Referências Bibliográficas

- ALVAREZ, M.; COUTO A.C.C. Processo de fracionamento dos componentes das folhas da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (Fundação Universidade Estadual de Maringá). **Pedido de Privilégio no Brasil**, protocolo nº 84 02 752, 1984
- ALVAREZ, M.; KUSUMOTO, I.T.; ARRAES, L.S. Correlação entre o teor de carboidratos totais e o teor de glicosídeos diterpênicos nas folhas secas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Arquivos Biológicos Tecnológicos**, v.5, p.19-24, 1986
- BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes**. Darmstadt (Germany): Steinkopff, New York: Springer, 1994. 387p
- CORREIA, N.C.F. **Estudo da cinética de extração do óleo da semente de maracujá com CO₂ supercrítico**. Belém, 1994. 87p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal do Pará
- CRAMER, B.; IKAN, R. Progress in the chemistry and properties of rebaudiosides. In: GRENBY, T.H. (Ed.) **Developments in Sweeteners 3**. New York: Elsevier, 1987. Chapter 2, p.45-64
- 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. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.14, p.247-256, 1999
- GOTO, A. **Estudo da influência do rebaudiosídeo A na solubilidade do esteviosídeo e análise sensorial dos produtos obtidos**. Maringá, 1997. 83p. Dissertação (Mestre em Química) – Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá

- JACOBS M. B. **The chemical analysis of foods and food products**. 3 ed., New York: Robert Krieger Publishing Co. p.21-23, 1973
- KIENLE, U. *Method of making a natural sweetener based on Stevia rebaudiana, and use thereof*. Int. Cl.⁵ A61K 35/78. U.S. Cl. 424/195.1, 586690 sep. 24, 1990; may 12, 1992. **Chemical Abstracts** n.111, 22442z
- McHUGH, M.; KRUKONIS, V. **Supercritical fluid extraction**. 2 ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994. 512p
- MONTEIRO, A.R. **Extração do óleo essencial/oleoresina de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) com CO₂ supercrítico: uma avaliação do pré-tratamento e das variáveis de processo**. Campinas, 1999. 176p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas
- 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
- PASQUEL, A.; MARQUES, M.O.M.; MEIRELES, M.A.A. *Stevia (Stevia rebaudiana Bertonii) leaves pretreatment with pressurized CO₂: an evaluation of the extract composition*. In: MEETING ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 6, 1999, Nottingham, United Kingdom. **Proceedings**. Nottingham: International Society for the Advancement of Supercritical Fluids, 1999, p.501-506
- PASQUEL, A.; MEIRELES, M.A.A.; MARQUES, M.O.M. *Extracción con CO₂ presurizado como etapa previa a la extracción de los glicósidos de la estévia*. In: II CONGRESO IBEROAMERICANO DE INGENIERIA DE ALIMENTOS. Bahia Blanca (Argentina): Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo – CYTED, 1998. Trabajo 87. CD-ROM
- PHILLIPS, K.C. *Stevia: steps in developing a new sweetener*. In: GRENBY, T.H. (Ed.) **Developments in Sweeteners 3**. New York: Elsevier, 1987. p.1-43
- REID, R.C.; PRAUSNITZ, J.M.; POLING, B.E. **The properties of gases and liquids**. 4ed., New York: McGraw-Hill, 1987. 741p

- 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) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas
- SANDLER, S.I. **Chemical and engineering thermodynamics.** 2ed., Singapore: John Wiley & Sons, 1989. 622p
- 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.**, v.37, p.71-79, 1983
- 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.
- SOVOVÁ, H.; KOMERS, R.; KUČERA, J.; JEŽ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil. **Chemical Engineering Science**, v.49, n.15, p.2499-2505, 1994
- TAN, S.; SHIBUTA, Y.; TANAKA, O. Isolation of sweetener from *Stevia rebaudiana*. *Jpn. Kokai* 63,177,764, 7p., 1988. *Apud: Chemical Abstracts*, v.110: 230444s
- TSANAVA, V.P.; SARDZHVELADZE, G.P.; KHAREBAVA, L.G. Effect of technological procedures on the composition of volatile substances in *Stevia rebaudiana*. **Subtrop. Kul't**, v.3, p.64-70, 1991. *Apud: Chemical Abstracts*, v.116, 116: 82387g

Apêndice 4. 1: Procedimento para operação da unidade de extração

- Abre-se a válvula 2a do cilindro 1 na **Figura 4. 1**, e lê-se a pressão no manômetro 5a. Dependendo da temperatura ambiente e da quantidade de CO₂ no cilindro, essa leitura deve variar entre 58 e 72 bar.
- Ligam-se os banhos termostáticos, conectados aos reservatórios 6a, 6b, 6c e 14 e aos cabeçotes das bombas 7 e 8 da **Figura 4. 1**, e se fixam as temperaturas desejadas para cada componente.
 - A temperatura dos banhos que controlam a temperatura dos reservatórios 6a, 6b e os cabeçotes da bombas 7 e 8, deve estar entre -5 e -10°C. Isto com a finalidade de se aumentar a eficiência da bomba, evitando-se cavitação. A temperatura do banho que controla a temperatura do extrator é estabelecida conforme as condições de extração selecionadas.
- As folhas de estévia trituradas com uma granulometria pré-estabelecida, são empacotadas dentro da célula de extração (2,83 cm de diâmetro e 37,50 cm de comprimento ou 235,9 cm³.) que é em seguida colocada dentro do extrator, 14, abrindo-se unicamente a sua tampa superior.
- Quando são alcançadas as condições de temperatura desejadas inicia-se a pressurização do sistema em três etapas:
 - i) As bombas 7 e 8 são ligadas¹ só com as válvulas 2a e 2b abertas, de modo a fazer-se a leitura da pressão na bomba 7 antes de introduzir-se o solvente pressurizado. A leitura da pressão nas duas bombas deve dar zero, independente das unidades de medida que estejam sendo usadas. Se a leitura não for zero procede-se a um ajuste manual, usando-se uma chave de fenda pequena.

¹O botão de liga/desliga fica no canto inferior direito da parte dianteira da bomba.

Na extremidade superior esquerda da parte traseira, onde existe um pequeno retângulo vertical identificado por ZERO ADJ, que por sua vez contém dois retângulos horizontais menores de cor azul com um pequeno parafuso de metal em cada um deles. Essas formas azuis parafusadas são identificadas pelos nomes de FINE e COARSE, e o ajuste a zero da bomba é feita nesses parafusos.

A seguir, e durante aproximadamente 3 minutos são abertas todas as válvulas da unidade, além da válvula de purga da bomba, com a finalidade de eliminar-se o ar que poderia existir no sistema.

- iv) Transcorridos os três minutos fecham-se as válvulas 2d, 2e, 2h, 2j, 2k, 2m e 15 da unidade, e usando a vazão máxima das bombas pressuriza-se a linha até uma pressão de aproximadamente 20% acima da pressão de trabalho.
 - v) Finalmente, pressuriza-se a coluna extratora (14) abrindo-se a válvula 2j.
- Quando a pressão de trabalho é alcançada no manômetro 5b e nos indicadores das próprias bombas, e transcorrido o período estático previsto no experimento, abrem-se as válvulas de saída 2m e 15 de maneira a manter uma vazão constante, que deve ser controlada com o totalizador de vazão 17. A válvula micrométrica (15) deve ser aquecida para compensar o calor perdido durante a etapa de despressurização, evitando-se desse modo o congelamento dessa válvula e do resto da tubulação até os recipientes de coleta (16).
 - A corrente que sai do cilindro extrator (14) e chega até o frasco coletor (16) é uma mistura multicomponente formada de CO₂ e das diferentes substâncias que constituem o extrato. Por despressurização simples, o CO₂ junto com alguns voláteis é separado do extrato, seguindo para os frascos de coleta adicional, onde são colocados adsorventes como carvão ativo, sílica e porapak Q que retém esses componentes mais leves. O CO₂ puro passa através do medidor de vazão antes de deixar o sistema.
 - Para extrações com duração de doze horas são feitas coletas periódicas das amostras a certo tempo previamente definido.

- Deve-se tomar muito cuidado com a variação da vazão e da pressão, de maneira a estar sempre pronto para se fazer ajustes manuais através da válvula 11, quando o sistema afasta-se das condições operacionais pré-estabelecidas.
- Alcançado o tempo pré-estabelecido de extração são desligadas as bombas e os banhos termostáticos, e fecha-se a válvula 2j, de modo a evitar a entrada de mais CO₂ no extrator (14), e aumenta-se lentamente a abertura das válvulas de saída 2m e 15, de maneira a se manter a vazão de trabalho mesmo durante a despressurização do sistema. Quando todo o CO₂ da linha é retirado, retiram-se os últimos frascos coletores, que após pesados, tampados e lacrados, são guardados em temperatura igual ou menor do que zero. Os adsorventes colocados nos frascos de coleta adicional são lavados com um solvente orgânico para retirar deles as substâncias de interesse.
- Abre-se a tampa superior do extrator (14) e retira-se a célula de extração.

A seguir, usando uma bomba peristáltica a tubulação é lavada com aproximadamente 200 mL de álcool etílico. Finalmente deixa-se passar CO₂ à pressão do cilindro por aproximadamente dez minutos, de forma a eliminar-se os traços de álcool da linha.

Apêndice 4. 2: Plano experimental para a extração dos glicosídeos da estévia

Foi utilizado o módulo Experimental Design do software comercial Statistica 6.0 para a formulação do plano fatorial descrito a seguir.

<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>
Temperatura	16, 30 e 40°C
Pressão	120 e 200 bar
Co-solvente	≈ 9,5% molar de água, etanol e mistura (50:50 % molar) de etanol:água

A vazão dos solventes e a granulometria das partículas foi fixada em aproximadamente $2,89 \pm 0,04$ g/min e 10/24 mesh, respectivamente.

Experimento	Pressão (bar) ± 1	Temperatura (°C) $\pm 0,05$	Co-solvente (% molar)
3	65	40,0	Etanol/Água 5,5:4,1
4	120	16,0	Água 9,5
8	200	30,0	Água 9,3
2	65	30,0	Etanol 9,4
7	200	16,0	Etanol/Água 5,5:4,1
6	120	40,0	Etanol 9,6
9	200	40,0	Água 9,5
1	65	16,0	Etanol 9,5
5	120	30,0	Etanol/Água 5,6:4,0

Apêndice 4. 3: Extração convencional dos glicosídeos da estévia

O processo de extração convencional das folhas da estévia pré-tratadas com CO₂ pressurizado e sem pré-tratamento foi baseado nos trabalhos de Alvarez & Couto [1984] e Goto [1997], que se resume no seguinte roteiro:

- 1.- Pesar em um béquer as folhas secas e trituradas da estévia.
- 2.- Ferver água destilada.
- 3.- Adicionar aproximadamente 1L de água destilada fervente por cada 50g de folhas secas de estévia. Deixar em infusão por uma hora.
- 4.- Filtrar usando papel de filtro em filtração a vácuo.
- 5.- Em um funil de separação misturar 40% do extrato aquoso com 60% de álcool isobutílico. Deixar em repouso até observar a separação completa por simples decantação das partes butanólica (camada superior) e aquosa (camada inferior).
- 6.- Centrifugar o extrato butanólico a 3500 rpm por 15 minutos, para retirar todas as partículas em suspensão.
Aquecer o material centrifugado até aproximadamente 80°C e passar através de um leito de carvão ativo de aproximadamente 1% p/v (1g de carvão por cada 100 mL do extrato). O leito de carvão deve ser preparado sobre papel de filtro em um funil.
- 7.- Concentrar o extrato butanólico clarificado a 70°C em um rotavapor, até a formação de uma massa semi-sólida. O balão do rotavapor deverá ser pesado previamente.
- 8.- Redissolver a massa semi-sólida em álcool metílico na proporção de 1g de sólido por cada 2 mL de metanol. Deixar repousar durante 24 h a temperatura ambiente, para cristalizar os glicosídeos da estévia.
- 9.- Separar os cristais mediante filtração a vácuo. Usar papel de filtro. Lavar os cristais usando metanol. Secar os cristais em estufa com circulação de ar a 120°C por 24 h.
- 10.- O licor mãe separado da filtração na etapa 8 junto com o resíduo da lavagem da etapa 9, são concentrados em um rotavapor a 70°C, até a formação de um xarope denso porém ainda fluido.
- 11.- Misturar o xarope com acetona na proporção de 1:3 em volume agitando intensamente até a aparição de um precipitado.

- 12.- Filtrar o precipitado e lavar lentamente com acetona anidra. Secar a 100°C em estufa com circulação de ar.
Para preparar a acetona isenta de água se utiliza 10% p/v de sulfato de sódio anidro (1g por cada 10 mL). Deve-se tomar especial cuidado para que a umidade do ar não contamine a acetona anidra em preparação.
- 13.- Redissolver o extrato seco em álcool metílico na proporção de 1g de extrato por 3 mL de metanol e deixar cristalizar a temperatura ambiente durante 24 h.
- 14.- Separar os cristais mediante filtração a vácuo e lavar lentamente com metanol.
- 15.- Secar os cristais em estufa com circulação de ar a 120°C por 24 h.

Apêndice 4. 4: Quantificação dos glicosídeos da estévia por espectrofotometria U.V.

Devido ao uso de água como co-solvente, primeiro foi necessário desidratar esses extratos aquosos mediante evaporação simples em chapa metálica de aquecimento. A seguir, os extratos sólidos foram redissolvidos em quantidades conhecidas de água, tendo como consideração básica que a leitura da absorbância para qualquer concentração não excedesse a unidade, a fim de obter melhor precisão analítica.

A concentração dos glicosídeos em uma amostra se determina usando a lei de Lambert-Beer:

$$\frac{I_t}{I_0} = 10^{-\epsilon cl} = t \quad (4. 16)$$

- I_0 : intensidade inicial
- I_t : intensidade atenuada pela amostra.
- ϵ : constante que varia com a amostra.
- c : concentração da amostra.
- l : comprimento de amostra percorrida pelo feixe de luz.
- t : transmitância.

Inicialmente foi traçada a curva de calibração do equipamento com 10 pontos de uma amostra comercial de esteviosídeo 95% diluído em água. Fazendo-se uma regressão linear entre as concentrações utilizadas e as absorbâncias observadas obtém-se a seguinte correlação:

$$\text{Concentração} = \frac{\text{mg esteviosídeo}}{\text{mL solução}} = 0,003 + (0,218)(\text{absorbância}) \quad (4. 17)$$

A seguir foi feita a espectrofotometria das diferentes amostras de cada um dos nove tratamentos testados segundo o plano experimental do **Apêndice 4. 2**, de maneira a se determinar sua absorvância no comprimento de onda selecionado (210 nm). Essa informação ao ser substituída na equação (4. 17) dá a concentração dos glicosídeos na amostra em mg/mL.

Apêndice 4. 5: Programas SAS para a análise da cinética da extração

Programa 1: Ajuste linear para a determinação dos parâmetros a serem utilizados no programa 2 [Rodrigues, 1996]

```
options ls=80;
data calsolu1;
infile 'a:\PTD9.dat';
input tmin mtco2 mtext;
al1=max(tmin-60,0);
al2=max(tmin-450,0);
proc print;
proc reg; model mtext=tmin al1 al2;
run;
```

O programa otimiza a correlação linear entre a massa de extrato obtida e o tempo de extração durante o período de taxa de extração constante. Ingressa-se com as estimativas mínima e máxima do período de extração constante (al1 e al2) em minutos transcorridos.

Uma corrida típica do programa 1 gera seus resultados no formato da tabela a seguir, sendo que os dados necessários para o programa 2 são os parâmetros estimados para cada variável.

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H ₀ : Parameter=0	Prob > T
Intercep					
Tmin					
AL1					
AL2					

Programa 2: Ajuste não linear para a determinação dos parâmetros cinéticos da transferência de massa em função do tempo transcorrido [Rodrigues, 1996]

```
options ls=80;
data calsolul;
infile 'a:PTD9.dat';
input tmin mtco2 mtext;
al1=max(tmin-60,0);
al2=max(tmin-450,0);
proc print;
proc nlin;
    parms    b0=0.1126280
             b1=-0.001184
             b2=0.007192
             b3=-0.003254
             knot1=60
             knot2=450;
    al1=max(tmin-knot1,0);
    al2=max(tmin-knot2,0);
model mtext=b0+b1*tmin+b2*al1+b3*al2;
proc print;
run;
```

O programa ajusta os resultados a um modelo não linear. Como no programa 1 ingressa-se com os valores de al1 e al2 como sendo as estimativas do início e do fim do período de taxa de extração constante, e com os quatro parâmetros resultantes do programa 1, que correspondem a b0, b1, b2 e b3, respectivamente. Os valores de knot1 e knot2 são os mesmos valores de al1 e al2, respectivamente.

Quando o programa é rodado, a informação procurada encontra-se numa tabela que apresenta o seguinte formato:

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0				
B1				
B2				
B3				
KNOT1				
KNOT2				

Somando B1 + B2 determina-se o valor da taxa de transferência de massa durante o período de taxa constante (CER), em massa de extrato/massa do solvente. KNOT2 dá o valor de t_{CER} , e M_{CER} é o cociente de CER/Área

Programa 3: Ajuste linear para a determinação dos parâmetros a serem utilizados no programa 4 [Rodrigues, 1996]

```
options ls=80;
data calsolul;
infile 'a:PTD1.dat';
input tmin mtco2 mtext;
al1=max(mtco2-332.7,0);
al2=max(mtco2-1354.4,0);
proc print;
proc reg; model mtext=mtco2 al1 al2;
run;
```

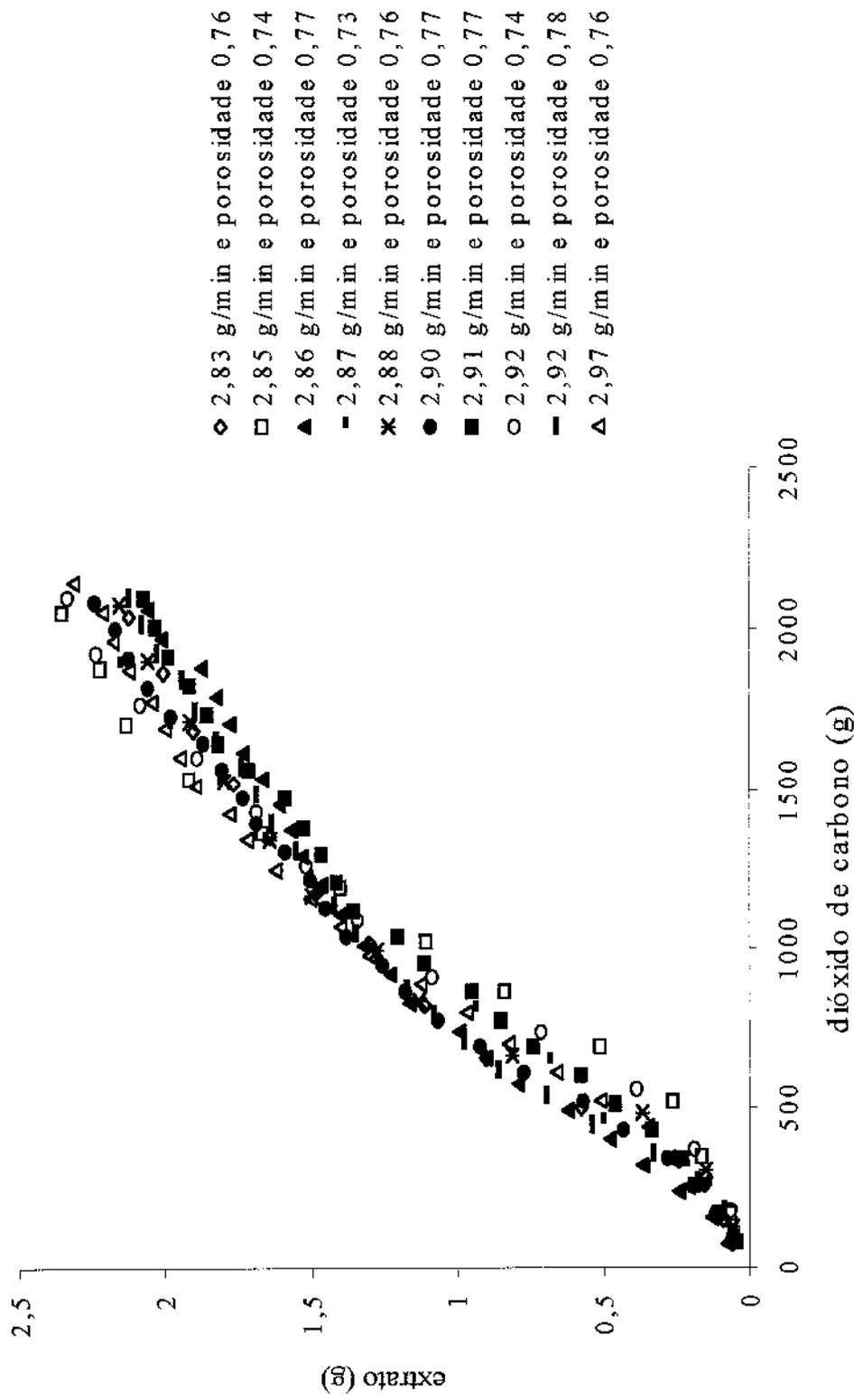
O programa otimiza a correlação linear entre a massa de extrato obtida e a massa de solvente durante o período de taxa de extração constante. Ingressa-se com as estimativas mínima e máxima do período de extração constante (a_{11} e a_{12}) em massa de solvente consumido. Uma corrida típica do programa 3 gera resultados similares ao programa 1.

Programa 4: Ajuste não linear para a determinação dos parâmetros cinéticos da transferência de massa em função do solvente utilizado [Rodrigues, 1996]

```
options ls=80;
data calsolul;
infile 'a:PTD1.dat';
input tmin mtco2 mtext;
a11=max(mtco2-332.7,0);
a12=max(mtco2-1354.4,0);
proc print;
proc nlin;
    parms    b0=-0.125289
             b1=0.001492
             b2=-0.000181
             b3=-0.000726
             knot1=332.7
             knot2=1354.4;
    a11=max(mtco2-knot1,0);
    a12=max(mtco2-knot2,0);
model mtext=b0+b1*mtco2+b2*a11+b3*a12;
proc print;
run;
```

Somando $B_1 + B_2$ determina-se o valor da concentração na saída do extrator em massa de extrato/massa de solvente (Y_{CER}). K_{NOT2} é o valor da massa de solvente correspondente à massa de extrato que representa o final do período de taxa constante (R_{CER}).

Apêndice 4. 6: Dados experimentais do pré-tratamento da estévia



Tempo (h)	PTD1			PTD2			PTD3		
	CO ₂ (g)	Extrato		CO ₂ (g)	Extrato		CO ₂ (g)	Extrato	
		(g)	%		(g)	%		(g)	%
1	145,9	0,092	0,13	125,4	0,061	0,08	107,9	0,064	0,08
2	332,7	0,244	0,33	303,0	0,150	0,21	261,9	0,135	0,17
3	498,1	0,575	0,79	487,4	0,366	0,50	458,8	0,497	0,61
4	654,0	0,900	1,23	663,2	0,814	1,11	640,0	0,681	0,83
5	823,8	1,113	1,52	838,3	1,131	1,54	805,3	0,938	1,15
6	1014,9	1,305	1,79	993,8	1,278	1,74	985,4	1,285	1,57
7	1180,2	1,481	2,03	1164,3	1,498	2,04	1163,1	1,469	1,80
8	1354,4	1,641	2,25	1341,6	1,641	2,24	1339,1	1,653	2,02
9	1519,2	1,764	2,42	1527,0	1,802	2,46	1518,8	1,812	2,22
10	1687,7	1,904	2,61	1714,7	1,915	2,61	1704,7	1,986	2,43
11	1862,5	2,007	2,75	1899,6	2,064	2,82	1884,7	2,156	2,64
12	2039,6	2,124	2,91	2072,7	2,159	2,95	2066,1	2,253	2,75

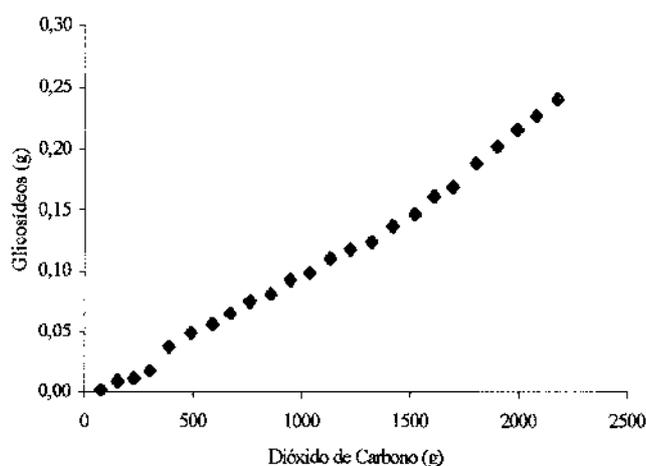
Tempo (h)	PTD4			PTD5			PTD6		
	CO ₂ (g)	Extrato		CO ₂ (g)	Extrato		CO ₂ (g)	Extrato	
		(g)	%		(g)	%		(g)	%
1	169,3	0,062	0,08	178,1	0,064	0,08	154,6	0,133	0,19
2	351,9	0,161	0,20	375,8	0,191	0,24	319,1	0,367	0,52
3	522,7	0,261	0,33	559,1	0,385	0,48	492,0	0,621	0,88
4	695,8	0,509	0,64	742,3	0,715	0,89	656,2	0,904	1,27
5	863,5	0,840	1,05	911,3	1,085	1,36	825,4	1,163	1,64
6	1023,7	1,109	1,39	1087,6	1,345	1,68	1009,7	1,324	1,87
7	1190,9	1,404	1,75	1257,9	1,521	1,90	1198,0	1,469	2,07
8	1367,8	1,670	2,09	1431,1	1,691	2,11	1373,3	1,567	2,21
9	1539,5	1,918	2,40	1601,2	1,894	2,37	1536,9	1,666	2,35
10	1709,0	2,134	2,67	1766,3	2,086	2,61	1707,6	1,783	2,51
11	1882,5	2,225	2,78	1926,2	2,241	2,80	1881,7	1,880	2,65
12	2053,6	2,356	2,95	2099,3	2,337	2,92	2057,5	2,062	2,90

Tempo (h)	PTD7			PTD8			PTD9		
	CO ₂ (g)	Extrato		CO ₂ (g)	Extrato		CO ₂ (g)	Extrato	
		(g)	%		(g)	%		(g)	%
1	169,3	0,105	0,15	177,7	0,083	0,12	167,2	0,117	0,16
2	341,6	0,229	0,32	357,4	0,328	0,48	344,2	0,278	0,38
3	518,6	0,458	0,64	534,9	0,692	1,01	523,1	0,512	0,70
4	693,1	0,737	1,04	706,8	0,975	1,43	703,2	0,823	1,12
5	862,0	0,949	1,34	873,6	1,168	1,71	886,0	1,123	1,53
6	1036,0	1,204	1,70	1046,6	1,347	1,97	1067,2	1,403	1,91
7	1207,8	1,417	2,00	1218,0	1,497	2,19	1246,6	1,620	2,21
8	1384,2	1,526	2,15	1397,9	1,636	2,39	1426,4	1,782	2,43
9	1563,6	1,717	2,42	1572,2	1,744	2,55	1602,4	1,949	2,66
10	1736,5	1,860	2,62	1749,8	1,895	2,77	1777,1	2,049	2,80
11	1916,3	1,987	2,80	1927,7	2,027	2,96	1963,3	2,178	2,97
12	2097,3	2,072	2,92	2100,6	2,129	3,11	2140,8	2,316	3,16

Apêndice 4. 7: Dados experimentais da extração dos glicosídeos da estêvia

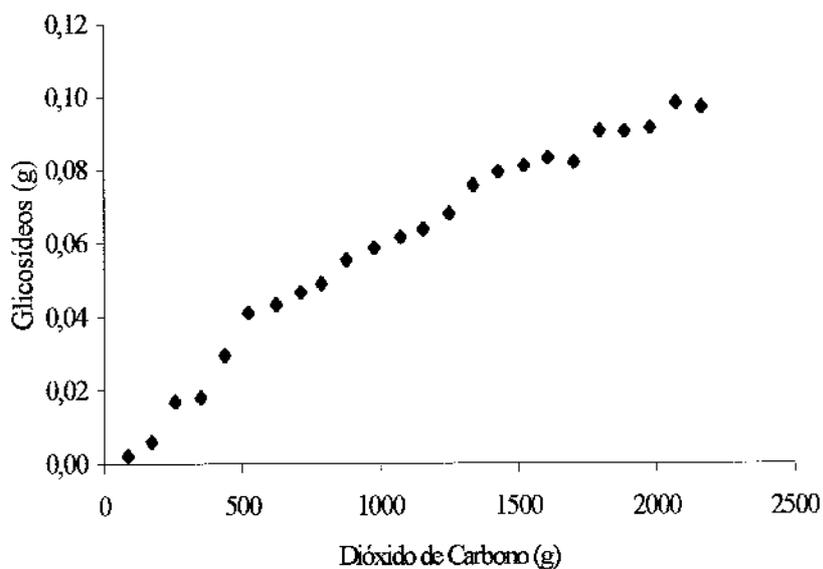
Experimento 1: ExGI 1: 200 bar, 30°C e 9,51% molar de etanol como co-solvente

Tempo (min)	CO ₂ (g)	Etanol (g)	Glicosídeos	
			%	g
30	73,4	7,3	0,003	0,002
60	151,8	15,0	0,012	0,008
90	227,2	22,5	0,016	0,010
120	300,4	29,8	0,025	0,016
150	387,3	38,4	0,054	0,034
180	488,1	48,4	0,070	0,045
210	588,8	58,3	0,080	0,051
240	670,5	66,4	0,093	0,059
270	760,9	75,4	0,107	0,068
300	856,4	84,9	0,115	0,074
330	946,9	93,8	0,131	0,084
360	1035,3	102,6	0,140	0,089
390	1130,8	112,1	0,157	0,100
420	1222,7	121,2	0,167	0,107
450	1319,7	130,8	0,176	0,112
480	1418,3	140,6	0,194	0,124
510	1518,7	150,5	0,208	0,133
540	1606,9	159,2	0,228	0,146
570	1693,7	167,8	0,239	0,153
600	1799,4	178,3	0,266	0,170
630	1896,5	187,9	0,286	0,183
660	1988,5	197,1	0,305	0,195
690	2077,0	205,8	0,321	0,206
720	2174,1	215,5	0,340	0,218



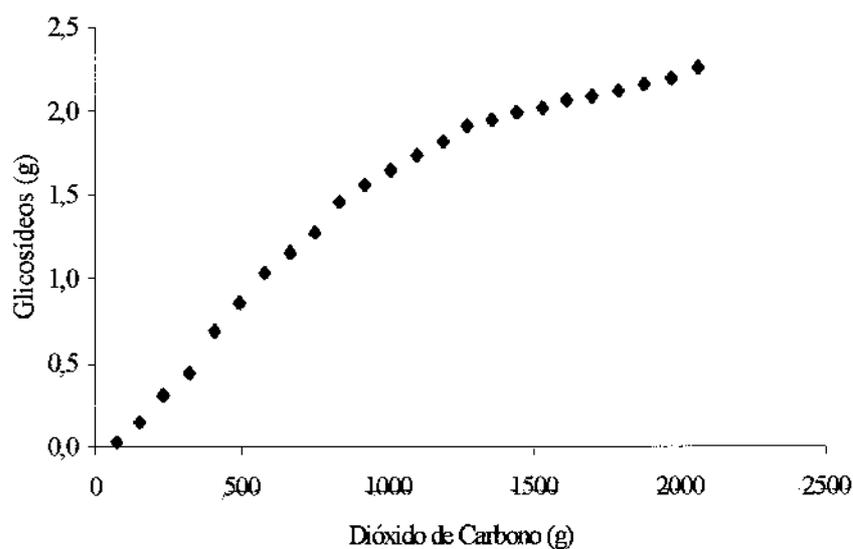
Experimento 2: ExGl 2: 65 bar, 16°C e 9,44% molar de etanol como co-solvente

Tempo (min)	CO ₂ (g)	Glicosídeos	
		%	g
30	85,0	0,003	0,002
60	170,0	0,007	0,005
90	255,1	0,021	0,014
120	348,4	0,023	0,015
150	435,1	0,037	0,025
180	520,3	0,052	0,034
210	622,5	0,055	0,036
240	709,4	0,059	0,039
270	784,6	0,062	0,041
300	876,6	0,070	0,046
330	977,3	0,074	0,049
360	1072,9	0,077	0,051
390	1156,2	0,080	0,053
420	1248,3	0,086	0,057
450	1335,3	0,095	0,063
480	1425,9	0,100	0,066
510	1519,7	0,102	0,067
540	1606,8	0,105	0,069
570	1699,1	0,103	0,068
600	1792,9	0,114	0,075
630	1881,7	0,114	0,075
660	1975,5	0,115	0,076
690	2069,4	0,124	0,082
720	2161,8	0,122	0,081



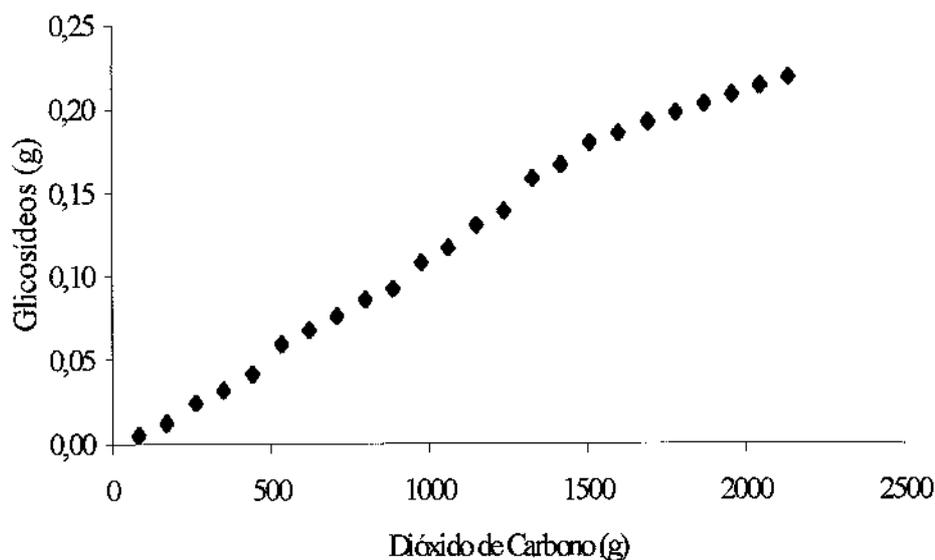
Experimento 4: ExGl 4: 120 bar, 16°C e 9,55% molar de água como co-solvente

Tempo (min)	CO ₂ (g)	H ₂ O (g)	Glicosídeos	
			(g)	%
30	72,3	3,0	0,029	0,042
60	151,4	6,3	0,149	0,213
90	232,5	9,6	0,313	0,446
120	320,0	13,3	0,447	0,637
150	406,0	16,8	0,695	0,992
180	491,8	20,4	0,862	1,229
210	577,6	23,9	1,038	1,481
240	664,8	27,5	1,155	1,647
270	748,4	31,0	1,274	1,817
300	833,9	34,5	1,454	2,074
330	921,0	38,1	1,560	2,225
360	1011,5	41,9	1,647	2,349
390	1099,8	45,5	1,736	2,475
420	1187,9	49,2	1,818	2,593
450	1269,4	52,6	1,914	2,729
480	1356,0	56,2	1,949	2,780
510	1440,9	59,7	1,991	2,839
540	1527,5	63,3	2,021	2,883
570	1612,6	66,8	2,067	2,948
600	1697,8	70,3	2,089	2,979
630	1788,1	74,1	2,121	3,049
660	1875,0	77,7	2,162	3,146
690	1968,6	81,5	2,199	3,211
720	2060,6	85,3	2,263	3,376



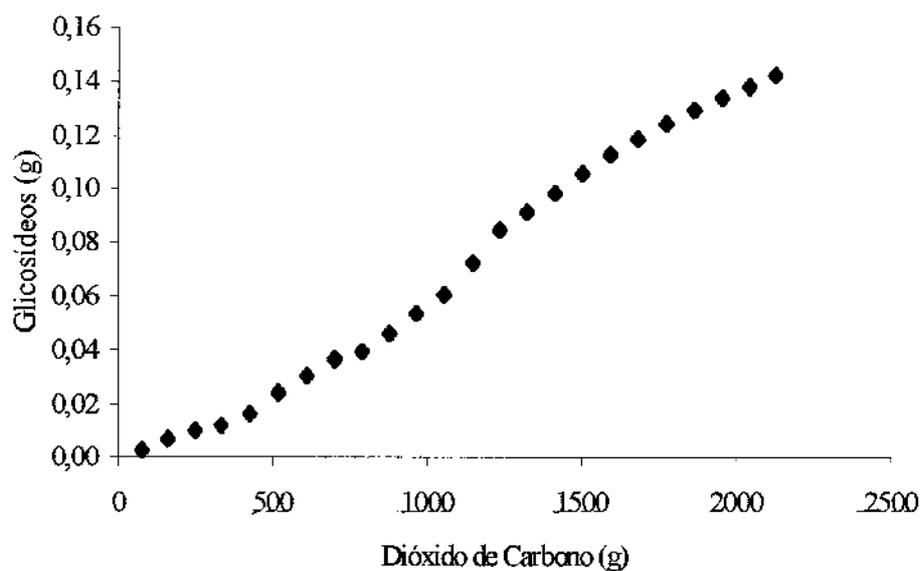
Experimento 5: ExGl 5: 120 bar, 30°C e 9,56% molar de mistura etanol:água
como co-solvente

Tempo (min)	CO ₂ (g)	Cosol (g)	Glicosídeos	
			%	g
30	83,5	6,4	0,009	0,006
60	170,5	13,0	0,022	0,013
90	262,5	20,0	0,044	0,027
120	349,4	26,7	0,058	0,036
150	441,5	33,7	0,076	0,046
180	533,4	40,7	0,109	0,067
210	621,5	47,4	0,125	0,076
240	709,6	54,1	0,141	0,086
270	797,4	60,8	0,158	0,097
300	886,9	67,7	0,170	0,104
330	976,5	74,5	0,199	0,122
360	1062,5	81,1	0,216	0,132
390	1149,8	87,7	0,241	0,147
420	1235,5	94,3	0,257	0,157
450	1326,2	101,2	0,293	0,179
480	1416,8	108,1	0,308	0,188
510	1507,4	115,0	0,332	0,203
540	1597,8	121,9	0,343	0,209
570	1693,3	129,2	0,355	0,216
600	1780,2	135,8	0,366	0,223
630	1870,7	142,7	0,376	0,229
660	1957,6	149,4	0,386	0,235
690	2044,7	156,0	0,395	0,241
720	2133,8	162,8	0,405	0,247



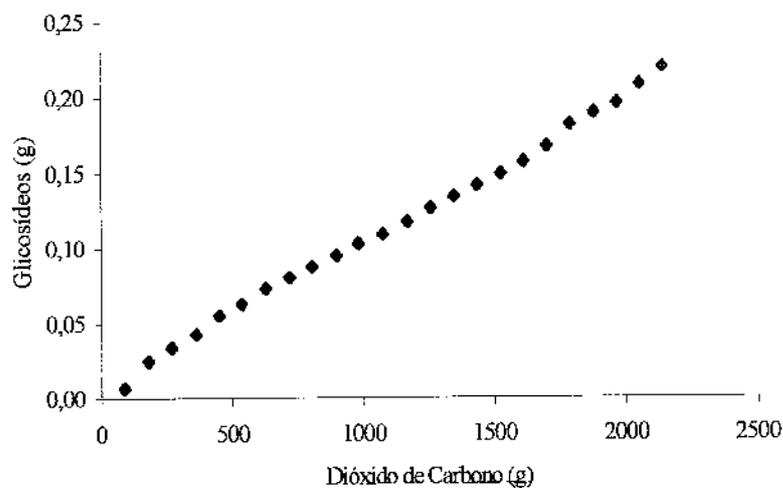
Experimento 6: ExGl 6: 120 bar, 45°C e 9,60% molar de etanol como co-solvente

Tempo (min)	CO ₂ (g)	Etanol (g)	Glicosídeos	
			%	g
30	75,4	7,5	0,004	0,003
60	160,9	16,1	0,012	0,007
90	247,8	24,8	0,018	0,011
120	333,1	33,3	0,021	0,013
150	424,9	42,5	0,029	0,018
180	518,1	51,8	0,043	0,027
210	609,7	61,0	0,054	0,034
240	699,7	70,0	0,066	0,041
270	789,7	79,0	0,070	0,043
300	877,6	87,8	0,082	0,051
330	962,6	96,3	0,095	0,059
360	1054,1	105,4	0,108	0,067
390	1145,6	114,6	0,129	0,080
420	1231,9	123,2	0,152	0,094
450	1321,6	132,2	0,163	0,101
480	1411,3	141,1	0,176	0,109
510	1498,9	149,9	0,189	0,117
540	1590,1	159,0	0,202	0,125
570	1677,8	167,8	0,212	0,132
600	1770,7	177,1	0,223	0,138
630	1862,1	186,2	0,232	0,144
660	1951,9	195,2	0,240	0,149
690	2039,9	204,0	0,247	0,153
720	2124,8	212,5	0,255	0,158



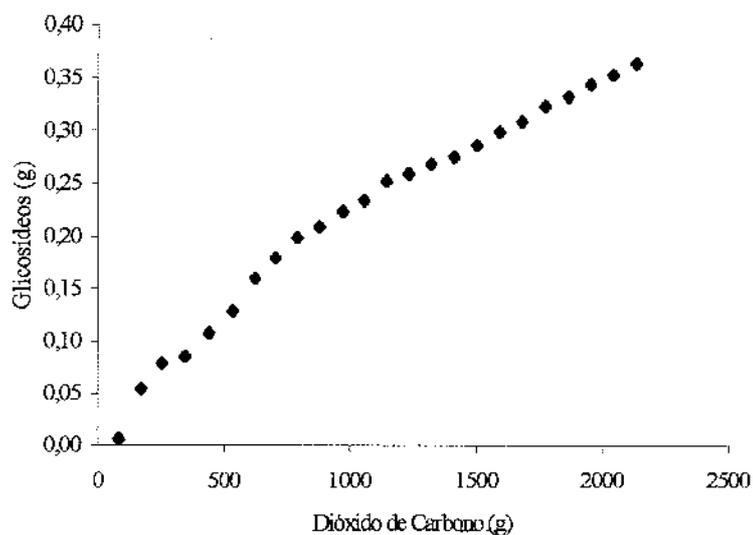
Experimento 7: ExGl 7: 200 bar, 16°C e 9,61% molar de mistura etanol:água
como co-solvente

Tempo (min)	CO ₂ (g)	Cosol (g)	Glicosídeos	
			%	g
30	87,4	6,7	0,012	0,007
60	176,3	13,4	0,044	0,027
90	265,2	20,2	0,061	0,038
120	359,2	27,4	0,076	0,047
150	448,1	34,2	0,098	0,061
180	533,9	40,7	0,112	0,069
210	624,9	47,7	0,129	0,080
240	715,9	54,6	0,143	0,088
270	803,2	61,3	0,155	0,096
300	894,3	68,2	0,169	0,105
330	980,3	74,8	0,183	0,113
360	1071,4	81,8	0,194	0,120
390	1165,6	88,9	0,209	0,130
420	1254,7	95,7	0,225	0,140
450	1343,8	102,5	0,239	0,148
480	1431,3	109,2	0,252	0,156
510	1522,4	116,2	0,266	0,165
540	1608,4	122,7	0,279	0,173
570	1697,6	129,5	0,298	0,185
600	1785,3	136,2	0,323	0,200
630	1876,5	143,2	0,337	0,209
660	1964,2	149,9	0,349	0,216
690	2050,2	156,4	0,370	0,229
720	2137,7	163,1	0,390	0,242



Experimento 9: ExGl 9: 200 bar, 45°C e 9,53% molar de água como co-solvente

Tempo (min)	CO ₂ (g)	H ₂ O (g)	Glicosídeos	
			%	g
30	81,8	3,4	0,011	0,007
60	168,5	7,0	0,090	0,055
90	251,7	10,4	0,129	0,080
120	343,6	14,2	0,139	0,086
150	436,8	18,1	0,175	0,108
180	532,1	22,0	0,209	0,129
210	620,2	25,7	0,260	0,160
240	701,7	29,0	0,291	0,179
270	788,3	32,6	0,323	0,199
300	876,4	36,3	0,339	0,209
330	966,6	40,0	0,363	0,224
360	1053,2	43,6	0,380	0,234
390	1139,8	47,2	0,410	0,253
420	1227,9	50,8	0,422	0,260
450	1317,9	54,6	0,436	0,269
480	1407,9	58,3	0,447	0,275
510	1497,9	62,0	0,464	0,286
540	1587,9	65,7	0,485	0,299
570	1677,8	69,5	0,501	0,309
600	1769,3	73,2	0,524	0,323
630	1860,8	77,0	0,539	0,333
660	1948,8	80,7	0,558	0,344
690	2038,8	84,4	0,572	0,353
720	2129,0	88,1	0,591	0,364



Apêndice 4. 8: Estatística descritiva dos rendimentos mássicos obtidos na extração dos glicosídeos da estévia utilizando mistura de fluidos pressurizados

Média	0,613196129
Erro padrão	0,351153596
Mediana	0,340011287
Desvio padrão	1,053460787
Variância da amostra	1,109779629
Curtose	8,183552309
Assimetria	2,815300978
Intervalo	3,366603999
Mínimo	0,01
Máximo	3,376603999
Soma	5,518765157
Contagem	9
Nível de confiança(95,0%)	0,809762167

CAPÍTULO 5

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM CO₂ PRESSURIZADO NA PERCEPÇÃO SENSORIAL DOS GLICOSÍDEOS DA ESTÉVIA

Conteúdo

ÍNDICE DE FIGURAS.....	152
ÍNDICE DE TABELAS.....	152
NOMENCLATURA.....	152
RESUMO.....	153
5.1 INTRODUÇÃO.....	155
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	157
5.2.1 Material utilizado.....	157
5.2.2 Seleção da equipe de provadores.....	158
5.2.3 Avaliação das amostras.....	158
5.2.4 Equivalência de doçura.....	159
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	160
5.3.1 Equipe de provadores.....	160
5.3.2 Equivalência de doçura.....	161
5.4 CONCLUSÕES.....	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	163
Apêndice 5. 1: Ficha utilizada na seleção dos provadores.....	165
Apêndice 5. 2: Ficha utilizada para se avaliar a intensidade de doçura de uma amostra.....	166
Apêndice 5. 3: Intensidade de doçura em função da concentração dos extratos.....	167

Índice de Figuras

Figura 5. 1: Sensação percebida pelo painel em função da concentração de extrato	162
Figura 5. 2: Relação entre intensidade de doçura e concentração do extrato	162

Índice de Tabelas

Tabela 5. 1: Potência edulcorante e concentração equivalente a sacarose 3% dos extratos glicosídicos da estévia.....	163
--	-----

Nomenclatura

S	:	sensação percebida pelo provador
C	:	concentração de estímulo utilizada
a, n	:	parâmetros a serem determinados

RESUMO

A análise sensorial dos extratos glicosídicos constitui a terceira parte desse trabalho. Primeiramente foi constituído um corpo treinado de provadores através de uma seleção dos participantes. Essa equipe de provadores analisou a intensidade de doçura dos extratos glicosídicos obtidos por extração convencional a partir de folhas de estévia pré-tratadas com CO₂ pressurizado a 200 bar e 30°C, e folhas sem pré-tratamento. Encontrou-se que a potências edulcorantes são iguais para os dois extratos, porém a percepção do sabor residual foi maior no caso do extrato sem pré-tratamento.

Embora não tenha sido feita a análise sensorial dos glicosídeos obtidos com a mistura de fluidos pressurizados, supõe-se que a sua qualidade deve ser ainda maior, em termos de uma menor percepção do sabor residual e uma maior percepção da doçura, devido a seu maior conteúdo de rebaudiosídeo A referido a seu teor de esteviosídeo..

Palavras Chave: *Estévia, Glicosídeos, Extração Pressurizada, Extração Supercrítica, Análise Sensorial*

5.1 Introdução

Desde que a extração dos glicosídeos da estévia é dificultada por outras substâncias químicas contidas em suas folhas, é muito importante o pré-tratamento das mesmas, como uma primeira etapa do processo para se extrair os glicosídeos diterpênicos das folhas da estévia. Considerando-se que os processos convencionais de extração não conseguem resolver o problema do sabor residual amargo do extrato da estévia, foram levantadas algumas hipóteses para explicá-lo. De acordo com Phillips [1987], uma patente da Stevia Company sugere que os óleos essenciais voláteis, taninos e flavonóides contribuem aos sabores desagradáveis associados com o extrato da estévia. Por outro lado, Soejarto *et al* [1983] sugerem que o gosto amargo provavelmente deve-se a lactonas sesquiterpênicas, e Tsanava *et al* [1991] reportaram que diminuindo as concentrações de cariofileno e espatulenol conseguiram minimizar o sabor e aroma amargo e levemente desagradável do extrato da estévia.

A extração convencional desses glicosídeos é feita através de processos combinados de extração sólido-líquido e líquido-líquido, porém os extratos glicosídicos obtidos possuem um marcante sabor residual amargo, responsável por muitas das restrições ao uso da estévia. Existem muitas hipóteses para explicar esse sabor residual: Phillips [1987] descreve que através de uma patente europeia de 1985, a Stevia Company reporta que os óleos essenciais, taninos e flavonóides presentes nas folhas da estévia, contribuem para o sabor desagradável da estévia, enquanto Soejarto *et al* [1983] acreditam que as lactonas sesquiterpênicas são responsáveis por este sabor amargo. Por sua vez, Tsanava *et al* [1991] sugerem que o cariofileno e o espatulenol contribuem decisivamente para o sabor desagradável dos produtos derivados da estévia, mas como bem lembra Phillips [1987], não se deve esquecer que tanto o esteviosídeo quanto o rebaudiosídeo A têm sua cota de sabor amargo, embora no caso desse último seja significativamente menor que no primeiro.

A legislação brasileira permite a utilização de certos edulcorantes, naturais e artificiais, com limites máximos que variam desde os 2g/100mL no caso do manitol para bebidas dietéticas, até o uso ilimitado no caso do sorbitol para alimentos e bebidas dietéticas e do manitol para alimentos dietéticos, passando pelo esteviosídeo que em ambos

os casos pode-se usar até 60 mg/100 mL ou 60 mg/100 g conforme o caso. Nos edulcorantes artificiais tem-se desde a sacarina que pode ser utilizada até 30 mg/100 mL ou 30 mg/100 g para bebidas ou alimentos dietéticos, até os ciclamatos cujo limite é 130 mg/100 mL ou 130 mg/100 g para bebidas ou alimentos dietéticos, passando pelo aspartame que tem como limite máximo 75 mg/100 mL ou 75 mg/100 g caso se esteja preparando uma bebida ou um alimento dietético (ABIA, 1991). Essas quantidades máximas permitidas correspondem a níveis de doçura diferentes dependendo da substância em avaliação. E para se avaliar esses diferentes níveis de doçura, a análise sensorial é uma ferramenta muito importante.

Logo, o uso da análise sensorial para a determinação da intensidade de doçura dos extratos das folhas da estévia obtidos por diferentes processos, permite avaliar a resposta de uma população particular sobre o grau de aceitabilidade desses produtos obtidos se seguindo caminhos diferentes. Os diversos trabalhos publicados sobre a intensidade da doçura dos glicosídeos da estévia concordam que o esteviosídeo é cerca de 300 vezes mais doce que a sacarose a uma concentração de 0,4%; 150 vezes quando a concentração é de 4%, e 100 vezes quando a solução de sacarose é de 10%. O rebaudiosídeo A de 250 a 400 vezes, o rebaudiosídeo B de 300 a 350 vezes, o rebaudiosídeo C de 50 a 120 vezes, o rebaudiosídeo D de 250 a 450 vezes, o rebaudiosídeo E de 150 a 300 vezes, e o dulcosídeo A de 50 a 120 vezes mais doce [Goto, 1997].

Para que um adoçante possa ser utilizado como substituto da sacarose, é preciso antes se conhecer as concentrações dos adoçantes a serem utilizados e suas doçuras equivalentes em sacarose. Cardello [1996] cita rapidamente os métodos mais usados para determinar a equivalência de doçura de um adoçante: limiar absoluto, comparação pareada, variações do método do estímulo constante e o método muito utilizado de estimação da magnitude e representação gráfica dos resultados através da lei de Stevens ou “power function” de Stone & Oliver [1969]. Esse método de estimação de magnitude possibilita a medida quantitativa direta da intensidade de doçura subjetiva. Nesse método, provadores selecionados através da sua capacidade de discriminar amostras são treinados para compararem os padrões de doçura e a informação que proporcionem é processada via fichas específicas para coletar a informação. Segundo Stone & Oliver [1969], os provadores devem receber uma amostra de referência com uma intensidade designada com um valor

arbitrário, por exemplo 100, seguida por uma série de amostras aleatorizadas, com intensidades maiores ou menores que a referência. Os provadores deverão estimar a intensidade de doçura das amostras desconhecidas.

Cardello [1996] citando a Moskowitz [1970] lembra que o princípio de estimação de magnitude, ou função de potência, proporciona diversas ferramentas importantes para a avaliação de alimentos através da análise sensorial. Bastante ilustrativa é a analogia física da temperatura: no intervalo entre 40 e 80°C existem 40 graus de diferença de temperatura, entretanto, 80°C não é percebido sensorialmente como tendo o dobro do aquecimento de 40°C; similarmente o dobro de uma determinada quantidade de sacarose ou cloreto de sódio, não vão produzir a sua percepção em dobro, precisando quantificar estas medidas da forma como elas são percebidas sensorialmente.

Baseado no descrito acima, este trabalho estudou o efeito da extração com CO₂ pressurizado na doçura do extrato glicosídico da estévia

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Material utilizado

A análise sensorial dos extratos obtidos da estévia foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Nutrição da FEA, dotado de cabines individuais para a realização dos testes. A sacarose e a cafeína utilizadas na seleção da equipe de provadores, bem como os recipientes necessários para todos os testes, foi de uso do Laboratório. As amostras avaliadas foram extratos obtidos usando técnicas de extração convencional a partir de folhas de estévia pré-tratadas com dióxido de carbono pressurizado e de folhas sem pré-tratamento. As amostras foram apresentadas em béqueres de vidro com capacidade para 50 mL e os testes foram realizados na temperatura ambiente nos meses de outubro a dezembro. O candidato a provador foi instruído a lavar a boca com água filtrada entre uma amostra e outra.

Para a seleção da equipe de provadores foram convidados funcionários e pós-graduandos do Departamento de Engenharia de Alimentos.

5.2.2 Seleção da equipe de provadores

Através do método da ordenação, os provadores foram escolhidos a partir de um grupo de 15 candidatos, usando-se três soluções de sacarose (1,0; 2,0; e 3,0% m/v) e três soluções de cafeína (0,035; 0,07; 0,14% m/v) recomendadas pela ASTM [1981], de maneira a se treinar o painel para identificar intensidades de amargor e doçura. Cada provador testou 6 amostras (as três de sacarose e as três de cafeína) completamente casualizadas com duas repetições cada, e foi instruído a separar inicialmente as soluções doces das amargas, depois ordenar as primeiras, e finalmente as segundas (**Apêndice 5. 1**). As repetições foram feitas em dias diferentes ou em horários da manhã e da tarde. O candidato a provador foi instruído a lavar a boca com água filtrada entre uma amostra e outra.

5.2.3 Avaliação das amostras

A medida da doçura relativa dos extratos glicosídicos das folhas da estévia foi realizada de acordo com o método de estimação de magnitude [Stone & Oliver, 1969], o qual proporciona a medida quantitativa direta da intensidade subjetiva de doçura.

Foram preparadas 5 soluções aquosas dos extratos glicosídicos com as seguintes concentrações: 0,0078%; 0,0125%; 0,0200%; 0,0320%; e 0,0500% (gramas de glicosídeos completadas a 100 mL de água filtrada). A amostra de referência foi uma solução de sacarose 3%. A ficha utilizada está no **Apêndice 5. 2**. As amostras foram apresentadas em béqueres de vidro com capacidade para 50 mL e os testes foram realizados na temperatura ambiente dos meses de outubro a dezembro.

Os provadores foram informados que receberiam uma série de 5 amostras codificadas com números de três dígitos, com uma referência em evidência marcada com a letra R, que receberia o valor arbitrário de doçura 100, seguido por uma série de amostras ordenadas ao acaso, que poderiam ter intensidades de doçura maiores ou menores que a da referência. Foi pedido a eles que estimassem a intensidade de doçura das amostras desconhecidas, relativamente à referência. Por exemplo um valor de 200 indicaria que a

amostra era duas vezes mais doce que a referência, enquanto um valor de 50 indicaria que a intensidade de doçura dessa amostra é só a metade da referência, e assim por diante.

5.2.4 Equivalência de doçura

As magnitudes de intensidade de doçura foram representadas, logaritmicamente em função das concentrações utilizadas. Para se estimar os valores das magnitudes de doçura foi seguido o seguinte procedimento¹:

A partir da informação proporcionada pelo painel de provadores, calcula-se a média geométrica para cada provador em cada concentração utilizada. A seguir normalizam-se os dados dos provadores utilizando a média geométrica respectiva. Os logaritmos comuns desses valores normalizados são plotados em função do logaritmo das concentrações utilizadas para se determinar a função de potência.

Segundo Moskowitz [1970] citado por Cardello [1996], as curvas tem que corresponder a uma função de potência do tipo:

$$S = aC^n \quad (5.1)$$

onde S é a sensação percebida, C é a concentração do estímulo, a e n são parâmetros do modelo.

Após se determinar as funções de potência, estima-se o estímulo sensorial (S) de doçura da amostra de referência (sacarose a 3% neste caso) na equação (5.1) determinada. Este valor é substituído na equação para os extratos glicosídicos da estévia, tendo C como variável dependente, obtendo-se como resultado a concentração dos extratos equivalente à doçura da amostra de referência. Segundo Cardello [1996], a função de potência da solução de sacarose a 3%, utilizada como amostra de referência, é:

¹ Cardello, H.M.A.B. (Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara) **Comunicação pessoal**, 1999

$$S = 0,1798C^{1,5572} \quad (5. 2)$$

Logo, o estímulo sensorial de doçura da sacarose a 3% é:

$$S = 0,1798(3)^{1,5572} = 0,994862 \quad (5. 3)$$

Consequentemente,

$$C = 0,0198$$

A potência edulcorante dos extratos, definida como o número de vezes que é mais doce que a amostra de referência, é calculada dividindo-se a concentração de sacarose em que se está avaliando a equivalência de doçura (3% neste caso) pelo valor da concentração calculada para o extrato glicosídico.

5.3 Resultados e discussões

5.3.1 Equipe de provadores

Nove dos quinze candidatos acertaram nas três vezes que testaram as seis soluções, e foram selecionados como provadores para as cinco soluções aquosas dos glicosídeos da estévia extraídos convencionalmente a partir de folhas pré-tratadas com CO₂ a 200 bar e 30°C, e de folhas sem pré-tratamento. Cinco dos nove provadores comunicaram por escrito na Ficha de avaliação respectiva e dois deles comunicaram verbalmente, a percepção muito maior do sabor residual no extrato obtido a partir de folhas de estévia sem o pré-tratamento com dióxido de carbono pressurizado.

5.3.2 Equivalência de doçura

A **Figura 5. 1** apresenta a resposta da equipe de provadores versus as concentrações utilizadas, e a **Figura 5. 2** apresenta o comportamento do logaritmo dos valores normalizados da magnitude de doçura dos dois tipos de extratos glicosídicos da estévia em função do logaritmo da concentração (informação mais detalhada no **Apêndice 5. 1**).

Observa-se da **Figura 5. 1** e da **Figura 5. 2**, que existe uma melhor correlação entre a sensação de doçura percebida pelo painel de provadores no caso do extrato glicosídico obtido a partir de folhas de estévia pré-tratadas com CO₂ pressurizado ($r^2 = 0,99$), enquanto que para o caso dos extratos glicosídicos obtidos da estévia sem pré-tratamento obtém-se $r^2 = 0,92$.

Essa diferença na correlação pode ser justificada pela redução do sabor residual que normalmente encobre o gosto doce dos extratos da estévia. Ele é menos pronunciado no caso do extrato glicosídico obtido da estévia pré-tratada com CO₂ pressurizado, como foi reportado por sete dos nove provadores, o que é válido pois durante o pré-tratamento foram extraídas muitas substâncias que segundo a literatura contribuem para aumentar o sabor residual dos extratos da estévia [Pasquel *et al*, 1999; Tsanava *et al*, 1991; Phillips, 1987 e Kinghorn & Soejarto, 1985].

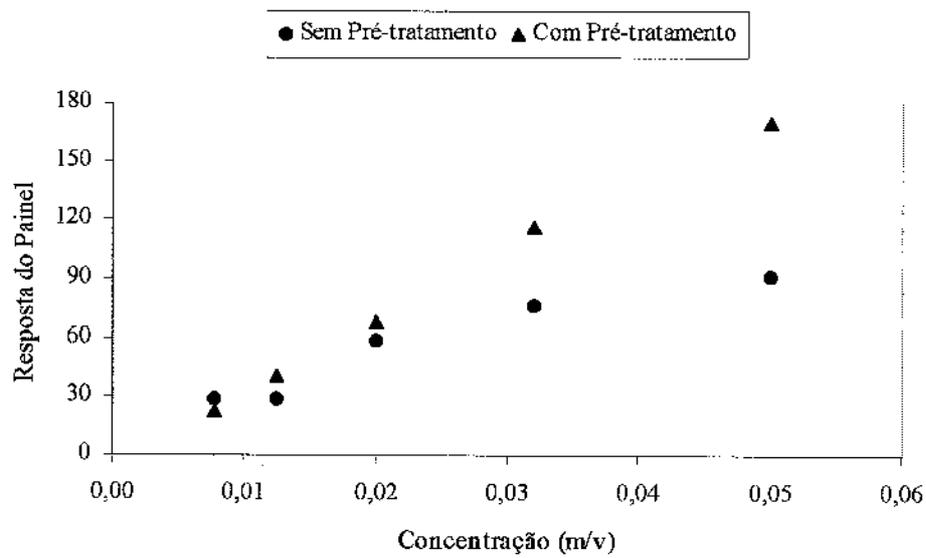


Figura 5. 1: Sensação percebida pelo painel em função da concentração de extrato

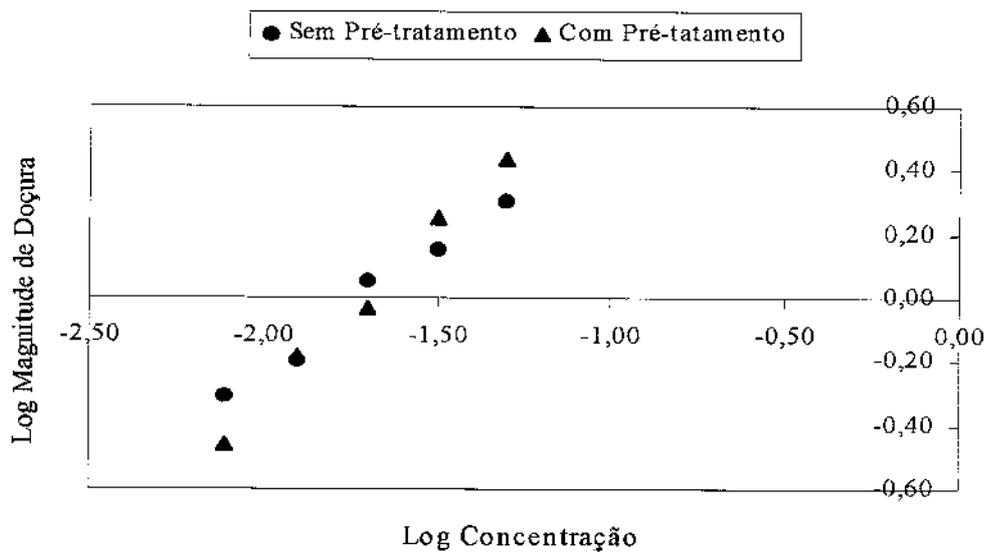


Figura 5. 2: Relação entre intensidade de doçura e concentração do extrato

Essa diferença na correlação porém não significa uma maior potência edulcorante, como se observa na **Tabela 5. 1**.

Tabela 5. 1: Potência edulcorante e concentração equivalente a sacarose 3% dos extratos glicosídicos da estévia

	Concentração Equivalente	Potência Edulcorante
Extrato sem Pré-tratamento	0,0198	151
Extrato com Pré-tratamento	0,0198	151

As potências edulcorantes encontrada nesse trabalho são da mesma ordem dos valores encontrados por Cardello [1996] que utilizou a mesma metodologia de medição.

5.4 Conclusões

Os extratos glicosídicos da estévia são 151 vezes mais doce que a solução de sacarose a 3%, e não existe efeito do pré-tratamento com dióxido pressurizado na potência edulcorante dos extratos.

Sete dos nove provadores do painel mostraram uma maior percepção do sabor residual característico dos extratos glicosídicos da estévia para o caso do produto obtido com matéria prima sem o pré-tratamento com dióxido de carbono pressurizado.

Referências Bibliográficas

- AMERICAM SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Guidelines for the selection and training of sensory panel members**. Philadelphia, 1981
- CARDELLO, H.M.A.B. **Caracterização sensorial de aspartame, ciclamato/sacarina 2:1 e extrato de folhas de estévia (Stevia rebaudiana Bertoni): equivalências em doçura, análise descritiva e análise tempo-intensidade**. Campinas, 1996. 237p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas
- GOTO, A. **Estudo da influência do rebaudiosídeo A na solubilidade do esteviosídeo e análise sensorial dos produtos obtidos**. Maringá, 1997. 83p. Dissertação (Mestre em

Química) – Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá

KINGHORN, D.A.; SOEJARTO, D.D. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In: WAGNER, H.; HIKINO, H.; FARNSWORTH N.R. (Eds.)

Economic and medicinal plant research. Orlando: Academic Press, 1985. Chapter 1, p.1-52

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. In: MEETING ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 6, 1999, Nottingham, United Kingdom. **Proceedings**. Nottingham: International Society for the Advancement of Supercritical Fluids, 1999, p.501-506

PHILLIPS, K.C. Stevia: steps in developing a new sweetener. In: GRENBY, T.H. (Ed.)

Developments in sweeteners 3. New York: Elsevier, 1987. Chapter 1, p.1-43

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.**, v.37, p.71-79, 1983

STONE, H.; OLIVER, S.M. Measurement of the relative sweetness of selected sweeteners and sweetener mixtures. **Journal of Food Science**, v.34, p.215-222, 1969

TSANAVA, V.P.; SARDZHVELADZE, G.P.; KHAREBAVA, L.G. Effect of technological procedures on the composition of volatile substances in *Stevia rebaudiana*. **Subtrop. Kul't**, v.3, p.64-70, 1991. *Apud*: **Chemical Abstracts**, v.116, 116: 82387g

Apêndice 5. 1: Ficha utilizada na seleção dos provadores

Nome:

Data:

Você está recebendo seis soluções aquosas, algumas de gosto doce e algumas de gosto amargo. Inicialmente separe as soluções doces das amargas. Em seguida ordene as soluções doces em ordem crescente de doçura. Finalmente, ordene as soluções amargas em ordem crescente de amargor.

Soluções doces	-----	-----	-----
	- doce		+ doce
Soluções amargas	-----	-----	-----
	- amarga		+ amarga

Apêndice 5. 2: Ficha utilizada para se avaliar a intensidade de doçura de uma amostra

Nome: _____ Data: _____

Prove primeiramente a amostra referência (R), e assinale o valor 100 para a intensidade de doçura dessa amostra. Em seguida avalie a intensidade de doçura de cada amostra codificada em relação à amostra referência (R). Por exemplo, se a amostra codificada for 2 vezes mais doce que a amostra R, dê à amostra codificada o valor 200, se for 2 vezes menos doce, dê o valor 50, e assim por diante.

Amostra	Magnitude
----------------	------------------

R	100
---	-----

.....
.....
.....
.....
.....

Comentários:.....
.....
.....

Apêndice 5. 3: Intensidade de doçura em função da concentração dos extratos

Provadores Seleccionados	Concentração (% m/v)									
	Sem Pré-Tratamento					Com Pré-Tratamento				
	0.0078	0.0125	0.0200	0.0320	0.0500	0.0078	0.0125	0.0200	0.0320	0.0500
	Intensidade de doçura					Intensidade de doçura				
1	10	5	30	40	60	10	20	40	140	200
2	50	50	30	20	50	40	50	50	100	150
3	20	20	10	20	60	10	30	20	50	200
4	1	50	50	200	50	30	50	200	200	300
5	50	25	200	20	50	25	25	50	200	200
6	50	25	33	150	200	25	66	33	90	100
7	10	20	50	100	200	10	50	100	100	150
8	40	50	70	75	80	40	50	70	120	130
9	30	20	50	60	70	20	30	50	50	100
MÉDIA	30	29	60	83	91	20	41	68	117	170

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES GERAIS E RECOMENDAÇÕES

6.1 Conclusões

A percepção sensorial do sabor residual no extrato glicosídico da estévia, obtido por métodos convencionais, é menor quando se utiliza como matéria prima folhas pré-tratadas com dióxido de carbono pressurizado

O pré-tratamento das folhas da estévia com dióxido de carbono pressurizado mostrou-se mais efetivo a 200 bar, 30°C e uma vazão do solvente de aproximadamente 2,9 g/min.

A extração dos glicosídeos a partir de folhas pré-tratadas com CO₂ pressurizado, usando misturas pressurizadas de CO₂/água a 120 bar, 16°C e 3 g/min, apresentou um rendimento mássico de aproximadamente 50% maior, em relação aos extratos obtidos por técnicas de extração convencional.

O extrato glicosídico obtido com a mistura pressurizada de CO₂/água apresentou uma maior concentração relativa de rebaudiosídeo A, o que faz supor que a percepção no sabor residual nesses extratos deve ser muito menor.

A água como co-solvente é a que proporcionou maiores rendimentos mássicos de extrato glicosídico, em todas as condições de pressão e temperatura testados, em relação ao uso de etanol e de misturas dessas duas substâncias.

Na etapa de pré-tratamento das folhas da estévia com CO₂ a 200 bar, 30°C e 2,9 g/min, mais do 63% do extrato foi extraído durante o período de taxa de extração constante, o que mostra a importância desse período no processo e, evidência a abundância dos solutos na parte externa das partículas sólidas, o que pode ser explicado como uma consequência da trituração das folhas antes da extração.

Na mesma linha de raciocínio da abundância dos solutos de fácil extração na superfície das partículas sólidas que conformam o leito, observa-se que a convecção natural é muito importante no processo de pré-tratamento, referida à convecção forçada, como mostra o elevado número da razão Gr/Re^2

Quarenta e dois por cento dos constituintes do extrato obtido durante o pré-tratamento foram identificados usando-se técnicas de cromatografia gasosa e espectrometria de massas.

A fração conhecida de substâncias foi utilizada para estimar-se as principais propriedades do extrato como uma pseudo substância pura, com a finalidade de se estimar a solubilidade e os coeficientes de transferência de massa na fase fluida e na fase sólida.

A modelagem do pré-tratamento usando o modelo de Lack, mostrou que os dados experimentais são melhor representados quando a solubilidade não é ajustada pelo próprio modelo.

6.2 Recomendações para Trabalhos Futuros

Estudar um maior intervalo de pressões e temperaturas durante a etapa do pré-tratamento das folhas da estévia, com dióxido de carbono pressurizado.

Aprofundar as pesquisas de extração dos glicosídeos da estévia, usando água como co-solvente, a partir de folhas pré-tratadas com dióxido de carbono pressurizado.

Estudar o efeito da pressão na estabilidade dos glicosídeos da estévia.