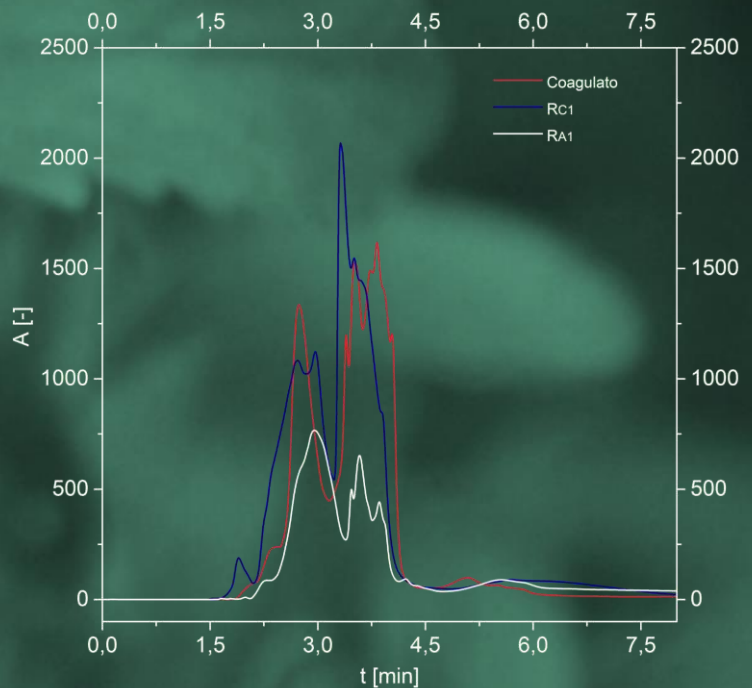


Studio del processo di estrazione di glicosidi da *Stevia rebaudiana*

Studio del processo di estrazione di glicosidi da *Stevia rebaudiana*



Anna Palumbo

Anna Palumbo



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

Studio del processo di estrazione di glicosidi da *Stevia rebaudiana*

Tesi in
Principi di Ingegneria Chimica

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Ing. Sara Cascone

Candidata:

Anna Palumbo

matricola 0612201618

Anno Accademico 2017/2018

A mia madre

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times New Roman

La data prevista per la discussione della tesi è il 20/02/2019

Fisciano, 11/02/2019

Sommario

Sommario.....	I
Indice delle figure.....	V
Indice delle tabelle	VII
Abstract.....	IX
Introduzione	IX
1.1 La Stevia _____	2
1.1.1 Cenni storici	3
1.1.2 Caratteri botanici	4
1.2 Glicosidi steviolici _____	6
1.2.1 Struttura	7
1.2.2 Stabilità e solubilità	7
1.3 Tecniche di estrazione _____	8
1.3.1 Estrazione convenzionale	9
1.3.2 Estrazione assistita da ultrasuoni	9
1.3.3 Estrazione assistita da microonde	10
1.4 Stato dell'arte _____	11
1.5 Obiettivi _____	15
Materiali, apparecchiature e metodi.....	17

2.1 Materiali	18
2.1.1 Stevioside	18
2.1.2 Rebaudioside A	18
2.1.3 Foglie essiccate di Stevia rebaudiana Bertoni	19
2.1.4 Coagulanti	19
2.1.5 Resine a scambio ionico	20
2.1.5.1 AMBERLITE IR120 Na.....	22
2.1.5.2 AMBERLITE IRA96	23
2.1.7 Altri materiali	24
2.2 Apparecchiature	24
2.2.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	24
2.2.2 Generatore di ultrasuoni	25
2.2.3 Generatore di microonde	26
2.3 Metodi	27
2.3.1 Metodo convenzionale	27
2.3.2 Metodo ad ultrasuoni	29
2.3.3 Metodo a microonde	30
2.3.4 Processo di purificazione	31
2.3.4.1 Coagulazione con $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	31
2.3.4.2 Coagulazione con $\text{Ca}(\text{OH})_2$	32
2.3.4.3 Scambio ionico con resine.....	33
2.3.5 Metodo analitico	34
2.3.6 Taratura glicosidi	35
Risultati e discussione	39
3.1 Purificazione mediante coagulazione con $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ _____	40
3.2 Purificazione mediante coagulazione con $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ e resine a scambio ionico _____	44
3.3 Purificazione mediante coagulazione con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e resine a scambio ionico rigenerate _____	50
Conclusioni.....	55

4.1 Conclusioni	56
-----------------------	----

Bibliografia	59
---------------------------	-----------

Indice delle figure

Figura 1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	2
Figura 2. Tavola botanica <i>S. rebaudiana</i> Bertoni. A) Foglie. B) Piantina. C) Capolino composto da 5 fiori bianchi. D) Sistema riproduttivo. E) Semi. F) Pianta matura [9].	5
Figura 3. Cavitazione acustica [17].	10
Figura 4. Fasi di cavitazione acustica: A) depressione; B) compressione ultrasonora; C) riscaldamento; D) implosione [16].	10
Figura 5. Struttura chimica dello Stevioside [28].	18
Figura 6. Struttura chimica del Rebaudioside A [29].	19
Figura 7. Catena polimerica solfonata [31].....	21
Figura 8. Sale ammonico quaternario [31].	21
Figura 9. HPLC modello modulare 1200 Infinity Agilent Technologies.....	25
Figura 10. Sonificatore VCX 130 PB 130 W, Sonics & Materials Inc.	26
Figura 11. Forno a microonde modello LG 735.	27
Figura 12. Foglie triturate di <i>S. rebaudiana</i>	28
Figura 13. Set-up sperimentale di estrazione convenzionale.....	28
Figura 14. Set-up sperimentale di estrazione assistita da ultrasuoni.....	29
Figura 15. Set-up sperimentale di estrazione assistita da microonde.....	30
Figura 16. Estratto tal quale.....	31
Figura 17. Immagini dell'estratto dopo coagulazione con solfato ferrico dopo: 30 minuti (a), 16 ore (b), dopo filtrazione (c).	32
Figura 18. Immagini dell'estratto durante la coagulazione con idrossido di calcio: soluzione satura (a), dopo filtrazione (b).....	32
Figura 19. Confronto fra estratto prima e dopo il trattamento con resine.	33
Figura 20. Esempi di cromatogrammi di Stevioside (a) e di Rebaudioside A (b).....	36

Figura 21. Retta di taratura Stevioside e Rebaudioside A.	37
Figura 22. Retta di taratura tenendo conto di tutti i punti.	37
Figura 23. Esempio cromatogramma di estratto tal quale e coagulato con $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ per l'estrazione convenzionale.	40
Figura 24. Esempio cromatogramma di estratto tal quale e coagulato con $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ per l'estrazione assistita da ultrasuoni.	41
Figura 25. Esempio cromatogramma di estratto tal quale e coagulato con $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ per l'estrazione assistita da microonde con tempo di estrazione 195 s.	42
Figura 26. Concentrazione di glicosidi nei coagulati ottenuti da MWE.	43
Figura 27. Concentrazione di glicosidi dopo ogni step di purificazione per estrazione convenzionale.	45
Figura 28. Concentrazione di glicosidi dopo ogni step di purificazione per estrazione assistita da ultrasuoni.	46
Figura 29. Concentrazione di glicosidi dopo ogni step di purificazione per estrazione assistita da microonde con tempo di estrazione 195 s.	47
Figura 30. Confronto fra cromatogramma dopo coagulazione e dopo trattamento R_{A1} per estrazione assistita da ultrasuoni.	48
Figura 31. Confronto fra cromatogramma dopo coagulazione, dopo trattamento R_{C2} (a) e dopo trattamento R_{A2} (b) per estrazione assistita da ultrasuoni.	49
Figura 32. Confronto fra cromatogramma dopo coagulazione e dopo trattamento con R_{A1} rigenerata per estrazione assistita da ultrasuoni.	50
Figura 33. Esempio di cromatogramma di estratto tal quale e coagulato con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ per l'estrazione assistita da ultrasuoni.	51
Figura 34. Cromatogramma dell'estratto dopo coagulazione, dopo il primo step (a) e dopo il secondo step (b) con resina cationica rigenerata e dopo il primo step con resina anionica rigenerata.	52
Figura 35. Concentrazione di glicosidi dopo ogni step di purificazione con resine rigenerate per estrazione assistita da ultrasuoni.	53

Indice delle tabelle

Tabella 1. Glicosidi in foglie di <i>S. rebaudiana</i> Bertoni [12].	6
Tabella 2. Dati fisici e solubilità di glicosidi steviolici [15].	7
Tabella 3. Scheda tecnica Amberlite IR120 Na [32].	23
Tabella 4. Scheda tecnica Amberlite IRA96 [33].	23
Tabella 5. Tempi e temperature di estrazioni al microonde.	30
Tabella 6. Rigenerazione resine a scambio ionico.	33
Tabella 7. Specifiche metodo HPLC.	34
Tabella 8. Soluzioni standard Stevioside puro.	35
Tabella 9. Soluzioni standard Rebaudioside A puro.	35
Tabella 10. Coefficiente di regressione e coefficiente di proporzionalità Stevioside, Rebaudioside A e del totale.	38
Tabella 11. Concentrazioni medie di glicosidi dopo la coagulazione con $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$.	42
Tabella 12. Concentrazione e temperatura per ogni tempo di estrazione assistita da microonde.	44
Tabella 13. Concentrazione [mg/L] al termine di ogni step di purificazione con resine.	47
Tabella 14. Concentrazione [mg/L] al termine di ogni step di purificazione utilizzando $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e resine rigenerate.	53

Abstract

Stevia leaves are rich in steviol glycosides, which give the extract a sweetening power 300 times higher than sucrose. Innovative approaches have been developed to increase the productivity of the steviol glycoside extraction process, such as microwave or ultrasonic assisted extraction. These techniques prove important technological advantages and they give higher yields in shorter times.

The goal of this work is to study the extraction process from *Stevia Rebaudiana*, comparing three extraction techniques: conventional extraction (CE), ultrasonic assisted extraction (USE) and microwave assisted extraction (MWE).

Stevia's dried leaves were crushed and mixed with distilled water in a beaker with a ratio between mass of vegetable matter and volume of liquid equal to 1:16.

In the CE process, the mixture has been stirred for 2 h at 80°C, in the USE process, it was subjected to ultrasonic waves for 10 min at 80°C and in the MWE process the mixture was subjected to microwaves for different times of extraction obtaining different and increasing outlet temperatures with time. The process was chosen with extraction time equal to 195 s, that gave an output temperature of 75°C. The extracts were filtered with filter paper and then subjected to purification, using different techniques: a coagulation was carried on using $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ obtaining a concentration of glycosides almost similar for all the extraction methods, but the HPLC chromatograms showed the need of further purification. This purification was carried out by two steps of ion-exchanging using resins but, analyzing the resulting chromatograms, the second step has been found superfluous since the concentration remained unchanged.

From the analysis of the samples taken from the extract after the purification step with anionic resin, an unexpected chromatographic

peak was shown which was attributed to the effect of the resin that probably brought a foreign substance in solution.

Therefore, the regenerated resins were used to further purify the coagulate and this time no unexpected peak was appear, showing that it was due to the fresh anionic resin.

Regenerated ion exchange resins were also used to purify the extract after coagulation with Ca(OH)_2 .

On the basis of this work, it can be concluded that the ultrasonic and microwave extraction processes are a valid alternative to the conventional method since, once fixed the parameters as extraction time, power, type of solvent and solid / liquid ratio, they involve obtaining a yield of glycosides in terms of concentration comparable with that obtained conventionally, but in shorter times.

Concerning the purification process of the extract, by comparing the coagulated treated with ferric sulfate and with calcium hydroxide, although requiring further purification in both cases, the first gave a more clarified coagulate, but with a concentration of dissolved substances considerably lower.

About ion exchange resins, due to the peak formed after treatment with fresh anionic resin, it was considered more appropriate to work with regenerated resin, as this process led to the removal of the undesired substance. Moreover, using the regenerated resins, the second purification step was necessary to remove numerous impurities from the solution.

Bibliografia

1. P. B. Jeppesen *et al.*, Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K⁺-channel activity, *Metabolism* 9 (2): 208-14 (2000).
2. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Scientific opinion on the safety of the extension of use of steviol glycosides (E 960) as a food additive, *EFSA Journal* 13(6):4146 (2015).
3. J. E. Brandle *et al.*, *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties, *Canadian journal of plant science* 78: 527–536 (1998).
4. http://www.storiain.net/storia/stevia-storia-del-dolcificante-che-sta-conquistando-il-mondo/#_edn3
5. K. Mizutani and O. Tanaka, Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan, A.D. Kinghorn *Medicinal and Aromatic Plants-Industrial profiles. Stevia: the Genus Stevia*, Taylor and Francis, London and New York 19: 178-195 (2002).
6. V. Chatsudthipong and C. Muanprasat, Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness, *Pharmacology & Therapeutics* 121: 41–54 (2009).
7. D.D. Soejart, Botany of Stevia and Stevia rebaudiana, A.D. Kinghorn *Medicinal and Aromatic Plants-Industrial profiles. Stevia: the Genus Stevia*, Taylor and Francis, London and New York 19: 18-39 (2002).
8. A. Santini *et al.*, La Stevia: un dolcificante non calorico di origine naturale, *Progress in nutrition* 10 (1): 3-10 (2008).
9. <https://sweetgreenfields.com/our-story/about-stevia/>
10. E. J. Kennelly, Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana*, A.D. Kinghorn *Medicinal and Aromatic Plants-Industrial profiles. Stevia: the Genus Stevia*, Taylor and Francis, London and New York 19: 68-85 (2002).
11. S. Ceunen and J. Geuns, The steviol glycosides of Stevia rebaudiana: chemical diversity, biosynthesis and metabolism, *J Nat Prod.* 76(6):1201-28 (2013).
12. C. González *et al.*, Main properties of steviol glycosides and their potential in the food industry: a review, *Fruits* 69(2) 127–141 (2014).
13. <https://www.chimicamo.org/chimica-organica/glicosidi.html>
14. F. Tacchella, Glicosidi steviolici: valutazione della sicurezza e loro utilizzo come edulcoranti alimentari, Tesi di laurea in Scienze chimiche (2015).

15. A. Douglas Kinghorn, Overview, A.D. Kinghorn *Medicinal and Aromatic Plants-Industrial profiles. Stevia: the Genus Stevia*, Taylor and Francis, London and New York 19: 1-17 (2002).
 16. http://www.masterreach.unina.it/Lezioni%202013_2014/Analisi%20chimica%20tossicologica-Prof.%20Perissutti-Di.%20Frecentese.pdf
 17. /lavaggio-ad-ultrasuoni-pulire-impossibile/
 18. Ani Alupului *et al.*, Ultrasonic vs. Microwave Extraction Intensification of Active Principles from Medicinal Plants, AIDIC conference series (2009).
 19. M. Desai *et al.*, Extraction of Natural Products Using Microwaves as a Heat Source, *Separation & Purification Reviews* 39:1–32, (2010).
 20. A.M.J. Kootstra and S. Huurman, Extraction of steviol glycosides from fresh Stevia using acidified water; comparison to hot water extraction, including purification, *ACRRES-Wageningen UR* 722 (2017).
 21. Shi Qiu Zhang *et al.*, Membrane-based separation scheme for processing sweeteners from stevia leaves, *Food Research International* 33: 617-620 (2000).
 22. Wea-Shang Fuh and Been-Huang Chiang, Purification of Steviosides by Membrane and Ion Exchange Processes, *Journal of food science*-Volume 55 No. 5 (1990).
 23. V. Jaitak *et al.*, An Efficient Microwave-assisted Extraction Process of Stevioside and Rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni), *Phytochemical Analysis* 20 240–245 (2009).
 24. J. Šic Žlabur *et al.*, Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves, *International Agrophysics* 29 231-237 (2015).
 25. Carbonell-Capella J.M., Šic Žlabur J., Rimac Brnčić S. *et al.*, Electrotechnologies, microwaves, and ultrasounds combined with binary mixtures of ethanol and water to extract steviol glycosides and antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* leaves, *J. Food Process Preserv.* 41: e13179 (2017).
 26. M. A. A. Gasmalla *et al.*, Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from *Stevia (Stevia rebaudiana* Bertoni) leaves, *Arabian Journal of Chemistry* (2014).
 27. A. Periche *et al.*, Influence of Extraction Methods on the Yield of Steviol Glycosides and Antioxidants in *Stevia rebaudiana* Extracts, *Plant Foods Hum Nutr* 70:119–127 (2015).
 28. <https://it.wikipedia.org/wiki/Stevioside>
 29. https://it.wikipedia.org/wiki/Rebaudioside_A
 30. <https://www.lenntech.it/biblioteca/coagulazione/coagulazione-flocculazione.htm>
 31. C. Brisi, *Chimica Applicata*, Libreria editrice universitaria Levrotto & Bella (1991).
 32. <https://www.lenntech.com/Data-sheets/Amberlite-IR-120-Na-L.pdf>
 33. <https://www.lenntech.com/Data-sheets/Amberlite-IRA-96-L.pdf>
 34. K. K. Jonnala *et al.*, Process for production of Steviosides from *Stevia Rebaudiana* Bertoni, *United States Patent Application Publication*, Pub. No.: US 2006/0142555 A1 (2006).
-

Alla conclusione di questo capitolo della mia vita desidero ringraziare tutti coloro che hanno contribuito al raggiungimento di questo traguardo (P.S. Non sono mai stata brava con le parole).

Ringrazio innanzitutto il Gruppo TPP ed in particolare il gruppo del Lab T5a.

Ringrazio il professore Gaetano Lamberti per avermi guidato con sapienza ed accuratezza e per avermi donato un enorme bagaglio culturale che porterò sempre con me.

Un grande grazie va a Sara per la fiducia che ha avuto in me sin dal primo giorno di tirocinio, per la cura e l'esperienza con cui mi ha seguito e per essere stata il mio punto di riferimento. Ma soprattutto per la sua simpatia ed il suo umorismo che hanno rallegrato il tempo trascorso in laboratorio e che ogni giorno mi hanno fatto varcare la sua porta con il sorriso.

Ringrazio anche Diego e Giovanni per le divertenti e costruttive pause pranzo condivise e per essersi dimostrati disponibili ogni qualvolta io abbia avuto bisogno del loro aiuto. Grazie ad Emanuele per gli utili consigli e soprattutto per tutte le noci, le nocciole e le tavolette di cioccolato che hanno placato i miei attacchi di fame durante la stesura della tesi.

Ringrazio mia madre e a lei dedico la mia tesi per l'amore e la pazienza che ha sempre riservato nei miei confronti. Anche se spesso è stato difficile capirmi e sopportarmi, soprattutto i giorni prima di un esame, lei mi è sempre stata accanto donandomi il suo sostegno e spronandomi a dare il meglio di me stessa.

Ti voglio bene.

Ringrazio mia sorella Lucia per avermi consigliato e rassicurato e per non aver mai smesso di motivarmi.

Ringrazio mio fratello Alessandro per aver sempre creduto in me ciecamente.

Ringrazio nonna Lucia per avermi chiamato prima e alla fine di ogni esame senza mai dimenticarsi di una data in questi tre anni.

Ringrazio nonna Anna che ogni mattina, prima che io uscissi di casa, si è accertata che io avessi portato qualcosa da mangiare con me (almeno una banana).

Ringrazio Adriana e i miei nipotini Alfonso e Alessia per avermi regalato momenti di spensieratezza durante i pomeriggi di studio.

Ringrazio Sabatino che con la sua positività e la sua allegria senza fine mi tira su di morale.

Ringrazio i miei zii per il loro supporto e il loro aiuto che non sono mai venuti meno.

Ringrazio tutti i miei cugini che io considero buoni Amici più che parenti.

Ringrazio Antonella, Dario, Federico e i nonni per avermi trasmesso la tranquillità di cui spesso ho bisogno.

Ringrazio Maria, una sorella più che un'amica, che ha condiviso con me l'ansia e l'attesa prima di ogni esame e poi i momenti di gioia.

Ringrazio Serena e Laura che, nonostante le conosca solo da pochi mesi, si sono rivelate buone amiche sin da subito grazie alla complicità che ci unisce.

Ringrazio Federica, Loredana, Laura, Maria, Mirco, Tarek ed il gruppo IUPAC per tutte le esperienze, il conforto morale e le risate condivise. L'università sarebbe stata più noiosa senza di voi!

Ringrazio Claudia, Fabio, Marco, Emanuele S. ed Emanuele R., gli storici amici del liceo che, nonostante abbia visto raramente negli ultimi tre anni, mi hanno fatto capire che non conta vedersi tutti i giorni per volersi bene e mi fanno ancora piangere dalle risate ogni volta che ci vediamo.

Ringrazio i miei amici "Maist" e tutti gli altri per i momenti di svago e le avventure condivise. Grazie per essere come siete!

Ringrazio Carmine, l'amore della mia vita. Ci sono infinite cose per cui io senta di ringraziarlo ma se volessi elencarle tutte non basterebbero tutti i fogli che ho a disposizione. In particolar modo lo ringrazio per tutte le volte che ha dovuto sopportare le mie preoccupazioni, spesso inutili, senza mai lamentarsi ma confortandomi con un abbraccio. Grazie per esserci stato sempre e per avermi capito più di chiunque altro, questa laurea è anche un po' tua. Ti amo.

Ringrazio Te che sei la mia forza, pur non essendo fisicamente presente, mi hai dato la determinazione che mi è servita a superare gli ostacoli e raggiungere l'obiettivo prefissato.
