طراحی واحد استخراج شیرین‌کننده طبیعی از برگ استه ویا

پروین ناهید[1*]، ایران عالمزاده[2]، سید سجاد مرتضوی[3]

۱- مربی مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی شریف

۲- استاد مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی شریف

۳- کارشناس مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی شریف

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۴/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۲

پیام‌نگار: nahid@shairf.edu

چکیده

استه ویا[1] یا گیاه شیرین، بومی قاره آمریکاست و نخستین بار پزشکی اسپانیایی در سال ۱۸۸۸ آن را مطالعه کرد. در طول قرنها، مردم پاراگوئه و برزیل برای شیرین کردن غذا و درمان فشار خون بالا، سوزش معده، کنترل اوریک اسید و درمان چاقی، از آن استفاده می‌کردند. اکنون بسیاری از کشورها مانند ژاپن عصاره استه ویا را به عنوان جایگزین شیرین‌کننده‌های مصنوعی، مانند ساخارین، آسپارتام و سیکلامات وارد بازار کرده‌اند تا از زیانهای این انواع مصنوعی جلوگیری کنند. از جملهٔ ترکیبات شیرین‌کنندهٔ آن (گلیکوزیدها) عبارت‌اند از استه ویوزید[2]، ربادیوزید A و جز اینها. در این پروژه، روشهای مختلف تولید و استخراج گلیکوزیدهای استه ویا مانند استخراج با حلالها، استخراج با سیال فوق بحرانی SCFE[3]، صافشهای غشایی، فرا و نانو بررسی شده است. در پایان، طرح مناسبی برای فرایند تولید شیرین‌کننده استه ویا ارائه شده است.

کلیدواژه‌ها: استه ویا، استخراج، صافش غشائی، فرا، نانو

۱. مقدمه

در دنیای امروز، به دلیل وجود مشکل چاقی و بیماریهای مرتبط با آن، برای شکر به عنوان یک ماده پر کالری دارای جایگزین‌هایی معرفی شده است، ولی مصرف شیرین‌کننده‌های مصنوعی چون ساخارین، اسپارتام و جز آنها به علت مشکلاتی چون سرطانزایی و تجزیه شدن در گرمای زیاد، محدود شده است. بیشتر پژوهشها به سمت شیرین‌کننده‌های طبیعی پیش می‌روند. شیرینی برگ گیاه استه ویا ۳۰ برابر شیرینی شکر است و خلوص عصاره گلیکوزید ۹۵٪ مورد تأیید سازمانهای غذا و داروی آمریکا FDA و بهداشت جهانی WHO است. عصاره استه ویا برعکس اسپارتام، مقاوم به اسید و حرارتی تا ۲۰۰°C است. افزایش تقاضا برای استه ویوزیدها (گلیکوزیدهای استه و یا) به عنوان شیرین‌کننده، از جهت فقدان قند و پایین بودن میزان کربوهیدراتهای آن و همچنین شیرینی ۲۵۰ تا ۳۰۰ برابری نسبت به شیرینی ساکارز است. استفاده از استه ویا برای قرنها در امریکای جنوبی و چین رواج داشته، در برزیل از ۱۹۸۶، ژاپن از ۱۹۷۰، سنگاپور از ۲۰۰۵ و امریکا از ۲۰۰۸ شروع شده است و تا امروز در بسیاری از کشورها ادامه دارد[۶-۱].

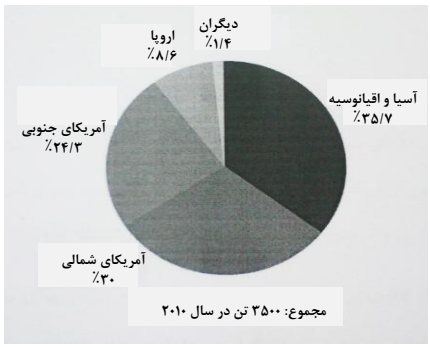
* تهران دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی شیمی و نفت

1. Stevia
2. Stevioside
3. Supper Critical Fluid Extraction

کشورهای اصلی تولیدکننده استه ویوزید، چین، پاراگوئه و برزیل هستند. چین عمده‌ترین تهیه‌کننده و ژاپن بزرگترین مصرف‌کنندهٔ این گیاه است. در سال ۲۰۰۶، سازمان بهداشت جهانی مطالعات آزمایشگاهی بر روی حیوان و انسان درباره گلیکوزیدهای استه ویا را بررسی کرد و به این نتیجه رسید که استه ویوزید و ربادیوزید A بر خلاف برخی از شیرین‌کننده‌های دیگر هیچ‌گونه اثر سرطانزایی ندارند. علاوه بر این، تأکید شده، که دارای برخی خواص دارویی برای بیماران مبتلا به فشارخون بالا و دیابت نوع دوم هستند. میزان مصرف روزانه آن معادل ۴ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مصرف‌کننده تعیین شد[۷و۸] (شکل (۱)). در سال ۲۰۰۸، شرکتهای کوکاکولا، کارگیل[1]، پپسی، و پیور سیرکل[2]، شیرین‌کننده‌هایی بر پایه استه ویا به نامهای ترونویا و پیورویا را معرفی کردند و مجوز استفاده از آنها از سوی FDA صادر شد. زیستگاه استه ویا مناطق نیمه مرطوب و نیمه گرمسیری، در ارتفاع ۴۰۰ متر بالاتر از سطح دریا با ۱۵۰۰ تا ۱۸۰۰ میلی متر بارش سالانه و دمای بین ۶ تا ۴۳ درجه سلسیوس و به صورت بومی در مناطق مسطح کم ارتفاع و در خاکهای شنی و اسیدی مجاور مرداب‌ها رشد می‌کند. در چین، حتی در منطقه‌ای با ۳۲ درجه شمال جغرافیایی که در بیشتر فصلهای رشد گیاه، ساعتهای آفتابی محدودی دارد (پوشش ابری سنگین) بیشترین بازدهی این گیاه به‌دست‌آمده است. بعد از برداشت، برگهای استه ویا به تجهیزات خشک‌کننده با خورشید ویا کوره منتقل می‌شوند. کاهش رطوبت با خورشید از ۱۰٪ تا ۸۰٪ حدود ۹ ساعت طول می‌کشد، اما خشک کردن کوره‌ای می‌تواند تا دو روز زمان ببرد. سپس، استخراج و مراحل بعدی صافی‌گذرانی برای تولید عصاره استه ویا اعمال می‌شود[۹]. با توجه به آینده تجاری خوب استه ویا، در ایران نیز تلاشهایی برای کاشت آن در شمال و اصفهان به عمل آمده است.

۲. روش تحقیق

تجزیهٔ برگهای استه ویا نشان می‌دهد که این گیاه منبع خوبی از ترکیبات مغذی است[۵]. (جدول (۱)). بنابر گزارش فائو و سازمان بهداشت جهانی امینواسیدهای ضروری، در گروه پروتئین‌ها، مثل لیزین و ایزولوسین، در استه ویا یافت می‌شوند. گلوتانیک و آسپارتیک اسید و نیز یکی از آمینواسیدهای غیر ضروری، به‌نام



شکل ۱. سهم قاره‌ای از تجارت جهانی استه ویا[۷].

آرژینین، نیز دیده شده است. مواد معدنی چون پتاسیم، کلسیم، منیزیم و آهن نیز در مقادیر قابل قبول در برگهای استه ویا یافت می‌شوند. چربیهای ضروری که برای جذب ویتامینهای محلول در چربی (A,D,E,K) مفیدند و اسیدهای چربی چون پالمیتیک و لینولنیک اسید نیز در این گیاه حضور دارند. وجود ویتامینهای محلول در آب، مانند فولیک اسید، ویتامین‌های C و B2 نیز در عصاره برگ این گیاه تشخیص داده شده است. شیرین‌کننده‌های طبیعی استه ویا، گلیکوزیدها ۱۰٪ تا ۱۵٪ وزن برگها را تشکیل می‌دهند و مهمترین آنها عبارتند از استه ویوزید، ربادیوزید (A,C) دولکوزید و استه ویول بیوزید[۷و۸] (جدول (۱)) ربادیوزید A با یک واحد گلوکز اضافی نسبت به استه ویوزید دارای شیرینی با کیفیت بهتری است. ساختار عمده گلیکوزیدهای استه ویا، رامنوز Rha، زیلوز Xyl و گلوکز Glu هستند. ترکیبات زیستی دیگری، از جمله استرول، کلروفیل، اسیدهای آلی، منوساخاریدها، تانین، و الکالوئید در برگ استه ویا، خواص ضد میکربی و ضد بیماری سرطان به این گیاه می‌بخشند. به علت وجود مواد نورشیمیایی، فنل‌ها و فلاونوئیدها فعالیت آنتی اکسیدانی استه ویا گلیکوزید چشمگیر است[۱۲] آزمایشهای ظرفیت رادیکالهای آزاد روش DPPH، رادیکال هیدراکسل اَبراکسید و رادیکال نیتریک اکسید در این مورد به کار می‌رود. سه نمونه استه ویوزید ۵μg/ml، یک نمونه اسکوربیک اسید استاندارد 5μg/ml و یک نمونه چای سبز (دم کرده ۱ گرم در 100ml آب جوش ۵ دقیقه) از نظر درصد ممانعت از فعالیت رادیکال آزاد DPPH بررسی شدند. برای چای سبز ۳/۷٪، اسکوربیک اسید استاندارد ۸۶. ۵٪ و سه عصاره استویا ۵/۲۱٪، ۲۵/۴۰٪ و ۸/۳۹ ٪ به‌دست آمد که نشان می‌دهد بسیار مناسب و بیشتر از چای سبز است[۱۳و۱۴].

1. Cargill
2. Pure Circle

جدول ۱. تجزیهٔ برگ‌های خشک شده استه ویا – g/100 – نمونه‌های ۴-۱[۵].

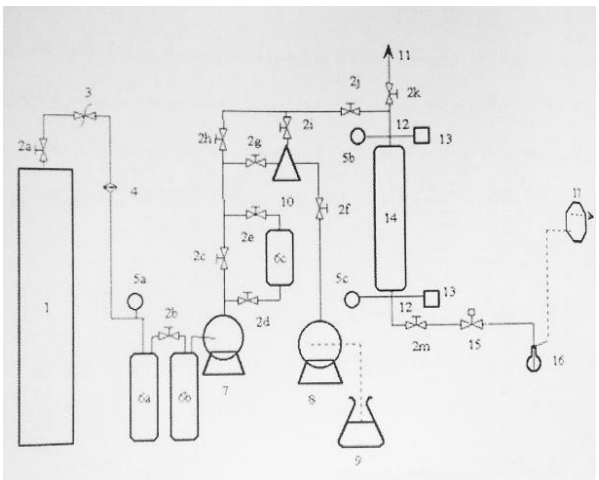
مواد	گرم درصد	مواد	گرم درصد
رطوبت	۷-۶۵/۴-۷-۳۷/۵	فیبر خام	۱۸-۲/۱۵-۵/۱۸-۵/۱۵
پروتئین	۱۰-۲/۱۱-۸/۹-۴/۱۱	استه ویوزید	۸/۵-۱/۹-۵-۱۰
چربی	۳-۹/۱-۵/۲-۷۳/۳	ربادیوزید A	۸/۱-۲/۱-۸/۳-۲-۴
خاکستر	۱۱-۳/۶-۵/۱۰-۴۱/۷	ربادیوزید C	۳/۱-۴/۱-۶/۰-۱-۲
کربوهیدرات	۵۲/۵۲-۹/۶۱	دالکوزید A	۳/۰-۴/۰-۷/۰

۲-۱ روش‌های استخراج- استخراج با آب و حلالها

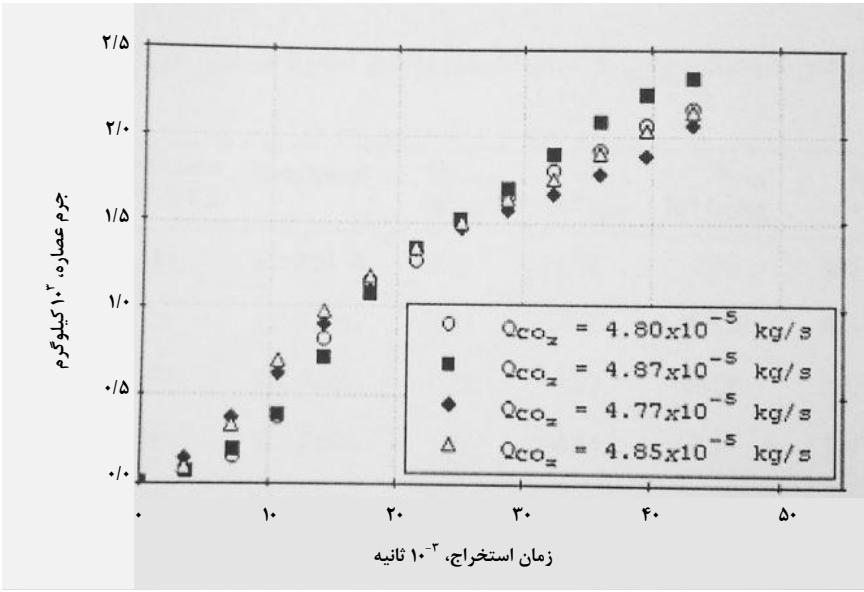
استه ویوزید در سال ۱۹۳۱ از عصاره استه ویا تفکیک، سپس هفت گلیکوزید دیگر استخراج شد. ربادیوزید A، پایدارترین و شیرین‌ترین آنها با کمترین مزه تلخ است، ولی کمترین درصد وزن را در برگ دارد؛ بنابراین، استخراج آن دشوارتر است. استخراج با آب پیچیده، پر هزینه و محتاج بهره‌گیری از حلال‌های آلی مانند متانول و بوتانول است که البته مشکل زیست محیطی دارند. اتانل مشکل تغییر طعم محصول را نیز دارد. در مواردی، حلال‌های غیر قطبی مثل کلروفرم یا هگزان از روی برگ‌های استه ویا به منظور حذف چربی‌ها، کلروفیل و دیگر مواد عبور داده می‌شوند. معمولاً یک مرحله استخراج جامد- مایع و یک مرحله استخراج مایع- مایع به‌کار می‌رود[۱۰].

۲-۲ استخراج سیال فوق بحرانی (SCFE)

در این شکل استخراج، سیال CO_2 همراه با کمک حلالی چون متانول، اتانول یا استون به‌کار می‌رود؛ کیفیت گلیکوزید به‌دست‌آمده از لحاظ شیرین‌سازی برتر از کیفیت شیرین‌سازی آن از سایر روش‌هاست. این روش شامل دو مرحله است (شکل (۲)):
۱. پیش فراوری برگ‌های استه ویا با استفاده از SCFE با CO_2،
۲. استخراج گلیکوزیدهای استه ویا از طریق SCFE با استفاده از مخلوط‌های آب + CO_2 ویا آب + متانول + CO_2 یا متانول + CO_2.
مطابق شکل، جامد ساییده شده در داخل سلول استخراج (با طول ۳۷۵/۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۸۳ متر) فشرده می‌شود. هنگامی که دمای سیستم به ۳۰°C می‌رسد، دریچه‌های 2A، 2B، 2C و 2H باز می‌شوند. وقتی فشار سیستم به ۲۰۰ bar رسید. دریچه‌های 2J، 2M و دریچه ریز سنج ۱۵ نیز باز می‌شوند. عصاره در بطری‌های شیشه‌ای جمع‌آوری می‌شود. سرعت جریان حلال پیوسته اندازه‌گیری و نمونه‌گیری ساعتی عصاره نیز انجام می‌شود. این آزمایش در فشار ۲۰۰ bar، دمای ۳۰°C و با سرعت جریان حلال متوسط $۴/۸۲\times۱۰^{-۵}$ کیلو گرم بر ثانیه در یک دوره ۱۲ ساعته انجام شده است، و منحنی استخراج در شکل (۳) مشاهده می‌شود[۱۵]. پارامترهای PH و دما نیز تأثیر دارند. PH به وسیله اسیدهای ضعیفی چون سیتریک اسید و مالیک و تارتاریک اسید پایین نگه داشته می‌شود. دمای استخراج از ۴ تا ۵۰ درجهٔ سلسیوس می‌تواند متغیر باشد که بستگی به زمان استخراج، غلظت ناخالصی رنگ دانه و عوامل دیگر دارد. ترکیبات تلخ عصاره را که ممکن است در دمای بالا به‌دست آید، می‌توان از طریق رسوب‌دهی با کلسیم کربنات کاهش داد. افزایش عصاره اگاوا که یک متعادل‌کننده طبیعی است، نیز شیرینی استه ویا را بالا می‌برد و ته مزه تلخ آنرا می‌پوشاند[۱۶].



شکل ۲. تصویر واحد آزمایشگاهی[۱۵].



شکل ۳. منحنی استخراج در ۲۰۰bar و ۳۰°C [۱۵].

روش‌های صافش

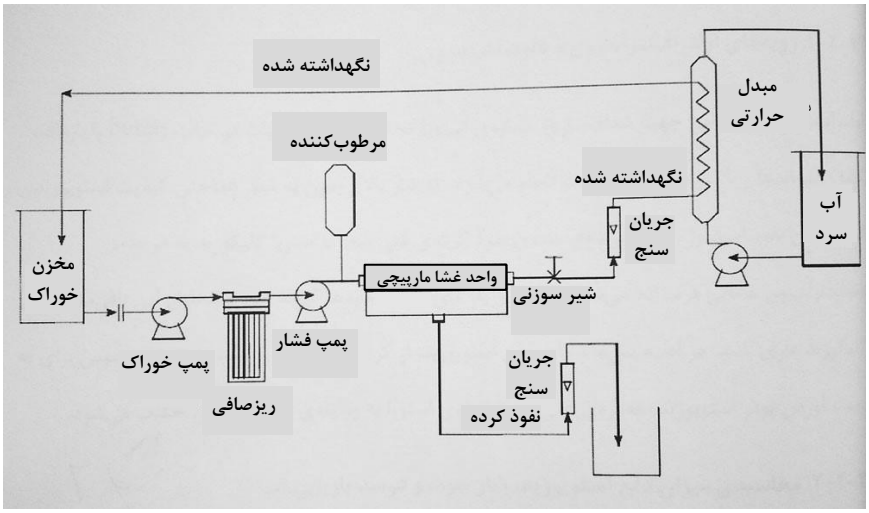
این روش‌ها شامل استخراج با آب داغ تحت فشار، فراصافش، UF، و نانو صافش NF، است. در ابتدا، مراحل پیش فراوری و شستشوی برگ‌ها با هگزان، و خشک کردن انجام می‌شود. عصاره در معرض آبگرم تحت فشار (فشار بهینه 100kpa) و دمای ۱۰۰ تا ۱۱۰ درجهٔ سلسیوس، به مدت ۱۰ دقیقه قرار می‌گیرد. سپس، عصاره خام به‌دست‌آمده سرد و PH محلول صاف شده با افزودن سدیم هیدروکسید ۰/۱N تنظیم می‌شود. مشاهده شده که آهنگ استخراج استه ویا در PH=3 بالاتر است. رسوب تشکیل شده را تصفیه و محلول غنی استه ویوزید را با افزایش اسید رقیق ۰/۱N کلریدریک اسید خنثی می‌کنند. سپس، به‌منظور خالص‌سازی آن را در معرض فراصافی‌گذرانی چند مرحله‌ای و نانو صافی‌گذارانی غشایی قرار می‌دهند. مرحله نانو صافش باعث می‌شود که رنگ دانه کاروتنویید از بین نرود. استه ویوزید غنی شده به وسیله کربن فعال از صافی رد می‌شود و پس از خشک شدن با اسپری، محصول سفید خالص ۹۸٪ استه ویا گلوکوزید به‌دست می‌آید. مقایسه عملکرد غشاهای UF و NF در تغلیظ و تصفیه استه ویوزید در جدول (۲) درج شده است و این جدول آهنگ بالای نفوذ و نیز مقدار نه چندان قابل توجه گرفتگی غشاء در حین صافی‌گذرانی را نیز نشان می‌دهد. به هر حال، محلول آبی استه ویا در عرض دو روز، شرایط مناسبی

جدول ۲. مقایسه عملکرد غشاهای UF و NF در تغلیظ و تصفیه استه ویوزیدها[۱۱].

پارامترها	فراصافش	نانوصافش
فشار خوراک	۱۰	۲۰
استه ویوزید در خوراک (µg/mL)	۹	۹۰
استه ویوزیدها، ماده نفوذ کرده (µg/mL)	۶ .۵	۳
رنگ دانه‌ها (٪)	۹۰-۸۰	۵
شار (L/m^2h)	۲۴	۳۲

برای رشد قارچ فراهم می‌کند. بنابراین، غشاء با آب مقطر و بعد با محلول سیتریک اسید ۲w/v٪ شستشو داده می‌شود. شستشوی یک هفته در میان با محلول ۱w/v٪ تتراسدیم EDTA نیز لازم است[۱۱]. معمولاً، در نانو صافش دمای بالاتر باعث حذف ترکیبات تلخ می‌شود، ولی زردینه‌هایی چون اپی جنین[1] -۴ و کوئر ستین[2] که طعمی تلخ و وزن مولکولی پایین‌تر از گلوکوزیدهای استه و یا دارند، می‌توانند از نانوصافی عبور کنند. در این حالت، به مراحل استخراج اضافه می‌شود که شامل حلال آبی قطبی، کلرزدایی، لختگی، کروماتوگرافی تغییر یون و تبلور است[۱۷-۱۲] (شکل (۴)).

1. Apigenin
2. Quercetin



شکل ۴. نمودار فراصافش و نانوصافش در مقیاس آزمایشگاهی[۱۴].

۲-۳ محاسبه میزان استه ویوزید و درصد بازیابی

در فرایندهای فرا و نانوصافش غشایی، کارایی جداسازی برحسب درصد ماده حل شده به صورت زیر بیان می‌شود[۱۷].

$$\%R = \left(1 - \frac{Cp}{Cf}\right) \text{x}100 \qquad (۱)$$

در معادله (۱) Cp مقدار استه ویوزید موجود در مادهٔ نفوذ کرده و Cf مقدار آن در خوراک است.

تخمین فشار اسمزی $A\pi(bar)$ از تساوی زیر محاسبه می‌شود:

$$A\pi = \text{ViCiRT} \qquad ۲)$$

Ci غلظت TDS در Vi 'mol. dm^{-3} مقدار یون‌هایی است که هنگام رسوب ماده حل شده تشکیل می‌شوند. R ثابت عمومی گازها و T دمای مطلق است. درصد استه ویوزید که بعد از فرایند تصفیه بازیافت می‌شود از طریق معادله (۳) به‌دست می‌آید:

$$\% \text{ بازیابی استه ویوزید} = \frac{\text{غلظت استه ویوزید در استخراج شده خام}}{\text{غلظت استه ویوزید در ماده بازیافت شده}} \times ۱۰۰$$

(۳)

۲-۴ روش‌های جدید جذبی برای بعد از استخراج

عصاره استخراج شده معمولاً یک محلول کلوییدی با ذرات قهوه‌ای است که باید زلال شود. برای این کار، غیر از حلال‌ها، فراصافش، نانو صافش، تبادل یونی و ستون‌های کروماتوگرافی نیز به کار می‌رود. زئولیت‌ها به عنوان جاذب برای شفاف‌سازی عصاره مورد استفاده قرار گرفته است[۱۸] رزین‌های معمولی نیز برای جذب و رنگ زدایی عصاره استه ویا بر اساس تبادل یونی به کار رفته است[۱۹].

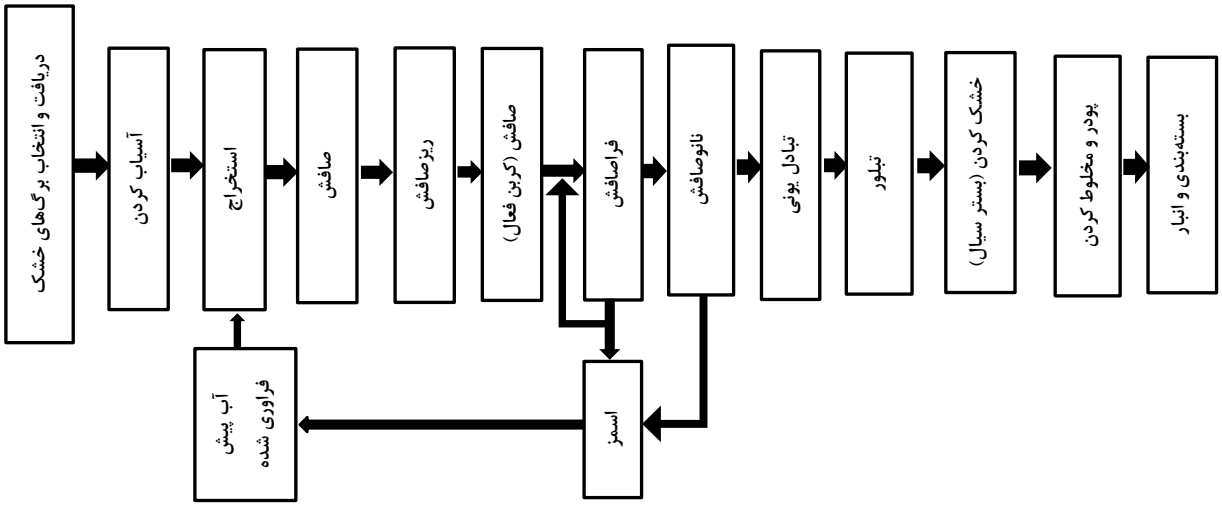
۳. نتایج و بحث

با توجه به بررسی فعلی انجام‌شده برای فرایند تولید عصاره استه ویا، طرحی شامل استخراج و صافش چند مرحله‌ای ارائه می‌شود (شکل (۵)). ابتدا اشیای اضافی (فلزی، شاخه) از برگ‌ها به‌کمک آشکار ساز فلز یا با دست جدا، و وزن و رطوبت برگ‌ها اندازه‌گیری می‌شود. برگ‌ها با یک آسیاب چکشی تا قطر ۱ میلی‌متری پودر می‌شوند. پودر حاصل با نوار حلزونی شکل به حوضچه‌های استخراج منتقل، و به نسبت ۱ به ۱۵ با آب مخلوط و ۴ ساعت خیسانده می‌شود. صافش اولیه با صافی ۰. ۵ میلی‌متری انجام و عصاره به‌دست‌آمده به ریزصافش می‌رود تا رنگ دانه‌ها، مواد با وزن مولکولی زیاد و باکتری‌های بزرگتر از ۱/۰ µm جدا شوند. به منظور از بین بردن بو و رنگ عصاره، صافی کربن فعال و برای جدایش پروتئین‌ها، پکتین‌ها، فراصافی و نانو صافی به کار می‌رود. ذرات بزرگتر، از منافذ غشاء باقی می‌مانند و گلیکوزیدهای استه ویا تغلیظ و برای تصفیه به اسمز معکوس فرستاده می‌شوند تا ذرات بزرگتر از ۰/۰۰۰۱µm جدا

شوند. آب فراوری شده نیز دوباره مصرف می‌شود. عصاره از ستون تعادل یونی (رزین‌های آنیونی یا کاتیونی) عبور می‌کند تا مواد معدنی حذف شوند. خشک کردن با خشک‌کن پاشنده، رطوبت محصول را به ۲٪ می‌رساند. سپس توسط یک آسیاب پودر و درروکش پلی اتیلن بسته‌بندی و در جعبه قرار داده می‌شود. گلیکوزیدهای استه ویا هم اکنون در کشورهای کانادا، آمریکا و اتحادیه اروپا، هم به عنوان افزودنی و هم مکمل غذایی مصرف می‌شوند. با توجه به گسترش جهانی تجارت استه ویا تولید تجاری آن در ایران نیز آینده نویدبخشی خواهد داشت.

۴. نتیجه‌گیری کلی

عصاره استه ویا در مقایسه با ساخارین (۳۰۰ بار شیرین‌تر از ساکارز ولی غیرمغذی و با احتمال بیماری‌زایی)، سیکلامات (۳۰ بار شیرین‌تر از ساکاروز و با احتمال بیماری‌زایی) و اسپارتام (تجزیه در حرارت بالا به مواد بیماری‌زا) شیرین‌کننده‌ای از عصاره گیاه، طبیعی، مغذی و مقاوم به حرارت و اسید است. علاوه بر صنایع غذایی، منبعی برای آنتی اکسیدان است، در صنایع پزشکی، خمیر دندان، دهان شویه، بیماری‌های دیابتی، خوراکیهای کاهندهٔ وزن، فشار خون و به عنوان عامل ضد باکتری کاربرد دارد.



شکل ۵. نمودار جعبه‌ای فرایند تولید شیرین‌کننده استه ویا [حاصل این بررسی].

مراجع

[1] Carbonell-capella, J. M., Buniowska, M., Esteve, M. J., Frigola, A., "Effect of Stevia rebaudiana addition on bioaccessibility of bioactive compounds and antiocidant activity of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion" Food chemistry, 184, 122-130, (2015).

[2] Jentzer, J. B., Alignan, M., Vaca-Garcia, C., Rigal, L., Vilarem, G., "Response surface methodology to optimise accelerated solvent extraction of steviol glycosides from stevia rebaudiana bertoni leaves" Food Chemistry, 166, 561-567, (2015).

[3] Adioo, R. Ph., Afoakwa, E. O., Dewettinck, K., "Rheological properties, melting behaviours and physical quality characteristics of sugar-free chocolates processed using inulin/polydextrose bulking mixtures sweetend with stevia and thaumatin extracts" Food Science and Technology, 1, 62, 592-597, (2015).

[4] Shivanna, N., Naika, M., Khanum, F., Kaul, V. K., "Antioxidant, anti diabetic and protective properties of stevia rebaudiana". Journal of diabetes and its complications 27(2):103-113, (2013)

[5] Goyal, S. K., Samsher. Goyal, R. K., "Stevia (Stevia rebaudiana) a bio-sweetener: a review ". Int J. food Sci nutr 61(1):1-10, (2010).

[6] Ulbricht, C. I. R., Milkin, T., Poole, E. A., Rusie, E., "An evidence based systematic review of stevia by the natural standard research collaboration". Cardiovasc Hematol agents med chem 8(2):113-27, (2010).

[7] Benford, D. J., Dinovi, M., Schlatter, J., "safety Evaluation of certain food additives: Steviol Glycosides" (PDF). WHO food additives series (World health organization joint FAO/WHO Expert Committee on food additives (JECFA)) 54: 140, (2006).

[8] Oddone, B., "How to grow stevia", Guarani Botanicals, Inc. : Pawcatuck, Connecticut. P. 1-30, (1999).

[9] Jia, G. N., "An experiment on the cultivation of stevia rebaudiana'' [chinese]. Shanxi agricultural Science, (1):p. 20-21, (1984)

[10] Horwitz, W., "Official methods for analysis". AOAC international, Gaithersburg, (2000).

[11] Tan, S., Shibuta, Y., Tanaka, O., "isolation of sweetener for stevia rebaudiana". Jpn. kokai 63, 177, 764, (1988).

[12] Khalaf, N. A. Shakya, A. K., Al-Othman, A., El-Agbar, Z., Farah, H., "antioxidant Activity of some common plants". Turkish journal of biology, 32, 51-55, (2008).

[13] Brand Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". LWT-Food science and technology, 28, 25-30, (1995)

[14] Van der Bruggen, B., Manttari, M., Nystrom, M., "Draw backs of applying nanofiltration and how to avoid them". Review. Separation and purification technology, 63, 251-263, (2008).

[15] Pasquel, A., "Extracao dos glicosideos da stevia com fluidos presssurizados". Ph. D. diss., unversidade Estadual de campinas, campinas, SP, Brazil, (1999).

[16] Kienle, U., "Method of making a natural sweetener based on stevia rebaudiana, and use thereof". Int. Cl. 5 A61K 35/78. U. S. CI. 424/195. 1, 586690 Sep. 24, 1990. May 12, 1992. Chemical abstracts No. 11, 22442z, (1992).

[17] Sridhar, S., Ravindra, R., Khan, A. A., "Recovery of monomethyl hydrazine liquid propellant by per evaporation method". Industrial & engineering chemistry research, 39, 2484-2488, (2000).

[18] Moraes, E. P., "Clarificacao do extrato de stevia rebaudiana bertoni atraves de adsorcao em zeolite modificada". Master thesis in chemical engineering, state university of maringa, (2000).

[19] Shi, R., Xu, M., Xu, M., Shi, Z., Fan, Y., Guo, X., Liu, Y., Wang, C., He, B., "Synthesis of Bifunctional Polymeric Adsorbent and Its Application in Purification of Stevia Glycosides" Reactive and Functional Polymers, 50, 107-116, (2002).