

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

**AVALIAÇÃO DA CLARIFICAÇÃO DE SUBPRODUTO DA EXTRAÇÃO  
DE ESTEVIOSÍDEO POR TROCA IÔNICA**

**AIRTON GOTO**

Orientador: Prof. Dr. **YONG KUN PARK**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia  
de Alimentos da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do Título de Doutor  
em Ciência de Alimentos

**CAMPINAS  
Estado de São Paulo – Brasil  
2004**

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

G712a Goto, Airton  
Avaliação da clarificação de subproduto da extração de esteviosídeo por troca iônica / Airton Goto. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Yong Kun Park  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Stevia rebaudiana. 2.Troca iônica. 3.Clarificação. I.Park, Yong Kun. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

## BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Yong Kun Park  
Orientador

---

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato  
Membro

---

Profa. Dra. Helena Teixeira de Godoy  
Membro

---

Prof. Dr. Edmar Clemente  
Membro

---

Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte  
Membro

---

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar  
Membro

---

Prof. Dr. José Luis Contado  
Membro

Campinas, ..... Setembro de 2004



**À minha esposa, Áurea.  
Aos meus filhos, Denis e Aline.  
Ao meu filho que está chegando.**



## AGRADECIMENTOS

- A DEUS, que sempre me acompanhou em todas minhas realizações.
- Aos meus pais Takeo e Kimico que sempre acreditaram em mim, permitindo que eu estudasse, mesmo nos momentos mais difíceis de suas vidas, e aos meus irmãos Meiry, Laura e Jorge.
- Ao professor Dr. Yong Kun Park, pela orientação deste trabalho.
- Aos diretores da Steviafarma Industrial S/A, em especial a Helena Meneguetti Hizo e Fernando Meneguetti, pelo apoio financeiro, pela confiança depositada, e pelos equipamentos disponibilizados.
- Ao técnico de laboratório Anderson Carvalho e a química Patrícia Valderrama, que muito me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, tanto na construção do piloto, quanto na coleta de dados.
- A professora Dr<sup>a</sup>. Hélia Harumi Sato, pela valorosa colaboração, contribuição e incentivo na realização deste trabalho.
- Aos professores Dr. Masaharu Ikegaki e Dr. José Luís Contado, pela grande ajuda durante a realização deste trabalho, pelo companheirismo, e também quando cheguei em Campinas.
- Ao professor Dr. Severino Matias, que me incentivou a apresentar este trabalho.
- Aos amigos da pós-graduação, em especial a Luciana Liboni, Cláudio Lima de Aguiar, Wilma Spinosa, Julio Paredes Gusmán pela amizade e bons momentos que compartilhamos no curso.
- Aos colegas do laboratório de bioquímica de alimentos, em especial a técnica Beatriz Mello, pela sua simpatia e disposição em ajudar.
- Aos professores do curso, funcionários e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xv
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xix
<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	xxi
<b>RESUMO</b> .....	xxiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xxv
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2.OBJETIVO DO ESTUDO</b> .....	3
<b>3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
3.1.EDULCORANTES .....	5
3.2.EDULCORANTES SINTÉTICOS .....	6
3.2.1.Aspartame .....	6
3.2.2.Sacarina .....	8
3.2.3.Ciclamato .....	10
3.2.4.Acesulfame K .....	11
3.2.5.Sucralose .....	12
3.3.EDULCORANTES DA ESTÉVIA .....	14
3.3.1.Esteviosídeo .....	14
3.3.1.1.Histórico .....	14
3.3.1.2.Aspectos botânicos .....	16
3.3.1.3.Aspectos químicos .....	21
3.3.1.4.Aspectos toxicológicos .....	29
3.3.1.4.1.Metabolismo .....	29
3.3.1.4.2.Estudos mutagênicos e carcinogenicidade .....	30
3.3.1.4.3.Toxicidade aguda .....	31
3.3.1.4.4.Toxicidade subaguda e toxicidade crônica .....	31

3.3.1.4.5.Fertilidade e teratogenicidade .....	32
3.3.1.4.6.Biodisponibilidade de nutrientes .....	33
3.3.1.4.7.Influência do consumo de esteviosídeo em grupos de população especial .....	35
3.3.1.4.8.Significâncias nutricionais, microbiológicos, toxicológicos e alergênicos .....	36
3.3.1.4.9.Propriedade anticariogênica do esteviosídeo .....	36
3.3.1.4.10.Propriedades adicionais .....	37
3.3.1.5.Aspectos organolépticos .....	37
3.3.1.6.Aspectos analíticos .....	39
3.3.1.6.1.Análise quantitativa dos princípios adoçantes por cromatografia gás-líquido .....	39
3.3.1.6.2.Análise quantitativa dos adoçantes por cromatografia líquida de alta eficiência .....	40
3.3.1.6.3.Determinação de esteviosídeo pelo método de espectrometria de reflectância no infravermelho próximo .....	44
3.3.1.7.Processos de purificação .....	44
3.4.TROCA IÔNICA .....	50
3.4.1.Resina catiônica de ácido forte .....	57
3.4.2.Resina catiônica de ácido fraco .....	57
3.4.3.Resina aniônica de base forte .....	61
3.4.4.Resina aniônica de base fraca .....	61
3.4.5.Sistemas de troca em batelada e em coluna .....	63
3.4.6.Equipamentos de troca iônica e operações .....	65
3.4.7.Procedimento de regeneração .....	66
3.4.8.Regeneração concorrente e regeneração contracorrente .....	67
3.4.9.Reutilização do regenerante .....	68
3.4.10.Desinfecção das resinas .....	71
3.4.11.Problemas operacionais de origem mecânica .....	72

3.4.11.1.Retro-lavagem imprópria .....	72
3.4.11.2.Regenerante insuficiente .....	73
3.4.11.3.Vazão inadequada .....	73
3.4.11.4.Presença de sólidos suspensos da alimentação .....	73
3.4.11.5.Regenerante contaminado .....	74
3.4.12.Redução no desempenho da resina .....	74
3.4.12.1.Perda de capacidade .....	74
3.4.12.2.Perda na integridade física .....	74
3.4.12.3.Perda na densidade da resina .....	75
3.4.13.Fatores que afetam a estabilidade da resina .....	75
3.4.13.1.Temperatura .....	76
3.4.13.2.Oxidação .....	77
3.4.13.3.Entupimento .....	77
3.4.13.4.Choque osmótico .....	78
3.4.13.5.Atrito mecânico .....	79
3.4.13.6.Radiação .....	80
3.5.ADSORÇÃO .....	80
3.6.PROCEDIMENTO INDUSTRIAL DE OBTENÇÃO DO CAMELO .....	83
<b>4.MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	85
4.1.MATERIAIS .....	85
4.1.1.Caramelo .....	85
4.1.2.Colunas de troca iônica .....	85
4.1.3.Reagentes .....	87
4.1.4.Equipamentos .....	88
4.2.METODOLOGIA DE CLARIFICAÇÃO .....	89
4.2.1.Teste de clarificação da solução de caramelo com resinas de troca iônica em sistema de batelada .....	89
4.2.1.1.Preparação da solução de caramelo .....	90

4.2.1.2.Regeneração das resinas para utilização em sistema batelada .....	90
4.2.1.3.Clarificação da solução de caramelo com resinas de troca iônica.....	90
4.2.1.4.Efeito da concentração da solução de caramelo na clarificação utilizando-se a mistura de resinas de troca iônica selecionada .....	91
4.2.1.5.Teste de saturação das resinas .....	92
4.2.1.6.Teste de clarificação máxima da solução de caramelo com mistura das resinas de troca iônica .....	92
4.2.2.Testes de clarificação da solução de caramelo em colunas de troca iônica .....	93
4.2.2.1.Preparação da coluna .....	93
4.2.2.2.Regeneração das resinas .....	95
4.2.2.3.Preparação da solução de caramelo .....	97
4.2.2.4.Efeito da vazão na clarificação da solução de caramelo em colunas de troca iônica .....	98
4.2.2.5.Efeito da concentração da solução de caramelo na clarificação em colunas de troca iônica .....	98
4.2.2.6.Curva de ruptura e ponto de exaustão .....	99
4.2.2.7.Teste da vida útil das resinas .....	100
4.2.2.8.Desinfecção das Resinas .....	102
4.3.METODOLOGIA ANALÍTICA .....	104
4.3.1.Avaliação da Clarificação .....	104
4.3.2.Determinação dos Princípios Adoçantes no Caramelo .....	104
<b>5.RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	107
5.1.CARACTERÍSTICAS DO CAMELO .....	107
5.1.1.Conteúdo de esteviosídeo e rebaudiosídeo A no caramelo .....	107
5.1.2.Avaliação dos comprimentos de onda de absorção da solução de caramelo .....	111
5.2.TESTES DE CLARIFICAÇÃO DA SOLUÇÃO DE CAMELO EM BATELADA .....	115

5.2.1. Clarificação da solução de caramelo com resinas de troca iônica .....	115
5.2.1.1. Clarificação da solução 9% de caramelo com a mistura de resinas RA (Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na) .....	115
5.2.1.2. Clarificação da solução 9% de caramelo com a mistura de resinas RB (Amberlite IRA-96-SB e Amberlite IRC-50) .....	121
5.2.1.3. Clarificação da solução 9% de caramelo com a mistura de resinas RC (Amberlite 958-Cl e Amberlite 252-Na) .....	124
5.2.1.4. Clarificação da solução 9% de caramelo com a mistura de resinas RD (Amberlite 958-Cl e Amberlite IRC 50) .....	127
5.2.2. Efeito da concentração da solução de caramelo na clarificação em batelada .....	131
5.2.3. Teste de saturação das resinas .....	135
5.3. TESTES DE CLARIFICAÇÃO DA SOLUÇÃO DE CAMELO EM COLUNAS DE TROCA IÔNICA .....	137
5.3.1. Efeito da vazão na clarificação da solução de caramelo em coluna de troca iônica .....	139
5.3.1.1. Testes de clarificação da solução 9% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na ligadas em série utilizando vazões de 40 e 30 volumes-leito/h .....	139
5.3.1.2. Testes de clarificação da solução 9% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na ligadas em série utilizando vazão de 10 volumes-leito/h .....	141
5.3.1.3. Testes de clarificação da solução de 9% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na ligadas em série utilizando-se 5 volumes-leito/h .....	147
5.3.2. Influência da concentração de caramelo na clarificação em colunas de troca iônica .....	159
5.3.2.1. Clarificação da solução 11% de caramelo .....	159
5.3.2.2. Clarificação da solução 13% de caramelo .....	163

5.3.2.3. Clarificação da solução 15% de caramelo .....	165
5.3.3. Curva de ruptura e ponto de exaustão .....	169
5.3.4. Teste de vida útil das resinas .....	175
5.3.5. Desinfecção das resinas .....	191
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>193</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>195</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>197</b>
<b>Anexo I .....</b>	<b>215</b>
<b>Anexo II .....</b>	<b>217</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Estrutura química do Aspartame .....	7
<b>Figura 2:</b>	Estrutura química da Sacarina .....	9
<b>Figura 3:</b>	Estrutura química do Ciclamato .....	10
<b>Figura 4:</b>	Estrutura química do Acesulfame K .....	12
<b>Figura 5:</b>	Estrutura química da Sucralose .....	13
<b>Figura 6:</b>	<i>Stevia rebaudiana</i> (Bert) Bertoni .....	19
<b>Figura 7:</b>	Estrutura química do Esteviosídeo .....	23
<b>Figura 8:</b>	Estrutura química do Rebaudiosídeo A. ....	23
<b>Figura 9:</b>	Estrutura dos glicosídeos adoçantes existentes nas folhas de estévia .....	27
<b>Figura 10:</b>	Estrutura da resina orgânica estireno em ligação cruzada com divinilbenzeno .....	55
<b>Figura 11:</b>	Capacidade de troca das resinas catiônica de ácido fraco e aniônica de base fraca em função do pH da solução .....	59
<b>Figura 12:</b>	Esquema operacional de uma coluna de troca iônica .....	63
<b>Figura 13:</b>	Efeito da reutilização de ácido na regeneração sobre a eficiência química .....	69
<b>Figura 14:</b>	Sistema de colunas de troca iônica utilizada para clarificação da solução de caramelo .....	95
<b>Figura 15:</b>	Placa de Petri contendo amostra do caramelo em pó, conforme é retirado do processo .....	107
<b>Figura 16:</b>	Tubo contendo solução de caramelo a 9% de sólidos dissolvidos totais .....	111
<b>Figura 17:</b>	Perfil de absorvância da solução 0,5% de caramelo na faixa de 400 a 900 nm .....	113

<b>Figura 18:</b> Clarificação da solução 9% de caramelo utilizando diferentes quantidades da resina RA (Amberlite IRA-96-SB (50%) + Amberlite 252-Na (50%)) .....	117
<b>Figura 19:</b> Clarificação da solução 9% de caramelo utilizando diferentes quantidades da resina RB (Amberlite IRA-96-SB (50%) + Amberlite-IRC-50 (50%)) .....	121
<b>Figura 20:</b> Clarificação da solução 9% de caramelo utilizando diferentes quantidades da mistura de resinas RC (Amberlite 958-Cl (50%) e Amberlite 252-Na (50%)) .....	125
<b>Figura 21:</b> Clarificação da solução 9% de caramelo utilizando-se diferentes quantidades da mistura de resinas RD (Amberlite 958-Cl e Amberlite IRC-50) .....	129
<b>Figura 22:</b> Clarificação da solução de caramelo nas concentrações de 9%, 11%, 13% e 15% utilizando-se a mistura de resina RA (Amberlite IRA-96-SB (50%) e Amberlite 252-Na (50%)) .....	133
<b>Figura 23:</b> Clarificação da solução de caramelo 9%, com resinas RA (Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na) por cinco ciclos ...	137
<b>Figura 24:</b> Clarificação de solução 9% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se uma vazão de 10 volumes-leito/h (40 L/h), avaliada pela medida de absorvância nos comprimentos de onda 420 nm e 670 nm .....	145
<b>Figura 25:</b> Clarificação de solução 9% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se uma vazão de 5 volumes-leito/h (20 L/h), avaliada pela medida de absorvância nos comprimentos de onda 420 nm e 670 nm .....	149

<b>Figura 26:</b> Perfil de absorção na faixa de 350 nm a 900 nm antes tratamento em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se uma vazão de 5 volumes-leito/h .....	153
<b>Figura 27:</b> Perfil de absorção na faixa de 350 nm a 900 nm, da amostra de solução 9% de caramelo retirada das colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, após 180 minutos, utilizando-se uma vazão de 5 volumes leito/h .....	155
<b>Figura 28:</b> Solução 9% de caramelo após clarificação em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na ligadas em série .....	157
<b>Figura 29:</b> Produto obtido após secagem da solução clarificada de caramelo, em secador tipo spray .....	157
<b>Figura 30:</b> Clarificação de solução 9% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se uma vazão de 5 volumes-leito/h (20 L/h), avaliada pela medida de absorvância nos comprimentos de onda 420 nm e 670 nm .....	161
<b>Figura 31:</b> Clarificação de solução 13% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se uma vazão de 5 volumes-leito/h (20 L/h), avaliada pela medida de absorvância nos comprimentos de onda 420 nm e 670 nm .....	165
<b>Figura 32:</b> Clarificação de solução 15% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se uma vazão de 5 volumes-leito/h (20 L/h), avaliada pela medida de absorvância nos comprimentos de onda 420 nm e 670 nm .....	167
<b>Figura 33</b> Curva do ponto de ruptura e ponto de exaustão para solução de caramelo 9% .....	171

<b>Figura 34:</b> Curva do ponto de ruptura e ponto de exaustão alimentado inicialmente com solução de caramelo 9%, pré-clarificada .....	173
<b>Figura 35:</b> Quantidade de volumes-leito clarificado entre 1 <sup>o</sup> e 30 <sup>o</sup> ciclos de regeneração .....	177
<b>Figura 36:</b> Quantidade de volumes-leito clarificado entre 31 <sup>o</sup> e 60 <sup>o</sup> ciclos de regeneração .....	179
<b>Figura 37:</b> Quantidade de volumes-leito clarificado entre 61 <sup>o</sup> e 200 <sup>o</sup> ciclos de regeneração .....	181
<b>Figura 38:</b> Resultados das análises das soluções de caramelo clarificados entre o 1 <sup>o</sup> e 30 <sup>o</sup> ciclos de regeneração .....	185
<b>Figura 39:</b> Resultados das análises das soluções de caramelo clarificados entre o 31 <sup>o</sup> e 60 <sup>o</sup> ciclos de regeneração .....	185
<b>Figura 40</b> Resultados das análises das soluções de caramelo clarificado entre os 61 <sup>o</sup> e 200 <sup>o</sup> ciclos de regeneração .....	187
<b>Figura 41:</b> Cromatograma de uma solução de caramelo clarificada .....	189
<b>Figura 42:</b> Cromatograma do Esteviosídeo padrão .....	189

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Propriedades da resina catiônica de ácido forte Amberlite 252-Na .....	86
<b>Tabela 2:</b>	Propriedades da resina aniônica de base fraca Amberlite IRA 96-SB .....	87
<b>Tabela 3:</b>	Composição das resinas mistas .....	91
<b>Tabela 4:</b>	Esquema para regeneração da resina catiônica forte – Amberlite 252-Na .....	97
<b>Tabela 5:</b>	Esquema para regeneração da resina aniônica fraca – Amberlite 96-SB .....	97
<b>Tabela 6:</b>	Composição do caramelo utilizado no experimento .....	109
<b>Tabela 7:</b>	Teor de sólidos solúveis, adoçantes totais e pureza das amostras de solução 9% após tratamento com diferentes quantidades da mistura de resinas RA (Amberlite IRA 96-SB (50%) + Amberlite 252-Na (50%)) .....	119
<b>Tabela 8:</b>	Teor de sólidos solúveis, adoçantes totais e pureza, após tratamento das amostras de solução 9% de caramelo com diferentes quantidades da mistura de resina RB (Amberlite IRA-96-SB (50%) e Amberlite 252-Na (50%)) .....	123
<b>Tabela 9:</b>	Teor de sólidos solúveis, adoçantes totais e pureza após tratamento das amostras de solução 9% de caramelo com diferentes quantidades da mistura de resina RC (Amberlite 958-Cl (50%) e Amberlite IRC-50 (50%)) .....	127
<b>Tabela 10:</b>	Teor de sólidos solúveis, adoçantes totais e pureza após tratamento das amostras de solução 9% de caramelo com diferentes quantidades da mistura de resinas RD (Amberlite 958-Cl e Amberlite IRC-50) .....	131

<b>Tabela 11:</b> Clarificação da solução de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se vazão de 40 volumes-leito/h (160 L/h) e 30 volumes-leito/h (120L/h) .....	139
<b>Tabela 12:</b> Clarificação da solução de caramelo 9%, em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na ligadas em série utilizando-se uma vazão de 10 volumes-leito/h (40 L/h).....	143
<b>Tabela 13:</b> Clarificação da solução de caramelo 9%, em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se uma vazão de 5 volumes-leito/h (20 L/h).....	147

## LISTA DE ABREVIACÕES

<b>BV</b>	Volumes-leito
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>Conc.</b>	Concentração
<b>DI</b>	Diâmetro Interno
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose Letal
<b>EC</b>	<i>E. coli</i>
<b>ERIP</b>	Espectrometria de Reflectância no Infravermelho Próximo
<b>Eq/L</b>	Equivalente por Litro
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>°GL</b>	Graus Gay-Lussac
<b>GLC</b>	Cromatografia Gás-Líquido
<b>GRAS</b>	Generally Recognize as Safe
<b>g/Kg</b>	Grama/Quilo de Peso Corpóreo
<b>IDA</b>	Ingestão Diária Aceitável
<b>In</b>	Polegada
<b>JECFA</b>	Join FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
<b>K</b>	Seletividade
<b>L</b>	Litro
<b>mg/Kg</b>	Miligrama/Quilo de Peso Corpóreo
<b>NMP</b>	Número mais provável
<b>NOEL</b>	No effect level
<b>PKU</b>	Fenilcetonúria
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>p/p</b>	%Peso/%peso
<b>PTFE</b>	Hydrophobic Fluoropore Membrane
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UV-VIS</b>	Ultravioleta-Visível
<b>ZTM</b>	Zona de Transferência de Massa



## RESUMO

O esteviosídeo e rebaudiosídeo A são os principais edulcorantes da planta estévia (*Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni). Esses glicosídeos são utilizados como edulcorante alimentício em muitos países do mundo. O esteviosídeo tem sabor doce intenso seguido de amargo residual, enquanto o rebaudiosídeo A tem sabor doce, porém não apresenta sabor amargo residual.

Este trabalho teve o objetivo de recuperar os compostos adoçantes do caramelo, um subproduto industrial do processo de extração de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, através de tratamento em resinas de troca iônica. Foram estudadas combinações de diferentes resinas de troca iônica, efeito da quantidade da mistura de resinas, concentração de caramelo no processo em batelada e posteriormente a clarificação de caramelo utilizando um conjunto de colunas contínuas em escala piloto.

Os melhores resultados de clarificação do caramelo foram obtidos através do tratamento do caramelo em coluna de troca iônica de ácido forte Amberlite 2520Na e coluna de troca aniônica de base fraca IRA-96-SB, ligadas em série, utilizando-se solução 9% de caramelo e vazão igual a 5 volumes-leito/h. Foi obtido clarificação do caramelo superior a 90% sem perda significativa dos compostos adoçantes.

O volume de solução de caramelo tratado nas colunas foi superior a 200 ciclos de regeneração, sendo que no final houve uma perda de 5 das resinas e de 9% da eficiência das resinas.



## ABSTRACTS

Stevioside and rebaudioside A are the principals sweeteners of the stevia plant (*stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni). These glycosides are used as food sweeteners in many countries over the world. The stevioside has an intense sweet flavor followed by a residual bitterness, while the rebaudioside A has a sweet flavor, however without the residual bitterness.

This work intends to show a way to recuperate the sweeteners of the caramel, an industrial by-product from the stevioside and rebaudioside A's extraction process, through the treatment in ion exchange resins. Many aspects were studied, including different combinations of ion exchange resins, the effect of the quantity of the resins mixture, the effect of the caramel concentration in the batch process and the caramel clarification in a pilot scale.

The best results in caramel clarification were obtained when a solution of 9% of caramel was treated with a strong acid ionic exchange resin Amberlite 252-Na and a weak base ionic exchange resin IRA-96-SB, which were used in columns and linked in serial. It was obtained 90% of clarification without a significant loss of the sweeteners when it was used flow rate of five bed-volume/hours.

The volume of caramel solution treated in the columns was higher than 200 cycles of regeneration. In the end, 5% of the resins and 9% of the resins efficiency were lost.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, o conceito de saúde tem sido mudado e a introdução de novos aditivos alimentícios tem modificado os hábitos alimentares do homem, que cada vez mais procura melhorar a sua qualidade de vida. Seja por problemas estéticos ou de saúde, o homem está substituindo o conhecido e consagrado açúcar (sacarose) por produtos conhecidos como edulcorantes, compostos com sabor semelhante à sacarose, porém de baixo valor calórico ou completamente sem calorias (ANGELUCCI, 1989).

Dentre os edulcorantes, destacam-se o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A, principais glicosídeos diterpênicos extraídos de uma planta conhecida como *Stevia rebaudiana* (Bert.) *Bertoni*, ou simplesmente estévia. A propriedade edulcorante da estévia já era conhecida pelos índios Guaranis, que usavam para edulcorar chás e bebidas medicamentosas (SAMANIEGO, 1946).

Os glicosídeos retirados da estévia são utilizados como edulcorante alimentício em muitos países do mundo. Desde 1970, o esteviosídeo é utilizado no Japão como agente edulcorante e em bebidas, dominando hoje cerca de 40% deste mercado, com um consumo acima de 200 toneladas anuais.

No Brasil, os glicosídeos da estévia foram aprovados em meados de 1987 como agentes flavorizante e edulcorante em várias classes de alimentos e nos Estados Unidos em 1996 para ser utilizado como ingrediente para suplemento dietético.

O esteviosídeo é o glicosídeo presente em maior quantidade nas folhas de estévia, tem sabor doce intenso, seguido de um amargo residual (*aftertaste*). Em seguida tem-se o rebaudiosídeo A, que é igualmente doce, entretanto não apresenta o sabor amargo residual. Estes glicosídeos são totalmente estáveis na faixa de pH 3 a 11 e ao calor, o que os tornam interessantes sob o ponto de vista da indústria alimentícia (GOTO & CLEMENTE, 1998).

A Steviafarma Industrial S.A., única empresa brasileira a fazer extração de esteviosídeo, utiliza em seu processo a cristalização. Este processo gera um subproduto, com quantidades significativas de esteviosídeo e principalmente rebaudiosídeo A. Este subproduto denominado de caramelo consiste de um pó com uma coloração marrom-esverdeada e sabor doce agradável, porém com forte aroma de erva.

## **2. OBJETIVOS DO ESTUDO**

Tendo em vista que a geração de caramelo, durante a produção de esteviosídeo, é da ordem de 15% do produto final e possui sabor extremamente agradável, torna-se altamente vantajoso a sua recuperação.

Este trabalho teve por objetivo estudar a clarificação e purificação de soluções aquosas de caramelo para obtenção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, por meio da utilização de resinas de troca iônica, avaliando-se os seguintes parâmetros:

- Escolha do conjunto de resinas apropriadas para a clarificação;
- Eficiência do processo;
- Metodologia de regeneração;
- Tempo de vida útil do conjunto de resinas.



### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. EDULCORANTES**

Os edulcorantes ou adoçantes são produtos capazes de adoçar um alimento em substituição ao açúcar naturalmente presente ou adicionado a esse alimento.

Edulcorantes, segundo a Resolução MERCOSUL/GMC nº. 83/93, são substâncias diferentes dos açúcares que conferem sabor doce ao alimento.

ANGELUCCI (1990) propôs as seguintes definições: edulcorantes são substâncias com sabor extremamente doce, não necessariamente açúcares ou polióis, embora possa contê-los como parte integrante de suas moléculas, não necessariamente energéticas, com poder edulcorante muito superior à sacarose.

CANDIDO & CAMPOS (1996) enumera as seguintes características para um edulcorante ser considerado ideal: poder edulcorante igual ou superior ao da sacarose; disponibilidade comercial; custo comparável ao da sacarose (baixo custo/unidade de doçura); compatibilidade química com aditivos, como aromatizantes e corantes; inertes aos demais componentes dos alimentos; incolor; inodoro; fácil solubilidade; estabilidade química e térmica; isento de toxicidade; normalmente metabolizado, ou resistente à digestão; apresentar valor calórico reduzido (<2 Kcal/g) ou ser isento de calorias; não promover diarreia osmótica; não promover cáries; permitir níveis irrestritos de utilização; proporcionar qualidades funcionais.

Tem sido propostas várias classificações para edulcorantes e adoçantes, baseadas em sua origem e valor calórico. A Comunidade Econômica Européia e o Codex Alimentarius classificaram os substitutos do açúcar em dois grupos: edulcorantes intensos, que fornecem somente doçura acentuada, não desempenham nenhuma outra função tecnológica no produto final, são pouco calóricos ou efetivamente não calóricos e são utilizados em quantidades muito pequenas; e adoçantes de corpo, que fornecem energia e textura aos alimentos. Geralmente contém o mesmo valor calórico do açúcar e são utilizados em quantidades maiores (CANDIDO & CAMPOS, 1996).

Existe um grande número de compostos capazes de produzir o sabor doce, entretanto, só alguns entre os naturais e sintéticos são permitidos em alimentos (MIOTTO, 2002).

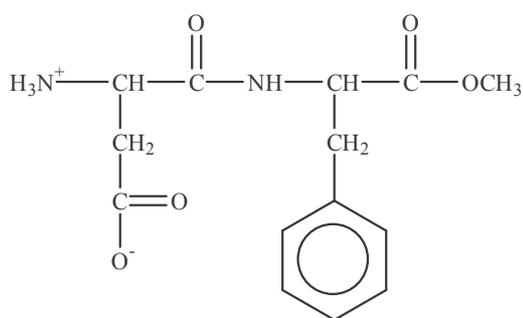
No Brasil são comercializados diversos edulcorantes intensos, porém o único de origem natural são os glicosídeos retirados da estévia.

## **3.2. EDULCORANTES SINTÉTICOS**

### **3.2.1. Aspartame**

O aspartame (Figura 1) foi descoberto acidentalmente. Nos anos 60, um dos projetos da G.D. Searle and Company, era encontrar um inibidor para gastrina, produto utilizado no tratamento da úlcera. O tetrapeptídeo terminal da gastrina foi empregado como padrão para o ensaio biológico e o aspartame foi o intermediário

na síntese. Em 1965, o pesquisador James M. Schlatter aquecia o aspartame em um frasco contendo metanol, contaminou suas mãos com a mistura. Minutos após, levando o dedo à boca para folhear um livro sentiu um sabor extremamente doce (CANDIDO & CAMPOS, 1996). O aspartame tem um gosto pronunciadamente doce, sendo aproximadamente 180 vezes mais doce do que a sacarose em solução aquosa (MAZUR, 1984).



**Figura 1:** Estrutura química do Aspartame (Metil éster do L-aspartil-L-fenilalanina) (CANDIDO & CAMPOS, 1996).

Pesquisas subseqüentes mostraram que muitas  $\alpha$ -amidas do ácido aspártico são também muito doces. Este dipeptídeo é mais aceitável e relativamente mais doce em concentrações baixas do que em concentrações elevadas. É estável na forma líquida até o pH 3, mas é instável com variações extremas de pH. Esta instabilidade se manifesta através de uma perda da doçura durante o armazenamento. Temperaturas prolongadas de cozimento, como as encontradas em frituras e assados, podem causar uma degradação significativa do aspartame em dicetopiperazina com uma perda conseqüente de doçura. Por esta razão a "Food and

Drug Administration (FDA)" requer que o rótulo do produto especifique que o aspartame não deve ser usado para cozinhar ou assar.

Uma preocupação em torno da segurança de uso do aspartame diz respeito ao seu conteúdo de fenilalanina e de aspartato.

A fenilcetonúria (PKU) é um defeito genético do metabolismo da fenilalanina que ocorre um em cada 10.000 nascimentos. Em pessoas com PKU, se os níveis de fenilalanina não são cuidadosamente mantidos abaixo de aproximadamente 12 mg/100 mL de sangue durante a gravidez e desenvolvimento, o risco de anomalias fetais e retardo mental é elevado. É exigida a rotulação clara do aspartame para indicar que contém fenilalanina e que a ingestão é limitada para indivíduos com PKU. Similarmente, quaisquer produtos alimentícios contendo aspartame teriam que ser assim rotulados.

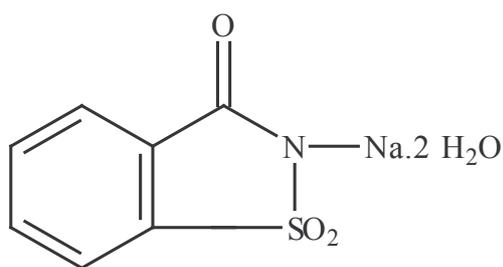
A "Food and Drug Administration" (FDA) aprovou o aspartame em 1981, para uso como um substituto do açúcar de mesa, como comprimido adoçante, ou como um aditivo em cereais, misturas de bebidas, café e chás instantâneos, gelatinas, pudins, recheios, laticínios e coberturas.

A Ingestão Diária Aceitável (IDA) aprovada para o aspartame foi de 40 mg/kg conforme *EEC Report for food on sweeteners* (1984).

### **3.2.2. Sacarina**

Descoberta acidentalmente por Remsen e Fawberg em 1879, a sacarina foi considerada, até recentemente, a substância mais doce conhecida.

A sacarina (Figura 2) é uma O-sulfobenzimidida de fórmula geral  $C_7H_5NO_3S$  é um composto aromático usado principalmente na forma de sal de sódio.



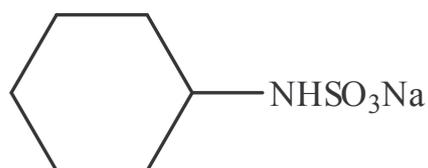
**Figura 2:** Estrutura química da Sacarina (1,2-benzisotiazol-3(2H)-um 1,1-dióxido) (CANDIDO & CAMPOS, 1996).

Em um excesso de concentração (0,1%), tende a ter gosto amargo. A sacarina é farmacologicamente inerte e efeitos desagradáveis são muito raros. Casos de fotossensibilização e reações alérgicas como urticária já foram relatados (MILLER et al., 1974).

Em 1984, após cuidadosa revisão, o Comitê Científico para Alimentos, aprovou o uso da sacarina (EEC-Report for food on sweeteners, 1984). Também em 1984, o JECFA estabeleceu para a sacarina a IDA provisória de 2,5 mg/Kg. Em 1993 este valor foi elevado para 5 mg/Kg. Em 1959, quando foi reconhecido como GRAS, a IDA era de 500 mg para crianças e 1000 mg para adultos (CANDIDO & CAMPOS, 1997).

### 3.2.3. Ciclamato (ciclohexilsulfamato)

A doçura do ciclamato de sódio (Figura 3) foi descoberta acidentalmente por Michael Sveda na Universidade de Illinois, quando ele ficou curioso a respeito do gosto de um cigarro que ele tinha colocado em cima de algumas substâncias químicas em um banco de laboratório. É denominado ácido ciclohexilsulfâmico, podendo existir sob quatro formas químicas: Ácido ciclâmico, ciclamato de cálcio, de sódio e de potássio. O sal sódico é o mais utilizado, embora o sal de cálcio possa ser utilizado em dietas hipossódicas. O ciclamato é cerca de 30 vezes mais doce que a sacarose, têm gosto doce, seguido de amargo, é livremente solúvel em água.



**Figura 3:** Estrutura química do Ciclamato (Ciclohexilsulfamato de sódio)  
(CANDIDO & CAMPOS, 1996).

Tem havido relatos da excreção de cicloexilamina na urina, após a administração oral de ciclamato. Parece que o ciclamato é transformado em ciclohexilamina, pela flora do trato gastrointestinal baixo, por cerca de 25% dos seres humanos, quando ingerido oralmente. A maior preocupação surge da observação de que, quando ratos foram injetados com ciclohexilamina, houve uma relação direta

entre concentração da dose e a percentagem de células espermatozóides e da medula óssea exibindo quebras cromossômicas (LEGATOR et al., 1969). Este tipo de anormalidade cromossômica pode ter um significado potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico.

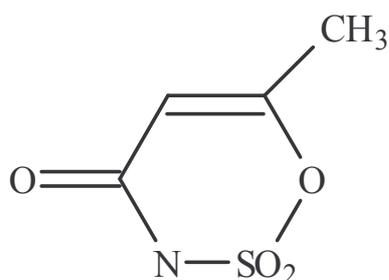
Os ciclamatos podem ainda induzir quebras cromossômicas tanto em leucócitos como em cultura de células em mono camadas da pele humana e células cancerosas *in vitro*. A demonstração de danos citogenéticos às células germinativas e somáticas é evidência de um provável risco genético (EPSTAIN et al, 1969).

Em outubro de 1969, o Secretário de Saúde, Educação e Bem-Estar (NEW-EUA) banuiu o uso dos ciclamatos em bebidas e alimentos, a partir de janeiro de 1970, nos Estados Unidos (U.S. Congress report, 1970). Os ciclamatos foram retirados da lista GRAS. Em agosto de 1970, a venda de todo ciclamato foi proibida nos Estados Unidos. Em razão das questões não resolvidas quanto ao risco do ciclamato e sacarina produzirem câncer em seres humanos, a FDA tem mantido a proibição desde 1969 para os ciclamatos.

#### **3.2.4. Acesulfame K**

O acesulfame K (Figura 4) foi descoberto por Karl Clauss e H. Jensen, da Companhia Hoechst, em 1967, na Alemanha, de forma acidental quando os pesquisadores trabalhavam no desenvolvimento de novos produtos e descobriram um composto de gosto doce, não sintetizado anteriormente (CANDIDO & CAMPOS, 1996).

O acesulfame K é um sal de potássio do 3,4-diidro-6-metil-1,2,3-oxiatiazina-4-um-2,2-dióxido, o qual é um derivado do ácido acetoacético.



**Figura 4:** Estrutura química do Acesulfame K (CANDIDO & CAMPOS, 1996).

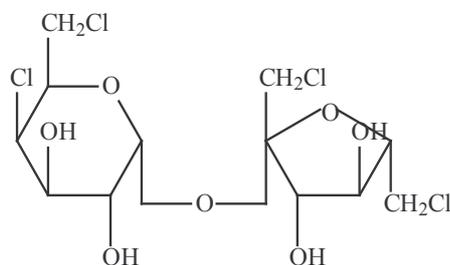
As propriedades sensoriais do acesulfame K são similares aos da sacarina. O poder edulcorante é cerca de 130 vezes o da sacarose a 4% (CROSBY E WINGARD, 1979). A Hoechst A.G. (Frankfurt, Alemanha Ocidental) trabalhou nos processos de aplicação deste adoçante e relataram que as avaliações toxicológicas do acesulfame K foram concluídas com sucesso. O acesulfame K foi, portanto reconhecido pela EEC com uma IDA de nove mg/kg. Foi reconhecido nos Estados Unidos, no Japão, no Brasil e outros Países. (INGLETT, 1984).

### 3.2.5. Sucralose

A sucralose (Figura 5) foi desenvolvida em 1976 por pesquisadores da Tate & Lyle Specialty Sweeteners (Inglaterra), e pelo grupo do professor Hough, do

Queen Elizabeth College, agora parte do King's College, na Universidade de Londres. Existem relatos de que o sabor doce da sucralose foi descoberto quando um estudante não entendeu corretamente uma solicitação e verificou que o composto era doce.

Entre os 1943 derivados teoricamente possíveis, o 1,6-dicloro-1,6-dideoxi  $\beta$ -D-frutofuranosil, 4 cloro-4-deoxi- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo foi denominado sucralose. A nomenclatura química é às vezes abreviada para 4,1',6'-triclora-4,1',6'-trideoxi-galacto-sacarose ou TGS. O termo galactosacarose representa um derivado da sacarose que sofreu inversão da configuração na posição 4-, convertendo o anel glicopiranosil em uma unidade galactopiranosil.



**Figura 5:** Estrutura química da Sucralose (CÂNDIDO & CAMPOS, 1996).

A sucralose é 600 vezes mais doce que a sacarose. Os valores de doçura são altamente dependentes do sistema (pH, temperatura, concentração) e podem variar em diferentes produtos alimentícios ou bebidas.

É um edulcorante não calórico, pois suas ligações carbono-cloro são estáveis e não são hidrolisadas durante a digestão ou metabolismo, sendo rápida e totalmente excretada nas fezes. Pode ser ingerido por diabéticos.

Durante quinze anos foram realizados mais de 140 estudos para demonstrar a segurança da sucralose. As conclusões obtidas dos estudos foram de que a sucralose não gera efeitos teratogênicos ou mutagênicos, não apresentando toxicidade na reprodução e ao feto. Administrado em crianças não causa riscos à saúde, nem interfere no nível normal de crescimento (CÂNDIDO & CAMPOS, 1996).

### **3.3. EDULCORANTES NATURAIS**

#### **3.3.1. Esteviosídeo**

##### **3.3.1.1. Histórico**

Na época da colonização da América do Sul pelos espanhóis e portugueses, entre os paralelos 19<sup>o</sup> e 24<sup>o</sup> de latitude sul e os meridianos 62<sup>o</sup> e 54<sup>o</sup> a oeste de Greenwich, nas imediações do Trópico de Capricórnio, compreendendo todo o território Paraguai e regiões limítrofes do Brasil, Argentina e Bolívia, habitavam com predominância, os índios nativos Tupi-guaranis. Eles utilizavam as folhas de uma pequena planta que denominaram Kaá-Hê-ê, que em guarani, significa erva doce. Esta planta, também conhecida como Caá-jhe-hê, Ca-á-yupê (doce), Azucá-caá (erva de açúcar) e Eira-Caá (erva de mel), pela propriedade

extremamente doce de suas folhas, era utilizada para adoçar diversas preparações medicinais (BER BUND, 1920).

As primeiras notícias do Kaá-Hê-ê para o mundo civilizado estavam contidos em documentos informativos, enviados pelos conquistadores à Espanha. Tais documentos davam notícia de que a planta era conhecida dos indígenas desde tempos remotos e que eles a usavam para edulcorar bebidas medicamentosas e especialmente para adoçar o mate cozido, (SAMANIEGO, 1946).

Somente em 1887 foi que, pela primeira vez, o Kaá-Hê-ê teve uma abordagem científica dada pelo naturalista Moisés S. Bertoni, suíço de nascimento e radicado no Paraguai, que a descobriu durante suas excursões de estudos pelas extensas florestas do Paraguai Oriental. Bertoni enviou parte da sua amostra para análise química ao Dr. Ovídio Rebaudi, químico paraguaio dedicado aos estudos de produtos naturais, que realizou os primeiros ensaios químicos sobre a planta, publicando-os em 1900 na revista Química e Farmácia de Buenos Aires. Em 1899, Bertoni denominou a planta como *Eupatoriun rebaudianun* sp, dedicando-a, como merecida homenagem, ao ilustre químico.

Em 1904, um estudo botânico completo comprovou que efetivamente se tratava de uma *Eupatoriae*, porém do gênero *Stevia* e em 1905, a planta foi denominada *Stevia rebaudiana* e, mais tarde, a Sociedade Botânica, em homenagem a Bertoni, denominou-a *Stevia rebaudiana* Bertoni. Em 1905, Bertoni publicou uma tradução em francês dos trabalhos de Rebaudi e transferiu a planta do gênero

*Eupatoriun*, que originalmente ele havia classificado, para o gênero *Stevia*, como é conhecida até hoje (BERTONI, 1905).

### **3.3.1.2. Aspectos botânicos**

O gênero *Stevia* pertence à família Compositae (Asteraceae) da classe *Eupatoriae*. É encontrada em todo o mundo, com uma distribuição que vai do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, onde o clima é tropical.

Existem cerca de 300 espécies de *Stevia* conhecidas, sendo que 80 são originárias da América do Norte, onde pelo menos 70 destas são do México (BRUCHER, 1974).

Membros desse gênero compreendem ervas e arbustos, encontrados freqüentemente a uma altitude de 500 a 3000 metros do nível do mar. Embora sejam normalmente encontradas em terras montanhosas de clima semi-árido, existem espécies que habitam pastagens, montanhas arborizadas, caatingas e florestas de coníferas (SOEJARTO, et. al., 1983).

As plantas do gênero *Stevia* são encontradas, especialmente na América do Sul, onde o clima tropical favorece o seu desenvolvimento. No Brasil foram mencionadas 14 espécies (PAGLIOSA, 1981). De todas as espécies, sabe-se que apenas a *Stevia rebaudiana* é explorada comercialmente para extração dos princípios adoçantes.

É um arbusto nativo das terras altas da serra do Amambai no nordeste do Paraguai e no sudeste do Brasil. É conhecida por diversos nomes, entretanto tornou-se comum chamá-la apenas de estévia (GOTO & CLEMENTE, 1998).

A parte aérea da estévia se enquadra em quatro diferentes aspectos de crescimento:

Aspecto de crescimento I: Planta única com brotos pouco desenvolvidos.

Aspectos de crescimento II: Planta com eixo principal dominante e galhos poucos desenvolvidos.

Aspectos de crescimento III: Planta com eixo principal dominante e galhos laterais bem desenvolvidos.

Aspectos de crescimento IV: Planta ramificada, dotado com muitos eixos dominantes e galhos laterais pouco desenvolvidos.

Apesar dessa diversificação de plantas, tanto a massa foliar quanto o conteúdo de adoçantes são mais influenciados pela prática agrônômica (TATEO et al., 1999).

Apresenta as seguintes características botânicas:

“*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (Figura 6), da família das compostas, perene de floração em dias curtos, possuindo ciclo vegetativo de 90 a 120 dias. Subarbusto ereto de 1 m de altura; caule pardo, pubescente e folioso até o ápice; folhas opostas, subsésseis, ovado oblongas, obtusas, cuneiformes na base, 3 nervadas membranas, tormentosas na parte inferior, até 6 cm de comprimento; 7 - 15 mm de largura; flores pálidas com escamas pardo-esverdeadas, agudas e

pubescentes, reunidas em capítulos corimbiformes de 4 - 5 e estes dispostos em panículas frouxas; fruto aquênio pequeno e com ângulos pilosos” (ROBINSON, 1930).

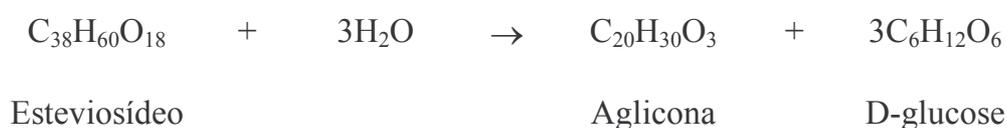


**Figura 6:** *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni



### 3.3.1.3. Aspectos químicos

O esteviosídeo tem fórmula química  $C_{38}H_{60}O_{18}$  e peso molecular de 804. Sua hidrólise resulta em uma aglicona de fórmula química  $C_{20}H_{30}O_3$  na proporção de 40,38% e D-glucose na proporção de 66,32%. Sendo assim propôs-se uma equação para sua hidrólise:



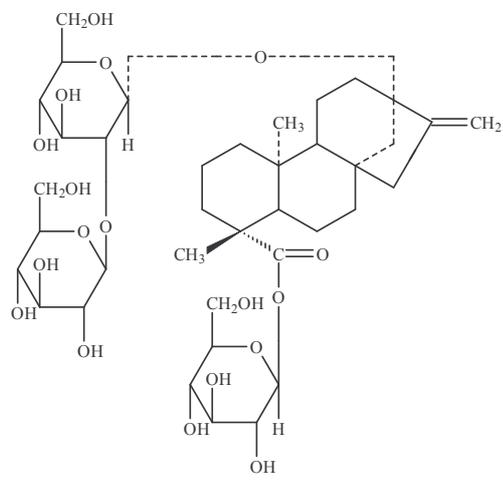
Em 1955, elucidou-se a estrutura química do esteviosídeo.

Durante o estudo de caracterização do esteviosídeo, os pesquisadores verificaram que o extrato bruto das folhas tinha um paladar muito mais agradável, indicando a presença de outros componentes que ajudam na melhoria do sabor.

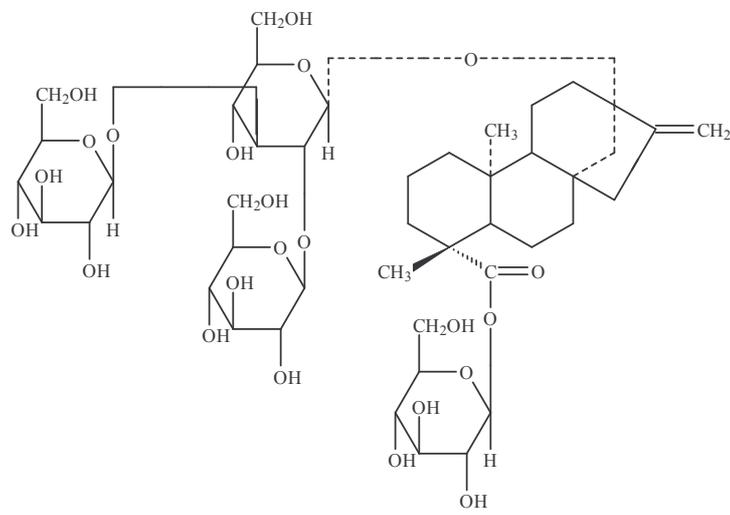
Dessa forma, além do esteviosídeo, foram identificados outros glicosídeos que colaboravam com a doçura do extrato de estévia. Estes glicosídeos foram nomeados de rebaudiosídeo A, B, C, D e E.

Uma análise das folhas de estévia mostrou que os componentes em maior quantidade são: esteviosídeo (5-10% p/p), rebaudiosídeo A (2 a 4% p/p) rebaudiosídeo C (1 a 2% p/p) e dulcosídeo A (0,4 a 0,7 % p/p). Por esses dados verificou-se que os produtos de maior interesse nas folhas de estévia são o esteviosídeo (registrado no Chemical Abstract com o nº 57817-89-7) exibindo o P.F. de 196-198 °C;  $[\alpha]_D^{20}$  -43,2;  $C_{38}H_{60}O_{18}$  e rebaudiosídeo A (registrado no Chemical

Abstract com o n° 58543.16-1), P. F. de 237-239 °C;  $[\alpha]_D^{20}$  -18,5;  $C_{44}H_{70}O_{23}$   
(KINGHORN e SOEJARTO, 1985). As estruturas químicas do esteviosídeo e do  
rebaudiosídeo A estão ilustradas nas figuras 7 e 8 respectivamente.



**Figura 7:** Estrutura química do esteviosídeo (ALVAREZ & KUSUMOTO, 1997).



**Figura 8:** Estrutura química do rebaudiosídeo A (ALVAREZ & KUSUMOTO, 1997).



A doçura do rebaudiosídeo A é 450 vezes superior ao da sacarose, mas como no esteviosídeo sua potência decresce com o aumento da concentração. O sabor amargo residual, ainda persiste, mas em intensidade muito menor que o esteviosídeo, tornando-o com sabor mais próximo da sacarose. O fato do rebaudiosídeo A ter qualidade de sabor superior ao esteviosídeo tem incentivado muitos países, tais como Japão, Estados Unidos, Israel e Brasil, a desenvolver este adoçante em escala comercial. O rebaudiosídeo A, diferente do esteviosídeo, é totalmente solúvel em água e o sabor doce não persiste na boca por muito tempo.

Além dos componentes adoçantes, a estévia apresenta inúmeros constituintes metabólicos que não apresentam doçura, tais como diterpenos, triterpenos, esteróis, flavonóides e óleos voláteis (YAMAZAKI, et. al, 1976).

SUZUKI et al (1976) isolaram e identificaram a rutina, um pigmento flavonóide de cor amarela, em cultura de calos de folhas de estévia.

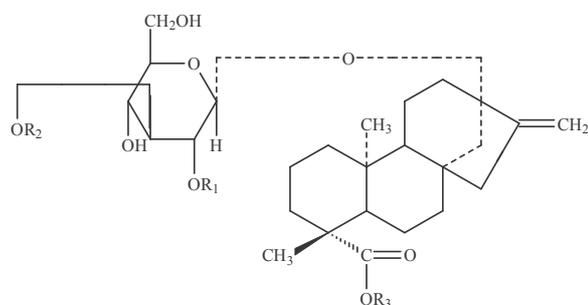
A folha seca de estévia contém aproximadamente 42% p/p de substâncias solúveis em água (KANEDA et. al. 1977).

CHANG & COOK (1983) realizaram uma análise completa do extrato aquoso das folhas de estévia com o intuito de determinar a sua composição não glicosídica. Estes autores mostraram que 30% dos sólidos totais da estévia são glicosídeos esteviosídicos, permanecendo 70% de impurezas de natureza orgânica e inorgânica. Os pigmentos encontrados no extrato foram as clorofilas  $\alpha$  e  $\beta$ , xantofilas,  $\beta$ -caroteno e outros dois pigmentos não identificados. O conteúdo de gomas foi aproximadamente 7 a 15% do total de sólidos. A principal goma contida

foi a goma arábica. A goma karaya também foi encontrada. O conteúdo de matéria inorgânica foi de aproximadamente 13% dos sólidos onde os principais componentes foram íons alcalinos, especialmente o  $K^+$ . Dentre os ácidos orgânicos determinados, estavam o ácido tartárico como o mais abundante, seguido do ácido fórmico e do ácido cítrico.

A Figura 9 ilustra as características de vários glicosídeos presentes nas folhas de estévia.

Produto	Fórmula Química	P.M.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Esteviolbiosídeo	(C <sub>32</sub> H <sub>50</sub> O <sub>12</sub> )	626,7	Glicosil	H	H
Esteviosídeo	(C <sub>38</sub> H <sub>60</sub> O <sub>18</sub> )	804,9	Glicosil	H	Glicosil
Rebaudiosídeo A	(C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>23</sub> )	967,0	Glicosil	Glicosil	Glicosil
Rebaudiosídeo B	(C <sub>38</sub> H <sub>60</sub> O <sub>18</sub> )	804,9	Glicosil	Glicosil	H
Rebaudiosídeo C	(C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> O <sub>22</sub> )	951,0	Rhamnosil	Glicosil	Glicosil
Rebaudiosídeo D	(C <sub>50</sub> H <sub>80</sub> O <sub>22</sub> )	1129,1	Glicosil	Glicosil	Glucosil <sup>2</sup> – <sup>1</sup> Glucosil
Rebaudiosídeo E	(C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>23</sub> )	967,0	Glicosil	H	Glucosil <sup>2</sup> – <sup>1</sup> Glucosil
Dulcosídeo A	(C <sub>38</sub> H <sub>60</sub> O <sub>18</sub> )	804,9	Rhamnosil	H	Glicosil



**Figura 9:** Estrutura dos glicosídeos adoçantes existentes nas folhas de estévia (ALVAREZ & KUSUMOTO, 1987).



#### **3.3.1.4. Aspectos toxicológicos**

Realizaram-se estudos científicos sobre a segurança da ingestão de estévia e seus glicosídeos. Estes estudos não mostraram nenhuma anormalidade, o que sustenta a sua segurança para consumo humano em bebidas e alimentos (KINGHORN, 1992).

Uma das mais importantes indicações da segurança da utilização da estévia e seus glicosídeos é a completa inexistência de registros de efeitos tóxicos em 1500 anos de contínua utilização pelos paraguaios. Uma indicação similar reside no uso corrente de esteviosídeo como agente adoçante no Japão por mais de 25 anos, onde foram ingeridas toneladas de esteviosídeo, e não se teve notícia de quaisquer efeitos colaterais.

##### **3.3.1.4.1. Metabolismo**

O esteviosídeo não é metabolizado no corpo humano e nenhuma das enzimas do trato gastrintestinal de diferentes animais e no homem é capaz de degradar esteviosídeo para esteviol. Os seres humanos não possuem enzimas que rompem as ligações  $\beta$ -glicosídicas presentes no esteviosídeo (HUTAPEA et al., 1997). O esteviosídeo foi incubado com  $\alpha$ -amilase da saliva,  $\alpha$ -amilase pancreática, saliva, pepsina, secreção gástrica, pancreatina e enzimas da membrana da borda em escova do intestino de ratos, camundongos e hamsters. Nenhuma dessas enzimas digeriu o esteviosídeo. Entretanto em experimentos com ratos e hamsters, o esteviosídeo foi metabolizado para esteviol pela flora bacteriana do ceco. Após

muitas horas, esteviol foi encontrado no sangue dos animais, e a concentração máxima ocorreu após 8 horas (NAKAYAMA et al.,1986). Em roedores ocorre coprofagia (Isto significa que os roedores comem suas próprias fezes, e deste modo reabsorvem nutrientes quebrados pelas bactérias do ceco. Neste estudo, não houve indicações de prevenção da coprofagia, então, não está claro se o esteviol encontrado no sangue, foi absorvido diretamente no cólon ou indiretamente através da ingestão de fezes) (GEUNS, 2002).

#### **3.3.1.4.2. Estudos mutagênicos e carcinogenicidade**

Testes mutagênicos são realizados para avaliar se o produto em estudo provoca mutação ou alteração de material hereditário. Deve ser enfatizado que compostos com respostas positivas em testes de mutagenicidade podem não ser carcinogênicos. Estes compostos devem ser testados para atividade carcinogênica, mas nem toda mutação induz câncer (GEUNS, 2002).

Durante os últimos anos, muitos testes de mutagenicidade foram feitos com esteviol, não mostrando nenhuma atividade (MATSUI et al., 1996; YAMADA et al. 1985; TOYODA et al. 1997).

O esteviol foi inativo no teste de AMES com ou sem ativação metabólica (PROCINSKA et al.1991; SUTTAJIT et al. 1993; KLONGPANICHPAK et al., 1997).

O JECFA (Join FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) declara que: “Esteviosídeo tem uma toxicidade oral muito baixa. A administração

oral de esteviosídeo a uma concentração de 2,5% em ratos por dois anos, não teve efeito significativo. Não foi encontrado nenhum potencial carcinogênico”.

Não há nenhum relato que o uso de estévia ou esteviosídeo tenha aumentado a incidência de câncer na população, apesar do longo tempo de uso (Paraguai (mais de 500 anos), Japão (25 anos), Brasil e Coréia (mais de 15 anos), China (mais de 11 anos), EUA (desde 1995)). A conclusão geral é que estévia e os adoçantes esteviosídeo e rebaudiosídeo A são completamente seguros (GEUNS, 2002).

#### **3.3.1.4.3. Toxicidade aguda**

Esteviosídeo em doses altas como 15 g/ kg de peso corpóreo não foi letal nem em camundongos, ratos ou hamsters. Hamsters são mais suscetíveis ao esteviol, do que ratos ou camundongos. Valores de  $DL_{50}$  para hamsters foi de 5,2 e 6,1 g/kg para machos e fêmeas respectivamente. Em ratos e camundongos o valor da  $DL_{50}$  do esteviol foi maior do que 15 g/kg, em ambos os sexos (TOSKULKAO et al., 1997).

Com ratos e camundongos foi encontrado uma  $DL_{50}$  de 8,2 g/kg para o esteviosídeo por ingestão oral e, uma  $DL_{50}$  de 2,99 g/kg, intraperitonealmente (MITSUHASHI, 1981).

#### **3.3.1.4.4. Toxicidade subaguda e toxicidade crônica.**

Estudos de toxicidade subaguda foram efetuados em ratos adicionando-se esteviosídeo purificado em sua ração diária a uma concentração superior a 7%

durante três meses (AKASHI & YOKOYAMA, 1975). Em outro estudo, ratos foram alimentados com 2,5 g/kg de esteviosídeo purificado adicionado em sua ração diária por três meses. Ambos os estudos relatam a ausência de efeitos nos animais testados. Isto significa que o NOEL é maior do que 2,5 g/kg e a IDA (ingestão diária aceitável) calculada pode ser pelo menos 25 mg/kg.

Ratos F-344 foram alimentados com doses de esteviosídeo a 0,625, 1,25, 2,0 e 2,5 g/kg durante 13 semanas (AZE, et. al., 1991). Os autores obtiveram um valor IDA de 25 mg/kg.

Hamsters, machos e fêmeas foram alimentados com esteviosídeo (0, 0,5, 1 e 2,5 g/kg/dia) (YODYINGYUAD & BUNYAWONG, 1991). Este experimento foi executado com diversas gerações de animais. Os autores concluíram que esteviosídeo em doses tão altas quanto 2,5 g/Kg/dia não afetou nem o crescimento nem a reprodução em hamsters. Destes resultados pode-se calcular uma IDA de 25 mg/kg.

#### **3.3.1.4.5. Fertilidade e teratogenicidade**

Estévia e esteviosídeo não têm qualquer efeito sobre a fertilidade ou reprodução. Isto pode ser ilustrado em diversas publicações.

Altas doses de extrato aquoso de estévia (equivalente a 525 mg/Kg/dia de esteviosídeo) foi administrado em ratos machos e fêmeas durante o período de copulação e gravidez (AKASHI & YOKOYAMA, 1975). Os autores não

observaram nenhuma diferença na média de copulação e concepção e nenhuma mudança no feto e filhotes quando comparado com o grupo controle.

Ratos Wistar machos e fêmeas receberam alimentação contendo 0,15%, 0,75% e 3% de esteviosídeo antes e após o início da gravidez. O consumo de esteviosídeo nos três grupos tratados foi 100, 480 e 2100 mg/Kg/dia em machos e 120, 530 e 2400 mg/kg/dia em fêmeas. Machos receberam esteviosídeo 60 dias antes do cruzamento e fêmeas de 14 dias antes do cruzamento até sete dias da gravidez. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos controle e teste considerando ciclo sexual, cruzamento e gravidez, nem houve nenhuma anormalidade no grupo teste considerando abortos e sobrevivência dos fetos. Além disso, não foi encontrada nenhuma anormalidade no crescimento, aparência geral, vísceras ou esqueleto dos fetos (MORI et al., 1981). Assim os autores concluíram que a adição de esteviosídeo em concentrações superiores a 3%, que significa 400 vezes o valor da IDA na alimentação, não tem efeito sobre o cruzamento, fertilidade ou o desenvolvimento e estado dos fetos em ratos antes e durante a fase inicial da gravidez.

#### **3.3.1.4.6. Biodisponibilidade de nutrientes**

A partir dos trabalhos de toxicidade subaguda e de IDA, pode-se deduzir que a estévia não tem nenhum efeito sobre a biodisponibilidade de nutrientes, como nenhum efeito foi encontrado no crescimento ou no peso dos animais, nem em outros processos fisiológicos.

Extrato de estévia foi extensivamente testado (baixa e alta concentração) em ratos durante 22 meses (machos) e 24 meses (fêmeas). Nenhuma diferença foi encontrada entre os animais teste e controle, implicando que todos os nutrientes foram absorvidos e metabolizado da mesma maneira (YAMADA et al. 1985).

O mesmo pode ser concluído do experimento em que hamsters adultos, machos e fêmeas, receberam alimentação forçada contendo alta e baixa concentração de esteviosídeo durante um mês. Foram feitos experimentos com mais de três gerações desses animais. Isto significa que tanto hamsters grávidas como a ninhada, foram forçados a ingerir esteviosídeo. Não foram encontrados diferenças no crescimento ou em outros parâmetros. Isto sugere que o esteviosídeo em concentrações relativamente altas não causa nenhum efeito sobre a absorção ou metabolismo de alimentos (YODYINGYUAD & BUNYAWONG, 1991). Outro trabalho empregando ratos Wistar alimentados durante 30 dias com extrato de estévia em altas concentrações chegou à mesma conclusão (MELLIS, 1996). Em um experimento com ratos durante 24 meses (XILI et al., 1992) e um experimento com 1000 aves (WOOD et al., 1996), não observaram efeito sobre o consumo de alimentos ou sobre o ganho ou perda de peso destes animais.

Num experimento, 60 voluntários humanos receberam 27,7 ou 110,8 mg de esteviosídeo puro por dia (BOECKH-HAEBISCH, 1992). O autor concluiu que extrato de estévia concentrado em doses normais para adoçar poderia ser usado sem restrição por pessoas normais como por diabéticos.

Em todos os experimentos citados, não há indicação de qualquer influência sobre a biodisponibilidade de nutrientes, nem efeitos fisiológicos foram encontrados. Além disso, estévia e esteviosídeo são largamente usados em muitos países e não há indicações de efeitos sobre a biodisponibilidade de outros nutrientes, ou sobre outras funções fisiológicas do corpo humano. Estévia e esteviosídeo têm sido consumido por centenas de milhares de pessoas durante um longo período de tempo, tanto por adultos quanto por crianças, sem dar a menor indicação de qualquer efeito prejudicial (GEUNS, 2002).

#### **3.3.1.4.7. Influência do consumo de esteviosídeo em grupos de população especial.**

Estévia e esteviosídeo são absolutamente seguros para diabéticos, pois não é absorvido pelo organismo. Também é seguro para fenilcetonúricos porque não possui nenhum aminoácido aromático.

Pessoas obesas poderiam perder peso pela troca do excesso de açúcar no alimento por esteviosídeo. Retirando-se o açúcar adicionado nos alimentos há um aumento da proporção relativa dos carboidratos poliméricos, trazendo um efeito benéfico para a saúde humana (GEUNS, 2002).

#### **3.3.1.4.8. Significâncias nutricionais, microbiológicos, toxicológicos e alergênicos.**

Estévia e esteviosídeo são causas improváveis para problemas nutricionais, microbiológicos, toxicológicos e alergênicos.

Não há nenhum trabalho publicado que sugira que o extrato das folhas de estévia é imunologicamente ativo quando aplicado internamente. Similarmente, não há nenhuma evidência que qualquer dos constituintes da estévia cause dermatite alérgica ao contato (KINGHORN, 1992).

#### **3.3.1.4.9. Propriedade anticariogênica do esteviosídeo**

KLEBER (1990) mostrou que uma solução a 0,5% de esteviosídeo reduz significativamente a incidência de lesões de superfície dentária (placa dentária) em 19%, valor este estatisticamente equivalente em eficiência a 0,02% de fluoreto de sódio. Com relação às fissuras dentárias, a redução foi de 6% sendo estatisticamente não significativo.

OLIVEIRA (1985) demonstrou que guaraná em pó, estévia, esteviosídeo e a associação de guaraná em pó com esteviosídeo, quando adicionados a água de beber, tiveram efeito anticariogênico em molares de ratos.

ZANELLA et al. (1997) avaliaram o efeito de bochechos diários com digluconato de clorexidina a 0,2%, fluoreto de sódio a 0,05% pH 3,4 e esteviosídeo a 0,1% sobre a inibição do acúmulo de placa dentária em crianças e verificaram-se os efeitos colaterais das soluções, assim como aceitação das mesmas. Os autores

concluíram que todas as substâncias testadas apresentaram inibição de placa bacteriana e com redução de 52,63% para o digluconato de clorexidina a 0,2%, 39,34% para o fluoreto de sódio a 0,05% pH 3,4 e 30,60% para o esteviosídeo 0,1%.

#### **3.3.1.4.10. Propriedades adicionais:**

A estévia tem sido utilizada por muitos anos para tratamento da diabete. JEPPESEN et al. (2000) estudaram o mecanismo de ação e concluíram que o esteviosídeo pode ter uma função potencial como agente anti-hiperglicêmico no tratamento da diabetes mellitus tipo 2.

Estudos em animais mostraram que esteviosídeo tem efeito antihipertensivo. CHAN et al. (2000) avaliaram o efeito do esteviosídeo sobre a hipertensão em humanos, e concluíram que administrado oralmente pode ser considerado como uma terapia alternativa para pacientes com hipertensão.

#### **3.3.1.5. Aspectos organolépticos**

As primeiras observações sobre as propriedades organolépticas dos adoçantes de estévia foram feitas pelo próprio Bertoni, seu descobridor, em 1899. Suas palavras textuais referentes à planta foram as seguintes:

“En su respecto, ninguna particularidad llama la atencion. Pero al poner en la boca cualquier pequena parte de las hojas ó del tallo, causa grande estranese lo dulce que es. Pues es verdaderamente

assombroso el poder edulcorante de esta plantita. Um fragmento de hojas de pocos milímetros cuadrados basta para tener dulce la boca durante una hora; pocas hojitas bastan para edulzar una fuerte taza de t   de café” (TANAKA, 1980).

Existem diversos trabalhos publicados sobre as propriedades organolépticas do esteviosídeo; trabalhos mais recentes indicam que a doçura do esteviosídeo    cerca de 300 vezes maior que a sacarose a uma concentração de 0,4%; 150 vezes quando a solução de sacarose é de 4% e 100 vezes quando a solução de sacarose é de 10%. O sabor do esteviosídeo com alto grau de pureza (95 a 98%)    idêntico ao da sacarose nos primeiros 10 segundos de prova, apresentando em seguida um gosto levemente amargo adstringente. Entretanto, quando a pureza é de apenas 50%, como nos extratos das folhas de estévia o sabor residual amargo (*aftertaste*) diminui sensivelmente (NISHIMA et al., 1978; SCHEFFE, 1952).

Esta característica organoléptica do esteviosídeo tem sido a principal dificuldade da sua aplicação em alimentos ou medicamentos. Dessa forma procuraram-se alternativas para a sua solução. As mais viáveis foram as misturas com outros adoçantes, tais como: açúcar (SCHEFFE, 1952), glicose, frutose, sorbitol, maltitol (ITO et al., 1977) e também com outros edulcorantes como a sacarina (SAZAKI & MURAKAMI, 1977), acesulfame K (WANG et al., 1994) etc. Misturas com aminoácidos tais como DL-triptofano (SHIMIZU & OCHI, 1978) com sais de glicina, alanina, aspartato e glutamato (MORITA, 1977), com goma de

xantana (OGONTO, 1980), com sais alcalinos de ácido fosfórico (OCHI & SHIMIZU, 1978), com D-xilose (UENO, 1980) etc., podem produzir adoçantes com baixo teor calórico e reduzido sabor amargo residual.

A doçura de outros glicosídeos edulcorantes da estévia, comparado com a sacarose é: esteviosídeo, 150 a 300; esteviolbiosídeo, 100 a 125; rebaudiosídeo A, 250 a 400; rebaudiosídeo B, 300 a 350; rebaudiosídeo C, 50 a 120; rebaudiosídeo D, 250 a 450; rebaudiosídeo E, 150 a 300; dulcosídeo A, 50 a 120 (TANAKA, et. al. 1977b)

#### **3.3.1.6. Aspectos analíticos**

Há inúmeros métodos analíticos publicados para determinação dos glicosídeos da estévia tanto na planta como em bebidas e alimentos.

Estes métodos utilizam cromatografia gasosa, cromatografia em camada delgada-densitometria, colorimetria e cromatografia líquida de alta eficiência.

##### **3.3.1.6.1. Análise quantitativa dos princípios adoçantes por cromatografia gás-líquido (GLC)**

O sistema de cromatografia gás-líquido (GLC), pelas suas próprias características exige que a amostra a ser analisada tenha seus componentes bastante voláteis. Componentes não voláteis não são analisáveis por este método. Assim sendo, o esteviosídeo e os demais glicosídeos da estévia têm, por este fato, sua análise dificultada em GLC.

Entretanto, MITSUHASHI et al. (1975), desenvolveram um processo para analisar o esteviosídeo por GLC. Este método implicou, então, numa purificação prévia do composto, a partir do extrato aquoso e posterior hidrólise em meio ácido, transformando o conteúdo de esteviosídeo quantitativamente em isoesteviol que é um composto volátil.

Devido ao fato de que a hidrólise ácida não é específica, há também a produção de isoesteviol a partir de outros glicosídeos, além do esteviosídeo, superestimando os teores deste último. SAKAMOTO et al. (1975) desenvolveram um método onde a hidrólise é feita enzimaticamente, com hesperidinase, produzindo esteviol como aglicona autêntica do esteviosídeo, não havendo hidrólise total dos rebaudiosídeos que ficam ainda na forma glicosídica não volátil. Sendo o esteviol tão volátil quanto o isoesteviol, os autores puderam quantificar com maior precisão o teor de esteviosídeo através de GLC.

#### **3.3.1.6.2. Análise quantitativa dos adoçantes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

O número de componentes glicosídicos diterpênicos que podem estar contidos em extratos da estévia é, como se sabe hoje, de oito compostos. Portanto, um processo analítico que quantifique satisfatoriamente estes componentes em uma única análise é o ideal para os processos de controle de qualidade. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas que pode realizar esse trabalho.

HASHIMOTO et al. (1978) desenvolveram um método de CLAE para separação e quantificação dos componentes da estévia, utilizando uma coluna de Shodex-OH-pak M-414 (Showa Denko, Japan) com dimensões de 50 cm de comprimento por 4 mm de diâmetro interno. A fase móvel consistiu de acetonitrila e água (4:1,v/v), com vazão de 0,5 mL/min. A detecção dos compostos foi feita por um detector de índice de refração. Com este sistema os autores puderam separar e quantificar esteviosídeo, rebaudiosídeo A, glicose e sacarose.

HASHIMOTO & MORIYASU (1978) utilizaram uma coluna de Lichrosorb NH<sub>2</sub> (10 $\mu$ , 25 cm x 2 mm D.I.), tendo como fase móvel acetonitrila e água (80:20,v/v) com uma vazão de 1,5 mL/min. A detecção foi feita pela absorção ao ultravioleta em 210 nm, obtendo-se excelentes resultados.

AHMED et al (1980), desenvolveram um método para analisar os glicosídeos diterpênicos da estévia em CLAE, através de derivados dos grupos carboxílicos do esteviolbiosídeo e rebaudiosídeo-B com brometo de p-bromofenacil. Estes derivados apresentam a vantagem de aumentar a capacidade de detecção ao ultravioleta em comprimento de onda fora da faixa de absorção dos solventes. A coluna cromatográfica utilizada para a separação dos derivados foi de  $\mu$ -bondapac C<sub>18</sub>, fase móvel de acetonitrila e água (3:2, v/v) com vazão de 0,5 mL/min e detector espectrofotométrico UV a 258 nm.

Alguns outros métodos de CLAE foram desenvolvidos (MORITA, 1977; CHEN & YEH, 1978; KIM et al., 1983) que apresentam correlação com os sistemas acima relatados e com outros métodos cromatográficos.

A empresa Japonesa Shimadzu Co., que fabrica equipamentos analíticos, patenteou em 1983 um processo analítico de cromatografia de alta eficiência (CLAE). O sistema consiste de uma extração dos princípios edulcorantes da estévia com Acetonitrila-água em presença de fosfato, utilizando uma coluna de sílica-NH<sub>2</sub> e uma fase móvel de acetonitrila:água:fosfato. A detecção foi feita pela absorção de luz Ultravioleta ou pela variação de índice de refração. Desta forma foi possível quantificar simultaneamente esteviosídeo, rebaudiosídeo A e esteviolbiosídeo.

MAKAPUGAY et al. (1984) desenvolveram um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência para análise de glicosídeos da estévia utilizando uma coluna Zorbax NH<sub>2</sub> com dimensões de 24 cm de comprimento e 0,4 cm de diâmetro interno. O eluente utilizado foi acetonitrila:H<sub>2</sub>O (84:70, v/v) em pH 5,0 e a detecção de picos foi feita medindo-se a absorbância dos picos sob luz UV a 210 nm. Os oito glicosídeos derivados da estévia foram assim separados, detectados e quantificados simultaneamente. Não houve necessidade de derivatizações.

Um método de CLAE, para análise dos edulcorantes da estévia, que vem sendo divulgado, consiste num sistema que utiliza uma coluna de fase reversa (Sílica-C<sub>18</sub> ou octadecilsilano). Os primeiros a usarem esta técnica foram os chineses PENG et. al. (1985) que analisaram preparações contendo esteviosídeo utilizando uma coluna YWG-C<sub>18</sub>H<sub>37</sub> como fase reversa e metanol:H<sub>2</sub>O (75:25, v/v) como fase móvel. A detecção foi feita pela absorção de luz UV a 205 nm apresentando um limite de detecção, para o esteviosídeo, de 0,2 µg. A recuperação

foi em torno de 100 %. A determinação de esteviosídeo por CLAE em fase reversa foi também realizada por GAGLIARDI et al. (1986), na Itália, de forma que as folhas de estévia foram pulverizadas e extraídas com uma solução de metanol:H<sub>2</sub>O (49:1,v/v), sendo que o extrato concentrado foi re-extraído com água:etanol:acetato de etila:ciclohexano (10:4:7:7, v/v/v/v). A fase aquosa da mistura foi seca e redissolvida em metanol:água (45:5, v/v) e analisada por CLAE utilizando uma coluna de Erbasil C<sub>18</sub>. A eluição foi feita por um gradiente linear de metanol:acetonitrila:H<sub>2</sub>O de 20:10:70 até 20:30:50 em 20 minutos. A detecção foi feita a 217 nm com um limite mínimo de 0,18 µg. Foi obtido uma média de concentração nas folhas de estévia analisadas de 6,72 % em peso seco.

Um método bastante simplificado para análise de esteviosídeo em folhas de estévia e em outras composições, foi elaborado por ALVAREZ & KUSUMOTO (1987) na Universidade Estadual de Maringá.

KASAI et al. (1987), desenvolveram um sistema de CLAE preparativo utilizando uma coluna de partículas esféricas de hidroxiapatita como fase estacionária e solução aquosa de acetonitrila. Este sistema, segundo os autores se mostrou mais eficiente em separar os glicosídeos da estévia do que os sistemas de colunas de sílica gel.

Os métodos de CLAE foram também utilizados por YUAN & QIAN (1988) para quantificar esteviosídeo e rebaudiosídeo A em soro, urina e fezes

humanas, e por STRIEDNER et al. (1991) para analisar quantitativamente o esteviosídeo em cultura de células de estévia.

### **3.3.1.6.3. Determinação de esteviosídeo pelo método de espectrometria de reflectância no infravermelho próximo (ERIP)**

NISHIYAMA et al. (1992), trabalhando no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Estadual de Maringá, desenvolveram uma metodologia, para quantificar o teor de esteviosídeo e carboidratos solúveis na folhas de estévia, utilizando para tanto o sistema de espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (ERIP), descrito por WETZEL (1983), que pode contribuir para estabelecer um procedimento analítico mais adequado para a determinação dos glicosídeos da estévia, principalmente para fins industriais e agrícola.

### **3.3.1.7. Processos de purificação**

Todos os processos apresentados na literatura seguem aproximadamente a mesma metodologia. Numa primeira fase, as folhas de estévia são extraídas com água ou álcoois (etanol, metanol, etc.) à quente, por infusão ou percolação, obtendo-se um nível máximo de extração em torno de 50% do peso seco da folha, na forma de uma solução carregada de partículas coloidais de cor marrom escuro, contendo todos os princípios ativos, pigmentos foliares, polissacarídeos solúveis e outras impurezas. Alguns processos fazem o desengorduramento prévio das folhas com solventes apolares como clorofórmio ou hexano (TANAKA et al., 1977a;

MASUYAMA, 1980; KINGHORN et al., 1982) para a eliminação preliminar de óleos essenciais, lipídios, clorofila e outros princípios apolares. A segunda fase, na grande maioria dos casos, reside na clarificação do extrato, isto é, na remoção no máximo de impurezas, tornando o mesmo um xarope claro, contendo praticamente o conteúdo integral dos princípios adoçantes.

Pode-se classificar os métodos para clarificação em seis grupos. O primeiro grupo de processos utiliza  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{CaCO}_3$  ou sais de  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (KIKUCHI & SAWAGUSHI, 1977; ISHIZONE, 1979; FUJI FOODS, 1982; TAMA SEIGAKU, 1980; YAMADA, 1980; TOYO SEITO, 1980; SEKISUI CHEM. Co., 1983; LI & KAJIMA, 1984; ZHOU et al., 1984; GIOVANETTO, 1989) como agentes precipitantes das impurezas do extrato, seguido de deionização através de resinas trocadoras de íons de natureza catiônica e aniônica, como poliamidas (KIKUCHI & SAWAGUSHI., 1977; FUJI FOODS, 1982), Amberlite XAD, Duolite ES-861; Diaion HP (KOBOMURA et al., 1976; TAMA SEIGAKU, 1982), Dow 50w/Dowex WGR (GIOVANETTO, 1989) resinas não polares (TOYO SEITO, 1980), Amberlite IR-120 (H+) e IRA-410 (-OH) (KIKUCHI & SAWAGUSHI., 1977; ISHIZONE, 1979; MIWA, 1979;) e outros tipos de Amberlite (CHANG & CHANG, 1985) obtendo vários graus de clarificação e purificação do extrato.

O segundo grupo utiliza somente íons metálicos como coagulantes na clarificação de extrato aquoso. O  $\text{CaCO}_3$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  (MASUYAMA, 1980);  $\text{Sn}^{4+}$  em

meio alcalino (CHISSO CORP., 1980);  $\text{CaCl}_2$ ;  $\text{AlCl}_3$ ;  $\text{FeCl}_2$ ;  $\text{Ca(OH)}_2 + \text{CO}_2$  ou  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3/\text{Ca(OH)}_2$  (TAKAMURA et al., 1977 e 1978; SATO et al., 1980; WAKABAYASHI, 1981; MITSHUBISHI ACETATE, 1983; ZI et al., 1984 e 1986) e  $\text{MgCO}_3$  ou  $\text{Mg(OH)}_2$  com aeração (TAKAMURA et al., 1977),  $\text{Mg(OH)}_2$  calcinado como adsorvente (YOKOYAMA & SUGIYAMA, 1990) ou ainda  $\text{Ca(OH)}_2/\text{CaCO}_3$  (De CERNADAS e PRYLUKA, 1985) são os mais usados para o processo de clarificação do extrato.

O terceiro grupo de processos utiliza somente resinas trocadoras de íons ou resinas adsorventes para descolorização do extrato. Estes processos utilizam a HP-20 (copolímero divinilbenzeno-estireno) como resina adsorvente (OHE et al., 1977) ou Diaion HP-10, Diaion WH, Duolite S-37 e Amberlite IRA-93 como resinas porosas, aniônicas fracas, levemente básicas (MARUZEM CHEM. Co., 1980; TOYO SUGAR REFINING Co., 1981; HAGA et al., 1976) ou sistemas de resinas trocadoras de íons (mistura de IR-120, IRA-68, IR-120B, IRA-411) (OHE et al., 1977). Utilizam ainda Amberlite XE-275, Amberlite XAD-7 e Amberlite IR-120 (KIUNI et al., 1977; PERSINOS, 1973; AQUINO et al., 1985), resinas ligadas à celulose (SEKISUI CHEM. Corp, 1984) e resinas macro-reticulares (BIAN et al., 1986), sendo que, também, alguns pesquisadores utilizaram carvão ativo como adsorvente de impurezas (MIZUFUME et al., 1987), produzindo um bom nível de clarificação e edulcorantes com paladar mais agradável.

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

O quinto grupo de processos consiste de tratamento do extrato aquoso das folhas de estévia com solventes orgânicos como os álcoois de 4 a 8 carbonos e cristalização em metanol (ASANO et al., 1975) ou fracionamento com sistema de solventes (ALVAREZ & COUTO, 1984), ou cristalizações fracionadas em álcoois (AJINOMOTO Co. Inc., 1981; HUANG & YANG, 1982). Alguns utilizam, ainda, uma seqüência de tratamentos com sais complexos como  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  e  $\text{CaCO}_3$  procedendo extrações sucessivas com solventes como éter, acetona e etanol (LI & LI, 1983; TAKAHASHI, 1987) ou  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{Ca}(\text{OH})_2$  (ARASHI, 1987).

O sexto grupo trata de processos que envolvem o clareamento do extrato aquoso da estévia, com polieletrólitos que fazem a coagulação e decantação das impurezas. Desta forma, o tratamento do extrato aquoso com cloreto de benzalcônio ou com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ou  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  seguido de agregação com uma amida poliacrílica ou outro polímero floculante (MITSUBISHI ACETATE Co. Ltd., 1983; KODAKA, 1977) consegue remover boa parte das impurezas do extrato, tornando-o bastante clarificado.

Com a clarificação do extrato das folhas de estévia, que é a parte da extração que diferencia os métodos, esta é processada a seguir, praticamente, da mesma maneira em todos os sistemas. A solução é concentrada e redissolvida em metanol para proceder a cristalização do esteviosídeo. A recristalização é feita no mesmo solvente, obtendo-se o esteviosídeo praticamente puro.

Vale ainda citar o método de extração e fracionamento dos princípios ativos para fins analíticos desenvolvido por KINGHORN et al. (1982), onde o extrato aquoso é extraído com butanol e a solução concentrada. O resíduo é purificado por cromatografia em um sistema contracorrente, conseguindo-se boa separação do esteviosídeo, rebaudiosídeo A e dulcosídeo A.

Outro método desenvolvido por KATO et al. (1977) para extração do esteviosídeo consiste em purificar o extrato aquoso ou aquoso-alcoólico pelo uso de membranas semipermeáveis (acetato de celulose, Daicel DRS-50) e por ultrafiltração do líquido tratado em membrana de poliacrilonitrilo (Daicel DUH-20), fornecendo um filtrado que ao ser concentrado produziu esteviosídeo com aproximadamente 80% de pureza. Sistema semelhante foi usado por FUH & CHIANG (1990), na Universidade de Taiwan, os quais utilizaram um sistema de ultrafiltração em membrana para remover acima de 96% da pigmentação do extrato aquoso de folhas de estévia e posterior concentração do extrato por osmose reversa. A clarificação final foi feita por troca iônica em resinas aniônicas e catiônicas.

Recentemente, novos processos usando tecnologia avançada vêm sendo experimentados. TANAKA et al., (1977), desenvolveram um processo de extração

de folhas de estévia através de CO<sub>2</sub> super crítico em presença de metanol, extraindo esteviosídeo e rebaudiosídeo A com 17,5 % de rendimento. Trabalho semelhante foi feito por KIENLE (1989), na Europa, o qual extraiu previamente as graxas e pigmentação contaminantes das folhas da estévia com CO<sub>2</sub> super crítico, extraindo posteriormente, de maneira convencional os princípios adoçantes. PASQUEL et al. (2000) desenvolveram um processo para obter extrato de estévia com qualidade melhor utilizando extração supercrítica. O processo proposto inclui um pré-tratamento das folhas seguido de uma extração dos glicosídeos da estévia por extração supercrítica utilizando CO<sub>2</sub> como solvente e água e/ou álcool etílico como co-solvente.

Particular interesse apresenta a extração, além do esteviosídeo, também dos rebaudiosídeos, principalmente o rebaudiosídeo A. Para tanto, foi desenvolvido um processo de separação do esteviosídeo e rebaudiosídeos a partir de um extrato de folhas de estévia clarificado pela MARUZEN CHEM. CO. LTD, (1982). A mistura foi tratada com álcoois de três a seis carbonos, solubilizando o esteviosídeo e permanecendo na fração insolúvel o rebaudiosídeo A.

A TOYO SUGAR REFINING CO. LTD. (1982) desenvolveu um processo utilizando uma resina adsorvente moderadamente polar (Diaion HP-10; Amberlite XAD-2 ou XAD-7) com um valor de saturação menor que o conteúdo de rebaudiosídeo e esteviosídeo, porém maior do que o teor de esteviosídeo. O rebaudiosídeo é carregado pelo eluente e o esteviosídeo fica adsorvido, separando assim os dois componentes.

NITTAYA-NGOWATANA (1997) desenvolveu um processo de extração e purificação de esteviosídeo que consiste em despigmentação com  $\text{Ca(OH)}_2$  e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e subsequente desmineralização com coluna de troca iônica empacotada com Amberlite 200 (resina de troca iônica catiônica forte).

Os processos que utilizam somente íons metálicos para clarificação são simples e econômicos, entretanto, apresentam o inconveniente de deixarem resíduos dos sais aplicados, que muitas vezes podem afetar a saúde dos consumidores dos produtos. Sob este aspecto, os extratos clarificados são posteriormente, deionizados por resinas trocadoras de íons, que praticamente eliminam aquele tipo de impureza.

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

Desponta agora os sistemas de membranas de ultrafiltração e osmose reversa que reduzem substancialmente os níveis de impurezas e os volumes a serem manipulados.

### **3.4. TROCA IÔNICA**

Troca iônica são reações químicas reversíveis, onde um íon de uma solução é trocado por outro íon de carga similar que se encontra ligado a uma

partícula sólida imobilizada. Estas partículas sólidas de troca iônica ocorrem naturalmente nas zeólitas inorgânicas ou em resinas orgânicas produzidas artificialmente. As resinas orgânicas sintéticas são mais utilizadas atualmente devido as suas características que podem ser modificadas de acordo com a sua utilização.

As primeiras observações registradas na literatura referentes à troca iônica datam de 1850. Químicos, especializados em solos descobriram, nas primeiras décadas do século XIX, a capacidade destes em remover íons  $\text{NH}_4^+$  de soluções que os atravessavam, substituindo-os por uma quantidade equivalente de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . A partir destas observações, várias tentativas foram realizadas no sentido de produzir trocadores inorgânicos mais apropriados. As principais dificuldades encontradas eram principalmente quanto ao acesso da substância a ser trocada no material utilizado como suporte, refletindo em uma baixa capacidade de troca e dificuldades na regeneração deste, para ser novamente utilizado. Apesar das dificuldades encontradas, a recompensa destes esforços foi obtida com a utilização do processo de troca iônica para suavizar a dureza da água.

Uma resina de troca iônica orgânica é composta por polieletrólitos de alto peso molecular que podem trocar seus íons ligados por outros íons de carga similar que estão no meio. Cada resina tem um número distinto de íons ligados que representa a quantidade máxima de troca por unidade de resina. Reações de troca iônica são reversíveis e estequiométricas e podem ser representadas na forma de uma simples reação:



O grau de deslocamento da reação no sentido da direita depende da seletividade da resina. A seletividade da resina para um dado íon, pode ser medida pelo coeficiente de seletividade (K).

$$K = \frac{[\text{Conc. B}^+]_{\text{resina}}}{[\text{Conc. A}^+]_{\text{resina}}} \times \frac{[\text{Conc. A}^+]_{\text{coluna}}}{[\text{Conc. B}^+]_{\text{coluna}}}$$

O coeficiente de seletividade expressa a distribuição relativa dos íons quando uma resina na forma  $A^+$  é colocada em contato com uma solução contendo íons  $B^+$ . A diferença de afinidade entre os íons da solução e a matriz é devido a diferenças de carga, sendo possível controlá-la utilizando fatores como pH e a força iônica.

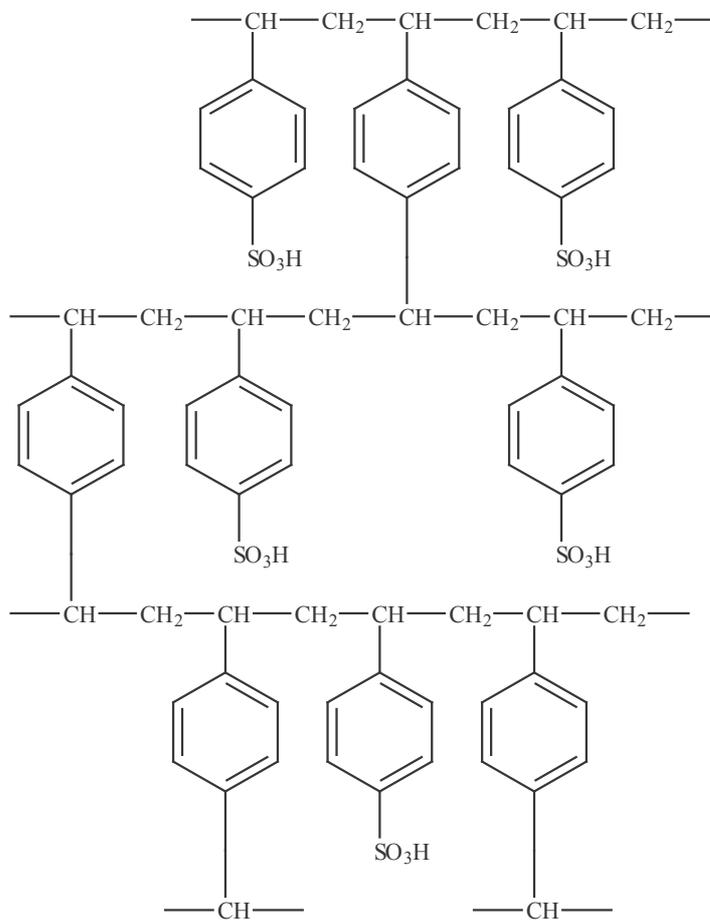
Para que a coluna possa ser novamente utilizada, ela precisa ser regenerada, isto é, ser equilibrada com o eluente inicial. Neste caso, os íons do eluente têm uma menor afinidade pelo grupo trocador da matriz, mas a condição de equilíbrio é alcançada fazendo-se passar pela coluna um volume do eluente igual a 5-10 vezes a sua capacidade. Deste modo, é possível ocorrer a troca de íons, eliminando aqueles contidos nos eluentes anteriormente utilizados. Sendo assim, o grau de afinidade é superado pela maior concentração de íons (COLLINS et al., 1997).

Em termos gerais, quanto maior a afinidade da resina por um íon particular, maior será a eficiência de troca em termos da capacidade da resina em

remover o íon da solução. A maior afinidade por um íon em particular, entretanto, resultará num aumento do consumo de regenerante.

Uma resina de troca iônica é classificada como trocador catiônico, quando possui um íon móvel carregado positivamente disponível para troca, e trocador aniônico, quando o íon disponível para troca é carregado negativamente. As resinas catiônica e aniônica são produzidas a partir do mesmo polímero orgânico básico (figura 10). A diferença é o grupo ionizável ligado ao polímero. É este grupo funcional que determina o comportamento químico da resina. As resinas, de um modo geral, podem ser classificadas em trocador catiônico de ácido forte ou ácido fraco ou trocador aniônico de base forte ou base fraca.





**Figura 10:** Estrutura da resina orgânica estireno em ligação cruzada com divinilbenzeno (COLLINS et al., 1997).



### 3.4.1. Resinas catiônicas de ácido forte:

Resinas de ácido forte são assim chamadas porque apresentam comportamento químico similar aos ácidos fortes. As resinas são fortemente ionizadas tanto na forma ácida (R-SO<sub>3</sub>H) como na forma salina (R-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>).

As resinas de ácido forte podem converter um sal metálico no ácido correspondente pela seguinte reação:



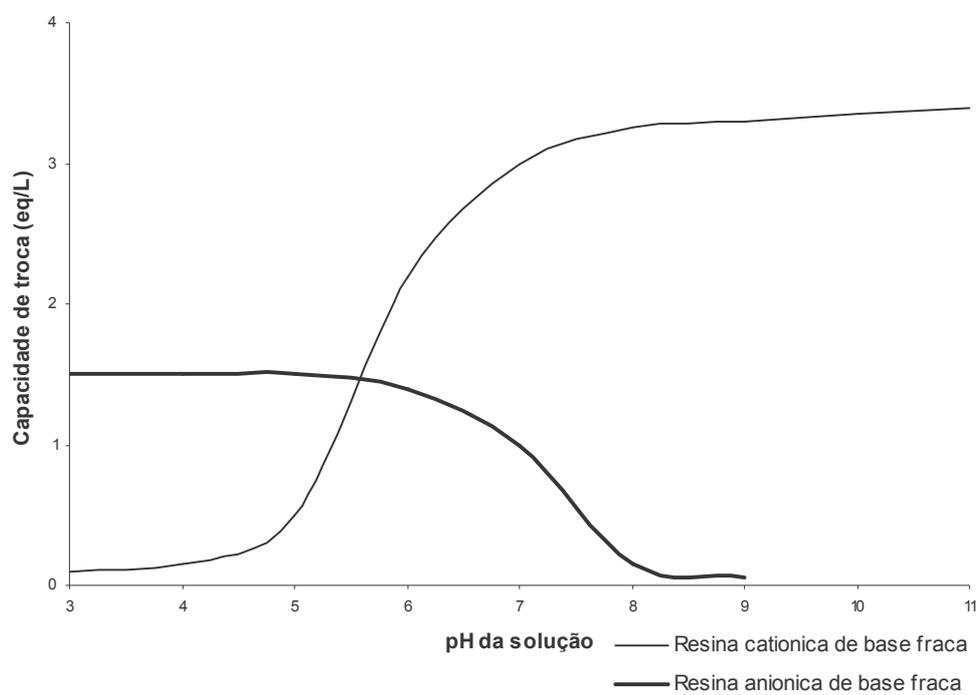
A forma hidrogênio e sódica da resina de ácido forte são altamente dissociadas e tanto o H<sup>+</sup> como o Na<sup>+</sup> estão prontamente disponível para troca em qualquer faixa de pH. Conseqüentemente a capacidade de troca das resinas de ácido forte é independente do pH da solução. Estas resinas podem ser utilizadas na forma de hidrogênio para deionização completa. Elas são usadas na forma sódica para retirar a dureza da água. Após exaustão, as resinas são convertidas novamente para a forma hidrogênio (regeneração) por contato com uma solução de ácido forte, ou a resina pode ser convertida para a forma sódica por uma solução de cloreto de sódio.

### 3.4.2. Resina catiônica de ácido fraco

Nas resinas de ácido fraco, o grupo ionizável é um ácido carboxílico (COOH). Estas resinas têm comportamento similar aos ácidos orgânicos fracos que são fracamente dissociados. Resinas de ácidos fracos exibem uma afinidade muito

maior pelo íon hidrogênio do que resinas de ácido forte. Esta característica permite a regeneração para a forma hidrogênio com uma quantidade menor de ácido do que é requerido para regenerar resinas de ácidos fortes. Regeneração quase completa pode ser concluída com quantidades estequiométricas de ácido. O grau de dissociação de uma resina de ácido fraco é fortemente influenciado pelo pH da solução. Conseqüentemente, a capacidade da resina depende em parte do pH da solução.

A Figura 11 mostra que uma resina típica de ácido fraco tem capacidade limitada com pH abaixo de 6,0.



**Figura 11:** Capacidade de troca das resinas catiônica de ácido fraco e aniônica de base fraca em função do pH da solução.



### 3.4.3. Resina aniônica de base forte

Assim como as resinas de ácido forte, as resinas de base forte são altamente ionizadas e podem ser usadas em qualquer faixa de pH. Estas resinas são usadas na forma básica (OH) para deionização da água. Elas reagem com ânions da solução e podem converter uma solução ácida em água pura.



Regeneração com hidróxido de sódio concentrado (NaOH), convertem resinas esgotadas para a forma básica (OH).

### 3.4.4. Resina aniônica de base fraca

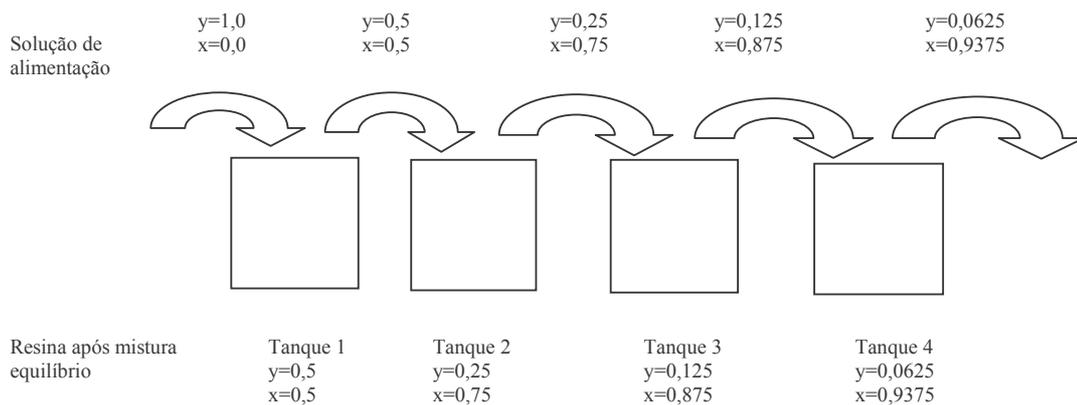
Resinas de base fraca têm comportamento similar às resinas de ácidos fracos. O grau de ionização é fortemente influenciado pelo pH. Conseqüentemente, resinas de base fraca exibem uma capacidade de troca mínima com um pH acima de 7,0, como pode ser vista também na figura 11. Estas resinas simplesmente sorvem ácidos fortes. Não podem reagir com sais.

Resinas de base fraca, não têm forma hidróxida, como as resinas de base forte. Conseqüentemente para a regeneração é necessário somente neutralizar o ácido adsorvido: não é necessário fornecer íons hidróxido. Pode-se empregar reagentes de base fraca mais baratos, tais como amônia (NH<sub>3</sub>) ou carbonato de sódio.



### 3.4.5. Sistemas de troca em batelada e em coluna

O processo de troca iônica pode ser realizado tanto pelo método em bateladas como pelo método em colunas. No primeiro método, as resinas e a solução são misturadas em um tanque, a troca é feita até o equilíbrio, então a resina é separada da solução. O grau de troca iônica é limitado pela preferência que a resina exibe para um íon na solução. Conseqüentemente, o uso da capacidade de troca da resina será limitado, exceto se a seletividade do íon na solução for maior do que o íon ligado na resina. A regeneração em batelada da resina é quimicamente ineficiente, por isso o processo de troca iônica em batelada tem potencial limitado de aplicação. A passagem de uma solução através de uma coluna contendo um leito de resinas de troca iônica é análoga ao tratamento da solução em uma série de tanques em batelada. Considerando-se uma série de tanques contendo um equivalente cada de resinas na forma íons X, conforme Figura 12.



**Figura 12:** Esquema operacional de uma coluna de troca iônica.



Um volume de solução contendo um equivalente do íon Y é trocado no primeiro tanque. Assumindo que a resina tem uma afinidade igual por íons X e Y, quando for estabelecido o equilíbrio a solução conterá 0,5 equivalentes de X e Y. Similarmente a resina conterá 0,5 equivalentes de X e Y. Esta separação é o que ocorre nos processos em batelada. Se a solução for removida do tanque um e adicionado no tanque dois, que também contém um equivalente da resina na forma X, a solução e a resina conterão 0,25 equivalentes de Y e 0,75 equivalentes do íon X. Repetindo procedimento no terceiro e no quarto tanque, a solução conterá 0,125 equivalentes do íon X e 0,0625 equivalentes do íon Y, respectivamente. Desconsiderando uma afinidade desfavorável da resina e usando um número suficiente de estágios, pode-se reduzir a concentração de íons Y na solução a qualquer nível desejado.

Esta análise simplificada do uso de colunas de troca iônica demonstra ser um processo dinâmico.

#### **3.4.6. Equipamentos de troca iônica e operação.**

A maioria das aplicações industriais usam sistemas de colunas em leitos fixos, cujo componente básico é a coluna de resina.

O desenho da coluna deve:

- Conter e suportar a resina de troca iônica.
- Distribuir uniformemente o fluxo de serviço e de regeneração através do leito de resinas.
- Fornecer espaço para fluidizar a resina durante a retrolavagem.

- Incluir tubulações, válvulas e instrumentos necessários para regular o fluxo da solução de alimentação, regeneração e retrolavagem.

### **3.4.7. Procedimento de regeneração**

Após a saturação, as resinas devem ser regeneradas. A regeneração emprega os seguintes passos básicos:

1. A coluna deve sofrer uma retrolavagem para remover os sólidos suspensos, coletados pelo leito durante o ciclo de serviço e para eliminar canais que podem ter formado durante este ciclo. O fluxo de retrolavagem fluidiza o leito, despreendendo as partículas que estão grudadas e reorientando as partículas da resina de acordo com o tamanho. Durante a retrolavagem as partículas maiores e mais densas acumularão na base, diminuindo no topo da coluna. Esta distribuição produz um bom modelo para o fluxo hidráulico e resistência ao entupimento “fouling” por sólidos suspensos.
2. O leito de resina é colocado em contato com a solução regenerante. Um enxágüe com um fluxo lento de água para remover qualquer resíduo de regenerante.
3. O leito de resina é submetido a um enxágüe rápido para remover os últimos traços da solução regenerante e garantir boas características de fluxo.
4. A coluna está pronta para outro ciclo de serviço.

Para as resinas que sofrem dilatação ou contração durante a regeneração, deve-se proceder uma segunda retrolavagem após a regeneração para eliminar

canalização (caminhos preferenciais) ou compressão das resinas. A regeneração em colunas de leito fixo normalmente necessita um período de uma a duas horas. A frequência depende do volume de resina na coluna de troca iônica e da quantidade de compostos que se deseja retirar na solução.

A capacidade da resina é normalmente expressa em termos de equivalentes/L (eq/L) de resina. Um equivalente é o peso molecular do composto em gramas dividido pela sua carga elétrica ou valência. Por exemplo, uma resina com capacidade de troca de 1 eq/L pode remover 32,5 g de zinco divalente ( $Zn^{+2}$ , peso molecular de 65).

#### **3.4.8. Regeneração concorrente e regeneração contracorrente**

As colunas são projetadas para utilizar a regeneração concorrente ou a contracorrente. Em unidades concorrentes, tanto a alimentação como a solução regenerante, fazem contato com a resina no fluxo descendente. Estas unidades têm custo de implantação menor, entretanto, utiliza o regenerante químico com menor eficiência do que o fluxo contracorrente.

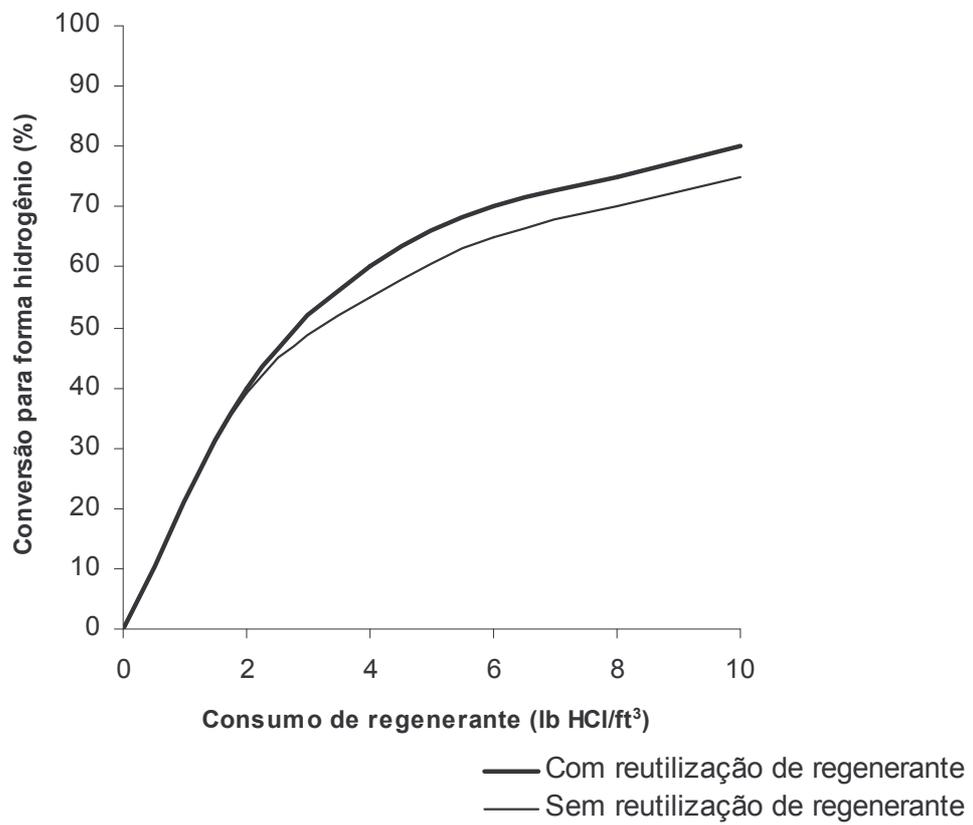
O uso eficiente de regenerantes químicos está diretamente relacionado com resinas de base forte ou resinas de ácido forte. As resinas fracamente ionizadas requerem concentrações do regenerante levemente maior do que a concentração estequiométrica para completar a regeneração, indiferente se utilizado o sistema concorrente ou contracorrente.

### 3.4.9. Reutilização do regenerante

Com sistemas de ácido forte ou base forte, pode-se melhorar a eficiência química, reutilizando-se parte do regenerante. Em sistemas de resinas fortemente ionizados, o grau de regeneração da coluna é o maior fator que determina a eficiência química do processo de regeneração. Uma troca teórica de 42% requer 1,4 vezes a quantidade estequiométrica de reagente [ $2\text{lb HCl/ft}^3$  ( $32\text{ g HCl/L}$ )]. Para aumentar a capacidade de troca para 60% ,o consumo aumenta para 2,45 vezes a dose estequiométrica [ $5\text{lb HCl/ft}^3$  ( $80\text{ g HCl/L}$ )].

A necessidade de doses de ácido consideravelmente maior do que a quantidade estequiométrica indica que há uma concentração significativa de ácido no regenerante. Dessa forma pode-se descartar a primeira parte do regenerante gasto e reservar a outra parte para reutilização.

Por exemplo, se uma dose de regenerante de  $5\text{ lb HCl/ft}^3$  ( $80\text{ g HCl/L}$ ) foi usado no sistema de resina da figura 12, os primeiros 50% do regenerante gasto conteria somente 29% da concentração de ácido inicial. O resto do ácido regenerante conteria 78% da concentração de ácido original. Se esta segunda parte do regenerante for utilizado no próximo ciclo de regeneração antes do leito de resina fazer contato com  $5\text{ lb/ft}^3$  de HCl novo, a capacidade de troca aumentaria para 67% da capacidade teórica. A capacidade utilizável então aumentaria de 60 para 67% da capacidade teórica. A figura 13 mostra o aumento da capacidade de troca utilizando a reutilização de regenerante em relação a não reutilização do regenerante.



**Figura 13:** Efeito da reutilização de ácido na regeneração da resina sobre a eficiência química.



### **3.4.10. Desinfecção das resinas**

A desinfecção das resinas de troca iônica deve ser executada em resinas, fisicamente limpas e completamente exauridas, para evitar reações de oxido-redução, induzidas pela acidez ou basicidade residual da resina, resultando em uma desativação do agente desinfectante. Deve-se executar uma retrolavagem, seguida de uma exaustão da resina para neutralizar o pH do efluente.

Numerosos biocidas estão disponíveis, de vários fabricantes. Eles diferem essencialmente pelo seu espectro biológico: fungicida, bactericida, esporicida etc.

Sua atividade e o seu impacto sobre a integridade das resinas são influenciados principalmente pela concentração, temperatura e tempo de contato a qual eles são utilizados. Em casos de desinfecção que se requerem a aplicação de um biocida especial (água para consumo, açúcar, produtos farmacêuticos), deve-se avaliar o impacto químico do agente de desinfecção em condições particular de uso tanto do trocador iônico como do produto resultante do processo de troca iônica.

Apesar da alta eficiência como biocida do grupo quaternário de amônia, eles não são compatíveis com resinas de troca catiônica.

Embora tenha sido freqüentemente utilizado, o formaldeído tem sido desaconselhado como agente desinfectante.

Atualmente os agentes desinfectantes mais utilizados são hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio. O hipoclorito de sódio pode ser aplicado a uma concentração de 0,12 a 0,25% (pH 9), com um mínimo de 0,5 volumes-leito. O tempo de contato apropriado é de 20 a 30 minutos e não deve ser excedido,

especialmente para trocadores aniônicos. Após uma lavagem de dois volumes-leito, deve-se fazer uma regeneração dupla, para converter a resina em sua forma iônica apropriada.

Peróxido de hidrogênio a 0,2% pode ser aplicado com um tempo de contato de 15 minutos, já na concentração de 0,05% por duas horas. Isto deve ser seguido de uma lavagem para eliminar o peróxido e então efetuar uma regeneração dupla.

Ácido peracético, estabilizado por peróxido de hidrogênio, também pode ser utilizado como agente de desinfecção. Este produto é mais largamente utilizado devido a ausência de resíduos tóxicos, uma vez que o ácido peracético se converte em ácido acético, que pode ser livremente consumido e peróxido de hidrogênio que se converte em água e oxigênio.

### **3.4.11. Problemas operacionais de origem mecânica**

#### **3.4.11.1. Retro-lavagem imprópria.**

Faz-se a operação de retro-lavagem para limpar o leito de materiais particulados que podem ter-se infiltrado durante o ciclo de operação. Um fluxo de retro-lavagem insuficiente pode resultar em um acúmulo de todos os sólidos suspensos no topo do leito de resina, sem serem removidos da coluna de troca iônica. Isto provavelmente contribui para a formação de canais através do leito de resinas, resultando numa perda de capacidade do leito devido a não utilização de

parte da resina presente na coluna. Fluxo excessivo tem resultado oposto. Além dos sólidos removidos pode haver arraste da resina, resultando numa perda de capacidade, devido a perda de resina.

#### **3.4.11.2. Regenerante insuficiente**

Quando o regenerante químico não entra em contato com a resina de troca iônica em concentração apropriada e tempo apropriado, ocorre uma redução da capacidade de troca. Isto pode ocorrer, principalmente devido a quantidade de regenerante ter sido calculada inadequadamente ou ter sido excessivamente diluída. A medida da densidade do efluente durante a etapa de regeneração freqüentemente resolve esta dificuldade.

#### **3.4.11.3. Vazão inadequada**

Vazões diferentes da recomendada, ou particularmente excessiva, pode as vezes ultrapassar a capacidade cinética da resina, principalmente em resinas de base fraca ou ácido fraco. Isto resulta em um produto de baixa qualidade.

#### **3.4.11.4. Presença de sólidos suspensos na alimentação.**

A resina deve ter como característica uma capacidade de filtração excelente. A presença de sólidos suspensos pode resultar em entupimento do leito da resina e formação de canais através do leito, causando uma saturação prematura e perda da capacidade. Esta condição pode ser controlada por um melhor pré-

tratamento da alimentação. Pode-se também controlar através de ciclos mais curtos e remoção dos sólidos filtrados do leito de resinas através de uma retro-lavagem.

#### **3.4.11.5. Regenerante contaminado**

Pode-se obstruir um leito de resina pelo uso de regenerantes contaminados. Isso resulta na formação de canais e redução da capacidade de troca iônica. O melhor exemplo deste problema é a contaminação da soda cáustica por ferro.

#### **3.4.12. Redução no desempenho da resina**

Problemas operacionais em sistemas de troca iônica devido a instabilidade da resina são normalmente devidos a quatro fatores: a perda de capacidade da resina, integridade física, densidade e cinética da reação.

##### **3.4.12.1. Perda na capacidade**

A perda total da capacidade de troca de uma resina resultará na perda proporcional da capacidade do sistema de troca iônica. Uma vez perdida, a capacidade da resina não é re-estabelecida.

##### **3.4.12.2. Perda na integridade física**

Leitos com resinas quebradas normalmente resultam em um aumento da perda de carga na coluna. Partículas mais finas são removidas pela operação de

retro-lavagem e esta perda de partículas físicas da resina resultará em uma redução da capacidade do sistema de troca.

### **3.4.12.3. Perda na densidade da resina**

Isto resultará na eventual perda de resina através da retro-lavagem e conseqüente redução da capacidade do sistema.

### **3.4.13. Fatores que afetam a estabilidade da resina.**

Na síntese de resinas de troca iônica para aplicações comerciais, é importante considerar a resistência à degradação química e física. Os custos de reposição das resinas devem ser minimizados pela máxima economia na operação. A vida de uma resina é geralmente medida pelo número de ciclos ou anos de operação antes que a reposição seja necessária. Às vezes, a vida de uma resina é expressa em termos de perda percentual da capacidade operacional por ano. Na maioria das aplicações de deionização a perda de capacidade de uma resina de troca catiônica está entre 2 e 5% ao ano. A perda de capacidade de uma resina de troca aniônica está normalmente entre 5 e 25% por cento ao ano.

Seis fatores afetam a estabilidade de uma resina.

- Temperatura;
- Oxidação;
- Entupimento “Fouling”;
- Choque osmótico;

- Atrito mecânico;
- Radiação;

#### **3.4.13.1. Temperatura**

As temperaturas máximas são oferecidas apenas como recomendação. A maioria dos fabricantes recomenda uma temperatura máxima de operação para o material de troca iônica. Para resina de troca catiônica, foram estabelecidas temperaturas de 120 °C a 150 °C para a forma salina e ligeiramente menor para a forma ácida.

No caso das resinas aniônicas, foram estabelecidas temperaturas máximas de 30 °C a 60 °C, para resinas operando na forma OH<sup>-</sup> ou base livre, sendo que a forma de sal é mais estável. As temperaturas máximas são apenas recomendações. Dessa forma, uma limitação da temperatura a 100 °C não significa que a resina será instável acima e estável abaixo desta temperatura. Também é reconhecido que a degradação térmica é proporcional ao tempo e temperatura. Então uma exposição ocasional a uma temperatura acima do máximo por um breve período de tempo pode resultar apenas numa pequena ou nenhuma perda do desempenho. Entretanto, a temperatura máxima pode ser excedida sem efeitos desastrosos se o custo do processo permitir uma reposição da resina em um período de tempo relativamente curto.

### **3.4.13.2. Oxidação**

A exposição das resinas de troca iônica em ambientes altamente oxidativos pode reduzir a vida das resinas. Um dos oxidantes mais comuns encontrados na água é o cloro livre. Peróxido de hidrogênio, ácido nítrico, ácido crômico e ácido clórico também são responsáveis pela deterioração das resinas. Oxigênio dissolvido, sozinho, não causa declínio significativo no desempenho, mas combinado com metais pesados e/ou temperaturas elevadas, a aceleração das perdas pode ser significativa, particularmente em resinas aniônicas. Percebe-se o declínio da capacidade operacional, normalmente quando a perda já é superior a 25%. Resinas de base fraca, particularmente aquelas que possuem grupos de aminas terciárias, tem uma estabilidade maior do que as resinas de base forte. A oxidação de resinas de base fraca pode resultar na formação de grupos de ácidos fracos. Quando isto ocorre, a resina tende a reter sódio e requer um grande volume de água de lavagem após a regeneração.

### **3.4.13.3. Entupimento**

A sorção irreversível, ou uma precipitação dentro das partículas da resina, as vezes causa deterioração no desempenho da resina. O entupimento da resina de troca aniônica devido a sorção irreversível de um ácido orgânico de alto peso molecular é um problema inoportuno.

Embora o entupimento raramente ocorra com resinas de troca catiônica, ocorrem dificuldades devido a presença de polieletrólitos catiônicos. A precipitação

de materiais inorgânicos, tal como, sulfato de cálcio, pode as vezes causar dificuldades operacionais com resinas catiônicas. Isto pode ser evitado, eliminando o contato dos íons envolvidos e pode normalmente ser resolvido por uma lavagem ácida prolongada. Entupimentos com ferro ocorrem tanto em resinas aniônicas quanto catiônicas. Tais ocorrências são eliminadas, por tratamento próprio da resina ou prevenção.

Procedimentos de limpeza em resinas entupidas.

1. Contaminação orgânica pode ser limpa por:

NaCl 10% a quente;

NaCl 10%-NaOH 2% a quente;

NaClO 2-4%.

2. Precipitação de sílica,  $H_2SiO_3$ , pode ser limpa com NaOH 2-4% a quente (49 °C), a qual produz uma solução de  $Na_2SiO_3$ .

3. Precipitado de sulfato de cálcio pode ser limpo por contato com HCl em fluxo contracorrente.

4. Óleos e graxas podem ser limpas por detergente não iônico.

5. Silicatos de ferro podem ser limpos por ácido hidrofúrico.

#### **3.4.13.4. Choque osmótico**

A exposição alternada da resina a altas e baixas concentrações de eletrólito pode causar rachaduras e quebras devido a contração e expansão alternadas. Eventualmente ocorre significativa redução do tamanho das partículas,

causando um aumento da resistência ao fluxo e subsequente perda de resina. A resistência de um dado material ao choque osmótico pode ser determinada pela exposição da resina a ciclos de alta e baixa concentração. Por exemplo, um tratamento alternado da coluna de resinas com NaOH (4%), água, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (8%) e novamente água, constitui um teste severo e indicativo.

O tamanho de partículas é o fator mais importante no choque osmótico. As partículas menores, particularmente aquelas que passam em uma peneira 30 mesh (menor do que 0,6 mm) são consideravelmente mais resistentes a quebras do que partículas maiores.

#### **3.4.13.5. Atrito mecânico**

A estabilidade física das resinas de troca iônica é importante para prevenir perdas por atrito na operação da coluna. As perdas devido ao choque osmótico ou precipitação nos poros da resina são erroneamente relatados como atrito mecânico. Entretanto, podem ocorrer perdas devido ao atrito mecânico, quando a resina é submetida a forças mecânicas não usuais. Por exemplo, quebras são encontradas no movimento das resinas de um vaso para outro, tais como ocorre em alguns equipamentos contínuos em contracorrente. A combinação de vazão elevada e leito de resina profundo, também podem contribuir para a fratura da resina. As partículas maiores estão mais sujeitas ao atrito mecânico do que partículas menores.

#### **3.4.13.6. Radiação**

Geralmente, resinas de troca catiônica são adequadamente estáveis para quase todas as aplicações envolvendo radioatividade. A radiação pode destruir as ligações cruzadas da base polimérica da resina. Resinas de troca aniônica são menos estáveis frente a radiação, embora também sejam adequadas para uso em tais condições (DOW LIQUID SEPARATION).

### **3.5. ADSORÇÃO**

Há muito tempo é sabido que um sólido poroso pode reter volume relativamente grande de gases condensáveis. Já em 1777, Fontana notou que um carvão vegetal recém calcinado, e resfriado sobre mercúrio, foi capaz de reter, muitas vezes o seu próprio volume de vários gases. No mesmo ano, Scheele constatou que o ar expelido de um carvão vegetal em aquecimento era retido novamente no resfriamento, de modo que o ar chegou a preencher oito vezes o espaço ocupado pelo carvão.

Logo em seguida, observou-se que o volume retido variava de um carvão para outro e de um gás para outro. Saussure, em 1814, sugeriu que a eficiência do sólido dependia da área da superfície exposta. Por outro lado, Mitscherlich em 1843, enfatizou o sistema de poros de carvão. E estimou seu diâmetro médio  $1/2400$  in. Estes dois fatores, área superficial e porosidade (ou volume de poros), são ainda hoje utilizados no estudo do fenômeno de adsorção, não somente em carvões, mas em uma grande variedade de outros sólidos. Dessa forma, verifica-se que a medida

de adsorção de gases ou vapores representa uma informação valiosa da determinação da área superficial e da estrutura porosa de um sólido (MIOTTO, 2002).

O termo adsorção foi introduzido por Kayser em 1881, para conotar a condensação de gases em superfícies livres, ao contrário da absorção gasosa, onde as moléculas de gás penetram na massa do sólido absorvente. Adsorção tem sido internacionalmente definida como o enriquecimento ou empobrecimento de um ou mais componentes de uma fase em uma camada interfacial.

No caso de uma interface gás sólido, as moléculas do gás são atraídas para a zona interfacial como consequência de forças atrativas exercidas pela superfície.

As forças intermoleculares podem se dividir em dois grupos conforme sua natureza:

- Forças específicas que exigem uma característica particular das moléculas como, por exemplo, pontes de hidrogênio entre dois átomos de elevada eletronegatividade pertencente a moléculas distintas e atrações eletrostáticas entre moléculas polares ou com dipolos permanentes.
- Forças não específicas, forças dispersivas ou forças de London (pertencentes ao grupo das forças de Van der Waals), que estão sempre presentes, pois exigem apenas a presença de elétrons. Elas

resultam de uma polarização momentânea induzida por flutuações rápidas na densidade eletrônica das moléculas vizinhas.

É possível afirmar que o processo de adsorção é geral, pois mesmo na ausência de interações específicas existem sempre as forças de London para atraírem as moléculas da fase gasosa para a interface.

A adsorção é um processo exotérmico, portanto a quantidade de gás adsorvido no equilíbrio diminui quando a temperatura aumenta, e é geralmente muito pequena para temperaturas superiores a temperatura crítica.

Quando o processo envolve apenas forças de Van der Waals, não há alteração química das moléculas adsorvidas, e o calor de adsorção é pequeno, trata-se de uma sorção física. Eventualmente podem se estabelecer ligações químicas com sítios ativos da superfície, conduzindo à formação de um composto químico de superfície, ou complexo de adsorção que é da mesma ordem de grandeza dos calores de reação. No primeiro caso podem se formar camadas moleculares sobrepostas, enquanto que na adsorção química se forma uma única camada molecular adsorvida.

Quando um sólido poroso em um recipiente fechado é exposto a um gás a uma pressão definida, inicia-se a adsorção do gás e o processo é acompanhado por um aumento na massa do sólido e um decréscimo na pressão do gás. Após um tempo a pressão se torna constante e a massa deixa de aumentar, pois foi atingido o equilíbrio. A quantidade de gás adsorvido pode ser calculada a partir da queda de

pressão pela aplicação da lei dos gases se o volume do recipiente e do sólido forem conhecidos, ou pode ser determinado diretamente pelo aumento da massa de sólido.

No equilíbrio a quantidade de um dado gás adsorvido por um determinado adsorvente será tanto maior quanto maior for a área da interface e depende também das variáveis: pressão e temperatura.

### **3.6. PROCEDIMENTO INDUSTRIAL DE OBTENÇÃO DO CAMELO**

O caramelo é um subproduto da extração do esteviosídeo pelo processo utilizado pela Steviafarma Industrial S.A.

O processo de obtenção de todos os produtos da *Stevia rebaudiana Bertoni* em suas etapas básicas consistem de:

- Preparação do extrato aquoso
- Preparação do extrato orgânico
- Obtenção do esteviosídeo
- Obtenção do caramelo

Para a preparação do extrato aquoso, folhas moídas de estévia são misturadas com quantidade mínima de água fervente. A seguir o extrato aquoso é removido de forma que as folhas sejam separadas do líquido, permanecendo com o mínimo de umidade, aproveitando-se o máximo de extrato aquoso. Este extrato contém os princípios adoçantes, os pigmentos da planta e demais impurezas solúveis em água.

O extrato aquoso é extraído com qualquer um dos álcoois de quatro a oito carbonos em mistura com um solvente menos polar como o benzeno, clorofórmio, hexano etc. Esta operação transfere os princípios adoçantes e os pigmentos para a fase orgânica da mistura, acompanhados de algumas poucas impurezas. A fase orgânica é então submetida à concentração até a formação de uma massa semi-sólida. A massa sólida obtida na operação anterior é redissolvida, em álcool e deixa da em repouso para cristalizar. Os cristais de esteviosídeo impuros são separados da solução por centrifugação e lavados com álcool frio.

A água mãe da primeira cristalização contém traços residuais de esteviosídeo demais princípios adoçantes, principalmente o rebaudiosídeo A, pigmentos da planta, principalmente a clorofila e ainda algumas impurezas. A mistura dos princípios adoçantes é denominado extrato doce ou caramelo. Para a obtenção do extrato doce, a água mãe da primeira cristalização é evaporada sob vácuo, produzindo-se um xarope denso, porém fluido. Esse xarope é então recolhido e misturado com acetona anidra. Forma-se, então um precipitado verde que consiste em um agregado acetônico de esteviosídeo, traços de clorofila e grande quantidade de rebaudiosídeos. A acetona contida no agregado precipitado é removida pelo aquecimento do mesmo em estufa à temperatura em torno de 100 °C.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. MATERIAIS**

#### **4.1.1. Caramelo**

O Caramelo utilizado neste experimento foi retirado do lote 019 C, fornecido pela Steviafarma Industrial S/A.

#### **4.1.2. Colunas de troca iônica.**

Optou-se por testar quatro resinas, sendo cada uma com um grupo trocador, ou seja: coluna aniônica base forte, coluna catiônica de ácido forte, coluna aniônica base fraca e coluna catiônica de ácido fraco.

Foram utilizadas resinas de troca iônica da Rohm and Haas, cujas especificações seguem abaixo, e foram escolhidas principalmente devido a suas aplicações.

##### **Coluna 1: Amberlite IRA -958-Cl**

Recomendada pelo fabricante para remoção de cor.

Resina aniônica base forte, macro-reticular.

Boa adsorção e eluição de matéria orgânica. Alta eficiência na remoção de cor em sucos fortemente coloridos. Pode ser usado sozinho ou como resina de polimento.

Regeneração com NaOH (10%), consumo de 3,0 Volumes Leito.

Capacidade total mínima (eq/L): 1,0

### Coluna 2: Amberlite 252 Na

Resina catiônica de ácido forte, macro-reticular com excelente resistência mecânica e osmótica. Recomendada para descalcificação de caldo de cana ou suco de beterraba.

Operação no ciclo do hidrogênio, para remoção dos cátions.

As suas propriedades estão descritas na tabela 1.

**Tabela 1:** Propriedades da resina catiônica de ácido forte Amberlite 252-Na

Matriz	Copolímero de estireno e divinilbenzeno
Grupo funcional	--SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Capacidade de troca	> 1,80 eq/L
Densidade	730 a 810 g/L
Regeneração	Solução de HCl (2,0 volumes-leito)
Tem. Máxima de operação	100 °C
Vazão de serviço	5 a 40 volumes-leito/h

### Coluna 3: Amberlite IRA – 96 SB

Amberlite IRA 96-SB é uma resina de troca iônica de base fraca, macro-reticular. O alto grau de porosidade desta resina promove adsorção eficiente de moléculas orgânicas grandes e desorção durante a regeneração, deste modo permite excelente proteção contra “fouling” orgânico. Operação no ciclo hidroxila, para remoção dos ânions e ajuste do pH assim como eliminação final de cor.

As suas propriedades estão descritas na tabela 2:

**Tabela 2:** Propriedades da resina aniônica de base fraca Amberlite IRA 96-SB

Matriz	Copolímero de estireno e divinilbenzeno
Grupo funcional	Amina terciária
Capacidade de troca	> 1,25 eq/L
Densidade	610 a 690 g/L
Regeneração	Solução de NaOH (2,0 volumes-leito)
Temp. máxima de operação	100 °C
Vazão de serviço	5 a 40 volumes-leito/h

#### **Coluna 4: Amberlite IRC 50**

Resina catiônica de ácido fraco, macro-reticular.

Operação no ciclo hidroxila, para remoção de cátions.

Capacidade mínima total (eq/L): 3,0.

Todas as resinas são recomendadas para a indústria alimentícia, com aprovação junto aos órgãos de saúde.

#### **4.1.3. Reagentes:**

- Para regeneração das colunas catiônicas utilizou-se ácido clorídrico P.A. marca Nuclear.
- Para regeneração das colunas aniônicas utilizou-se Hidróxido de sódio P.A. marca Nuclear.

- Para lavagem inicial das colunas utilizou-se álcool etílico 96 °GL fornecido pela Usina Santa Terezinha.
- Para sanitização das colunas de Troca Iônica utilizou-se ácido peracético, fornecido pela Solvay-Peróxidos do Brasil Ltda.
- Para as análises de cromatografia, utilizou-se Acetonitrila grau HPLC, marca OMNISOLV.
- Para regeneração da coluna aniônica com 25 L de resinas utilizou-se hidróxido de sódio comercial.
- Para regeneração da coluna catiônica com 25 L de resinas, utilizou-se ácido clorídrico comercial.

#### **4.1.4. Equipamentos**

- Cromatógrafo Líquido de alta Eficiência Modelo HP 1090 acoplado a um detector de Ultravioleta. Coluna para cromatografia Merck Lichrocart 125-4 tipo Lichrospher 100 NH<sub>2</sub> – 5 µm.
- Balança Filizola MFI-100, capacidade de 100 ± 0,02 Kg.
- Balança analítica OHAUS – Adventurer – capacidade de 210 ± 0,0001 g.
- Estufa de Secagem e Esterilização, marca FANEM. Modelo 315 – SE.
- Espectrofotômetro digital marca Micronal B-342 II.
- Evaporador rotativo Quimis.

- Conjunto de colunas de troca iônica com capacidade de 4 litros de resina, confeccionado em PVC.
- Conjunto de colunas de troca iônica com capacidade de 25 litros de resina, confeccionado em PVC.
- Bomba centrífuga modelo Dancor Pratika CP-4C P. Term.
- Filtro de cartucho de celulose abertura de 1  $\mu\text{m}$ , marca Millipore.
- Filtro Millex LCR com membrana PTFE modificada para filtração de solventes orgânicos e aquosos 0,45  $\mu\text{m}$ , 13 mm.
- Refratômetro de Brix Quimis, modelo Q-107-A1 com compensação automática de temperatura.
- Deionizador Permuton
- Espectrofotômetro UV-VIS (HITACHI U-200).

## **4.2. METODOLOGIA DE CLARIFICAÇÃO**

### **4.2.1. Testes de clarificação da solução de caramelo com resinas de troca iônica em sistema de batelada**

Foram realizadas testes em batelada com a finalidade de determinar as melhores condições de clarificação e purificação da solução de caramelo.

#### **4.2.1.1. Preparação da Solução de Caramelo.**

Tomando como base a solução de caramelo de concentração 9% (9 g/100 mL), para uma solução de 1 L, pesou-se 90 g de caramelo em pó, e dissolveu-se com água deionizada, de modo que a solução final atingisse um volume de 1L, medido em balão volumétrico. Esta solução de coloração marrom escura foi em seguida filtrada em papel qualitativo, adicionando-se à solução 2 g de conservante sorbato de potássio.

#### **4.2.1.2. Regeneração das resinas para utilização em sistema batelada**

As resinas para os testes em batelada foram regeneradas seguindo o procedimento de regeneração em colunas, descrito no item 4.2.2.2

As resinas foram acondicionadas em colunas, lavadas e regeneradas e em seguida foram retiradas das colunas e armazenadas em meio aquoso para uso. Adotou-se este procedimento, devido a necessidade de uma alta eficiência na regeneração. É sabido que regeneração em batelada tem pouca eficiência de troca.

#### **4.2.1.3. Clarificação da solução de caramelo com resinas de troca iônica.**

Para o estudo da clarificação da solução de caramelo foram utilizadas misturas das resinas Amberlite IRA 96-SB (aniônica de base fraca), Amberlite 958-Cl (aniônica de base forte), Amberlite 252-Na (catiônica de ácido forte) e Amberlite IRC-50 (catiônica de ácido fraco) como ilustrado na Tabela 3.

Alíquotas de 100 mL de solução 9% de caramelo (p/v) em água deionizada preparadas como descrito no item 4.2.1.1., foram tratadas com quantidades de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 g de misturas de resinas por 30 minutos, sob agitação de 45 rpm e temperatura ambiente.

**Tabela 3:** Composição das resinas mistas

Amostra	Resina 1 (50%)	Resina 2 (50%)
RA	Amberlite IRA-96-SB	Amberlite 252-Na
RB	Amberlite IRA-96-SB	Amberlite IRC-50
RC	Amberlite 958-Cl	Amberlite 252-Na
RD	Amberlite 958-Cl	Amberlite IRC-50

A porcentagem de clarificação e o teor de adoçantes nas amostras de caramelo tratadas foram determinados como descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.2 respectivamente.

#### **4.2.1.4. Efeito da concentração da solução de caramelo na clarificação utilizando-se a mistura de resinas de troca iônica selecionada.**

Foram preparadas soluções de caramelo nas concentrações 9, 11, 13 e 15% de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.1.1.

Alíquotas de 100 mL das soluções de caramelo com diferentes concentrações foram tratadas com 20 g da mistura das resinas Amberlite 96-SB e

Amberlite 252-Na na proporção (50%:50%), durante 30 minutos com agitação a 45 rpm, a temperatura ambiente.

A porcentagem de clarificação e o teor de adoçantes nas amostras de caramelo tratadas foram determinados como descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.2 respectivamente.

#### **4.2.1.5. Teste de saturação das resinas.**

Este procedimento consistiu em exaurir a capacidade de adsorção das resinas, colocando em contato com as resinas usadas uma nova solução de caramelo, até que não fosse observada qualquer clarificação da solução.

Alíquotas de 100 mL de solução 9% de caramelo em água deionizada foram adicionadas a 20 g de mistura das resinas Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na (50%:50%) e mantidas durante 30 minutos sob agitação de 45 rpm, a temperatura ambiente.

#### **4.2.1.6. Teste de clarificação máxima da solução de caramelo com mistura das resinas de troca iônica.**

Da mesma forma como se pretendeu exaurir a capacidade de troca das resinas, viu-se necessário a determinação, a clarificação máxima que a solução de caramelo pode alcançar.

Amostras de 100 mL de solução 9% de caramelo foram tratadas repetidamente com 20g da mistura de resinas novas Amberlite IRA-96-SB e

Amberlite 252-Na (50%:50%), durante 30 minutos sob agitação constante a temperatura ambiente, até que não houvesse mudanças na coloração da solução de caramelo.

A porcentagem de clarificação e o teor de adoçantes nas amostras de caramelo tratadas foram determinados como descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.2 respectivamente.

#### **4.2.2. Testes de clarificação da solução de caramelo em colunas de troca iônica**

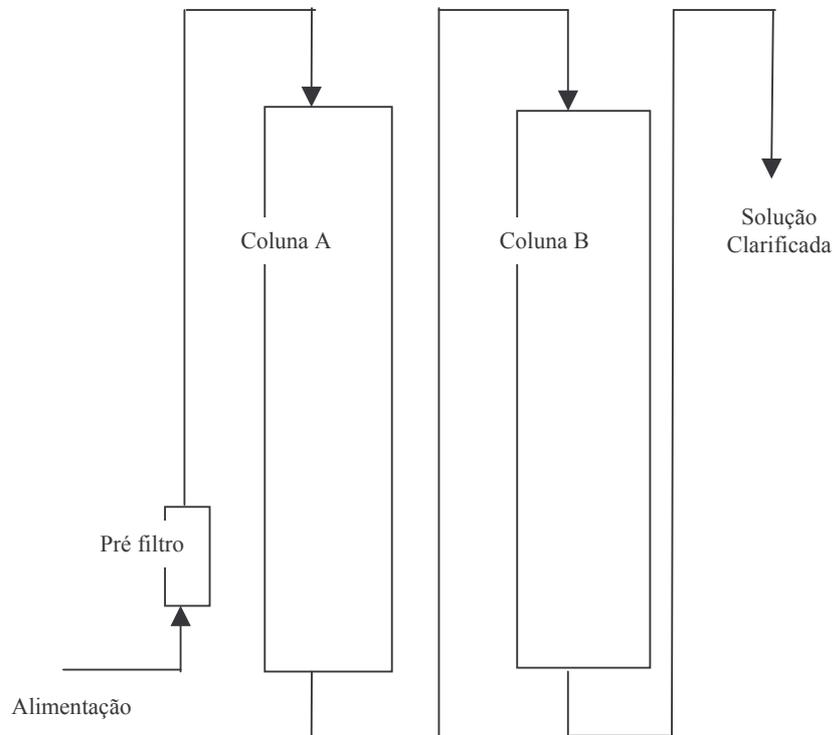
Os estudos de clarificação da solução de caramelo em colunas de resinas de troca iônica selecionadas foram executados em planta piloto, para que os dados obtidos pudessem ser extrapolados para o processo industrial.

##### **4.2.2.1. Preparação da coluna**

As resinas Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, selecionadas no teste em bateladas (item 4.2.1.3) foram empacotadas em colunas construídas com tubos PVC Tigre de 75 mm de diâmetro e um metro de altura, com volume útil de 4,5 L. Cada coluna recebeu 4,0 L de resina. Inicialmente as resinas foram lavadas com nove litros de álcool etílico 96 °GL, e em seguida lavadas com igual volume de água deionizada.

O conjunto foi montado sobre estrutura metálica. A solução de caramelo foi bombeada para a coluna em fluxo descendente, através de uma bomba centrífuga. O fluxo foi controlado através de um registro tipo globo com abertura de

0,25 in. Para a regeneração do sistema foram utilizadas duas bombonas plásticas como reservatório e a solução foi eluída para a coluna por gravidade. O sistema de clarificação da solução de caramelo em colunas de troca iônica está ilustrado na Figura 14.



**Figura 14:** Sistema de colunas de troca iônica utilizada para clarificação de solução de caramelo.

#### 4.2.2.2. Regeneração das resinas

As colunas foram regeneradas conforme procedimento descrito nas tabelas 4 e 5.



**Tabela 4:** Esquema para regeneração da resina catiônica forte – Amberlite 252-Na

Coluna A – Catiônica Forte – Amberlite 252 – Na						
Passos	Tempo (min)	Serviço	Sentido	Vazão (BV/h)	Fluido	Volume (BV)
1	15	Retrolavagem	▲	4	Água	1
2	30	Injeção HCl	▼	4	HCl 7%	2
3	30	Lavagem lenta	▼	4	Água	2
4	30	Lavagem rápida	▼	8	Água	4

**Tabela 5:** Esquema para regeneração da resina aniônica fraca – Amberlite 96-SB

Coluna B – Aniônica Fraca – Amberlite 96 SB						
Passos	Tempo (min)	Serviço	Sentido	Vazão (BV/h)	Fluido	Volume (BV)
1	15	Retrolavagem	▲	4	Água	1
2	30	Injeção NaOH	▼	4	NaOH 5%	2
3	30	Lavagem lenta	▼	4	Água	2
4	30	Lavagem rápida	▼	8	Água	4

#### 4.2.2.3. Preparação da solução de caramelo

Foram preparadas soluções aquosas de caramelo nas concentrações de 9%, 11%, 13% e 15%.

O caramelo foi pesado e dissolvido em um tanque de 100 litros, com água deionizada. A água utilizada foi previamente deionizada para evitar a interferência de sais inorgânicos no processo de clarificação e regeneração das resinas. As

concentrações das soluções foram monitoradas por um refratômetro de Brix e os teores de adoçantes foram determinados por CLAE, como descrito no item 4.3.2.

A solução foi deixada decantar por duas horas e em seguida filtrada em um filtro de celulose tipo cartucho, com abertura de 1  $\mu$ .

#### **4.2.2.4. Efeito da vazão na clarificação da solução de caramelo em colunas de troca iônica**

Foi utilizado o conjunto de colunas descrito no item 4.2.2.1. A solução de caramelo 9% foi eluída no sentido descendente.

Iniciaram-se os testes com uma vazão de 40 volumes-leito/hora. Em seguida foram efetuados testes com vazões de 30 volumes-leito/hora, 10 volumes-leito/hora e cinco volumes-leito/hora.

A solução de caramelo foi eluída pela coluna e nos testes utilizando-se vazões de 40, 30 e 10 volumes-leito/h as amostras foram retiradas a cada dez minutos. No teste usando-se vazão de cinco volumes-leito/h as amostras foram coletadas a cada 20 minutos para análise de adoçantes totais, teor de sólidos dissolvidos ( $^{\circ}$ Brix), e porcentagem de clarificação.

#### **4.2.2.5. Efeito da concentração da solução de caramelo na clarificação em colunas de troca iônica**

Este teste teve por finalidade, uma vez definida a vazão de trabalho mais adequada, determinar a concentração de solução de caramelo que obtivesse

melhores resultados de clarificação. Foram preparadas soluções de caramelo com quatro concentrações diferentes: 9%, 11%, 13% e 15%. A metodologia de preparo está descrita no item 4.2.2.3.

A solução de caramelo foi eluída pelas colunas de resina Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na e as amostras foram coletadas a cada 20 minutos. Analisou-se o teor de adoçantes totais, teor de sólidos dissolvidos e porcentagem de clarificação.

#### **4.2.2.6. Curva de ruptura e ponto de exaustão**

Um conceito de ampla aplicação na determinação do equilíbrio de troca iônica em sistema de leito fixo é a chamada “zona de transferência de massa” (ZTM), em que a resistência total a transferência de massa é expressa em termos de uma quantidade relativa de resina necessária ao equilíbrio. O movimento da ZTM ao longo do leito pode ser verificado visualmente, mas o seu acompanhamento é realizado com mais facilidade através do monitoramento da concentração do soluto do efluente.

O movimento da ZTM pode ser representado pelas curvas de ruptura, nas quais a ordenada corresponde à concentração do efluente (C) e a abscissa corresponde à duração do fluxo através da coluna, ou seja, o tempo (t) de percolação da solução pelo leito ou ainda volume (V) de solução que atravessou o leito.

O ponto de ruptura é definido arbitrariamente, sendo usualmente considerado quando a concentração do efluente alcança um valor igual a 5% da

concentração da alimentação. O ponto de exaustão é considerado quando a concentração do efluente for igual a concentração da alimentação, ou seja, a capacidade de troca da resina estiver completamente esgotada (RUPP, 1996).

Tanto o ponto de ruptura quanto o ponto de exaustão podem ser expressos em volumes-leito, ou seja, a razão entre o volume total tratado e o volume do leito de resina.

Estes parâmetros foram monitorados através da avaliação da clarificação, na vazão de 5 volumes-leito/hora em uma solução de caramelo a 9% de concentração.

#### **4.2.2.7. Teste de vida útil das resinas.**

Este procedimento consistiu em exaurir a capacidade de adsorção das resinas, proceder à regeneração e novamente exaurir a capacidade de troca da resina. O procedimento foi repetido para verificar o número de regenerações possíveis nas resinas, sem que houvesse perda significativa de sua eficiência.

Estes estudos foram realizados em colunas construídas com tubos de PVC Tigre de 150 mm de diâmetro e 1500 mm de altura. Cada coluna foi empacotada com 25 L de resina.

Após o empacotamento, as resinas Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na foram lavadas com 50 L de álcool etílico 96 GL, e em seguida lavadas com igual volume de água. Foram utilizados neste teste os resultados mais expressivos dos

anteriores, ou seja, a vazão de 5 volumes-leito/hora e concentração de 9% na solução de caramelo.

A vazão de 5 volumes-leito/h foi controlada através de um registro globo com abertura de 0,25 in. Utilizou-se uma bomba centrífuga Dancor Pratika CP-4C P. Term.

A solução 9% de caramelo foi preparada em um tanque de 500 L, com água deionizada. A água utilizada foi previamente deionizada para evitar a interferência de sais inorgânicos no processo de clarificação e regeneração das resinas. As concentrações das soluções foram monitoradas por um refratômetro de Brix e os teores de adoçantes foram determinados por CLAE. A solução foi deixada decantar por duas horas. No conjunto de colunas foi incorporado um filtro de cartucho, com elemento filtrante de polipropileno com abertura de 1,0  $\mu$  como ilustrado na Figura 14.

Considerou-se clarificado, o produto que atendia a uma absorvância de 0,05 a 420 nm e 0,001 a 670 nm em uma solução com 4% de concentração. Estes valores correspondem a uma clarificação superior a 90%, entretanto optou-se pela medida de absorvância, uma vez que são parâmetros aceitos comercialmente. Considerou-se a coluna saturada, quando se atingiu o ponto de exaustão.

A solução de caramelo com valores de absorvância superior ao especificado, foi novamente clarificada em uma coluna regenerada, que em seguida recebia solução de caramelo inicial, até atingir o ponto de exaustão.

Após saturação as colunas foram regeneradas, conforme procedimento descrito no item 4.2.2.2. e novamente submetidas ao processo de clarificação.

#### **4.2.2.8. Desinfecção das resinas**

As resinas são passíveis de infecção e por isso efetuou-se uma desinfecção semanal utilizando-se ácido peracético.

Devido a alta contaminação por matéria orgânica ao final do ciclo operacional, foi feito um tratamento com salmoura alcalina antes da desinfecção com ácido peracético.

Preparou-se aproximadamente quatro volumes-leito de uma solução contendo NaOH 2% (20 g/L) e NaCl 10% (100 g/L). Procedeu-se a limpeza a 45 °C.

Inicialmente, lavou-se a resina em fluxo contracorrente. Em seguida foi percolado vagarosamente dois volumes-leito da solução por aproximadamente duas horas. Deixou-se a solução em repouso dentro da coluna por uma noite. Em seguida percolou-se os dois volumes-leito restante, por uma hora. Lavou-se a coluna com dois volumes-leito de água deionizada (dois volumes-leito/hora). Em seguida aumentou-se a vazão da água até fluxo normal.

Após o tratamento com salmoura alcalina a coluna foi drenada e introduziu-se um volume-leito de ácido peracético a 0,2% de concentração através do pé da coluna. Deixou-se em contato por uma hora. Em seguida procedeu-se a lavagem das colunas e finalmente procedeu-se a regeneração conforme item 4.2.2.2.

A eficiência da sanitização foi verificada através da análise de Coliformes Totais. Utilizou-se a técnica do número mais provável, descrito a seguir:

Preparou-se o meio de cultura (caldo lactosado ou caldo lauril sulfato triptose) em quantidade suficiente para análise. Identificou-se três séries de cinco tubos contendo o caldo lactosado (15 tubos para cada amostra). Transferiu-se 10 mL de meio de cultura para cada tubo contendo tubos de Durham invertidos e autoclavou-se por 15 minutos a 121 °C. O conservante foi inativado com uma solução de 0,3 g de lecitina e 3 mL de Tween 80 (Polisorbato) em 90 mL de meio de cultura, autoclavado previamente. Transferiu-se 10 mL da amostra para a solução inativante. Após 15 minutos o conservante foi inativado.

Transferiu-se 1 mL da amostra inativada para a primeira série de tubos. Em seguida transferiu-se 1 mL da série anterior para a série de tubos seguinte. Transferiu-se novamente 1 mL da série anterior para a série de tubos seguinte. Foi feito um controle adicionando-se 10 mL de meio de cultura em tubo de ensaio. As amostras foram incubadas a 35°C, durante 24 – 48 h. Após 24 horas, foi feita uma leitura. Quando o resultado foi positivo houve formação de gás no tubo de Durham. Para os tubos que deram resultado negativo, incubou-se por mais 24 horas a 35°C e realizou-se nova leitura. Os resultados foram calculados com base na tabela de NMP. Este resultado foi referente a coliformes totais. Quando os tubos apresentavam resultados positivos, foi necessária uma pesquisa de Coliformes totais. Os tubos positivos foram repicados em tubos com 10 mL de caldo EC com tubos de Durham. As amostras foram incubadas a 35°C por 18 a 24 horas. Considerou-se

positivo os tubos que apresentavam formação de gás. Os resultados foram calculados com base na tabela de NMP (Anexo I).

### **4.3. METODOLOGIA ANALÍTICA**

#### **4.3.1. Avaliação da clarificação**

Para o estudo da clarificação da solução de caramelo em colunas de troca iônica foram feitas curvas de calibração da solução de caramelo nos comprimentos de onda, de absorção máxima verificados no espectro de varredura. Esta curva de calibração teve por objetivo determinar, além da clarificação da solução, o comportamento da solução ao longo do processo.

A clarificação nos testes em coluna foi definida tomando-se apenas a absorvância da solução em pontos de máximo.

$$\% \text{ despigmentação} = \left( 1 - \frac{D}{A} \right) \times 100$$

Onde:

A = Absorvância no  $\lambda_{\text{máx}}$ . (420 nm e 670 nm) antes da purificação.

D = Absorvância no  $\lambda_{\text{máx}}$  (420 nm e 670 nm) depois da purificação.

#### **4.3.2. Determinação dos princípios adoçantes no caramelo**

As análises de esteviosídeo e rebaudiosídeo A nas amostras de solução de caramelo foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência HP1090

equipado com detector de Ultravioleta 210 nm e detector de índice de refração e coluna Lichrocart de NH<sub>2</sub> de 125 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno como descrito por HASHIMOTO & MORIYASU (1978).

A fase móvel foi preparada pela mistura de 800 mL de acetonitrila (grau HPLC, filtrada em filtro Millipore 0,45 µm) e 200 mL de água (destilada, filtrada em filtro Millipore de acetato de celulose cód LCR-JBR13LCRI Millipore com abertura de 0,45 µm). A fase móvel foi degaseificada. Utilizou-se um fluxo de 1,5 mL/min.

Os padrões de esteviosídeo e rebaudiosídeo A foram secos a 105 °C por duas horas e resfriados em um dessecador. Pesou-se exatamente 5,000 mg dos padrões (Wsa) e dissolveu-se completando o volume para 10 mL com a fase móvel. As soluções foram filtradas em filtro Millipore 0,45 µm.

Para construção da curva-padrão de esteviosídeo utilizaram-se as seguintes concentrações: 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mg/mL. As análises foram feitas em triplicata. A curva-padrão com os resultados analíticos podem ser observados no Anexo II.

As amostras foram aquecidas 105 °C por duas horas e resfriadas em um dessecador. Pesou-se exatamente 5,000 mg da amostra teste (W) e dissolveu-se completando o volume para 10 mL com a fase móvel. As soluções foram filtradas em filtro Millipore, 0,45 µm ou equivalente. As soluções de caramelo foram analisadas utilizando o mesmo procedimento, sendo utilizado a curva-padrão de esteviosídeo. Foram injetadas alíquotas de 20 µL de amostra. Os testes foram feitos

em duplicata. Os tempos de retenção do esteviosídeo e do rebaudiosídeo A foram confirmados pelos padrões. O coeficiente de variação (100 x desvio padrão dividido pela média das áreas) para as áreas não deve exceder a 2%.

Cálculos:

$$\% \text{ Esteviosídeo} = \frac{W_{sa}}{W} \times \frac{A_a}{A_{sa}} \times 100$$

$$\% \text{ Rebaudiosídeo A} = \frac{W_{sa}}{W} \times \frac{A_c}{A_{sa}} \times 1,20 \times 100$$

Onde :

$W_{sa}$  = Peso do padrão em mg

$W$  = Peso da amostra em mg

$A_{sa}$  = Área do pico do esteviosídeo na solução padrão

$A_a$  = Área do pico do esteviosídeo na amostra

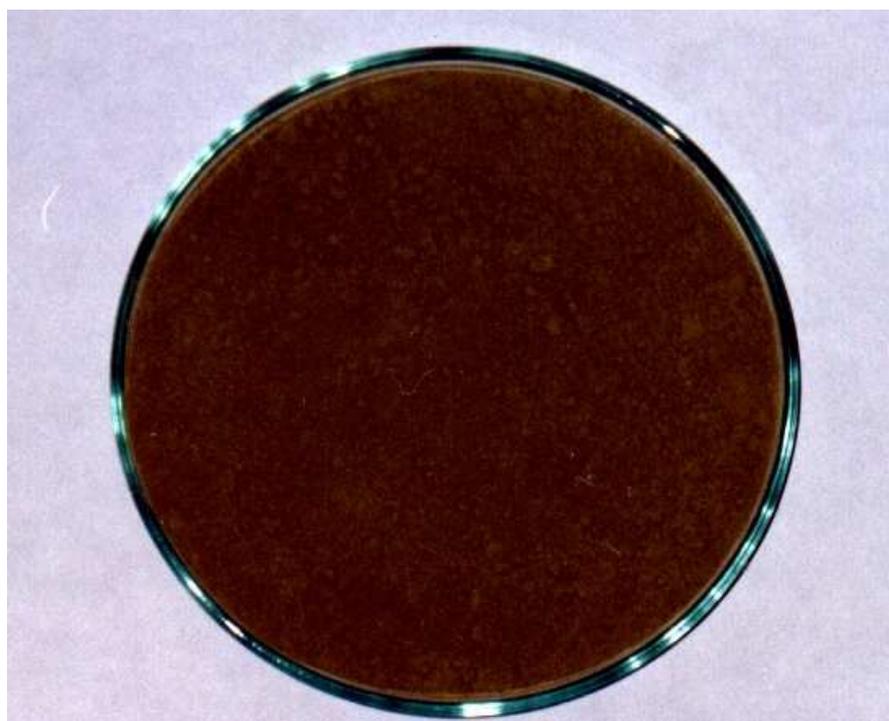
$A_c$  = Área do pico do rebaudiosídeo A na amostra

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES:

### 5.1. CARACTERÍSTICAS DO CAMELO

#### 5.1.1. Conteúdo de esteviosídeo e rebaudiosídeo A no caramelo

O caramelo em pó (Figura 15), subproduto da obtenção do esteviosídeo apresentou 20,45% de esteviosídeo e 22,78% de rebaudiosídeo A (Tabela 6).



**Figura 15:** Placa de Petri contendo amostra do caramelo em pó, conforme é retirado do processo.



**Tabela 6:** Composição do caramelo utilizado no experimento.

Forma Física	Esteviosídeo (%)	Rebaudiosídeo A (%)	Brix	Pureza
Pó	20,45	22,78	-	43,23
Solução 9% de caramelo	1,75	1,99	9,0	41,55
Folha de Estévia	6,2	2,4	-	

Os resultados analíticos do caramelo foram confirmados, mediante a análise da solução de caramelo 9% que também pode ser observado na Tabela 6. A proporção dos adoçantes tanto na solução de caramelo quanto no pó se apresentam de forma semelhante. A solução de caramelo 9% pode ser visualizada na Figura 16.

O caramelo apresenta em sua composição uma grande concentração de rebaudiosídeo A, quando comparado com a existente na folha de estévia (Tabela 6).

Esta grande concentração de rebaudiosídeo A no caramelo torna atraente a sua recuperação para utilização como adoçante. (GOTO & CLEMENTE, 1998).





**Figura 16:** Tubo contendo solução de caramelo a 9% de sólidos dissolvidos totais.

### **5.1.2. Avaliação dos comprimentos de onda de absorção da solução de caramelo**

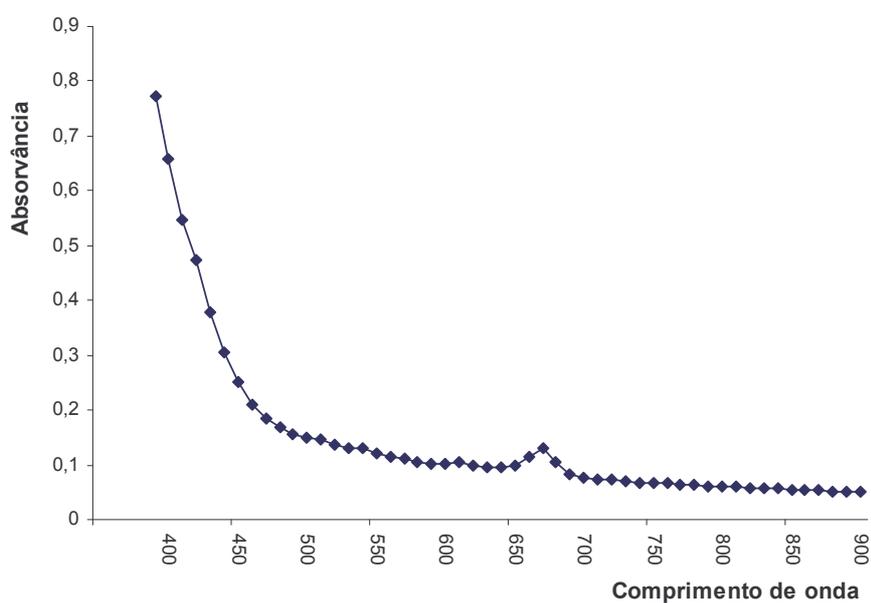
A solução de caramelo a 9% apresenta coloração verde escura quase preta, devido a pigmentos foliares presentes estévia, tais como clorofila e carotenóides, que não puderam ser eliminados no processo de obtenção do esteviosídeo.



Devido a coloração escura da solução, não foi possível medir a absorvância da solução em diferentes comprimentos de onda, sendo necessária a sua diluição para uma concentração de 0,5%.

A Figura 17 ilustra a varredura realizada de 400 nm a 900 nm, a partir da solução de caramelo antes do processo de purificação, de onde se observam picos de absorção em 420 nm e 670 nm, conforme descrito por MORAES (2000) e FUH & CHIANG (1990).

Dessa forma adotaram-se os dois comprimentos de onda para avaliação do processo de clarificação e para a determinação do ponto de ruptura.



**Figura 17:** Perfil de absorvância da solução 0,5% de caramelo na faixa de 400 a 900 nm.



## **5.2. TESTES DE CLARIFICAÇÃO DA SOLUÇÃO DE CAMELO EM BATELADA.**

### **5.2.1. Clarificação da solução de caramelo com resinas de troca iônica**

As amostras de 100 mL de solução 9% de caramelo foram clarificadas com quantidades de 5 a 30 g de misturas de resinas como descrito no item 4.2.1.3.

#### **5.2.1.1. Clarificação da solução 9% de caramelo com a mistura de resinas RA (Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na)**

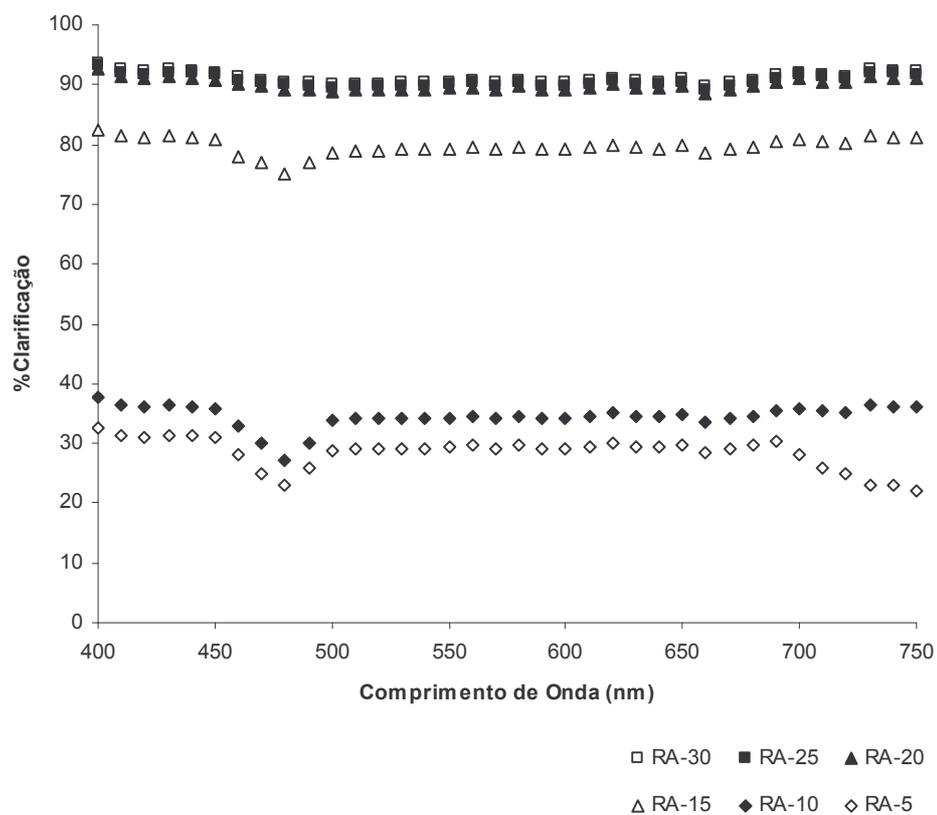
A Figura 18 ilustra a clarificação de amostras de solução 9% de caramelo com mistura de resinas RA (Amberlite IRA-96-SB (50%) e Amberlite 252-Na (50%)).

Utilizando-se 10 g da mistura de resinas RA para 100 mL de solução 9% de caramelo foi obtido clarificação inferior a 40%, enquanto que utilizando-se quantidades de 20 a 30g de mistura de resina foi obtido cerca de 90% de despigmentação do caramelo.

Observou-se que a mistura de resinas RA apresenta excelente clarificação, em processo em batelada, quando a proporção de solução de caramelo:mistura de resina foi cerca de 5:1 (v:p)

Observa-se que este conjunto de resinas apresenta excelente clarificação quando o volume de caramelo é inferior a 5 vezes o volume da resina.





**Figura 18:** Clarificação da solução 9% de caramelo utilizando-se diferentes quantidades da resina RA (Amberlite IRA-96-SB (50%) + Amberlite 252-Na (50%)).

A Tabela 7 apresenta o teor de sólidos dissolvidos totais, teor de adoçantes totais e pureza das amostras de caramelo a 9%, tratadas com diferentes quantidades da mistura de resinas RA.

Analisando os resultados da Tabela 7, observou-se que não houve redução dos adoçantes totais, demonstrando que as resinas têm afinidade pelas substâncias coloridas presentes na solução de caramelo e não apresenta afinidade com os adoçantes (esteviosídeo e rebaudiosídeo A).



Observou-se também, que as quantidades de substâncias que colaboram com a coloração da solução, estão presentes em pequenas quantidades, uma vez que não houve redução significativa da quantidade de sólidos dissolvidos, entretanto esta pequena redução, resultou em um aumento da pureza. Os dados obtidos de pureza e clarificação demonstram que apesar de estarem presentes em pequenas quantidades, tais substâncias apresentam forte coloração.

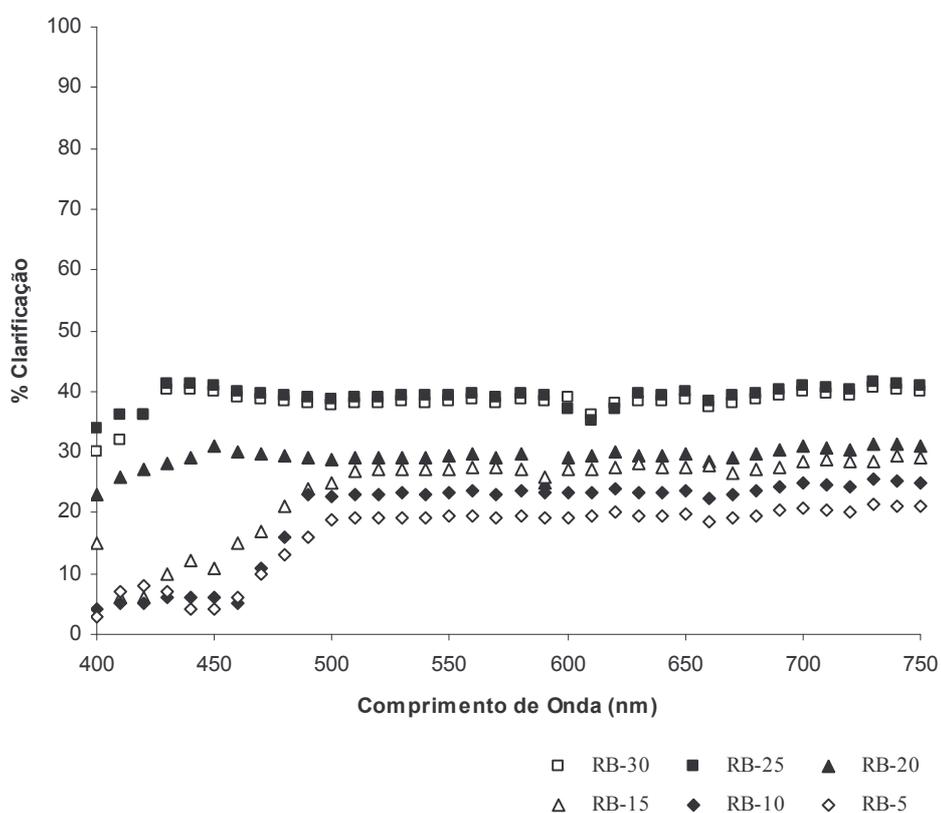
**Tabela 7:** Teor de sólidos solúveis, adoçantes totais e pureza das amostras de solução 9% após tratamento com diferentes quantidades da mistura de resinas RA (Amberlite IRA 96-SB (50%) + Amberlite 252-Na (50%)).

Amostra (g de resina)	Teor de sólidos dissolvidos	Adoçantes totais (g/100 mL)	Pureza (%)
Inicial	9,0	3,74	41,55
5	8,0	3,69	46,12
10	8,0	3,74	46,75
15	7,6	3,80	50,00
20	7,8	3,65	46,79
25	7,6	3,71	48,81
30	7,6	3,65	48,03



### 5.2.1.2. Clarificação da solução 9% de caramelo com a mistura de resinas RB (Amberlite IRA-96-SB e Amberlite IRC-50).

A Figura 19 ilustra a clarificação de solução de caramelo com diferentes quantidades da mistura de resina Amberlite IRA-96-SB (50%) e Amberlite IRC 50 (50%). Foi obtido clarificação da solução de caramelo inferior a 40% em toda a região do espectro analisado mesmo utilizando 30g da mistura de resina RB para 100 mL de amostra de solução 9% de caramelo.



**Figura 19:** Clarificação da solução 9% de caramelo utilizando-se diferentes quantidades da resina RB (Amberlite IRA-96-SB (50%) + Amberlite-IRC-50 (50%)).



A Tabela 8 apresenta o teor de sólidos totais dissolvidos, teor de adoçantes totais e pureza das amostras de solução de caramelo a 9%, tratadas com diferentes quantidades da mistura de resinas RB (Amberlite IRA-96-SB (50%) Amberlite 252-Na (50%)).

Analisando os resultados da Tabela 8, observou-se um comportamento similar ao conjunto anterior em relação a pureza, que praticamente permaneceu constante em todos os tratamentos. Entretanto, apesar de não ser significativa, observou-se uma tendência de redução dos adoçantes totais, indicando que as resinas adsorveram pequena quantidade de adoçantes da estévia. Esta redução colaborou para que a pureza da solução permanecesse aos patamares da alimentação.

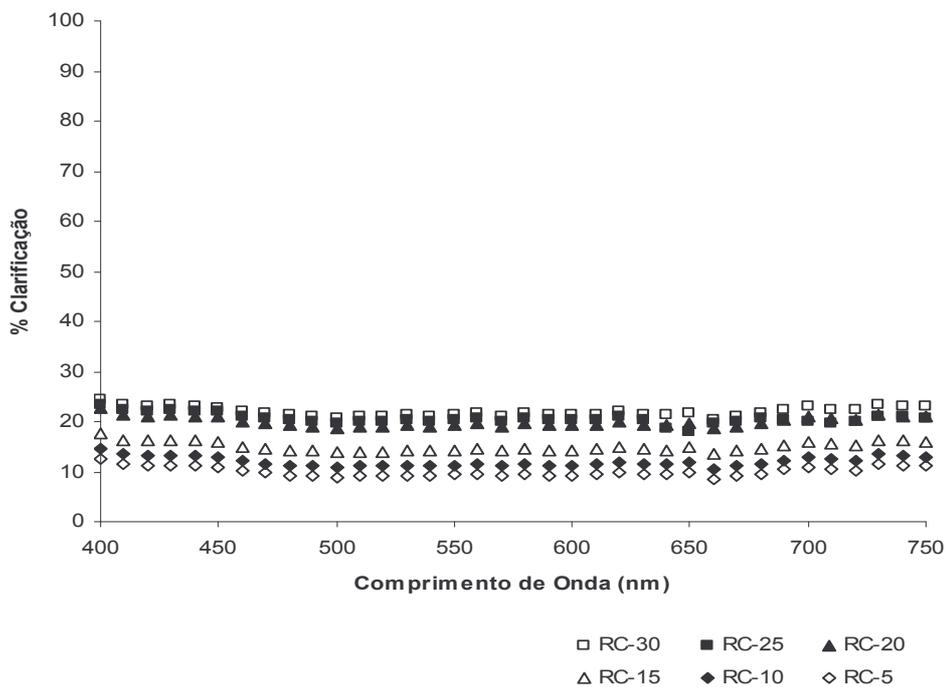
**Tabela 8:** Teor de sólidos solúveis, adoçantes totais e pureza, após tratamento das amostras de solução 9% de caramelo com diferentes quantidades da mistura de resina RB (Amberlite IRA-96-SB (50%) e Amberlite 252-Na (50%)).

Amostra (g de resina)	Teor de sólidos Dissolvidos	Adoçantes totais (g/100 mL)	Pureza (%)
Inicial	9,0	3,74	41,55
5	8,4	3,55	42,26
10	8,2	3,46	42,19
15	8,0	3,39	42,37
20	8,0	3,58	44,75
25	7,6	3,25	42,76
30	7,8	3,29	42,18

### **5.2.1.3. Clarificação da solução 9% de caramelo com a mistura de resinas RC (Amberlite 958-Cl e Amberlite 252-Na).**

A Figura 20 ilustra a clarificação da solução 9% de caramelo com diferentes quantidades da mistura de resinas (Amberlite 958-Cl (50%) e Amberlite 252-Na (50%)). A clarificação da solução de caramelo foi inferior a 25%, mesmo usando 30g da mistura de resina RC em 100 mL de solução 9% de caramelo.

O conjunto de Resinas RC, conforme pode ser visualizado na Figura 20, apresentou uma clarificação homogênea em todo o espectro analisado, entretanto observou-se que a clarificação está abaixo de 25%. O nível de clarificação sofre pouca influência da concentração de resina, demonstrando uma baixa afinidade aos pigmentos presentes na solução de caramelo.



**Figura 20:** Clarificação da solução 9% de caramelo utilizando-se diferentes quantidades da mistura de resinas RC (Amberlite 958-Cl (50%) e Amberlite 252-Na (50%)).

A Tabela 9 apresenta o teor de sólidos dissolvidos totais, teor de adoçantes totais e pureza das amostras de solução de caramelo a 9%, tratadas com quantidades de 5 a 30 g da mistura de resinas Amberlite 958-Na (50%) e Amberlite IRC-50 (50%).

Analisando os resultados da Tabela 9, observou-se que tanto o teor de sólidos dissolvidos totais quanto o teor de adoçantes totais sofreram pequena influência após tratamento com a mistura de resinas RC.



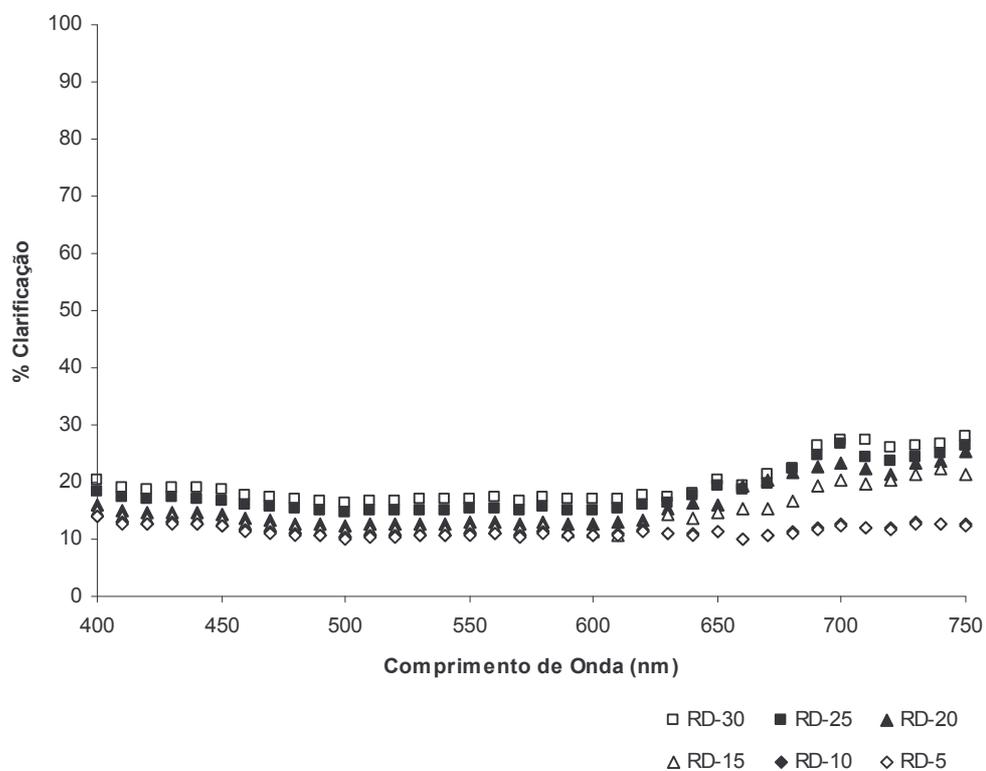
**Tabela 9:** Teor de sólidos solúveis, adoçantes totais e pureza após tratamento das amostras de solução 9% de caramelo com diferentes quantidades da mistura de resina RC (Amberlite 958-Cl (50%) e Amberlite IRC-50 (50%)).

Amostra (g de resina)	Teor de sólidos dissolvidos	Adoçantes totais (g/100 mL)	Pureza (%)
Inicial	9,0	3,74	41,55
5	8,6	3,58	41,62
10	8,6	3,77	43,84
15	8,4	3,68	43,80
20	8,4	3,51	41,78
25	8,2	3,81	46,46
30	8,2	3,48	42,43

#### **5.2.1.4. Clarificação da solução 9% de caramelo com a mistura de resinas RD (Amberlite 958-Cl e Amberlite IRC 50)**

A Figura 21 ilustra a clarificação da solução 9% de caramelo utilizando-se a mistura de resinas Amberlite 958-Cl (50%) e Amberlite IRC-50 (50%). Observou-se clarificação da solução de caramelo inferior a 20% na faixa de comprimento de onda de 400 a 650 nm e inferior a 30% na faixa de 650 a 750 nm, indicando que a mistura não é adequada para a clarificação do caramelo.





**Figura 21:** Clarificação da solução 9% de caramelo utilizando-se diferentes quantidades da mistura de resinas RD (Amberlite 958-Cl e Amberlite IRC-50).

A Tabela 10 apresenta o teor de sólidos solúveis, teor de adoçantes totais e pureza das amostras de solução de caramelo a 9%, tratadas com diferentes quantidades da mistura de resinas RD (Amberlite 958-Cl e Amberlite IRC-50).

Observou-se diminuição do teor de adoçantes totais com o aumento da quantidade da mistura da mistura de resinas RD.



**Tabela 10:** Teor de sólidos solúveis, adoçantes totais e pureza após tratamento das amostras de solução 9% de caramelo com diferentes quantidades da mistura de resinas RD (Amberlite 958-Cl e Amberlite IRC-50)

Amostra (g de resina)	Teor de sólidos dissolvidos	Adoçantes totais (g/100 mL)	Pureza (%)
Inicial	9,0	3,74	41,55
5	8,2	3,49	42,56
10	8,2	3,35	40,85
15	8,2	3,26	39,75
20	8,2	3,31	40,36
25	8,0	3,11	38,88
30	8,0	3,15	39,37

Avaliando-se os resultados obtidos nos testes de clarificação do caramelo com misturas de resinas em batelada, foi obtido melhor resultado com a mistura de resinas RA: Amberlite 96-SB e Amberlite 252-Na.

Verificou-se também que utilizando-se as misturas de resinas que continham Amberlite IRC-50, houve uma redução dos princípios adoçantes da estévia, demonstrando que essa resina adsorve esses compostos.

### **5.2.2. Efeito da concentração da solução de caramelo na clarificação em batelada**

Ao visualizar as soluções em contato com as resinas e verificar os resultados de clarificação, apresentados pelos conjuntos de resinas RA, RB, RC e RD, observou-se que o conjunto de resina RA com uma concentração de 20g em

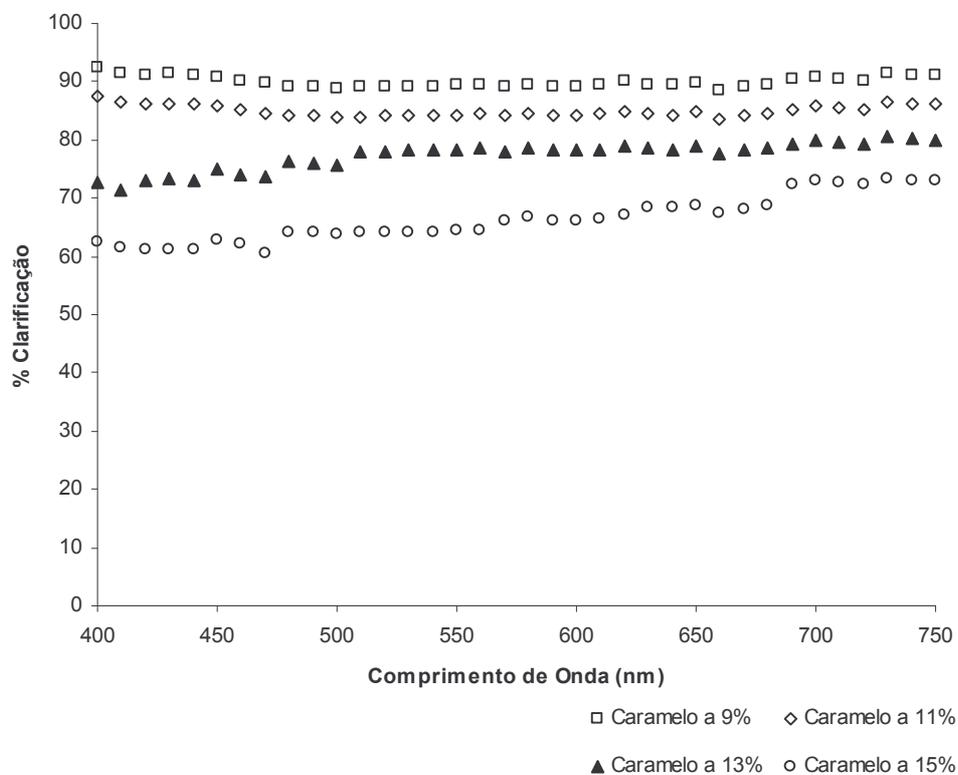
100 mL, apresentou melhor nível de clarificação em detrimento a concentrações menores. Por outro lado concentrações maiores também não apresentam níveis de clarificação superiores, não justificando o seu uso.

Dessa forma, para os testes seguintes optou-se pelo conjunto de resinas RA com uma concentração de 20 g em 100 mL, como sendo a mais conveniente, por apresentar excelente clarificação com níveis relativamente baixa de resina.

As soluções de caramelo com diferentes concentrações (9, 11, 13 e 15%) foram submetidas a clarificação com o conjunto de resinas RA com 20 g em 100 mL de solução como descrito no item 4.2.1.4

A Figura 22 ilustra o efeito do aumento da concentração utilizando-se a mistura de resinas RA (Amberlite 96-SB e amberlite 252-Na)

Conforme já observado, a uma concentração de 9% de caramelo a clarificação foi bastante satisfatória, alcançando índices superiores a 90%, demonstrando mais uma vez que este conjunto de resinas é adequado para a clarificação com esta concentração de caramelo.



**Figura 22:** Clarificação da solução de caramelo nas concentrações de 9%, 11%, 13% e 15% utilizando-se a mistura de resina RA (Amberlite IRA-96-SB (50%) e Amberlite 252-Na (50%)).

Quando a concentração de caramelo é aumentada para 11%, observa-se uma pequena redução nos níveis clarificação do caramelo, entretanto o perfil de clarificação permanece o mesmo da concentração anterior.



Entretanto quando a concentração de caramelo é aumentada para 13%, observa-se uma redução nos níveis de clarificação em comprimentos de onda inferior a 500 nm. Esta redução prejudica de maneira substancial os níveis de clarificação, uma vez que os pigmentos que mais colaboram com a coloração escura se encontram nesta faixa de comprimento de onda.

Na concentração de 15%, observa-se uma redução nos níveis de clarificação até 650 nm.

Através deste experimento pode-se estabelecer um padrão de comportamento do conjunto de resina RA, na clarificação de uma solução de caramelo.

Utilizando-se solução de 9% e 11% de caramelo, observou-se que a resina tem afinidade pelos pigmentos que absorvem abaixo de 480 nm, entretanto estes pigmentos saturam rapidamente a coluna de forma que os níveis de clarificação reduzem a medida que a concentração aumenta.

### **5.2.3. Teste de saturação das resinas**

A Figura 23 ilustra a clarificação de cinco amostras de solução 9% de caramelo, sucessivamente em processo em batelada, utilizando uma amostra de mistura de resinas RA (Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na).

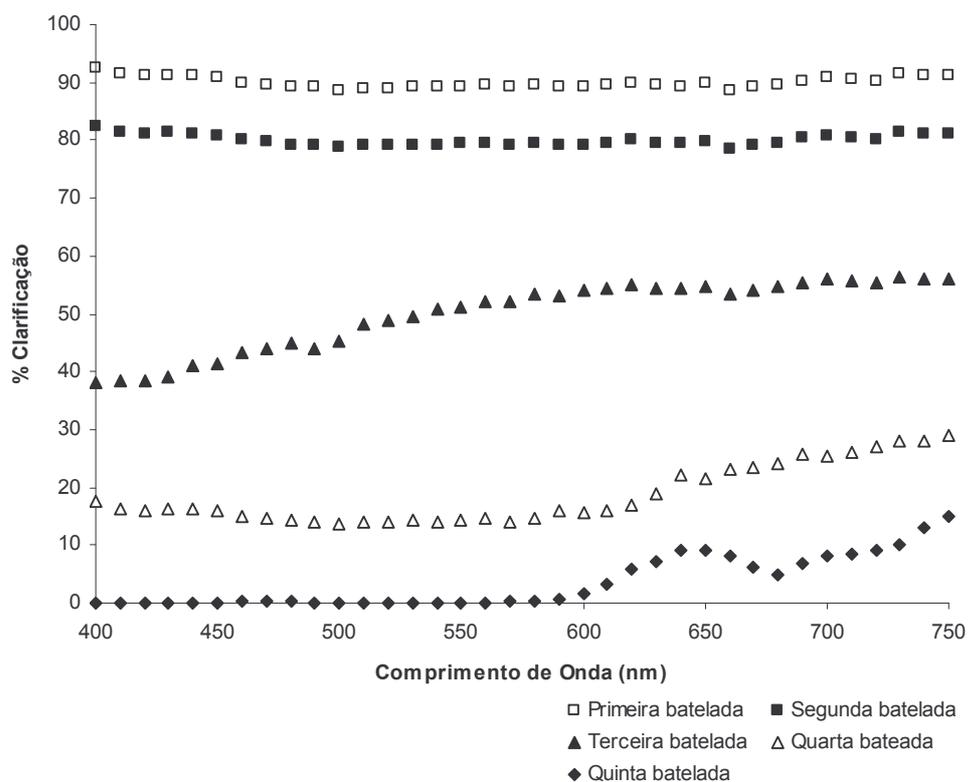
A Figura 23, mostra que o melhor resultado de clarificação da solução 9% de caramelo foi obtido no primeiro ciclo, pois se refere a primeira utilização das resinas. A partir do segundo ciclo, observa-se uma redução na clarificação, porém de

forma homogênea em todos os comprimentos de onda. Isto se deve ao fato de que os sítios ativos das resinas já se encontravam parcialmente saturados.

No terceiro ciclo observou-se o mesmo comportamento do segundo ciclo, entretanto com uma redução maior na clarificação.

A partir do quarto ciclo, observou-se que a clarificação foi reduzida, sendo que de forma mais pronunciada para comprimentos de onda menores.

O quinto ciclo mostrou claramente a saturação da resina com relação a diversos compostos, pois somente aqueles com grande afinidade ainda conseguiram ser reduzidos.



**Figura 23:** Clarificação da solução de caramelo 9%, com resinas RA (Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na) por cinco ciclos.

### 5.3. TESTES DE CLARIFICAÇÃO DA SOLUÇÃO DE CAMELO EM COLUNAS DE TROCA IÔNICA

Após a realização dos testes em batelada, onde foram definidas as resinas que apresentam o melhor nível de clarificação, executou-se o estudo deste conjunto de resinas em colunas, uma vez que o processo em colunas permite uma operação contínua, além de apresentar uma maior eficiência, facilidade na regeneração, e permitir coleta de dados para o aumento de escala para uma transição para colunas industriais.



### 5.3.1. Efeito da vazão na clarificação da solução de caramelo em coluna de troca iônica

#### 5.3.1.1. Testes de clarificação da solução 9% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na ligadas em série utilizando vazões de 40 e 30 volumes-leito/h

O efeito da vazão na clarificação da solução 9% de caramelo em coluna Amberlite IRA-96-SB e coluna Amberlite 252-Na, ligadas em série, foi testado como descrito no item 4.2.2.4.

A Tabela 11 ilustra a clarificação da solução 9% de caramelo, em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se uma vazão de 40 volumes-leito/h (160 L/h) e 30 volumes-leito/h.

**Tabela 11:** Clarificação da solução de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se vazão de 40 volumes-leito/h (160 L/h) e 30 volumes-leito/h (120L/h)

Tempo (Minutos)	40 volumes-leito/h				30 volumes-leito/h		
	Teor de sólidos dissolvidos	Clarificação		Teor de sólidos dissolvidos	Clarificação		
		420 $\eta$ m	670 $\eta$ m		420 $\eta$ m	670 $\eta$ m	
10	9,0	0,00	5,23	9,0	0,00	6,4	
20	9,0	0,00	2,25	9,0	0,00	0,00	
30	9,0	0,00	0,00	9,0	0,00	0,00	
40	4,4	0,00	0,00	9,0	0,00	0,00	
50	0	-	-	5,8	-	-	
60	0	-	-	0,0	-	-	



Observou-se que o teor de sólidos dissolvidos da solução de caramelo não sofreu alteração após 30 minutos de tratamento utilizando-se uma vazão de 40 volumes-leito/h. Após 40 minutos houve um decréscimo porque após este tempo, toda a solução de caramelo havia sido bombeada para a coluna e o produto remanescente dentro da coluna, estava se misturando com água, que estava sendo bombeada para o interior da coluna, para eluir a solução de caramelo presente dentro da coluna, sofrendo uma diluição. Entretanto não se observou, clarificação da solução de caramelo, avaliada pela medida da absorvância a 420 nm e 670 nm.

Observou-se também que o teor de sólidos totais da solução de caramelo não sofreu alteração após 40 minutos de tratamento, utilizando-se uma vazão de 30 volumes-leito/h. Após 50 minutos houve um decréscimo no teor de sólidos, porque após este tempo, toda a solução de caramelo havia sido bombeada para a coluna e o produto remanescente dentro da coluna, estava se misturando com água, que estava sendo bombeada para o interior da coluna, para eluir a solução de caramelo presente dentro da coluna, sofrendo uma diluição. Também não se observou clarificação da solução, indicada pela medida da absorvância a 420 nm e 670 nm.

#### **5.3.1.2. Testes de clarificação da solução 9% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na ligadas em série utilizando vazão de 10 volumes-leito/h**

A Tabela 12 ilustra os teores de sólidos solúveis totais e o teor de adoçantes totais após clarificação da solução 9% de caramelo em colunas de

Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando uma vazão de 10 volumes-leito/h.

**Tabela 12:** Clarificação da solução de caramelo 9%, em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na ligadas em série utilizando-se uma vazão de 10 volumes-leito/h (40 L/h).

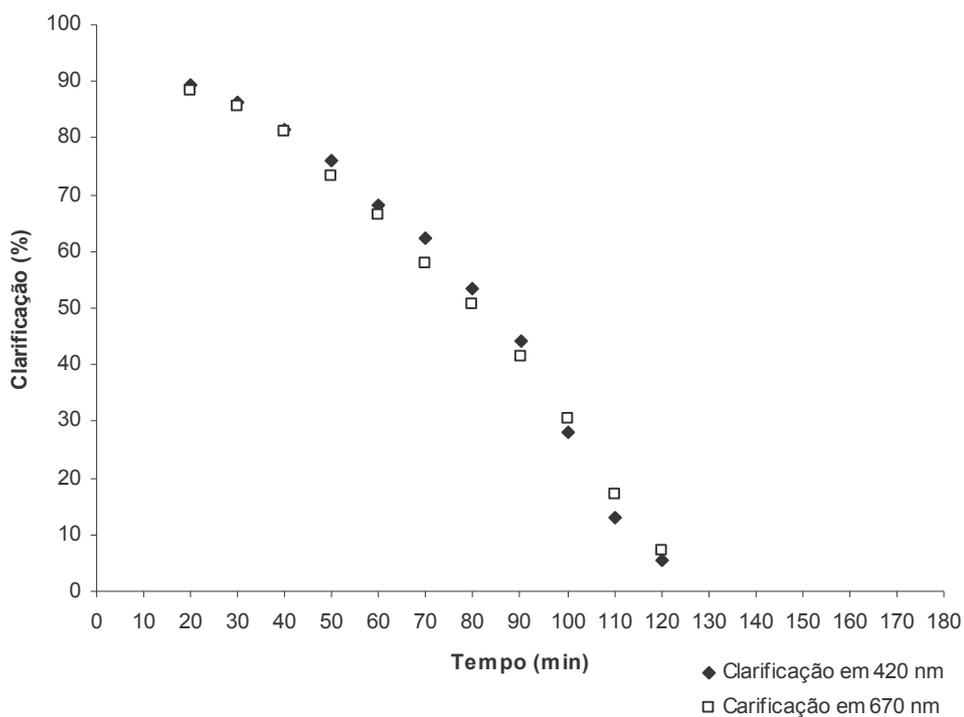
Tempo (minutos)	°Brix	Adoçantes Totais (g/100 mL)	Pureza
Solução inicial	9,0	3,74	41,55
10	0	-	-
20	5,2	-	-
30	8,4	3,59	42,74
40	8,4	-	-
50	8,4	-	-
60	8,4	3,85	45,83
70	8,6	-	-
80	8,6	-	-
90	8,8	3,81	43,29
100	8,8	-	-
110	8,8	-	-
120	9,0	3,63	40,33
130	9,0	-	-
140	9,0	-	-

Os valores de 8,4 podem estar indicando que pigmentos estão sendo adsorvidos e após 120 minutos ocorreu saturação de resina.

Observou-se, através da Figura 24 que nos dez minutos iniciais, uma clarificação alta devido a alta capacidade de adsorção de pigmentos pelas resinas e também devido a diluição da solução de caramelo com água existente na coluna. Na amostra de 20 minutos ocorreu uma clarificação superior a 90%. No entanto, esta

clarificação sofreu, um decréscimo acentuado atingindo o nível mínimo em 120 minutos, ou seja, após 20 volumes-leito.

Após esse tempo não foi possível calcular os valores de clarificação, pois as leituras foram praticamente iguais a solução inicial. Dessa forma, o experimento foi encerrado após 140 minutos.



**Figura 24:** Clarificação de solução 9% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se uma vazão de 10 volumes-leito/h (40 L/h), avaliada pela medida de absorvância nos comprimentos de onda 420 nm e 670 nm.

Apesar de adsorção dos pigmentos presentes, o volume tratado foi relativamente baixo, apenas 14 L (4 volumes-leito). Optou-se por executar um novo experimento reduzindo-se a vazão.



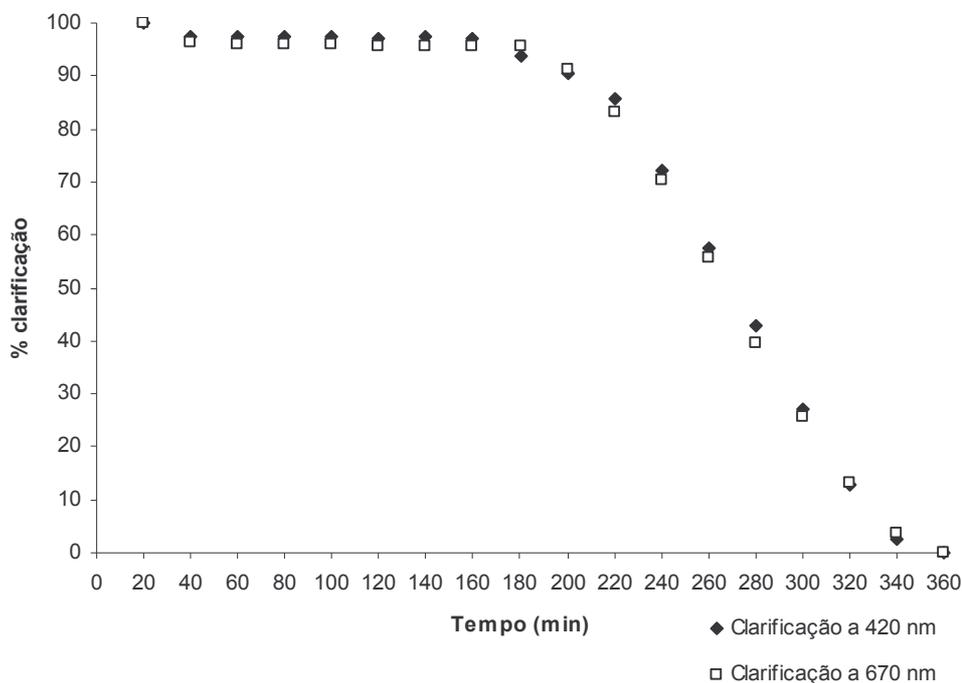
**5.3.1.3. Testes de clarificação da solução de 9% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se 5 volumes-leito/h**

A Tabela 13 ilustra o teor de sólidos dissolvidos e teor de adoçantes totais das amostras de caramelo clarificadas em colunas Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, utilizando-se vazão de 5 volumes-leito/h. Observou-se que não houve redução de adoçantes totais durante o experimento.

**Tabela 13:** Clarificação da solução de caramelo 9%, em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se uma vazão de 5 volumes-leito/h (20 L/h).

Tempo (min)	°Brix	Adoçantes Totais (g/100 mL)	Pureza
Solução inicial	9,0	3,74	41,55
20	4,6	-	-
40	7,6	-	-
60	8,2	3,62	44,14
80	8,2	-	-
100	8,2	-	-
120	8,2	3,78	46,10
140	8,2	-	-
160	8,2	-	-
180	8,2	3,34	40,73
200	8,4	-	-
220	8,4	-	-
240	8,4	3,82	46,58
260	8,6	-	-
280	8,6	-	-
300	8,6	3,76	43,72
320	8,8	-	-
340	9,0	-	-
360	9,0	3,58	39,89





**Figura 25:** Clarificação de solução 9% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se uma vazão de 5 volumes-leito/h (20 L/h), avaliada pela medida de absorvância nos comprimentos de onda 420 nm e 670 nm.

Observou-se, através da Figura 25, que com uma vazão de 20 L/h, ocorreu uma clarificação da solução de caramelo, quando avaliada em comprimentos de onda 420 nm e 670 nm, acima de 93%.

Foi obtido clarificação da solução de caramelo acima de 90% por um período superior a 180 minutos, ou seja, um volume superior a 15 vezes o volume do leito de resinas.

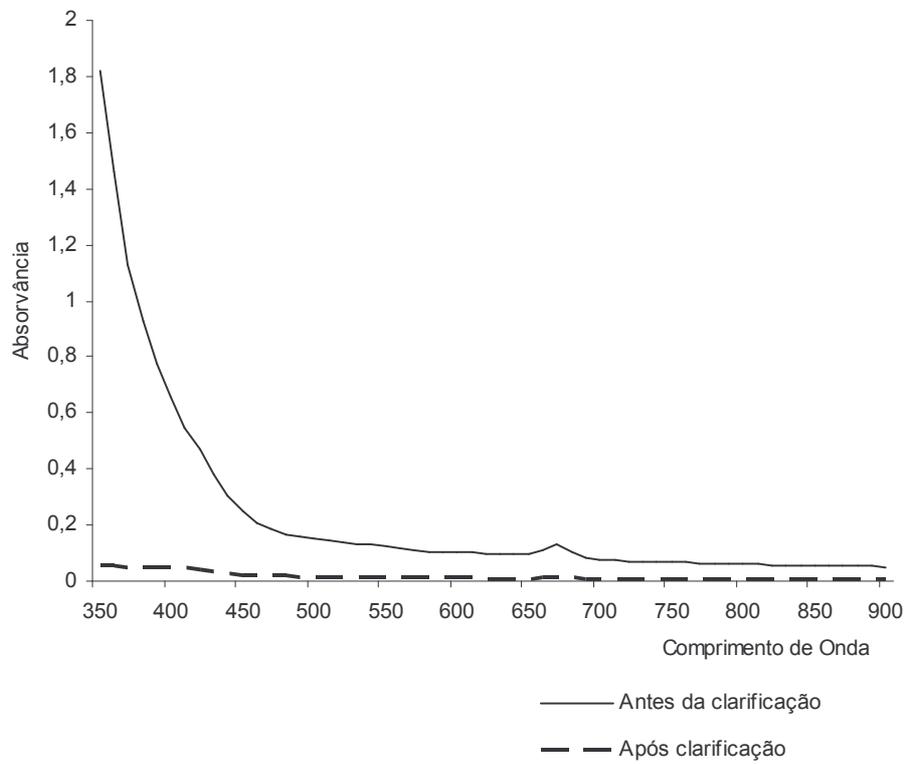


Após 180 minutos observou-se um decréscimo da clarificação demonstrando que as resinas se encontram em fase de saturação, entretanto ainda possui capacidade de troca, que pode ser aproveitada no sentido de aumentar o volume de solução tratada, uma vez que a solução de caramelo pode ser considerada pré-tratada antes de entrar em contato novamente com a coluna.

A figura 26 ilustra o perfil de absorção na faixa de comprimento de onda de 350 nm a 900 nm, da solução 9% de caramelo inicial e da amostra retirada das colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, após 180 minutos ou 15 volumes-leito

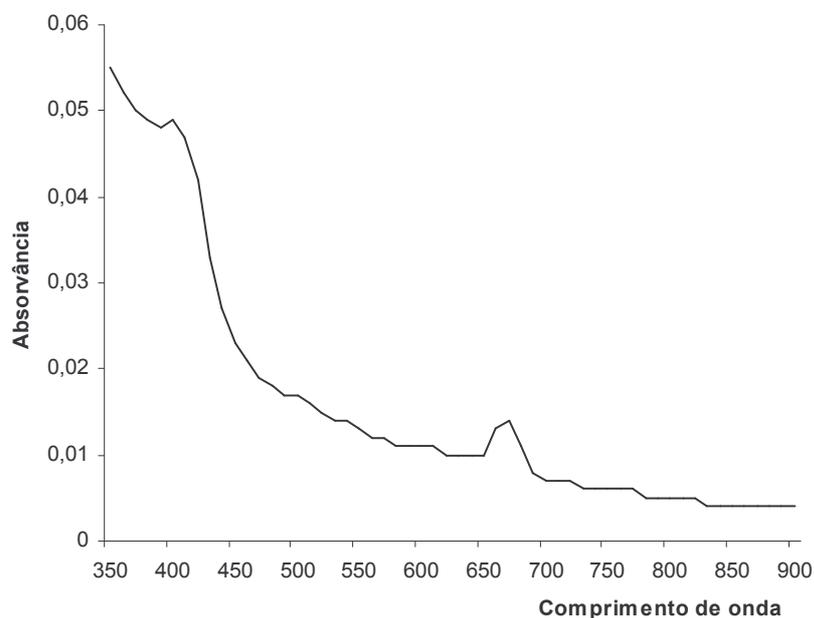
O resultado pode ser melhor visualizado na figura 27, onde mostra uma ampliação dos resultados após o tratamento.





**Figura 26:** Perfil de absorção na faixa de 350 nm a 900 nm antes e após tratamento em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se uma vazão de 5 volumes-leito/h.





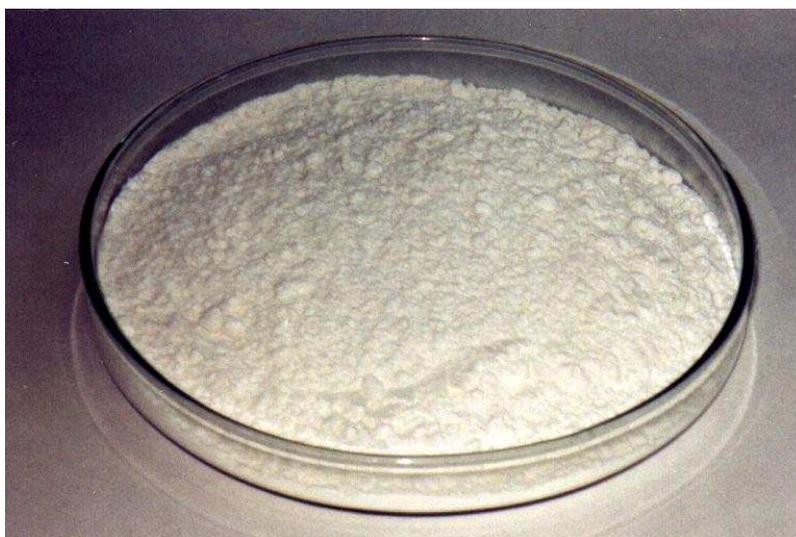
**Figura 27:** Perfil de absorção na faixa de 350 nm a 900 nm, da amostra de solução 9% de caramelo retirada das colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, após 180 minutos, utilizando-se uma vazão de 5 volumes leito/h.

A figura 28 ilustra que a solução clarificada de caramelo obtida após tratamento em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, mostrou-se incolor e sem partículas em suspensão. A Figura 29 mostra que o produto obtido da secagem, da solução clarificada de caramelo, em spray, apresentou-se como um pó branco.





**Figura 28:** Solução 9% de caramelo após clarificação em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série.



**Figura 29:** Produto obtido após secagem da solução clarificada de caramelo, em secador tipo spray.



### **5.3.2. Influência da concentração de caramelo na clarificação em colunas de troca iônica**

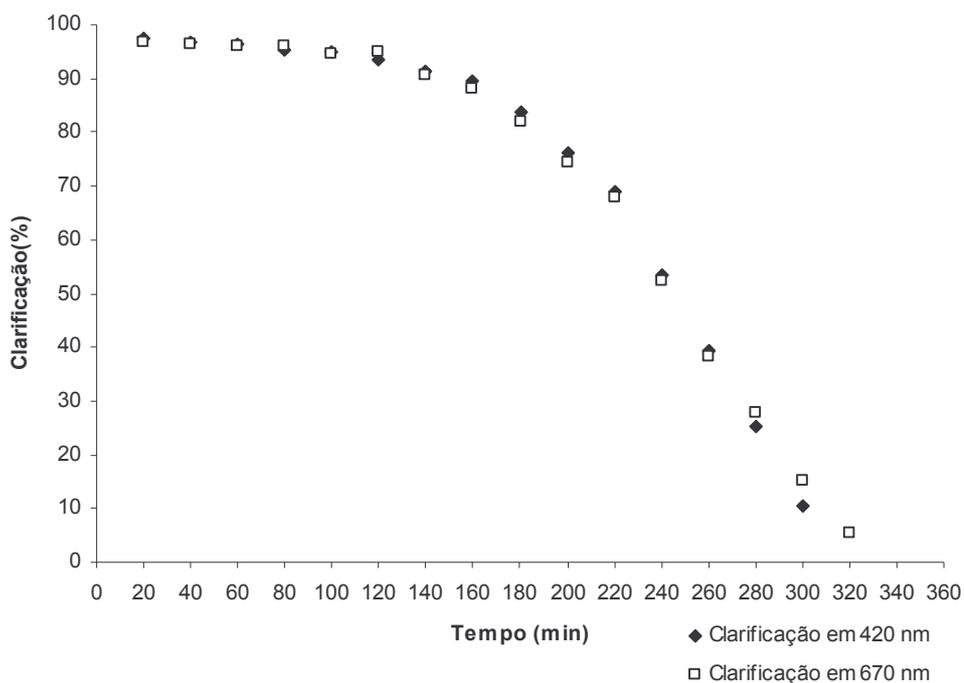
O efeito da concentração de caramelo na clarificação em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na foi testado como descrito no item 4.2.2.5.

#### **5.3.2.1. Clarificação da solução 11% de caramelo.**

A figura 30 ilustra a clarificação de solução 11% de caramelo, em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em serie, utilizando-se fluxo de 5 volume-leito/h. Foi obtido clarificação acima de 90% avaliada pela medida de absorvância a 420 e 670 nm, entretanto a clarificação foi eficiente até 120 minutos, ou seja, até dez vezes o volume do leito de resinas.

Após 120 minutos observou-se um decréscimo na clarificação. Este volume pode igualmente ser utilizado para alimentar uma nova coluna, e aproveitar ao máximo a capacidade de troca das resinas.





**Figura 30:** Clarificação de solução 9% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se uma vazão de 5 volumes-leito/h (20 L/h), avaliada pela medida de absorvância nos comprimentos de onda 420 nm e 670 nm.

Na clarificação de solução 11% de caramelo utilizando-se colunas Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série e vazão de 20 L/h foi possível clarificar dez vezes o volume do leito ou seja 4,40 Kg de caramelo. Este valor foi menor do que a quantidade clarificada utilizando-se solução 9% de caramelo, no qual foi possível clarificar o equivalente a 6,48 Kg de caramelo.

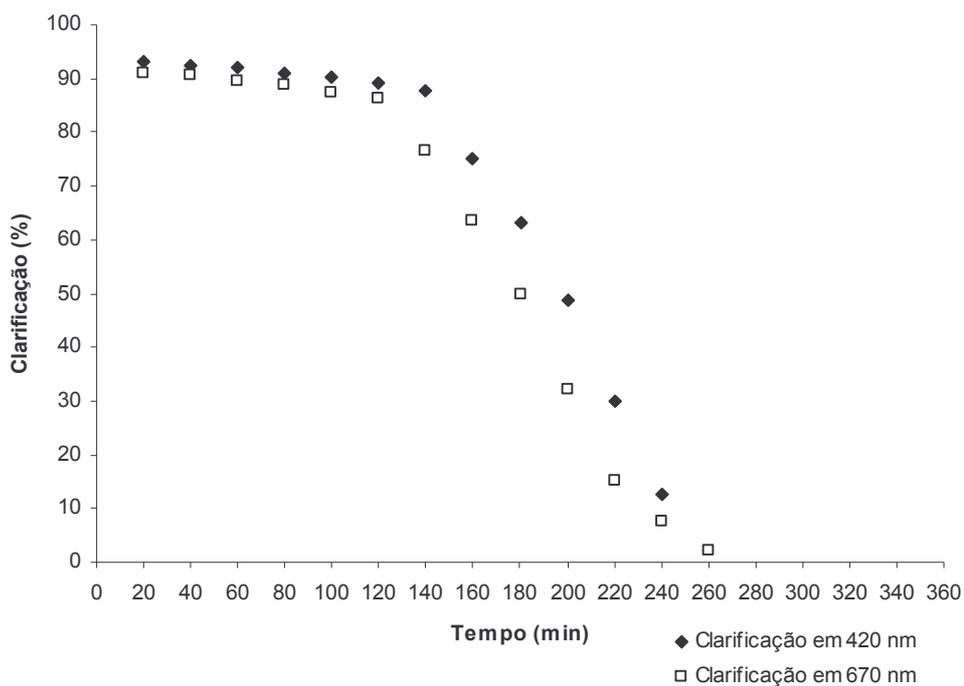


### **5.3.2.2. Clarificação da solução 13% de caramelo.**

A Figura 31 ilustra a clarificação de solução 13% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se vazão de 20 L/h. Foi obtido clarificação da solução acima de 90%, quando avaliada pela medida de absorvância a 420 nm até sete volumes do leito de resinas.

Avaliando-se a clarificação pela medida de absorvância a 670 nm foi observado resultados acima de 90% somente nos 40 minutos iniciais, ou seja, aproximadamente o equivalente a três volumes do leito da resina. Entretanto a clarificação da solução foi considerada eficiente até 100 minutos, ou seja, até cerca de sete vezes o volume do leito de resinas. Após 100 minutos observou-se um decréscimo acentuado na capacidade das resinas adsorver os pigmentos do caramelo.



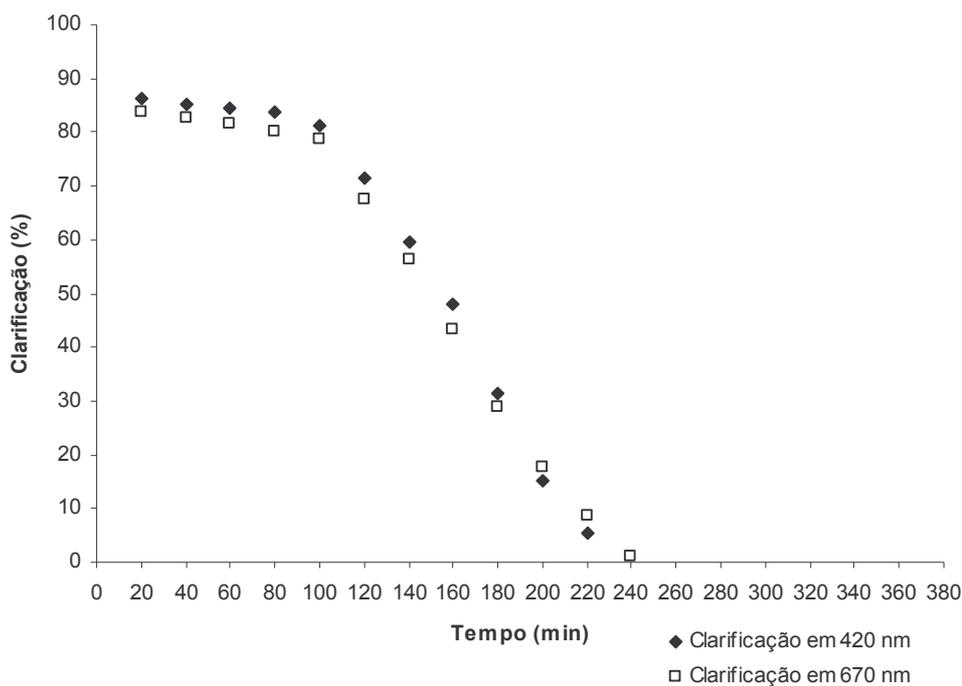


**Figura 31:** Clarificação de solução 13% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se uma vazão de 5 volumes-leito/h (20 L/h), avaliada pela medida de absorvância nos comprimentos de onda 420 nm e 670 nm.

### 5.3.2.3. Clarificação da solução 15% de caramelo

Quando a concentração de caramelo é aumentada para 15%, a clarificação não alcança os índices desejados de 90%. Entretanto ocorre uma boa clarificação nos primeiros 80 minutos, que pode servir para alimentar uma nova coluna, alcançando níveis ideais de clarificação. Este resultado pode ser visualizado na Figura 32.





**Figura 32:** Clarificação de solução 15% de caramelo em colunas de Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, ligadas em série, utilizando-se uma vazão de 5 volumes-leito/h (20 L/h), avaliada pela medida de absorvância nos comprimentos de onda 420 nm e 670 nm.

Apesar dos resultados indicarem uma solução de 9% de caramelo como a melhor concentração de trabalho, é interessante observar a influência da concentração, pois quando se necessita utilizar soluções mais concentradas, deve-se encontrar o equilíbrio entre o tamanho da coluna a ser implantada e o custo operacional de uma eventual concentração.



### **5.3.3. Curva de ruptura e ponto de exaustão**

Para determinação do ponto de ruptura e do ponto de exaustão, foi necessário o preparo de 250 L de solução de caramelo a 9%, uma vez que seria necessário passar uma quantidade de caramelo de concentração constante até a saturação total da resina. A solução de caramelo foi preparada também conforme o item 4.2.1.1.

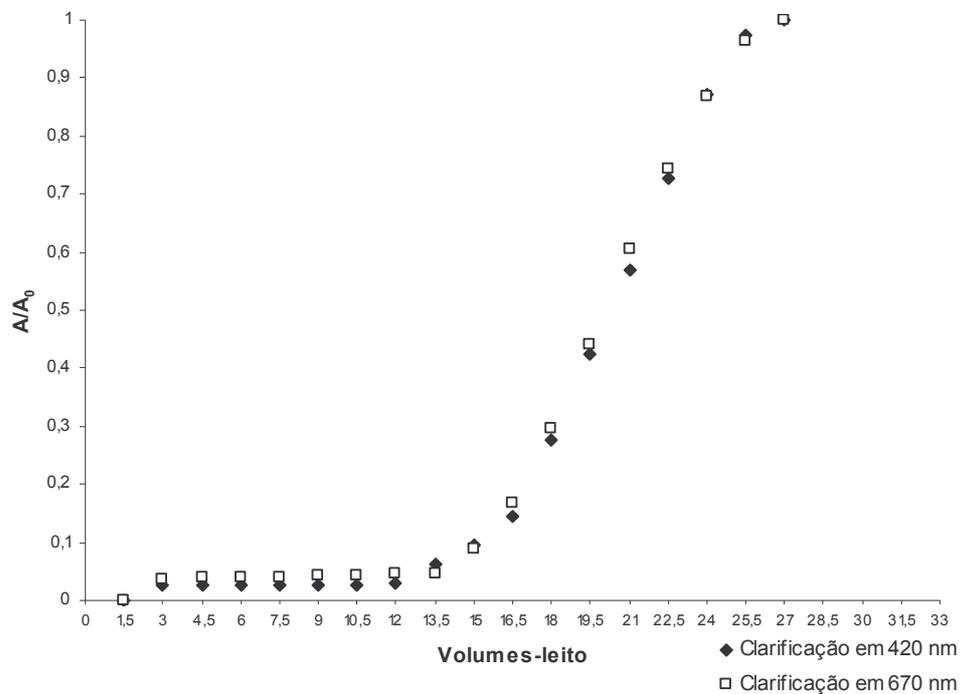
O ponto de ruptura foi definido anteriormente, sendo usualmente considerado quando a concentração do efluente alcança um valor igual a 5% da concentração da alimentação. O ponto de exaustão é considerado quando a concentração do efluente for igual a concentração da alimentação, ou seja, a capacidade de troca da resina estiver completamente esgotada.

Neste caso, considerando-se a clarificação como objetivo, redefiniu-se o ponto de ruptura como sendo o valor que a absorvância do efluente alcança um valor igual a 10% da absorvância da alimentação, ou seja, quando o nível de clarificação atingir 90%. Estes valores foram definidos, baseado em parâmetros de clarificação aceitos comercialmente, conforme descrito no item 4.2.2.7.

A vazão utilizada no experimento foi de 5 volumes-leito/h.

O ponto de ruptura para o conjunto de colunas ocorreu em 15 volumes-leito e o ponto de exaustão ocorreu em 27 volumes-leito.





**Figura 33:** Curva do ponto de ruptura e ponto de exaustão para solução de caramelo 9%.

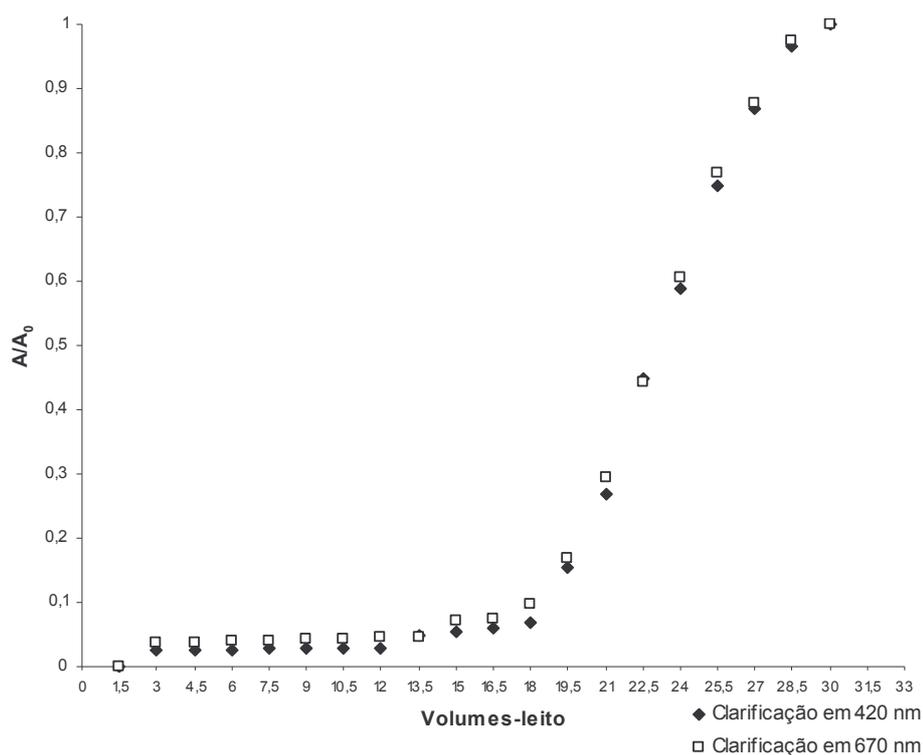
Observa-se que o conjunto de resinas, ainda tem capacidade para promover clarificação superior a 50%, até 20 volumes-leito (cinco volumes-leito), ou seja, um volume equivalente a 33% do volume considerado clarificado. O conjunto de resinas ainda promove clarificação em cinco volumes-leito de solução antes de atingir o ponto de ruptura.



Dessa forma, cada litro de resina é suficiente para clarificar 15 L de solução de caramelo a 9% (1,35 kg de caramelo em pó), promover uma clarificação parcial superior a 50% em 5 L de solução de caramelo a 9% (0,45 Kg de caramelo em pó) e finalmente promover uma pequena clarificação em 5 L de solução de caramelo a 9% (0,45 Kg de caramelo em pó).

Com base nestas observações, o caramelo que foi considerado não clarificado, pelo primeiro conjunto de colunas, foi novamente tratado com uma resina nova, mantendo-se a vazão de cinco volumes-leito/h.

Os resultados podem ser visualizados na Figura 34.



**Figura 34:** Curva do ponto de ruptura e ponto de exaustão alimentado inicialmente com solução de caramelo 9%, pré-clarificada.



Observou-se que a clarificação máxima do produto não sofre alteração significativa, entretanto o volume tratado aumentou para 17 volumes-leito e o ponto de exaustão elevou para 29 volumes-leito.

#### **5.3.4. Teste de vida útil das resinas.**

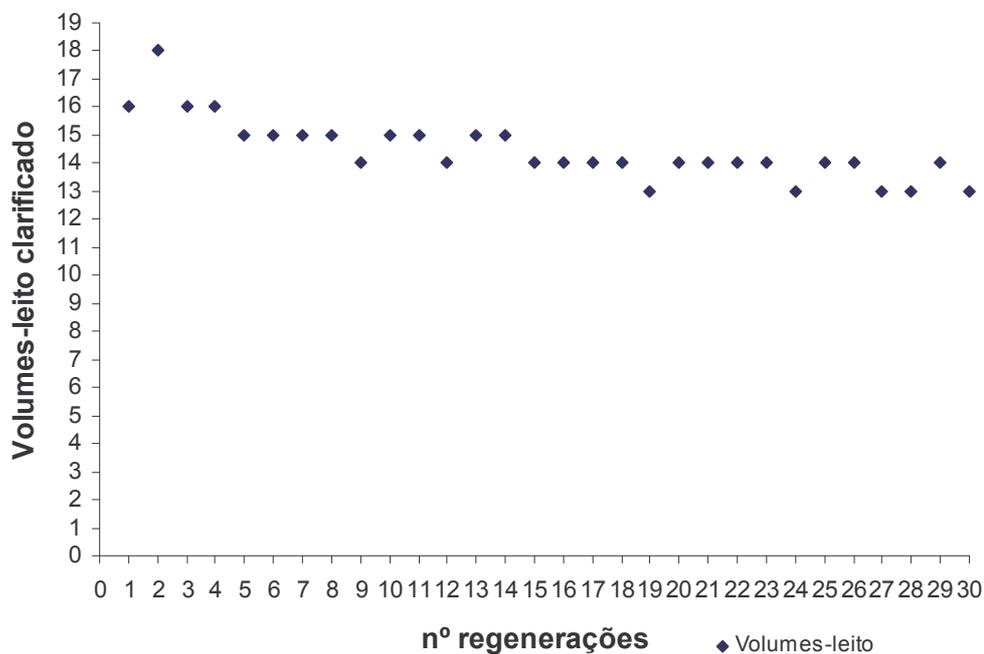
O teste de vida útil das resinas Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na foi realizado como descrito no item 4.2.2.7.

Neste experimento utilizou-se um fluxo de cinco volumes-leito/h e uma solução de caramelo a 9% de concentração, pois foram os melhores resultados que foram obtidos nos testes anteriores.

Os testes foram executados por um período de 200 ciclos de regeneração, e os resultados estão dispostos em três gráficos. A Figura 35 apresenta resultados referentes a 30 ciclos de regeneração. A Figura 36 apresenta resultados referentes 30 ciclos subseqüentes. A Figura 37 apresenta resultados após 60 ciclos de regeneração até o final do experimento. A regeneração foi feita sem o reaproveitamento do regenerante. Apesar do reaproveitamento de regenerante ser considerado mais eficiente, não foi possível efetuar esta modalidade de regeneração, devido a presença de substâncias coloridas.

Observa-se na Figura 35 que após o primeiro ciclo de regeneração a coluna clarificou o equivalente a 16 volumes-leito. Este valor está coerente com os resultados obtidos nos testes em coluna. No segundo ciclo houve um aumento de volumes-leito clarificado, provavelmente devido a passagem de solução pré-

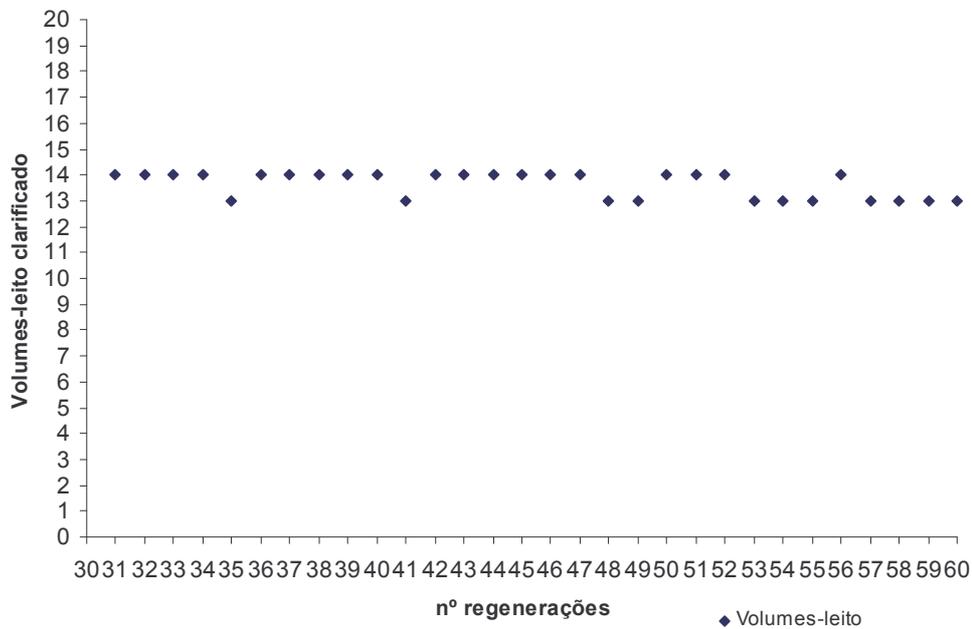
clarificada do ciclo anterior. A partir do terceiro ciclo de regeneração os valores tenderam a se estabilizar em 14 volumes-leito de solução clarificada. Este valor é um pouco menor ao obtido inicialmente. Isto pode ser explicado, devido ao equilíbrio que ocorre nas resinas entre a solução regenerante e os íons trocados, de forma que a capacidade de troca não é totalmente re-estabelecida aos níveis iniciais.



**Figura 35:** Quantidade de volumes-leito clarificado entre 1º e 30º ciclos de regeneração.

Observa-se na Figura 36 que a quantidade de volume-leito tratada permanece inalterada após 52 ciclos de regeneração, demonstrando que o conjunto de resinas é estável, não sofrendo qualquer tipo de saturação por compostos oriundos da solução de caramelo.

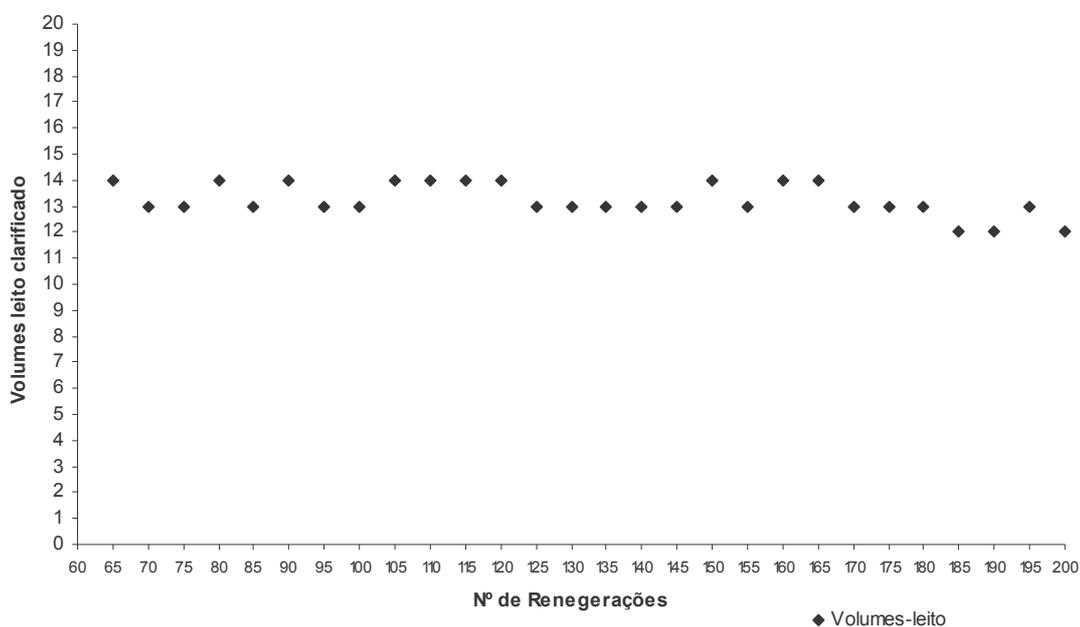




**Figura 36:** Quantidade de volumes-leito clarificado entre 31<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> ciclos de regeneração.

Observa-se na Figura 37, que a quantidade de volumes leito tratado permanece inalterada, entretanto sofreu uma pequena queda após 160 ciclos de concentração. Não se observa nenhuma tendência de saturação das resinas por compostos da solução de caramelo.





**Figura 37:** Quantidade de volumes-leito clarificado entre 61<sup>o</sup> e 200<sup>o</sup> ciclos de regeneração.

Foram executadas 200 regenerações das resinas ao longo de 15 meses, e durante este período o volume de solução clarificada sofreu uma queda de 9% em relação a clarificação inicial de 15 volumes-leito. De acordo com dados teóricos, na maioria das aplicações de deionização, a perda de capacidade de uma resina de troca catiônica está entre dois e cinco por cento ao ano. A perda de capacidade de uma resina de troca aniônica está normalmente entre cinco e vinte e cinco por cento ao ano. O valor encontrado pode ser considerado normal para a perda de capacidade.

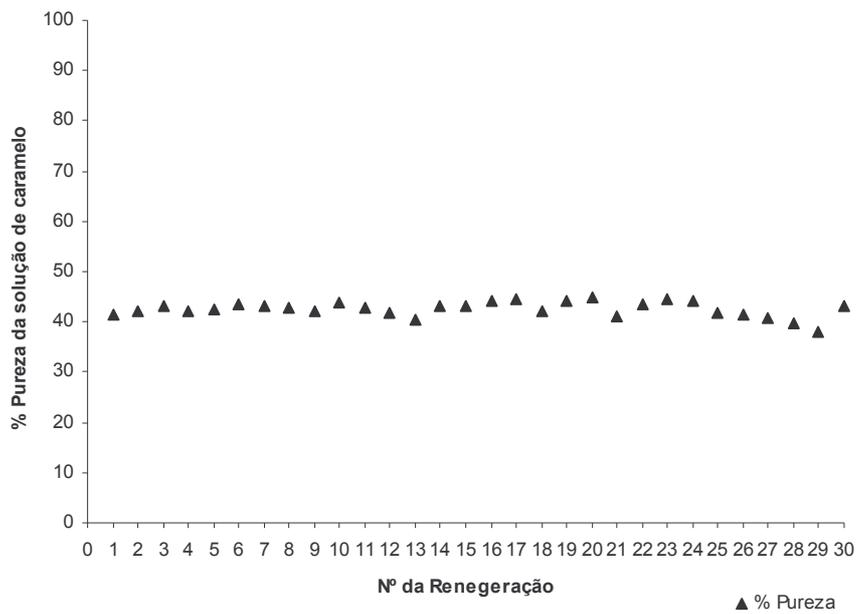


As colunas foram abertas após o término do experimento e constatou-se uma perda de massa equivalente a 5% do volume inicial, ou seja, 2,5 Kg de resinas foram perdidas. Esta perda provavelmente foi causada pelas sucessivas regenerações e retrolavagem executadas durante o período. Após este período recomenda-se a reposição da quantidade de resinas perdida.

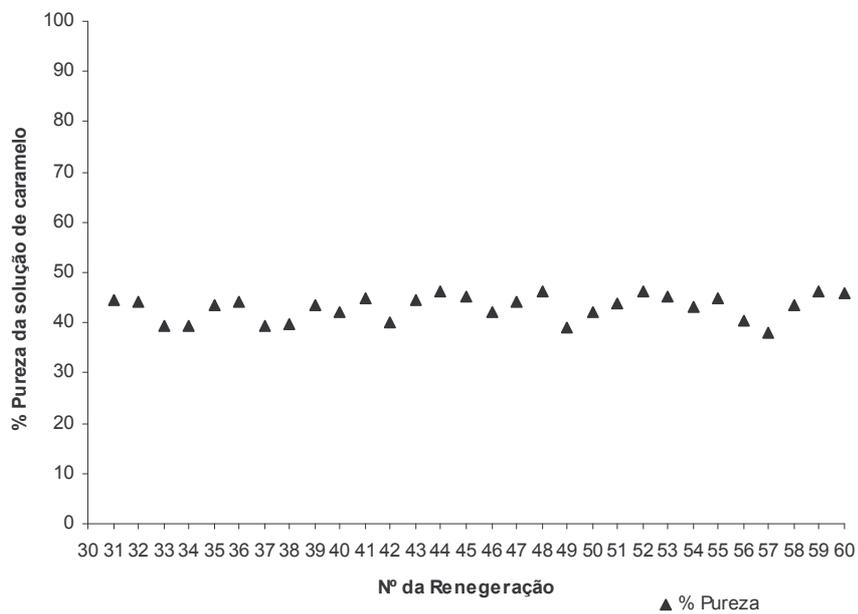
As amostras de caramelo clarificadas foram analisadas por CLAE e os resultados podem ser visualizados nas Figuras 38, 39 e 40.

Observou-se que não ocorre alteração da pureza, demonstrando que o conjunto de resinas utilizadas não tem afinidade com os sólidos presentes na solução de caramelo, apresentando afinidade apenas pelas substâncias que colaboram com a coloração. Tais substâncias estão presentes em pequenas quantidades, entretanto são compostos fortemente coloridos.



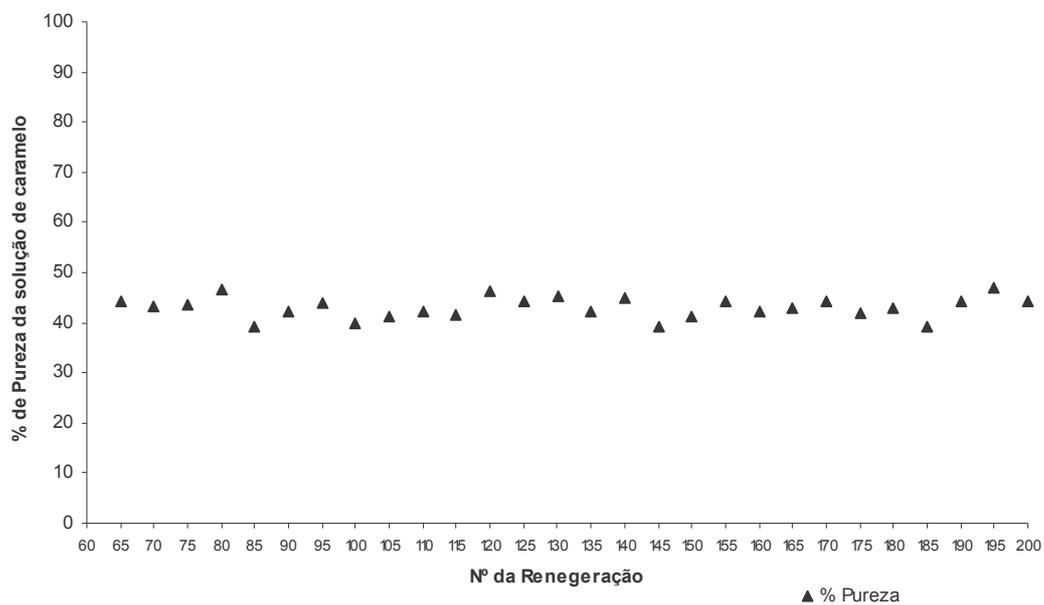


**Figura 38:** Resultados das análises das soluções de caramelo clarificados entre o 1<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> ciclos de regeneração.



**Figura 39:** Resultados das análises das soluções de caramelo clarificados entre o 31<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> ciclos de regeneração





**Figura 40:** Resultados das análises das soluções de caramelo clarificado entre os 61<sup>o</sup> e 200<sup>o</sup> ciclos de regeneração.

A Figura 41 ilustra o cromatograma de uma solução clarificada de caramelo onde o esteviosídeo é o pico em 2,93 e o rebaudiosídeo A é o pico em 3,62. A Figura 42 ilustra o cromatograma típico do padrão de esteviosídeo.





Figura 41: Cromatograma de uma solução de caramelo clarificada

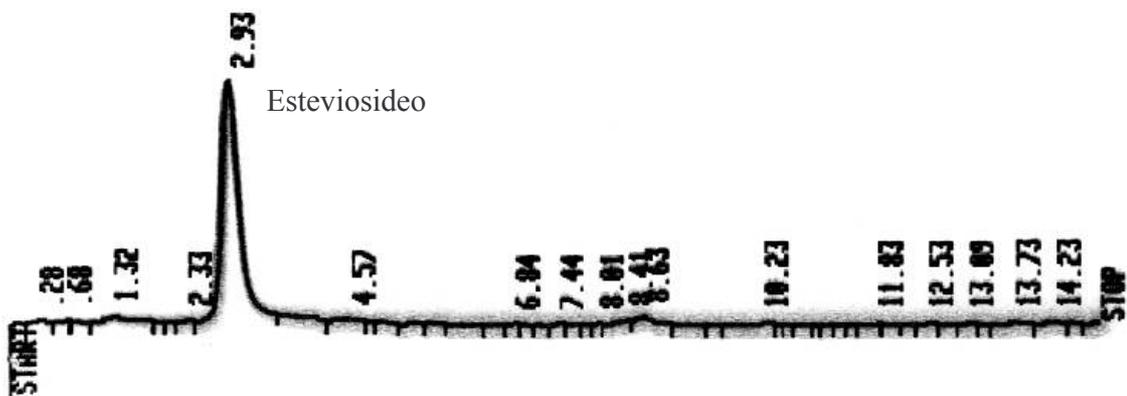


Figura 42: Cromatograma do Esteviosídeo padrão.



### **5.3.5. Desinfecção das Resinas.**

As resinas de troca iônica, quando acondicionadas em colunas, sofrem um acúmulo de matéria orgânica, facilitando o crescimento biológico.

Após a sanitização, testou-se a presença de coliformes totais na água de lavagem, após a completa regeneração e também na solução de caramelo, antes da passagem pela coluna e após a passagem pela coluna, como descrito no item 4.2.2.8..

Em todos os testes realizados o nível de contaminação se encontrava abaixo do limite de detecção do método.



## 6. CONCLUSÕES

O conjunto de resinas que apresentou melhor resultado para a clarificação da solução de caramelo, subproduto da obtenção de esteviosídeo, foi Amberlite IRA-96-SB, uma resina catiônica de ácido forte e Amberlite 252-Na, uma resina aniônica de base fraca.

Foi obtida clarificação de 90% utilizando-se duas colunas ligadas em série com as resinas Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na, com uma vazão de 5 volumes-leito/h e solução 9% de caramelo.

O volume tratado é superior a 15 volumes-leito em cada ciclo. A vida útil das resinas é superior a 200 ciclos de regeneração. Ao final do período testado houve uma perda de 5% da massa e de 9% na eficiência da resina.

Não houve aumento da pureza no produto final, demonstrando que as resinas Amberlite IRA-96-SB e Amberlite 252-Na é eficiente apenas na remoção de cor, porém, não tem afinidade a outras impurezas presentes no caramelo.

Os testes de vida útil das resinas demonstram que são altamente estáveis, permitindo um grande número ciclos de regeneração, sem perder sua capacidade de troca, o que torna sua utilização muito vantajosa em termos econômicos.

Foi obtido recuperação superior a 90% dos princípios adoçantes, com uma vazão de 5 volumes-leito/hora e solução 9% de caramelo.

O método utilizado para clarificação apresenta-se como uma alternativa viável para aproveitamento do caramelo, que hoje é considerado um subproduto de

produção com alternativas comerciais limitadas, devido a forte presença de cor e ao sabor adstringente de ervas.

## **7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS**

Sugere-se para trabalhos futuros um estudo da viabilidade de utilização do conjunto de resinas para clarificação do extrato aquoso direto das folhas, eliminando dessa forma um conjunto de operações que envolvem cristalização, um processo reconhecidamente pouco eficiente, e viabilizando um novo processo para produção de adoçantes da estévia.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADUCCI, J.; BUDDHASUKH, D.; TERNAI, B. Improved Isolation and Purification of Stevioside. **Journal of Scientific Society Thailand**. p. 179-183, 1987.
- AHMED, M. S.; DOBBERSTEIN, R. H.; FARNSWORTH, N. R. *Stevia rebaudiana*. I. Use of p-Bromophenacyl-Bromide to Enhance Ultraviolet, Detection of Water-soluble organic Acids (Stevioside and Rebaudioside-B) in High-Performance Liquid chromatographic Analysis. **Journal of Chromatography**. v.. 192, p. 387-393, 1980.
- AJINOMOTO CO. INC. Stevioside Removal From *Stevia* Sweetener. **Japan Kokai**, v. 81, p. 121-455, 1981.
- AKASHI, H.; YOKOYAMA, Y. Security of dried-leaf extracts of *Stevia*. Toxicological tests. **Food Industry**, v. 18, p. 34-43, 1975.
- ALVAREZ, M. & COUTO, A.C.C. Processo de Fracionamento dos Componentes das Folhas da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. (Fund. Univ. Estadual de Maringá e Banco do Brasil). **Pedido de privilégio no Brasil**, protocolo nº 84, 02,752, 1984.
- ALVAREZ, M. & KUSUMOTO, I.T. Quantitative Analysis of Glicosidic Sweeteners of *Stevia rebaudiana* and Their Hydrolysis products by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Arquivo Biológico Tecnológico**. (Curitiba). v. 30, nº 2, p. 337-348, 1987.

- ANGELUCCI, E. Edulcorantes e adoçantes em alimentos. **Casa da Agricultura**, v. 2, nº 11, p. 14-15, 1989.
- ANGELUCCI, E. Legislação sobre edulcorantes no Brasil In: EDULCORANTES E ADOÇANTES EM ALIMENTOS. **Edulcorantes e Adoçantes em alimentos: Ciclo de Debates**. Campinas: ITAL, p.1-9, 1990.
- AQUINO, R.P.; BEHAR, I.; BIONDI, A.; DE SIMONI, F.; SCALESSE, G. Isolation of Sweet Compounds from *Stevia rebaudiana*. **Bolletín. Soc. Ital. Biol. Sper.** v. 61, no 9, p. 1247-1252, 1985.
- ARASHI, H. Purification Of Stevioside from *Stevia rebaudiana* Leaves.(Arashi Agro-desenvolvimento Ltda.). **Bras. Pedido PI BR 87 00, 543 (CI C13D1/14)**. 6 pp, 1987.
- ASANO, K.; TOMOMATSU, S.; KAWASAKI, M. Extraction of Stevioside. (Tagasaku Perfumery co., Ltd.). **Japan Kokai**. v. 75, p. 88, 100, 1975.
- AZE, Y.; TOYODA, K.; IMAIDA, K.; HAYASHI, M.; IMAZAWA, T.; HAYASHI, Y.; TAKAHASHI, M. Subchronic oral toxicity study of stevioside in F344 rats, **Bulletin of National Institute of Hygienic Science**, v. 109, p. 48-54, 1991.
- BER BUND Eine Neue Zuckerpflanze. Publicação jornalística em Berna, 3 de dezembro 1920.
- BERTONI, M. Le Kaá Hê-é, Sa Nature e ses Propriétés. **Anales Científicos Paraguayos**. v. I, no. 5, p.1-14, 1905.

- BRUCHER, H. Paraguays "SuBstoff"- Pflanze *Stevia rebaudiana* **Naturw. dsch.** v. 6, p. 231-233, 1974.
- BIAN, S.; SUN, H.; LIU, L.; ZHOU, H. Extraction of Total Stevioside by Macroreticular Resins. **Zhongcaoyao.** v. 17 n° 6, p. 12-13, 1986.
- BOECKH-HAEBISCH, E.M.A. Pharmacological Trial of a concentrated crude extract of *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni in health volunteers, **Arquivo Biológico. Tecnológico.** v. 35, n° 2, p. 299-314, 1992.
- CANDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. **Alimentos para fins Especiais – Dietéticos**, Livraria Varela – São Paulo 1ª Ed.. 423 pp, 1996.
- CHAN, P.; TOMLINSON, B.; CHEN, Y.J.; LIU, J.C.; HSIEH, M.H.; CHENG, J.T.; A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. **Brazilian Journal of Clin. Pharmacology**, v. 50, n° 3, p. 215-220, 2000.
- CHANG, C.Y.; CHANG, W.H. A Study on The Conditions of Extraction of Stevioside from *Stevia* Leaves. **Chung-Kuo Nung Yeh Hua Hsueh Hui Chih.** v. 23, n° 1-2, p. 168-177, 1985.
- CHANG, S. & COOK, J. Stability Studies of Stevioside and Rebaudioside-A in Carbonated Beverages. (Corp. Res. Dev. Dep. coca-Cola Co.). **Journal Agriculture Food Chemistry.** v. 31, n° 2, p. 409-412, 1983.
- CHEN, W. S. & YEH, C. S. Preliminary Report on the Examination of Stevioside by High-pressure Liquid Chromatography. **Tai-Wan Tang Yeh Yen Chin so Yin Chin Hui Pao.** v. 79, p. 43-48, 1978.

- CHISSO CORP. *Stevia* Sweetener Purification. **Japan Kokai**. v. 80, p. 720-770, 1980.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, L. B.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos** – 7<sup>a</sup> ed. Editora da Unicamp, Campinas, SP, 1997.
- CROSBY, G.A.; WINGARD, R.E., Jr. A Survey of Less Common Sweeteners. In Development on Sweeteners-1 (Hough, E.A.M., Parker, K.J., Vlitos, A.J., eds.) **Applied Scientific**. London, 1979.
- DE CERNADAS, R.R.; PRYLUKA, M. A Method for the Isolation of Stevioside from Leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Rev. Agroquim. Tecnol Aliment.** (Buenos Aires). v. 25, n<sup>o</sup> 2, p. 268-272, 1985.
- DOW LIQUID SEPARATIONS – **Dowex Ion Exchange Resins – Practice Guidelines**
- EEC REPORT OF THE SCIENTIFIC COMMITTEE FOR FOOD ON SWEETNERS Final revision. **Commission of European Communities** - Directorete General for Internal Market and Industrial Affairs III/A/2 – S, 1984
- EPSTEIN, S.S.; HOLLAENDER, A.; LEDERBERG, M.; RICHARDSON, H.; WOLFF, A.H. Wisdom of Cyclamate, **Bam. Science Committee for Food**. v. 166, p.1575, 1969.
- FUH, W.S. & CHIANG, B.H. Purification of Steviosides by Membrane and Ion Exchange Processes. **Journal of Food Science**, v. 55, n<sup>o</sup> 5, p. 1454-1457, 1990.
- FUJI FOODS K.K. Stevioside. **Japan Kokai**. Tokyo Koho. 82, 46,998, 1982.

- GEUNS, J.M.C. Stevioside, **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 27, 299-319, 2002.
- GAGLIARDI, L.; AMATO, A.; BASILI, A.; CAVAZZUTI, G.; GALEFFI, C.; BOLASCO, A.; CHIMENTI, F.; GATTAVECCHIA, E.; TONELLI, D. Determination of Stevioside in *Stevia rebaudiana* by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography. **Ann. Chimie. (Rome)**. v. 76, n° 1-2, p. 39-43, 1986.
- GIOVANETTO, R.H. Extraction of Steviosides from *Stevia rebaudiana*. **European Patent Applied**. EP 302,948 (Cl CO7H15/256). 3 pp, 1989.
- GOTO, A. & CLEMENTE, E. “Influência do Rebaudiosídeo A na solubilidade do Esteviosídeo”, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n° 1, p. 3-6, 1998.
- HAGA, T.; ISE, R.; KOBAYASHI, A. Purification of Stevioside. (Sanyo Kokusaku Pulp. Co. Ltd.). **Japan Kokai**. 76,149,300, 1976.
- HASHIMOTO, Y. & MORIYASU, M. Determination of Sweet Components in *Stevia rebaudiana* by High-Performance Liquid Chromatograph. Ultraviolet Detection. **Shoyakugaku Zasshi**. v. 32, no 2, p. 209-211, 1978
- HASHIMOTO, Y.; MORIYAMA, M.; NAKAMURA, S.; ISHIGURO, S.; KOMURO, M. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Stevia Components on a Hydrophilic Packed Column. **Journal of Chromatography**. v.161, p. 403-405, 1978.
- HUANG, Y. & YANG, H. Isolation of Stevioside from leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni Indigenous of China. **Shongcaoyao**. v.15, n° 8, p. 379:382.

- HUTAPEA, A. M.; TOSKULKAO, C. H.; BUDDHASUKH, D.; WILAIRAT, P.; GLINSUKON, T. Digestion of Stevioside, a natural sweetener, by various digestive enzymes. **Journal Clin. Biochem. Nutrition.** v. 23, p. 177-186, 1997.
- INGLETT, G. E. Sweeteners, new challenges and concepts. **In Symposium: Sweeteners** (Inglett, G. E., ed.), Avi, Westport, Conn, 1974.
- ISHIZONE, H. Separation and Purification of Stevioside. (Hriuchi Itaro Shoten K. K.). **Japan Kokai.** 79,12,400, 1979.
- ITO, T; IZUHO, Y.; ITO, M. Stevioside Flavor Improvement. (Nisshin Seito Co. Ltd.). **Japan Kokai.** 77,27,400, 1977.
- JEPPESEN, P. B.; GREGERSEN, S.; POULSEN, C. R.; HERMANSEN, K. Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensistive K<sup>+</sup>-channel activity. **Metabolism**, v. 49, n<sup>o</sup> 2, p. 208-214, 2000
- KANEDA, N.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; TANAKA, O. Chemical Studies on Sweet Diterpene. glucosides of *Stevia rebaudiana*: Conversion of Stevioside Into Rebaudioside-A. **Chem. Pharm. Bulletin** v. 25, n<sup>o</sup> 9, p. 2466-2467, 1977.
- KASAI, R.; YAMAGUSHI, H.; TANAKA, O. High Performance Liquid Chromatography of Glycosides on a New Type of Hydroxilapatite Column. **Journal of Chromatography.** v. 407, p. 205-210, 1987.
- KATO, R.; SAKAGUSHI, Y.; MOTOI, N. Extraction and Purification of Stevioside. (Daicel, Ltd.). **Japan Kokai,** 77,136,200, 1977.

- KIKUCHI, H. & SAWAGUCHI, Y. Stevioside. (Sanyo Kakusaku Pulp. co.). **Japan Kokai.** 77,57,199, 1977.
- KIM, N.S.; OH, S.L.; NAM, Y.J.; MIN, B.Y.; SUH, K.B. Comparative Studies on the Assay Methods of *Stevia* Sweeteners. **Han'guk Sikip'um kurahakhoechi.** v. 15, n° 3, p. 209-214, 1983.
- KINGHORN, A. C. & SOEJARTO, D. D. "Ct Status of Stevioside as a Sweetening Agent for Human Use". In: **Economic and Medicinal Plant Research**, v.1, pp. 1-52, 1985.
- KINGHORN, A. D.; NANAYAKKARA, N. P. D.; SOEJARTO, D. D.; MEDON, P. J. Potential Sweeteners Agents of Plant origin. I. Purification of *Stevia rebaudiana* Sweet Constituents by Droplet Counter Current Chromatography. **Journal of Chromatography.** v. 237, p. 478-483, 1982.
- KINGHORN, A.D. *Stevia rebaudiana* leaves - **Safety Reviews**, University of Illinois at Chicago, pp 4-20, 1992.
- KLEBER, C. J. Rat Dental Caries Investigation of Stevioside Natural Sweetener. 53 p, 1990.
- KLONGPANICHPAK, S.; TOSKULKAO, Y.; TEMCHAROEN, P.; APIBAL, S.; GLINSUKON, T. Lack of mutagenicity of stevioside and steviol in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100, **Journal Med. Assoc. Thailand**, v. 80, p. 121-128, 1997.

- KIENLE, U. Process for Preparation of a Natural Sweetening Agent from *Stevia rebaudiana* and its Use. **European Patent Applied**. EP 335,265 (Cl C07H15/256), 7 pp, 1989.
- KIUNI, M.; NAKASAWA, T.; SASAKI, S.; FUKUMURA, T. Stevioside Production. (Japan Organo Corp. Ltd.). **Japan Kokai**. 77, 100,500, 1977.
- KODAKA, K. Purification of Sugar Solutions from *Stevia* dry Leaves. **Japan Kokai**. 77,110,872, 1977.
- KUBOMURA, S; UENO, J; CHIDA, S.; KANAEDA, J. Purification of Stevioside. (Nikken Chemicals Co. ltd.). **Japan Kokai**. 76,91,300, 1976.
- LEGATOR, M.S.; PALMER, K.A.; GREEN, S.; PETERSEN, K.W. Cytogenetic Studies in Rats of Cyclohexylamine, a Metabolite of Cyclamate. **Science**, v. 165, p.1139-1140, 1969.
- LI, Y. & LI, Y. Extraction of Stevioside from *Stevia rebaudiana* - An Experimental Method for High Yield. **Shipin Kexue** (Beijing). v. 46, p.20-22, 1983.
- LI, S. Preliminary Studies on Technological Conditions of Extraction of Stevioside. **Zhongguo Tiaoweipin**. N° 9, p. 10-11, 1984.
- MAKAPUGAY, H.C.; NANAYAKARA, N.P.D.; KINGHORN, A.D. Potencial Sweetening Agents of Plant Origin. V. Inproved High-performance Liquid Chromatography Separation of The *Stevia rebaudiana* Sweet Dioterpene Glycosides using linear Gradiente Elution. **Journal of Chromatography**. v. 283, p. 390-395, 1984.

- MARUZEM CHEMICAL CO. LTD. Separation of Stevioside and Rebaudioside-A. **Japan Kokai.** 82, 86,264, 1982.
- MARUZEM CHEMICAL CO. LTD. A New Sweetener: Ruboside. **Japan Kokai.** 83,28,245, 1983.
- MARUZEM CHEMICAL CO. LTD. Decolorization of *Stevia* extract. **Japan Kokai,** 80, 111,768, 1980.
- MASUYAMA, F. Stevioside Sweetener Purification from *Stevia rebaudiana* Leaves. **Japan Kokai.** 80,07,039, 1980.
- MATSUI, M; SOFUNI, T.; NOHMI, T. Regionally-targeted mutagenesis by metabolically-activated steviol: DNA sequence analysis of steviol-induced mutants of guanine phosphoribosyltransferase (GPT) gene of *Salmonella Typhimurium*, **Mutagenesis**, v. 11, n° 6, p. 565-572, 1996.
- MAZUR, R. H. The discovery of aspartame. **In Aspartame: Physiology and Biochemistry** (Stegink, L. D., and Filer, L. J., Jr., eds.), Marcel Dekker, New York, Chap. 1, 1984.
- MELLIS, M.S. A crude extract of *Stevia rebaudiana* increase the renal plasma flow of normal and hypertensive rats, **Brasilian J. Medical and Biological Research**, v. 29, n° 5, p. 669-675, 1996.
- MILLER, R.; WHITE, L.W.; SCHWARTZ, H.J. A case of Episodic Urticaria Due to Saccharin Ingestion. **Journal Allergy Clin. Immunology** v. 53, p. 240-242, 1974.

- MIOTTO, D. Avaliação da purificação de solução de subproduto de extração do esteviosídeo por adsorção em Zeólitas modificadas. **Dissertação de mestrado, DEQ-UEM**, Maringá, Pr. Brasil, 2002.
- MITSUBISHI ACETATE CO. LTD. Purification of Stevioside Extract. **Japan Kokai**. 83,28,247, 1983.
- MITSUBISHI ACETATE CO. LTD. Stevioside Sweetener Purification. **Japan Kokai**. 83, 28,246, 1983.
- MITSUHASHI, H.; UENO, J.; SUMITA, T. Studies on the Cultivation of *Stevia rebaudiana*. Determination of Stevioside I. **Yakugaku Zasshi**. v. 95, n° 1, p.127-130, 1975.
- MITHUHASHI, H. Safety of stevioside. In Tama Biochemical Co. Ltd. **Report on Safety of Stevia**, pp. 1-20, 1981.
- MIZUFUNE, S.; UDA, Y.; IKEDA, M. Extraction of Stevioside as a Sweetener from Plants. **Japan Kokai**, Tokyo Koho JP 62 56,158 ((87 56,158) (CI A23L1/221). 4 pp.
- MIWA, K. Extraction of Stevioside or Phyllo dulcin. (Toyo Ink. Mfg. Co. Ltd.). **Japan Kokai**, 79,103,900, 1979.
- MIWA, K.; MAEDA, S.; MURATA, Y. Purification of Stevioside. (Toyo Ink. Mfg. Co. Ltd.). **Japan Kokai**, 79,90,199, 1979.
- MIWA, K.; MAEDA, S.; MURATA, Y. *Stevia* Sweetener Purification by Electrolysis. (Toyo Ink. Mfg. Co. Ltd.). **Japan Kokai**, 79,89,066, 1979.

- MORAES, E. P. Clarificação do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni através de adsorção em Zeólitas modificadas, **Dissertação de Mestrado**, DEQ/UEM, Maringá, Pr. Brasil, 2000.
- MORI, N.; SAKANOUÉ, M.; TAKCUSHI, M.; SHIMPO, K.; TANABE, T. Effect of stevioside on fertility in rats, **Shokuhin Eiseiga Ku Zasshi (Journal of Food Hygienic Society Japan)**. v. 22, p. 409-414, 1981.
- MORITA, E. Improvement of Stevioside Sweetener. (Morita Kagaku Kogyo Co. Ltd.). **Japan Kokai**. 77, 117, 474, 1977.
- NAKAYAMA, K.; KASAHARA, D; YAMAMOTO, F. Absorption, distribution, metabolism and excretion of stevioside in rats, **Journal of Food Hygienic Society of Japan**, v. 27, p. 1-8, 1986.
- NISHIMA, T.; KATAYAMA, O.; YOKOYAMA Y. Sensory Evaluation of Stevia Sweeteners. **Fifth. International Congress of Food Science and Technology**, Held at Kyoto. p. 158, 1978.
- NISHIYAMA, P., ALVAREZ, M., VIEIRA, L.G.E. Quantitative Analysis of Stevioside in the Leaves of *Stevia rebaudiana* by Near Infrared Reflectance Spectroscopy, **Journal of Science Food Agriculture** v. 59, n° 3, p. 277-281, 1992.
- NITTAYA-NGOWATANA Improvement of extraction and purification of stevioside and its products from *Stevia rebaudiana*. **Kasetsart Univ.**, Bangkok. Graduate School, 1997.

- OCHI, T. & SHIMIZU, T. Stevia Taste Improvement. (San-Ei Chemical Industries, Ltd.). **Japan Kokai**. 78,148,573, 1978.
- OGONTO, K. K. Flavor improvement of stevia Sweetening Agents. **Japan Kokai**. 81, 55, 174, 1980.
- OHE, Y.; OKANE, H.; WATANABE, M.; SHIBASATO, M.; KAMATA, Z. Separation of Sweeteners from *Stevia*. (Toyo Sugar Refining Co. Ltd.). **Japan Kokai**. 77,120,170.
- OLIVEIRA, C. D. S. S. Influência do Guaraná (*Paulinia cupana*), da *Stevia rebaudiana* (BERT) Bertoni e do esteviosídeo, na incidência da cárie dentária em ratos (*Rattus norvegicus, albinus*), Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, 61p, 1985.
- OLIVEIRA-FILHO, R.M.; UEHARA, O.A.; MINETT, C.A.S.A.; VALLE, L.B.S. Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni in rats: endocrine effects Endocrine Effects, **Gen. Pharmac**, 20(2) 187-191, 1989.
- PAGLIOSA, F. M. Pesquisa sobre *Stevia Rebaudiana Bertoni* no Centro de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal de Santa Maria - RS. **I Seminário sobre Stevia rebaudiana Bertoni**. IX : 1-2, 1981.
- PASQUEL, A.; MEIRELLES, M. A. A.; MARQUES, M. M.; PETENATE, A. J. Extraction of Stevia glycosides with CO<sub>2</sub> + water, CO<sub>2</sub> + ethanol, and CO<sub>2</sub> + water + ethane. **Brazilian Journal of Chemistry Engineering**, São Paulo, v. 17, n° 3, 2000.

- PENG, K.; FAN, S.; WANG, W. Separation and Quantitative Determination of Stevioside by Reversed-phase HPLC. **Seppu** v. 2, n° 1, p. 6-10, 1985.
- PERSINOS, G. J. Method of Producing Stevioside (Amazon Natural Drug Company). **U.S. Patent** 73, 3, 723, 410, 1973.
- PROCINSKA, E.; BRIDGES, B.A.; HANSON, J.R. Interpretation of results with 8-azaguanine resistance system in *Salmonella typhimurium*: no evidence for direct acting mutagenesis by 15-oxosteviol, a possible metabolite of steviol, **Mutagenesis**, v. 6, n° 2, p. 2478-2482, 1991.
- ROBINSON, B. L. The Stevias of Paraguay. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University** v. 90, p. 79-90, 1930.
- SAKAMOTO, I.; KOHDA, H.; MURAKAMI, K.; TANAKA, O. Quantitative analysis of Stevioside. **Yakugaku Zasshi**. v. 95, n° 12, p.1507-1511, 1975.
- SAMANIEGO, C. C. *Stevia rebaudiana* - "Caa-jhe-He" (Yerba Dulce). **Revista Farmacêutica**. Buenos Aires. v. 88, p. 199-202, 1946.
- SAZAKI, K. & MURAKAMI, K. Improvement of Taste of Artificial Sweetener With Waste from Stevioside Manufacture. (Sanyo Kokuzaku Pulp. Co. Ltd). **Japan Kokai**. 77.47,960, 1977.
- SATO, T.; KURODA, J.; MIHARA, K. Stevioside Purification. (Inst. for Prod. and Dev. Sci.). **Japan Kokai**. 80,39,731, 1980.
- SAWAGUSHI, Y. & KIKUCHI, H. Purification of Stevioside. (Sanyo Kokusaku Pulp. Co. Ltd.). **Japan Kokai**. 77,05,800, 1977.

- SCHEFFE, H. Analyses of Variance for Paired Comparison. **Journal of American Stat. Association.** v. 47, p. 381-384, 1952.
- SEIKISUI CHEMICAL CO., LTD. Purification of *Stevia* Sweeteners by Precipitation. **Japan Kokai** Tokkyo Koho JP 58, 212,759 ((83 212,759)) (Cl A23L1/22). 3 pp., 1983.
- SEIKISUI CHEMICAL CO., LTD. Purification of *Stevia* Sweeteners. **Japan Kokai** Tokkyo Koho JP **59 42,862** ((84 42,862)) (Cl A23L1/22). 4 pp., 1984.
- SHIMIZU, T. & OCHI, T. Stevia sweetener to Soft Drinks. **New Food Industries.** v. 25, n° 4, p. 38-43, 1978.
- 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. **Economic Botany** v. 37, p. 71-79, 1983.
- STRIEDNER, J., CZYGAN, F.C., BRAUNEGG, G. Contribution to the Biotechnological Production of Sweeteners from *Stevia rebaudiana* Bertoni I. A Method for the Serial Analysis of Diterpene Glycosides by HPLC. **Acta. Biotechnology.** v. 11, n° 5, p. 495-499, 1991.
- SUTTAJIT, M.; VINITKAUMNUEN, U.; MEEVATEE, U.; BUDDHASUKH, D. **Environmental Health Perspectives Supplements**, v.101, p. 53-56, 1993.
- SUZUKI, H.; IKEDA, T; MATSUMOTO, T.; NOGUSHI, M. isolation and Identification of Rutin from Cultured Cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Agric. Biol. Chem.** v. 40, n° 4, p. 819-820, 1976.

- TAKAHASHI, T. Method for Obtaining Sweetening Sugars from Leaves of *Stevia*.  
(Arashi Agro-desenvolvimento Ltda.). **Braz. Pedido PI BR** 86 05,325 (CI  
CO7H15/24). 12 pp, 1987.
- TAKAMURA, K.; KAWAGUCHI, M.; ISONO, C. Separation of Stevioside  
(Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.). **Japan Kokai**. 77,51,069, 1977.
- TAKAMURA, K.; KAWAGUCHI, M.; ISONO, C. Stevioside from *Stevia rebaudiana*. (Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.). **Japan Kokai**, 77, 05,800,  
1977.
- TAMA SEIGAKU K. K. Stevioside Purification. **Japan Kokai**. Tokyo Koho.  
82,75,992, 1982.
- TANAKA, O. Chemistry of *Stevia rebaudiana* Bertoni. New Source of Natural  
Sweeteners. **Recent. Adv. Nat. Prod. Res. , Proc. Int. Symp.** pp.219-227,  
1980.
- TANAKA, O.; YAMAZAKI, K.; KASAI, K.; KOHDA, H. Preparation of  
Sweetening Agents. (Ajinomoto Co. Inc.). **Japan Kokai**. 77, 41,275, 1977a.
- TANAKA, O.; YAMAZAKI, K; KASAI, R & KANDA, H. Rebaudiosides.  
Ajinomoto Co. Inc. **Japan Kokai**. 77, 83, 731, 1977b.
- TATEO, F.; ESCOBAR-SANCHES, M.L.; BONONI, M.; LUBIAN, E. Stevioside  
content of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni grown in East Paraguay. :  
**Italian-Journal-of-Food-Science**, v.11, n° 3, p. 265-269, 1999.

- TOSKULKAO, C.; CHATURAT, L.; TEMCHAROEN, P.; GLINSUKON, T. Acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, and its metabolite, steviol, in several animal species, **Drug and Chemical Toxicology**, v. 5, p. 119-143, 1997.
- TOYO SEITO K. K. Stevioside Extraction of *Stevia rebaudiana*. **Japan Kokai**. 80,40,596, 1980, .
- TOYO SUGAR REFINING CO. LTD. Sterol Glycoside Purification. **Japan Kokai**. 81,137,866, 1981.
- TOYO SUGAR REFINING CO. LTD. Purification of a-Glucosil-stevioside. **Japan Kokai**. 82,43,659, 1982.
- TOYODA, K.; MATSUI, H.; SHODA,T.;UNEYAMA, C.; TAKADA, K.; TAKAHASHI, M. Assesment of the carcinogenicity of stevioside in F344 rats, **Food and Chemical Toxicology**. v. 35, p. 957-965, 1997.
- UENO FINE CHEMICAL INDUSTRIES LTD. Low Calories Sweetener Composition. **Japan Kokai**. 80,156, 562,1980.
- YAMADA, S. & KAJIMA, S. Pure Stevioside Production. **Japan Kokai**. Tokkyo Kono. 80,162,953, 1980.
- YAMADA, A.; OHGAKI, S.; NODA, T.; SHIMIZU, M. Chronic toxicity of dietary Stevia Extracts, **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 26, n<sup>o</sup> 2, p. 169-183, 1985.
- YAMAZAKI, K.; KOHDA, H.; KOBAYASHI, T.; KASAI, R.; TANAKA, O. Structures of *Stevia* diterpenes-glucosides: Application of Carbon-13 NMR. **Tetrahedron Letter**. v. 13, p. 1005-1008, 1976.

- YODYINGYUAD, V.; BUNYAWONG, S. Effect of stevioside on growth and reproduction, **Human Reproduction**, v. 6, n° 1, p. 158-165, 1991.
- YOKOYAMA, S. & SUGIYAMA, H. Clarification of Aqueous Extract from *Stevia* Leaves by Using Magnesia Adsorbent. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**. v. 37, n° 11, p. 899-905, 1990.
- YUAN, Y. & QIAN, J. Quantitative Determination of Stevioside by HPLC in Serum, Urine and Excrement. **Zhongcaoyao** (Naijing). v. 18, n° 11, p. 491-492, 1987.
- WAKABAYASHI, T. Purificação de Extratos Contendo Esteviosídeo. **Pedido Bras. PI - BR. 81, 03,228**, 1981.
- WANG, W.; LIU, Q.; LI, S. Evaluation of Sweetness and Flavor of mixtures containing Acesulfame K and other sweeteners. **Shipin Kexue** (Beijing) n° 10, 9-12, 1994
- WETZEL, D.L. Near Infrared Reflectance Analysis. Sleeper Among Spectroscopic Techniques. **Anal. Chem.**, v. 55, no 12, p. 1165A-1176A, 1983.
- WOOD, D.J.; LIRETTE, A.; CROBER, D.C.; JU-HY The effect of stevia as a feed sweetener on weight gain and feed consumption of broiler chickens, **Can. J. Animal Science.**, v. 76, n° 2, p. 267-269, 1996.
- XILI, L.; CHENGJIANG, B.; ERYI, X.; REIMING, S.; YUENGMING, W.; HAODONG, S.; ZHIYUAN, H. Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats, **Food Chemistry Toxicology**, v. 30, n° 11, p. 957-965, 1992.

- ZANELA, N. L. M.; BIJELLA, M. F. T. B.; MACHADO, M. A. A. M.; SILVA, S. M. B.; TÁRZIA, O. Influência de bochechos com soluções de digluconato de clorexidina a 0,2 por cento, fluoreto de sódio a 0,05 por cento pH 3,4 e esteviosídeo a 0,1 por cento na inibição da placa dentária “in vivo” em crianças. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**; v. 5(1/2): nº 7, p. 1-8, jan-jun., 1997.
- ZHOU, R.; RAN, Z.; LI, Q.; ZI, X.; RONG, Y.; LI, R. Ion Exchange Methods in Extraction and Purification of Steviosides from *Stevia rebaudiana*. **Zhongguo Tiaoweipin**. nº 12, p. 12-13, 1984.
- ZI, X.; LI, R.; ZHOU, R. Extraction of Steviosides from *Stevia* by modified water Extraction-Alcohol Precipitation Methods. **Zhongguo Tiaoweipin**. nº 20, p. 17-18, 1986.

## Anexo I

Número de tubos positivos				Limite	
100 mg ou 0,1 mL/tubo	10 mg ou 0,01 mL/tubo	1 mg ou 0,001 mL/tubo	NMP/g (mL)	Inferior	Superior
0	0	0	<3	-	-
0	0	1	3	<0,5	9
0	1	0	3	<0,5	13
1	0	0	4	0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	50	4800
3	3	3	>2400	-	-

Número mais provável para réplicas de 3 tubos e limites de confiança de 95%



## Anexo II

### CURVA PADRÃO DE ESTEVIOSÍDEO

Resultados obtidos por CLAE para confecção da curva-padrão de esteviosídeo.

Concentração (mg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Média
0,10	256.269	250.633	256.824	254.575,3
0,25	617805	605.861	606.195	609.953,7
0,50	1.201.970	1.142.148	1.187.151	1.177.090,0
0,75	1.651.569	1.668.745	1.738.052	1.686.122,0
1,00	2.187.942	2.246.298	2.247.251	2.227.264,0

Curva de calibração para o esteviosídeo

