

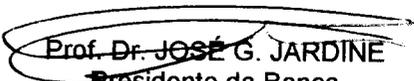
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**TECNOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE CONCENTRADO  
NATURAL DE AROMA E SABOR DE COGUMELO  
SHIITAKE (*Lentinula edodes* Sing) POR PROCESSO  
CONJUGADO DE ULTRAFILTRAÇÃO E OSMOSE  
INVERSA.**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por ROBERTA BELANDRINO RODRIGUES aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de fevereiro de 1998.

Campinas, 10 de fevereiro de 1998.

  
Prof. Dr. JOSÉ G. JARDINE  
~~Presidente da Banca~~

Roberta Belandrino Rodrigues  
Farmacêutica

Prof. Dr. José Gilberto Jardine  
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Campinas, SP  
1998

9507

UNIDADE	BC
N.º DA UNIDADE:	
33460	
N.º DA UNIDADE:	
395/98	
C	X
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	14/04/98
N.º CPD	

CM-00109043-5

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

R618t

Rodrigues, Roberta Belandrino

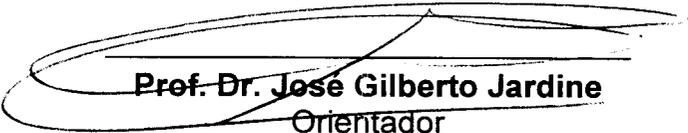
Tecnologia para obtenção de concentrado natural de aroma e sabor de cogumelo shiitake (*Lentinula edodes* Sing) por processo conjugado de ultrafiltração e osmose inversa / Roberta Belandrino Rodrigues. – Campinas, SP: [s.n.], 1998.

Orientador: José Gilberto Jardine

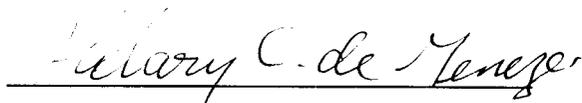
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Cogumelos. 2.Shiitake. 3.Extração. 4.Sabor.  
5.Ultrafiltração. I.Jardine, José Gilberto. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

**Membros da banca examinadora**



**Prof. Dr. José Gilberto Jardine**  
Orientador



**Prof.ª Dr.ª Hilary Castle de Menezes**



**Prof.ª Dr.ª Marisa de Nazare H. Jackix**

---

**Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma etapa vencida na minha vida.

A minha família, que esteve sempre presente em minha vida e sempre me apoiou e incentivou nos meus estudos.

Ao Prof. Dr. José Gilberto Jardine, pela orientação, amizade, esforço e por todo ensinamento passado.

Aos componentes da banca examinadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Hilary Castle de Menezes, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marisa de Nazaré H. Jackix e Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig pelas sugestões e comentários.

Ao CTAA/EMBRAPA, por permitir o uso do equipamento de ultrafiltração e osmose inversa e realização de algumas das determinações químicas.

À pesquisadora Dr.<sup>a</sup> Lourdes Cabral por toda orientação e conhecimento dispensados nas etapas de ultrafiltração e osmose inversa.

Ao Luís Fernando M. da Silva, pela orientação no uso do equipamento de ultrafiltração e osmose inversa.

Ao Fabiano pela ajuda durante as etapas de ultrafiltração e osmose inversa.

Ao pessoal do Laboratório de Farmacognosia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas pela disponibilidade e ajuda prestada durante a etapa de extração.

Aos funcionários da FEA-UNICAMP, pela prestatividade.

A Universidade Federal do Rio de Janeiro, em particular a professora Dr.<sup>a</sup> Cláudia Moraes Rezende e doutoranda Sandra Regina Gomes Fraga, do Instituto de Química, pelo inestimável apoio na condução das análises cromatográficas.

Aos amigos Virgínia, Cristina, Daisy, Edmar, Hector Abel e Paulo por todos os momentos agradáveis que passamos juntos.

Aos meus colegas de pós-graduação da FEA-UNICAMP, pelo companheirismo e amizade.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À FAPESP pelo auxílio financeiro durante toda realização do Mestrado.

## SUMÁRIO

Índice de Tabelas.....	i
Índice de Figuras.....	iii
Resumo.....	v
Summary.....	vi
<b>I INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1. Cogumelo.....	3
2.2. “Flavor”.....	9
2.3. Extração.....	15
2.4. Concentração.....	18
2.4.1. Separação e Concentração por Membranas.....	19
2.4.1.1. Membranas.....	26
2.4.1.2. Aplicação da Ultrafiltração e Osmose Inversa na Separação e Concentração de Sucos.....	35
2.5. Identificação de Compostos Voláteis.....	43
2.5.1. Headspace.....	43
2.5.2. Simultaneous Distillation and Extraction.....	44
2.5.3. Solid Phase Micro Extraction.....	44
2.5.4. Destilação.....	44
2.5.5. Purge and Trap.....	45
2.5.6. Extração Direta.....	45
2.5.7. Cromatografia Gasosa Sniffing Port.....	46
2.5.8. Cromatografia Gasosa Multidimensional.....	46

<b>III MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
3.1. Material.....	48
3.1.1. Matéria Prima.....	48
3.1.2. Solvente.....	49
3.1.3. Equipamento.....	49
3.1.4. Limpeza da Membrana.....	52
3.2. Processamento.....	52
3.2.1. Testes Preliminares para Definição do Processo de Extração.....	54
3.2.2. Planejamento Experimental.....	58
3.2.3. Extração dos Compostos do Flavor.....	61
3.2.4. Filtração.....	62
3.2.5. Ultrafiltração.....	62
3.2.6. Osmose Inversa.....	63
3.2.7. Análises Físicas e Químicas.....	64
3.2.7.1. Sólidos Solúveis.....	65
3.2.7.2. Sólidos Totais.....	65
3.2.7.3. Umidade.....	65
3.2.7.4. Lipídeos Totais.....	65
3.2.7.5. Proteína Bruta.....	65
3.2.7.6. Cromatografia Gasosa.....	65
3.2.7.7. Avaliação Sensorial.....	66
<b>IV RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
4.1. Testes de Extração.....	68
4.2. Planejamento Experimental para Extração.....	72
4.3. Composição Centesimal do Cogumelo shiitake.....	77
4.4. Extração dos Compostos de Aroma e Sabor.....	78

4.5. Ultrafiltração.....	79
4.6. Osmose Inversa.....	82
4.7. Cromatografia Gasosa.....	85
4.8. Avaliação Sensorial.....	98
<b>V CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>104</b>
Anexo.....	112

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Caracterização dos processos de separação e concentração com membranas.....	20
Tabela 2.2. Aplicações industriais dos principais processos de separação por membranas.....	22
Tabela 3.1. Níveis codificados das variáveis independentes para os ensaios.....	59
Tabela 3.2. Níveis descodificados das variáveis independentes .....	60
Tabela 4.1. Parâmetros do processo de extração contínua em contra corrente para o teste 1.....	68
Tabela 4.2. Parâmetros do processo de extração contínua em contra corrente para o teste 2.....	69
Tabela 4.3. Parâmetros do processo de extração contínua em contra corrente para o teste.3.....	69
Tabela 4.4. Parâmetros do processo de extração contínua em contra corrente para o teste 4.....	70
Tabela 4.5. Parâmetros do processo de extração contínua em contra corrente para o teste 5.....	70
Tabela 4.6. Parâmetros do processo de extração contínua em contra corrente para o teste 6.....	71
Tabela 4.7. Parâmetros do processo de extração contínua em contra corrente para o teste 7.....	71
Tabela 4.8. Respostas obtidas de cada ensaio do planejamento experimental.....	73
Tabela 4.9. Efeitos estimados e coeficiente para a variável Brix.....	73
Tabela 4.10. Análise de variância para a variável Brix.....	74
Tabela 4.11. Composição centesimal do cogumelo shiitake fresco utilizado no experimento.....	77

Tabela 4.12. Teor de sólidos totais, sólidos solúveis e sólidos insolúveis do cogumelo Shiitake.....	78
Tabela 4.13. Rendimento da extração dos sólidos solúveis.....	79
Tabela 4.14. Variação do fluxo de permeado em função do tempo de processo de ultrafiltração.....	81
Tabela 4.15. Variação do fluxo de permeado em função do tempo de processo de osmose inversa (1ª batelada).....	83
Tabela 4.16. Variação do fluxo de permeado em função do tempo de processo de osmose inversa (2ª batelada).....	84
Tabela 4.17. Valores do tempo de retenção, área e área% para extrato aquoso de cogumelo Shiitake .....	91
Tabela 4.18. Valores do tempo de retenção, área e área% para extrato aquoso de cogumelo Shiitake permeado da ultrafiltração.....	93
Tabela 4.19. Valores do tempo de retenção, área e área% para extrato aquoso de cogumelo Shiitake concentrado da osmose inversa.....	94
Tabela 4.20. Valores do tempo de retenção, área e área% para extrato aquoso de cogumelo Shiitake permeado da osmose inversa.....	95
Tabela 4.21. Caracterização dos componentes do aroma do extrato aquoso de cogumelo Shiitake.....	96
Tabela 4.22. Caracterização dos componentes do aroma do extrato aquoso de cogumelo Shiitake permeado da ultrafiltração.....	97
Tabela 4.23. Caracterização dos componentes do aroma do extrato aquoso de cogumelo Shiitake concentrado da osmose inversa.....	97
Tabela 4.24. Caracterização dos componentes do aroma do extrato aquoso de cogumelo Shiitake permeado da osmose inversa.....	98

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 2.1. Cogumelo Shiitake produzido em toras de eucalipto em fase final de maturação.....	8
Figura 2.2. Principais processos com membranas, seus limites de separação e intervalos de pressão normalmente utilizados.....	22
Figura 2.3. Módulo Quadros e Placas.....	29
Figura 2.4. Módulo Tubular.....	30
Figura 2.5. Módulo Fibra Oca.....	32
Figura 2.6. Módulo Espiral.....	33
Figura 3.1. Cogumelo Shiitake, corpo frutífero totalmente aberto.....	49
Figura 3.2. Foto do equipamento de U.F. e O.I. Lab Unit M 20 DDS.....	51
Figura 3.3. Fluxograma básico do processo para obtenção do concentrado de aroma e sabor de cogumelo shiitake.....	53
Figura 3.4. Esquema de extração contínua em contra corrente onde L1, L2, L2, L4 e L5 representam os extratos e R1, R2, R3, R4 e R5 os resíduos .....	56
Figura 4.1. Efeitos principais para a variável Brix.....	75
Figura 4.2. Efeito da temperatura para a resposta intensidade da aroma.....	76
Figura 4.3. Gráfico da Variação do fluxo de permeado em função do tempo de processo de ultrafiltração.....	82
Figura 4.4. Gráfico da variação do fluxo de permeado em função do tempo de processo de osmose inversa (1ª batelada).....	84
Figura 4.5. Gráfico da variação do fluxo de permeado em função do tempo de processo de osmose inversa (2ª batelada).....	85
Figura 4.6. Cromatograma do extrato aquoso de cogumelo shiitake.....	87

Figura 4.7. Cromatograma do extrato aquoso de cogumelo shiitake permeado na ultrafiltração.....	88
Figura 4.8. Cromatograma do extrato aquoso de cogumelo shiitake concentrado na osmose inversa (retido).....	89
Figura 4.9. Cromatograma do extrato aquoso de cogumelo shiitake permeado na osmose inversa.....	90
Figura 4.10. Histograma de distribuição das respostas sensoriais, em escala hedônica de 9 pontos, para macarrão tipo oriental. A: aroma B: sabor.....	99
Figura 4.11. Histograma de distribuição das respostas sensoriais, em escala hedônica de 9 pontos, para creme de legumes. A: aroma B: sabor.....	100
Figura 4.12. Histograma de distribuição das respostas sensoriais, em escala hedônica de 9 pontos, para creme de frango. A: aroma B: sabor.....	100

**RODRIGUES, ROBERTA BELANDRINO.** Tecnologia para obtenção de concentrado natural de aroma e sabor de cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes* Sing.) por processo conjugado de ultrafiltração e osmose inversa.

CAMPINAS: Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1997. (Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos).

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma tecnologia para obtenção de um concentrado natural de aroma e sabor de cogumelo shiitake (*Lentinula edodes* Sing), utilizando as tecnologias de ultrafiltração e osmose inversa conjugadas. Foi realizada a extração contínua em contracorrente dos compostos aquossolúveis, entre eles, os responsáveis pelo aroma e sabor característico do cogumelo shiitake e posterior separação desses compostos por diferença de peso molecular utilizando a tecnologia de ultrafiltração. O processo de ultrafiltração foi realizado em módulo Lab Unit M-20 DDS, utilizando membranas de polissulfona com peso molecular de corte de 20.000 daltons (GR 61 PP), a pressão transmembrânica de 5 bar. O permeado da ultrafiltração foi concentrado pelo processo de osmose inversa. Este foi realizado no mesmo módulo da ultrafiltração, utilizando membranas de filme composto (HR95), a pressão transmembrânica de 40 bar. Esta tecnologia produziu um concentrado final com 10° brix, de aroma característico intenso e de grande aceitabilidade através da análise sensorial. Os resultados das determinações químicas e físicas, em particular a cromatografia gasosa, demonstraram que não houve perda dos compostos voláteis durante o processo de ultrafiltração e osmose inversa. Pode-se concluir que é possível a preparação de concentrado de sabor e aroma de cogumelo shiitake a partir da extração aquosa em contra corrente, e concentração pelo processo conjugado de ultrafiltração e osmose inversa.

---

**Palavras Chaves:** Cogumelo Shiitake, extração, "flavor", ultrafiltração, Osmose inversa, concentração.

**RODRIGUES, ROBERTA BELANDRINO.** Technology to obtain a natural concentrate of the aroma and taste of Shiitake mushroom (*Lentinula edodes* Sing.), using a conjugated process of ultrafiltration and reverse osmosis. CAMPINAS: Food Technology Department, Faculty of Food Engineering, 1997. (Master Thesis in Food Technology).

## SUMMARY

The objective of this work was to develop the technology to obtain a natural concentrate of the aroma and taste of Shiitake mushroom (*Lentinula edodes* Sing.), using conjugated ultrafiltration and reverse osmosis technologies. A continuous counter-current extraction of the water soluble compounds was carried out, which among included those responsible for the characteristic aroma and taste of the Shiitake mushroom, and subsequently, the compounds were separated by molecular weight using ultrafiltration. The process of ultrafiltration was effected using a Lab Unit M-20 DDS module, and polysulfone membranes with a cut-off of 20.000 daltons (GR 61 PP), and transmembrane pressure of 5 bar. The permeate of the ultrafiltration was concentrated by reverse osmosis. This process was carried out in the same ultrafiltration module, using thin film composite membranes (HR 95), with a transmembrane pressure of 40 bar. This produced a final concentrate of 10° Brix, with a characteristic and strong aroma and taste, and considerable acceptability as measured by sensory evaluation. The results of the chemical and physical determinations, especially, gas chromatography, showed that there was no loss of volatile compounds as a result of the ultrafiltration and reverse osmosis processes. It was concluded that it is possible to prepare an aroma and taste concentrate of Shiitake mushroom by aqueous counter-current extraction, followed by concentration using a conjugated process of ultrafiltration and reverse osmosis.

---

**Key words:** Shiitake mushroom, extraction, flavor, ultrafiltration, reverse osmosis concentration.

## I. INTRODUÇÃO

A produção de cogumelo é uma atividade agrícola concentrada, utilizando-se pequenas áreas para se obter volumes consideráveis de produto, é independente de oscilações climáticas e com baixo custo de implantação. Esses fatores tem atraído produtores de culturas tradicionais e de outros segmentos da economia. Como consequência, observa-se taxa de crescimento anual superior a 13%, trazendo como resultado um aumento rápido na oferta do produto.

Os cogumelos são produtos altamente perecíveis. Sofrem escurecimento muito rápido, depreciando o produto em termos comerciais. Esse escurecimento é devido a presença da enzima polifenol oxidase. Portanto, os cogumelos, na sua maioria são comercializados após alguma transformação industrial, objetivando o prolongamento da vida útil, que consiste na secagem ou no cozimento. Ao mesmo tempo que esses processos prolongam a vida útil dos cogumelos, também acarretam em perda dos compostos responsáveis pelo aroma, que são voláteis e termossensíveis.

O mercado mundial de aditivos está em forte expansão e a obtenção de produtos a partir do cogumelo que possam ser utilizados como aditivos para fornecer ou realçar o sabor e aroma de cogumelo em produtos como sopas, molhos, pães, biscoitos, snacks, peixes e carnes, é uma excelente alternativa de transformação industrial, adicionando valor à produção agrícola e com mercado externo e interno garantidos.

Os “flavors” são substâncias que dão aos alimentos ou bebidas, sabor e odor característico ou desejado. Existem vários alimentos industrializados aromatizados como biscoitos, snacks, embutidos cárneos, molhos entre outros. Além de produtos industrializados, é importante ressaltar que, na elaboração da quase totalidade das refeições consumidas pela população, tanto doméstica quanto em estabelecimentos

comerciais, também são empregados um grande número de produtos aromatizantes “in natura” ou parcialmente industrializados, na forma de condimentos ou temperos.

O cogumelo shiitake (*Lentinula edodes* Sing.) é a espécie mais rica em compostos aromáticos que são responsáveis pelo sabor característico de cogumelo. São os mais simples de se produzir e de elevado rendimento agrícola. O preço médio do cogumelo shiitake é R\$13,00 / kg.

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de uma tecnologia para a obtenção de um concentrado natural de aroma e sabor de cogumelo shiitake (*Lentinula edodes* Sing.), com o emprego da tecnologia de concentração por membranas , ultrafiltração e osmose inversa conjugadas.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Cogumelos

Os cogumelos têm sido usados como alimento pelo homem há séculos. Atualmente são conhecidos cerca de seiscentas espécies de cogumelos comestíveis.

A produção mundial de cogumelos se situa hoje na casa dos dois milhões de toneladas anuais, com crescimento anual de cerca de 13%, taxa essa das mais elevadas no seguimento agro-industrial da cadeia econômica. Os principais centros de produção são Europa (Itália e França), Ásia e os Estados Unidos (SINTESE NATURAL - MICÉLIO E ASSESSORIA EM COGUMELOS, 1995).

A exploração comercial do cogumelo no Brasil é uma atividade agro-industrial relativamente recente. A produção anual é de cerca de dez mil toneladas. Observa-se taxa de crescimento no setor superior àquelas verificada nos países tradicionalmente produtores com índice de retorno elevado do capital investido.

Por se tratar de atividade agrícola concentrada, sendo suficiente pequenas áreas, ao contrário de outras culturas, independentes de oscilações climáticas, principalmente chuvas, baixo custo de implantação, (investimento inicial do cultivo do cogumelo shiitake oscila de R\$150,00 a R\$200,00, para o preparo de 100 toras de eucalipto), tem atraído produtores de culturas tradicionais, bem como investidores de outros seguimentos da economia diferentes do agro-industrial (BOLETIM INFORMATIVO - "Luiz de Queiroz", 1996).

A grande São Paulo, principalmente o município de Mogi das Cruzes, é a maior região produtora. Há produção também em Americana, Atibaia, Cabreúva, Campinas, Itatiba, Vinhedo, Guaíba (RS), algumas cidades do Paraná, Santa Catarina e Rio de Janeiro. Da produção total, cerca de 15 mil toneladas, estima-se

que 40% é comercializada “in natura” e 60% processada (SÍNTESE NATURA - MICÉLIO E ACESSORIA EM COGUMELOS, 1995).

O Brasil importa cogumelo principalmente da Itália e Chile. O produto é colocado no mercado interno a preço médio de US \$ 12,00/kg (CEAGESP), fazendo com que uma parcela muito pequena da população tenha acesso a ele. Enquanto o consumo “per-capita” dos países desenvolvidos é de 4kg, no Brasil, é de apenas 30g anuais.

As perspectivas agro-industrial de cogumelos no Brasil são muito boas. No que diz respeito ao setor de produção o Brasil tem clima favorável, todas as matérias-primas necessárias a bom preço e em abundância e a técnica está disponível.

Os cogumelos comestíveis são fungos pertencentes a classe Basidiomycetes. As espécies de maior consumo enquadram-se na ordem Agaricales, na qual encontram-se duas famílias de maior destaque a Boletaceae e Agaricaceae a qual pertence o cogumelo Shiitake, (*Lentinus edodes* Sing.), mais recentemente (*Lentinula edodes* Sing) (SÍNTESE NATURA - MICÉLIO E ACESSORIA EM COGUMELOS, 1995).

O Shiitake é também conhecido como cogumelo japonês, cogumelo chinês e cogumelo da floresta. É um fungo saprófito que coloniza madeiras mortas de várias espécies. No Japão, ocorre naturalmente em um tipo de árvore chamada shii. Daí o nome Shiitake, em japonês o fungo da árvore shii (SUN SHIITAKE e [www.lexxa.com.br/sunshiitake](http://www.lexxa.com.br/sunshiitake), setembro de 1997).

Os cogumelos Shiitake têm o corpo frutífero redondo, com diâmetro que pode chegar até mais de 15 cm e sua coloração pode variar do caramelo ao marrom escuro. As lamelas são bastante características, apresentando uma coloração quase branca, assim como os talos. A curvatura, diâmetro, coloração, assim como o

comprimento e a espessura do talo variam conforme a linhagem do Shiitake.

O mais antigo registro conhecido a respeito do cogumelo Shiitake foi no ano 199, no tempo do Imperador Chuai no Japão. Já o cultivo originou-se na China durante a Dinastia Sung (960 a 1127), estendendo-se posteriormente ao Japão, onde foi aperfeiçoado (SUN SHIITAKE e [www.lexxa.com/sunshiitake](http://www.lexxa.com/sunshiitake), setembro de 1997).

No Japão, onde seu consumo é milenar, o Shiitake sempre foi considerado como um “Elixir da Vida”, uma fonte de longevidade e de boa vida. Alimento rico em proteínas, o cogumelo Shiitake possui os nove aminoácidos essenciais, e também é considerado ótima fonte de vitaminas, minerais, e princípios ativos medicinais.

Seus principais constituintes nutricionais são:

Proteínas	- 10 a 20%
Carboidratos	- 43 a 78% (manitol, glicogênio, hemicelulose, glicose e levulose)
Minerais	- Cálcio, cobre, fósforo, potássio, magnésio, sódio, zinco e cromo
Lipídeos	- 1,0%
Vitaminas	- Tiamina (B1), Riboflavina (B2), Cianocobalamina (B12), Biotina, Niacina, Ácido Pantotênico (B3), Ácido Ascórbico (C), Ergosterina (D), Ácido Nicotínico, Tocoferol (E)

Fonte: SÍNTESE NATURA - MICÉLIO E ACESSORIA EM COGUMELOS (1995).

O cogumelo Shiitake é tradicionalmente utilizado pela medicina popular chinesa. Suas propriedades terapêuticas são hoje objeto de estudos em laboratórios

de todo mundo. Seus diversos princípios ativos medicinais possuem efeitos terapêuticos já conhecidos, conforme MIZUNO (1995) e SÍNTESE NATURAL LTDA-MICÉLIO ACESSORIA EM COGUMELOS (1995):

Lentinan - Polissacarídeo isolado do corpo frutífero com ação antitumoral.

KS2 - Polissacarídeo extraído do micélio do cogumelo e também possui ação antitumoral, principalmente em carcinoma de Ehrlich's.

LEM e LAP - Polissacarídeo isolado do micélio do cogumelo, também com ação antitumoral.

Lentimine - Glicoproteína extraída do micélio com efeito terapêutico contra o vírus da AIDS juntamente com Aziditimidina (AZT).

Lentinacin, deoxylentinacin, 5'-AMP, 5'-GMP - Componentes de ácido nucleotídeo de baixo peso molecular, possuem efeito antitrombótico.

Eritadanine - Derivado da adenina extraído do corpo frutífero com ação antiolesterêmica.

O Shiitake é o segundo cogumelo mais cultivado mundialmente, ficando atrás apenas do *Agaricus bisporus*. A produção mundial do Shiitake foi de 190.000 tons em 1981, perdendo apenas para o *Agaricus*, 940.000tons/ano. O Japão produziu 78.000 tons do Shiitake fresco e 14.000 tons do seco em 1985. Além da China e do Japão, o cogumelo Shiitake é também bastante cultivado em Taiwan, Tailândia, Coréia, Singapura e ainda em diversos países ocidentais como Holanda, Estados Unidos e Canadá (MIZUNO, 1995).

No Brasil, o cultivo comercial do Shiitake começou a ganhar força no início dos anos 90, existindo atualmente um número expressivo de produtores, sendo a grande maioria de pequeno porte ([www.lexxa.com/sunshiitake](http://www.lexxa.com/sunshiitake), setembro de 1997).

O Shiitake pode ser cultivado em toras de madeira, porém recentemente, o cultivo desse cogumelo em substrato sintético a base de serragem vem sendo bem difundido. No ano de 1990, a produção de cogumelo cultivado em serragem foi de 20% da produção total de shiitake no Japão (WATANABE, 1993). MIZUNO (1995), em seu estudo, verificou uma pequena diferença de aroma e na sensação na boca entre cogumelos cultivados em toras e aqueles encontrados em tocos selvagens e árvores mortas. Contudo, a cultura de cogumelos Shiitake em serragem, que vem ganhando mercado recentemente, são de textura mais leve e menos aromatizados.

No Brasil, o cultivo vem sendo realizado em toras de eucalipto, madeira abundante e de preço acessível.

De maneira simplificada, a técnica de cultivo do Shiitake se realiza através das seguintes etapas:

- Inicialmente é necessário isolar o fungo, fazer com que ele se desenvolva formando o micélio;
- Selecionar as árvores de eucalipto, e cortá-las em comprimento padrão (1 metro), mantendo a casca intacta;
- Inocular as toras, por meio de furos ao longo da madeira. posteriormente selar os furos com parafina;
- Empilhar as toras para incubação. Este processo dura aproximadamente 5 a 6 meses, e é necessário o controle das condições do ambiente e a irrigação;

- Após esse tempo, as toras são induzidas através de choque térmico e mecânico a frutificar;
- Depois de alguns dias os cogumelos são colhidos, e as toras passam por um período de recuperação, após o qual, são induzidas novamente e assim sucessivamente até serem exauridas e então descartadas.

Para cada uma das etapas descritas anteriormente é necessário o uso de tecnologia, equipamentos e instalações adequadas ([www.lexxa.com.br/sunshiitake](http://www.lexxa.com.br/sunshiitake), setembro de 1997). A figura 2.1 mostra o cogumelo, ainda na tora, em fase final de maturação, pronto para ser colhido.

Figura 2.1: Cogumelos Shiitake produzido em toras de eucalipto em fase final de maturação.



## 2.2. “Flavor”

Uma pesquisa realizada em 1995 pelo Food Marketing Institute nos Estados Unidos revelou que o “flavor” é a razão mais importante pela qual 90% dos consumidores compram determinado alimento. Em segundo lugar, com 74%, estão os aspectos nutricionais e em terceiro, com 69%, está o fator preço. (Aromas - IFF, 1996).

A palavra “flavor” é originária do inglês “flavour”, oriunda do francês “flaur”, que veio do latim vulgar “flator” que significa odor, que por sua vez é proveniente do latim “flature”, sopro (NEUFELDET & GURALNIK, 1988). Segundo a literatura inglesa, a palavra “flavour” é classificada como: (1) “odor, cheiro, aroma”; (2) “a qualidade de uma substância de possuir gosto e cheiro”; “gosto em geral”; qualquer substância adicionada a medicamento, alimento, etc, para conferir gosto. Atualmente as denominações “flavor” e “flavour” são muito utilizadas, a primeira denominação é mais comum na América e a segunda na Europa.

Portanto, as palavras “flavor” e “flavour” definem uma classe de compostos que conferem as características de gosto e aroma de qualquer alimento.

De acordo com Aromas - IFF (1996), há duas definições de aromas:

- IOFI (International Organization of the Flavor Industry, 1978): “Aromas são preparações concentradas, adicionadas ou não de solventes ou veículos, utilizados para conferir sabor. Não devem ser consumidas tal qual”.
- Legislação Brasileira (Resolução 22/7 da CNNPA do MS 1976): “Aroma é a substância ou mistura de substâncias possuidoras de propriedades odoríferas e/ou sápidas, capaz de conferir ou intensificar o odor e/ou sabor dos alimentos, incluídos as bebidas. Excluem-se desta definição os produtos que apresentam apenas sabor doce, salgado ou ácido.

Pelo fato de o sabor ser um conjunto de sensações psicofisiológicas de natureza complexa é preciso definir com clareza alguns termos empregados (Aromas – IFF, 1996):

- “Flavor” - palavra de origem inglesa, a qual engloba os termos aroma e sabor juntamente.
- Aroma - produto, mistura de substância ou substância dotada de propriedades organolépticas, capaz de conferir e/ou acentuar o sabor dos alimentos.
- Sabor - conjunto de sensações decorrentes do contato de um alimento com estruturas sensoriais da boca e do nariz.
- Essência - termo atualmente em desuso na Indústria de alimentos, sendo mais aplicado a preparações destinadas a conferir odor a produtos não comestíveis como detergentes, sabonetes, cosméticos, etc.

Os aromas, são utilizados com uma ou mais funções tais como caracterização, reconstituição, melhoramento e padronização do sabor desejado ou para mascarar sabor indesejável. Sempre na perspectiva de proteção, o segundo papel do aroma é a comprovação do estado de conservação do alimento.

Segundo a Legislação Brasileira os aromas são classificados da seguinte forma:

- Aroma Natural: aquele cuja elaboração foi feito uso exclusivo de matéria-prima aromatizante natural e/ou produto aromatizante natural.
- Aroma Natural Reforçado: aquele cuja elaboração entra, preponderantemente, matéria prima aromatizante, natural, e/ou produto aromatizante natural, adicionado em quantidade limitada, de substância aromatizante idêntica a natural, existentes no produto cujo aroma se quer reforçar.

- Aroma Reconstituído: aquele cuja elaboração entra produto aromatizante natural, substância aromatizante natural ou substância aromatizante idêntica a natural, de modo que sua composição reconstitua o aroma natural correspondente.
  
- Aroma Imitação: aquele em cuja elaboração foi feito o uso de:
  - Substância aromatizante natural e/ou substância aromatizante idêntica à natural, presente no produto aromatizante natural cujo aroma e/ou sabor pretenda imitar, adicionada ou não do produto aromatizante natural correspondente;
  
  - Matéria-prima aromatizante natural originária do produto cujo aroma ou sabor pretende imitar, adicionada de produto aromatizante natural ou substância aromatizante idêntica a natural.
  
- Aroma Artificial: aquele em cuja elaboração foi utilizado:
  - Substância aromatizante artificial, adicionada ou não de matéria-prima aromatizante natural, produto aromatizante natural, substância aromatizante natural ou de substância aromatizante idêntica à natural;
  
  - Substância aromatizante natural, ou substância aromatizante idêntica à natural, não ocorrente no aroma que lhe empreste o nome, adicionada ou não de matéria-prima aromatizante natural.

É importante ressaltar que, na elaboração da quase totalidade das refeições comerciais consumidas pela população, tanto domésticas quanto em estabelecimentos comerciais, também são empregados um grande número de toneladas de produtos aromatizantes “in natura” ou parcialmente industrializados na forma de condimentos e tempero.

O “flavor é uma das mais importantes razões que estimulam o consumo de cogumelos (HADAR & DOSORETZ, 1991).

Não se sabe ainda, precisamente, a exemplo de muitos outros produtos, quais são as várias combinações de compostos responsáveis pelo sabor e aroma dos cogumelos. O que se sabe é que compostos não voláteis contribuem para o sabor característico a exemplo do ácido L-glutâmico, ácido aspártico, ácidos graxos de cadeia curta, carboidratos, proteínas e nucleotídeos (MORITA & KOBAYASHI, 1966; NAKAJIMA citado por WADA et al, 1967; CRONIN & WARD, 1971; DIJKSTRA et al, 1976) e Segundo MIZUNO (1995) e BAEK et al (1989), em adição aos componentes não voláteis, pode-se citar também o glutamato monossódo, 5'-nucleotídeos, aminoácidos livres, peptídeos de baixo peso molecular, ácidos orgânicos, e açúcares.

Com a finalidade de verificar os principais “flavours” do cogumelo Shiitake, MIZUNO (1995), elaborou um caldo com cogumelo e verificou que os “flavours” que mais contribuíram foram 5''- GMP, 5'- AMP, 5'- CMP, sendo o 5''- GMP, considerado o principal.

Segundo PICARDI e ISSEMBERG (1973), aproximadamente cento e cinquenta compostos voláteis foram identificados em várias espécies de cogumelo.

Segundo MIZUNO (1995), os voláteis encontrados no cogumelo Shiitake incluem álcoois, cetonas, sulfitos alcalis, ácidos graxos

Para PYYSALO (1976); TRESSL et al (1982); CHEN & WU (1984), e KIRDERLERER (citado por HADAR E DOSORETZ, 1991), os compostos voláteis que contribuem para as características do “flavor” em cogumelos são constituídos por uma série de oito carbonos como 1-octen-3-one, 3-octanol, 3-octanone e 1-octanol.

Os compostos do aroma identificados como os maiores constituintes voláteis e os mais importantes são 1-octen-3-one e o seu álcool correspondente, o 1-octen-3-ol (CRONIN & WARD, 1971; CHEN & WU, 1984; HADAR & DOSORETZ, 1991 e MIZUNO, 1995).

A substância que detém a mais extensa característica de aroma de cogumelo é o 1-octen-3-ol conhecido como “álcool de cogumelo”, cuja estrutura é [  $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_4 \text{CH} (\text{OH}) \text{CH} = \text{CH}_2$  ] (CRONIN & WARD, 1971; PYYSALO, 1976; CHEN & WU, 1984; HADAR & DOSORETZ, 1991 e MIZUNO, 1995). Segundo DIJKSTRA et al (1976), TRESSL et al (1982) e MOSANDL et al (1986), a forma natural deste composto, forma negativa do 1-octen-3-ol possui um “flavor” mais acentuado que a forma positiva, quando observado em cogumelo *Agaricus bisporus*.

PICARDI & ISSEMBERG (1973), realizaram um estudo com cogumelos *Agaricus bisporus* crus e cozidos. No extrato de cogumelos crus identificaram seis compostos, entre eles o 1-octen-3-ol. Já no extrato de cogumelos cozidos, identificaram além dos seis presentes no extrato de cogumelos crus, o 1-octen-3-one, demonstrando com isso que o 1-octen-3-one é apenas detectável em extratos de cogumelos cozidos.

Os aromas típicos dos cogumelos tendem ser compostos voláteis ( $\text{C}_8$ ) enzimaticamente derivados de precursores de ácidos graxos insaturados (HADAR & DOSORETZ, 1991).

Os principais precursores dos compostos voláteis de cadeia curta responsáveis pelo aroma típico de fungos são ácidos graxos insaturados  $\text{C}_{16}$  à  $\text{C}_{22}$ , que contém uma ou mais duplas ligações (HADAR & DOSORETZ, 1991). TRESSL et al (1982); e DE LUMEM, WURZEMBERGER & GROSH (citados por CHEN & WU 1984) e, foram mais específicos citando o ácido linoleico como substrato.

No shiitake, em adição aos compostos de oito carbonos, há principalmente compostos sulfurados cíclicos que exercem grande influência no aroma desse cogumelo.

O cogumelo fresco exibe um leve odor, porém quando seco e ou picado, um aroma sulfuroso característico é gradualmente desenvolvido IWAMI & YASUMOTO (1982); e YASUMOTO (citado por CHEN & HO, 1986).

Segundo IWAMI et al (1975a), (1975b), (1975c); IWAMI & YASUMOTO, (1982) e YASUMOTO (citado por CHEN & HO, 1986), os compostos cíclicos sulfurados do cogumelo shiitake são originados a partir do ácido lentínico por ação enzimática durante o processo de secagem, cozimento e ou corte. O ácido lentínico é um derivado do  $\gamma$ -glutamilcisteína sulfoxida. Existem duas enzimas responsáveis pela conversão do ácido lentínico em compostos cíclicos sulfurados, são elas,  $\gamma$ -glutamiltranseptidase e cisteína liase (c-s-liase).

A Lentionina, 1, 2, 3, 5, 6-pentatietano, ( $C_2H_4S_5$ ) é o composto cíclico sulfurado conhecido por possuir o aroma característico do cogumelo shiitake. O 1, 2, 4, 5-tetratiane ( $C_2H_4S_3$ ) e 1, 2, 4-tritriolane ( $C_2H_4S_3$ ), são outros dois compostos sulfurados cíclicos que também estão presentes e contribuem fortemente para o aroma característico do cogumelo shiitake (WADA et al, 1967; MORITA & KOBAYASHI, 1967; e CHEN & HO, 1986).

Em estudos feitos por IWAMI et al, (1975a), IWAMI et al, (1977) e IWAMI & YASUMOTO (1982), o mecanismo para obtenção da lentionina no cogumelo shiitake, tem demonstrado que a evolução do aroma se dá por duas reações enzimáticas independentes, como visto a seguir:

(1) ácido lentínico + aminoácido →  $\gamma$  glutamil aminoácido + des-glutamil ácido lentínico

(2) des-glutamil ácido lentínico + H<sub>2</sub>O → polietileno + ácido pirúvico + amônia + formaldeído

Pelo fato de alguns compostos responsáveis pelo aroma serem formados por processos catalisados por enzimas, sua formação é afetada pelo pH durante o processo de branqueamento. De acordo com CHEN et al (1984), a formação dos compostos voláteis com oito carbonos alcançou maiores valores a pH em torno de 5,0 - 5,5, já a formação dos compostos sulfurados tem início em pH 5,5 e alcança melhores valores em torno de 7,0, embora; IWAMI et al, (1975a), (1975b), (1975c), considera o pH 9,0 como sendo o melhor para a formação dos compostos sulfurados e o pH 7,0 como sendo o melhor para a formação dos compostos voláteis de oito carbonos.

### 2.3. Extração

A operação unitária de extração sólido-líquido tem sido utilizada em diversos processos agro-industriais como na produção de açúcares, álcool, sucos de frutas, corantes naturais e outros (DOUSSE & UGSTAD, 1975; BINKLEY & WILEY, 1978; e WILEY et al, 1978).

Um estudo realizado por BINKLEY & WILEY (1978), teve como objetivo comparar a eficiência de extração do processo de difusão contínua em contra corrente com a eficiência do método de pressão Willmes, para recuperação de suco de maçã. A comparação foi baseada no rendimento e na qualidade sensorial do produto final. Para a extração contínua foi utilizado equipamento da marca DDS, inicialmente desenvolvido para recuperação de açúcares a partir de beterraba. O

processo de extração teve duração de aproximadamente 6 horas para ambos, sendo que o processo de extração contínua em contra corrente obteve um rendimento de 13,47% maior que o método de Willmes. Quando comparados sensorialmente, o produto final obtido pelo método de Willmes teve preferência.

WILEY & LEE (1978), inicialmente estudaram a viabilidade de extrair betalaína a partir de beterrabas vermelhas, usando um extrator contínuo em contra corrente. Trabalharam com o equipamento com inclinação de 4,0° e 4,5°, e este foi operado as temperaturas de 70°C-74°C. Foi investigado a eficiência da água e das soluções de ácido cítrico a 0,050%, 0,090% e 0,125%, sendo estas as maiores variáveis dos experimentos. A proporção solvente/beterraba foi de aproximadamente 1,5/1. Nas condições ótimas de extração, 4,5° de inclinação, pH 5,5, obtiveram um rendimento de 71% de betalaína.

Com a finalidade de otimizar o trabalho anterior de extração da betalaína, WILEY et al (1979); utilizaram o equipamento de extração contínua em contra corrente (DDS) alterando algumas condições do experimento. Trabalharam a temperaturas de 75°C, 85°C e 90°C sob atmosfera de nitrogênio. As melhores condições de extração dos corantes vermelho e amarelo foram a temperatura de 85°C seguido de uma diminuição à 75°C e pH de 5,2, obtendo um rendimento de 90%.

CHEN & WU (1984), realizaram um estudo objetivando descrever os componentes voláteis do cogumelo *Agaricus subrufecens*. Para este trabalho, os pesquisadores utilizaram 300 g de cogumelo fresco. A estes foram adicionado 700 ml de água destilada e a mistura foi mantida sob agitação por 5 minutos. Os componentes voláteis foram extraídos em equipamento Likens Nikerson, modificado por Romer e Renner, 1979, utilizando como solvente extrator éter dietil na proporção 1:1.

KERR et al (1985), em seu trabalho de pesquisa, obtiveram extrato de cogumelo *Agaricus bisporus*, a partir da extração com solução a 10 M de metabissulfito ou ácido ascórbico à 60°C, 75°C e 90°C, em escala piloto utilizando difusor inclinado em contra corrente, com rendimento de extração de sólidos solúveis de 94,4%. Não houve variação de rendimento em função da temperatura utilizada e a solução de metabissulfito se mostrou mais eficiente que a solução de ácido ascórbico.

CHEN & HO (1986), obtiveram um extrato de aroma de cogumelo Shiitake partindo de 100 g de cogumelo fresco. A estes foi adicionado 500 ml de água destilada e mantido sob agitação por três minutos. Durante a agitação, o pH foi ajustado para pH 6,5 utilizando solução 0,1 N NaOH ou 0,1 N HCl. Feito isso, adicionaram a mistura 50 g de celite, com a finalidade de separar a fração líquida da fração sólida. As duas frações sofreram extração com três porções de clorofórmio, (1,5 litros no total), e posteriormente foram concentrados por evaporação para as análises de aroma.

Com a finalidade de verificar as propriedades físico-químicas e a avaliação sensorial da lentionina, um dos principais componentes do “flavor” do cogumelo Shiitake, WADA et al (1967) fizeram uma extração utilizando como solvente extrator o metileno clorídrico, partindo de cogumelo seco, submerso em água por várias horas. Após purificar o extrato por cromatografia em sílica gel, este foi resfriado e após recristalização, obtiveram a lentionina com produto final.

CHEN et al (1984), em seu estudo, verificaram os efeitos dos valores de pH na formação de voláteis do cogumelo Shiitake e para isso, utilizaram o difusor Linkens Nickerson, modificado por Romer e Renner (1974), para extrair os compostos de aroma e sabor de cogumelo Shiitake. Um total de 250 g de cogumelo foi adicionado a 750 ml de água destilada e mantido sob agitação por cinco minutos. Durante esse tempo os valores de pH foram mantidos em valores constantes adicionando solução 0,1 N de HCl ou 0,1 N de Na OH. O pH da mistura percorreu uma faixa de 4,0 a 9,0 com 0,5 unid / intervalo. O tempo utilizado para a extração foi de uma hora, utilizando n-pentano como líquido extrator.

## 2.4. Concentração

A concentração pode ser considerada como uma forma de conservação por reduzir a atividade de água do alimento. Esse processo também leva a uma redução de peso e volume o que resulta em imediata vantagem econômica.

A evaporação à vácuo é comumente usada em alimentos sensíveis ao calor pois é um método que usa baixa temperatura sob vácuo. Mesmo com eficientes evaporadores à vácuo, onde a água atinge o ponto de ebulição à 27 °C ou menos, alguns compostos voláteis responsáveis pelo “flavor” são perdidos com o vapor d’água.

Processos convencionais de concentração e secagem com elevação da temperatura podem acarretar mudanças significativas na composição do “flavor” de cogumelo, já que possuem numerosos compostos quimicamente reativos, cuja transformações são aceleradas pelo aumento da temperatura (HADAR & DOSORETZ, 1991). Segundo WU (citado por CHIANG et al, 1986), a técnica mais usada para concentração de “flavor” de cogumelo a partir da água de branqueamento é a evaporação à vácuo.

Todavia, é possível concentrar alimentos a baixas temperaturas e com isso minimizar as perdas causadas pelo calor.

Um método conhecido é a crioconcentração, uma tecnologia relativamente nova que envolve o congelamento do alimento e posterior remoção dos cristais de gelo formado, ocorrendo dessa forma a concentração.

Esta tecnologia tem sido usada para concentrar sucos, café, cerveja e vinho. Tem como maiores vantagens a retenção de voláteis responsáveis pelo aroma e sabor, evitar danos térmicos e produzir concentrado de alta qualidade. (SILVA, 1995).

Apesar da crioconcentração ser um método de concentração onde usa-se baixas temperaturas, não foi encontrado nenhum artigo, das referências pesquisadas sobre sua aplicação na concentração de “flavor” de cogumelo.

Outro processo que também não utiliza altas temperaturas é o de separação e concentração por membranas. Separação e concentração por membranas é um método que tem como fundamento a separação e concentração de componentes de uma mistura líquida ou gasosa, forçando-os a fluir sob certa pressão através de uma membrana semi permeável (KOSEOGLU e BEREZOVSKY, citado por SILVA, 1995).

Esse processo tem encontrado interesse de aplicação nas indústrias farmacêuticas, nucleares, têxtil, de alimentos, químicas e outras (SILVA, 1995). Essas aplicações são dependentes de propriedades das membranas que são, a razão de permeabilidade a água, razão de rejeição de soluto e macromoléculas e duração do tempo de vida útil da membrana.

#### **2.4.1. Separação e Concentração por Membranas**

As técnicas de ultrafiltração (UF), microfiltração (MF), osmose inversa (OI) ou hiperfiltração, nanofiltração (NF) ou ultraosmose e eletrodialise (ED) são conhecidas coletivamente como processos de membrana (tabela 2.1). A tecnologia envolve a separação de componentes de um fluido por meio de membranas especiais, permitindo a concentração, o fracionamento e a purificação destes compostos com base no peso e tamanho molecular, na forma dos compostos e nas interações com a superfície das membrana e outros componentes da mistura.(KESSLER, 1981 e SILVA, 1995).

TABELA 2.1. - Caracterização dos processos de separação e concentração com membranas.

Processo	Força motriz	Material retido	Material permeado
Microfiltração	diferença de pressão (0,5-2 atm)	material em suspensão; bact. PM >500.000	água e sólidos dissolvidos
Ultrafiltração	diferença de pressão (1-7 atm)	Colóides macromoléculas PM > 5000	(solvente e sais)
Osmose Inversa	diferença de pressão (7-60 atm)	todo material solúvel suspensão	água (solvente)
Diálise	diferença de concentração	moléculas de alto PM em suspensão PM > 5000	íons e materiais orgânicos de baixo PM
Eletrodiálise	diferença de potencial elétrico	não iônicos e macromoléculas	íons
Permeação de gases	diferença de pressão e concentração	gás menos permeável	gás mais permeável
Pervaporação	pressão de vapor	líquido menos permeável	líquido mais permeável

Fonte: NOBREGA (1995).

Basicamente, nos processos de separação e concentração por membranas uma solução contendo um ou mais solutos escoam tangencialmente sobre uma membrana semi permeável, sob pressão, onde solvente e solutos com tamanhos menores que os poros da membrana passam através dela e são recolhidos como permeado ou filtrado, enquanto que as partículas maiores são retidas pela membrana e recolhidas numa solução denominada retentado ou concentrado (ANÔNIMO, 1990).

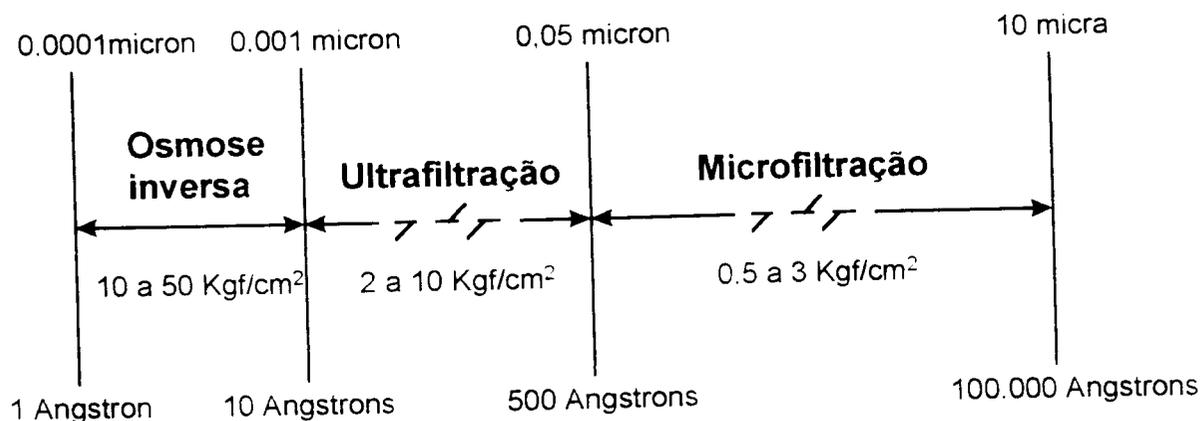
Segundo NOBREGA (1995), o processo de separação com membranas possui as seguintes vantagens:

- Economia de energia;
- Especificidade;
- Separação de compostos termolábeis;
- Simplicidade de Operação;
- Simplicidade de "Scale Up".

Os processos de separação por membranas possuem diversas aplicações industriais. A tabela 2.2 apresenta alguns exemplos dessas aplicações.

Não são observadas diferenças significativas entre os processos de microfiltração e ultrafiltração, a não ser pelo menor diâmetro dos poros das membranas de ultrafiltração e da pressão maior, normalmente utilizada, para se promover a separação de macromoléculas. Comparativamente com a osmose inversa, as diferenças são relevantes. A diferença entre estes três processos em função do diâmetro das partículas e /ou moléculas a serem separadas e da pressão utilizada, é mostrada na figura 2.2.

Figura 2.2: Principais processos com membranas, seus limites de separação e intervalos de pressão normalmente utilizados.



Fonte: Modificado de GYURE (1992) (citado por PETRUS, 1997).

O processo de Ultrafiltração é considerado um moderno processo de separação com membranas semi-permeáveis que foi introduzido nas indústrias de alimentos no final dos anos 70 e mais largamente utilizado a partir da década seguinte. Comparativamente com outros processos de separação ele ainda é pouco utilizado, mas com um enorme potencial e um crescimento e difusão cada vez maiores. As membranas vêm se tornando cada vez mais baratas e resistentes aos agentes químicos de limpeza e tem uma maior vida útil em relação às primeiras que surgiram no mercado (PETRUS, 1997).

Tabela 2.2 - Aplicações industriais dos principais processos de separação por membranas

Processo	Aplicações
Microfiltração	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esterilização bacteriana</li> <li>• Clarificação de vinhos e cervejas</li> <li>• Concentração de células</li> <li>• Oxigenação de sangue</li> </ul>
Ultrafiltração	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fracionamento e concentração de proteínas</li> <li>• Recuperação de pigmentos</li> <li>• Recuperação de óleos</li> </ul>
Osmose inversa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dessalinização de água</li> <li>• Concentração de suco de frutas</li> <li>• Concentração de antibióticos</li> <li>• Desmineralização de água</li> </ul>
Diálise	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemodiálise - Rim artificial</li> <li>• Recuperação de NaOH</li> </ul>
Permeação de gases	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recuperação de Hidrogênio</li> <li>• Fracionamento CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub></li> <li>• Fracionamento do ar: obtenção de gás inerte e de corrente rica em O<sub>2</sub></li> </ul>
Pervaporação	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desidratação de álcoois</li> <li>• Eliminação de VOC da água</li> </ul>

Fonte: NOBREGA (1995).

De todas as tecnologias de membrana, a ultrafiltração é a mais difundida e utilizada. O processo permite a concentração e o fracionamento simultâneos de componentes ao utilizar membranas com poros entre 0,002 a 0,2 microns. Isso corresponde a um peso molecular de corte de 500 a 3.000 daltons, o que permite a

passagem de água e pequenas molécula ou íons como açúcares e sais inorgânicos e assegura a retenção de macromoléculas e colóides como proteínas, gorduras, gomas, etc. O processo opera à pressões menores que 5 atmosfera (BEATON, 1979).

Segundo PETRUS (1997), o processo de ultrafiltração para a clarificação de sucos possui algumas vantagens e desvantagens:

- Vantagens:
  - redução do número de operações e mão de obra;
  - obtenção de um suco cristalino;
  - permite uma estabilização biológica;
  - preserva o sabor e aroma;
  - possibilita uma automatização completa do processo;
  - custo do equipamento.
- Desvantagens:
  - processo não recomendado para todos os tipos de suco;
  - fluxo de permeado ainda relativamente baixos;
  - tempo para limpeza CIP.

A osmose inversa ou hiperfiltração é a mais complexa das técnicas de membranas. Ela retém quase todos os solutos dissolvidos, incluindo sais, açúcares e íons e permite a passagem de solvente. Este processo tem sido largamente utilizado no Oriente Médio para dessalinizar água do mar ou recuperar água

salobra. Na Arábia Saudita, onde o índice pluviométrico é menor que 4 polegadas por ano, a dessalinização de água gera cerca de um bilhão de galões de água por dia (HAGGIN, 1988).

Na natureza, osmose envolve o movimento da água através de uma membrana semi-permeável, da região de menor concentração para a região de maior concentração de soluto. é possível reverter o fluxo normal da água através da membrana pela aplicação de uma pressão maior que a pressão osmótica no lado da membrana onde o soluto está em maior concentração. A este fenômeno dá-se o nome de osmose inversa.

As vantagens da osmose inversa segundo MATSUURA (1974); BRADOCK et al, (1991) e KÖSEGLER, QUI; BOWDEN & ISAACS; ANON, CROSS; GOVINDAN, DOWNER; MARSHALL; WATANABE; BALOH,(citado por SILVA, 1995), são:

- Melhor qualidade do produto;
- Não utiliza calor;
- Retém os componentes do aroma e sabor;
- Não ocorre caramelização;
- O sistema é fechado, o que evita perda de cor e “ escurecimento ”;
- Não envolve mudança de fase, tendo menos gasto de energia, diminuindo o custo do processo;
- Alta recuperação de aroma;
- Requer pequeno espaço para instalação;
- O permeado apresenta pureza maior que qualquer outro processo de separação;
- Equipamento e operação simples.

#### **2.4.1.1. Membranas**

As membranas são classificadas morfológicamente como assimétricas ou microporosas (PAULSON et al, 1984). As membranas assimétricas, também chamadas de anisotrópicas, possuem uma camada fina de 0,1 - 0,2 micrômetros de espessura, seletivamente permeável que efetua a separação e determina o fluxo enquanto o corpo principal da membrana é de natureza esponjosa, com poros extremamente abertos. Isto resulta no fenômeno conhecido como anisotropia ou assimetria, em que o comportamento da membrana muda dependendo de qual face da membrana está sendo usada na filtração da solução. Portanto nas membranas anisotrópicas, o tamanho dos poros muda através da extensão da membrana. Já as membranas microporosas ou isotrópicas possuem poros de tamanho uniforme, de uma superfície a outra (CHERYAN, citado por VIOTTO, 1991). As membranas assimétricas possuem permeabilidade à água 100 vezes maior que as membranas simétricas (MAUBOIS,1991).

Nas tecnologias de ultrafiltração e osmose inversa, são utilizadas membranas anisotrópicas e, segundo MEDINA & GARCIA (1988), com o seu desenvolvimento pode-se notar um grande desenvolvimento na tecnologia de membranas. O surgimento das primeiras membranas foi na década de 60, e no final dessa, a tecnologia de membranas deixou de ser uma técnica somente laboratorial (MALDONADO,1991).

As primeiras membranas, foram feitas essencialmente de acetato de celulose, e foi desenvolvida por LOEB e SOURIRAJAN para dessalinizar água do mar. Essa primeira geração, apresenta limites de trabalho em relação ao pH (3 e 8) e temperatura (50°C), além de sensibilidade a microorganismos e desinfetantes (MAUBOIS, 1980). O acetato de celulose, não era considerado eficiente no processo de osmose inversa por apresentar pequeno fluxo de água.

A partir de 1975 foram introduzidas membranas de diferentes composições químicas e propriedades funcionais, tais como poliamidas, poli-benzimidazoles e aramidas que são resistentes à hidrólise e ao ataque de microorganismos, porém degradam na presença de cloro (ZANINI, 1994). Atualmente, a maior parte da área de membranas instalada mundialmente constitui-se das chamadas membranas de segunda geração, feitas de polímeros sintéticos, principalmente derivados de polissulfona ou poliolefina. Suas características são a maior resistência a temperatura (75°C), e pH (2 a 12), boa resistência a compostos clorados (até 200 ppm), apesar de apresentarem baixa resistência a compactação mecânica.(GLOVER, citado por VIOTTO, 1991).

A partir da década de 80, na França e nos EUA, membranas minerais se tornaram disponíveis comercialmente, porém estas foram desenvolvidas durante os anos 70 pela indústrias nucleares para separação de isótopos de urânio. As membranas minerais são feitas de um componente mineral, óxido de zircônio ou alumina depositadas sobre superfície de grafite, essas membranas possuem grande resistência mecânica, suportando altas pressões (20 bar). Além disso, toleram toda faixa de pH (0 a 14) e temperaturas superiores a 400°C. Este tipo de membranas são consideradas membranas de terceira geração (SUTHERLAND & FREE, 1991).

A seguir estão apresentados os principais critérios para a seleção de membranas segundo MERSON (1968), CROSS (citado por SILVA, 1995), e KOSEOGLU & LUSA,(1989):

- fluxo, força motriz, temperatura e viscosidade;
- pressão e faixa de temperatura;
- resistência mecânica;
- seletividade e compatibilidade dos componentes do fluido;

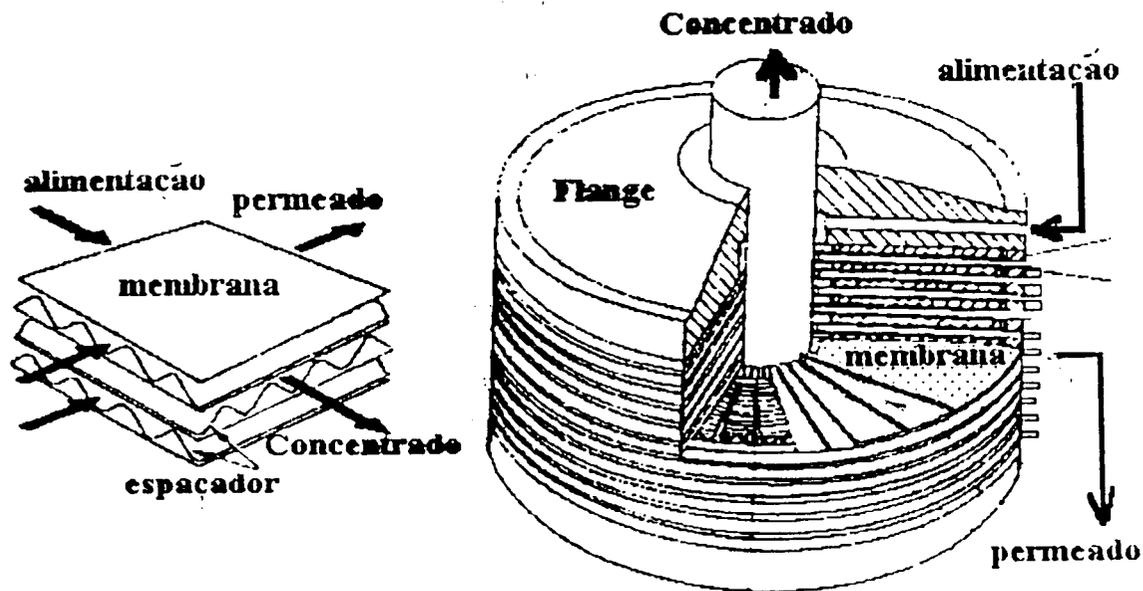
- tamanho dos poros que juntamente com o peso molecular dos componentes do fluido, auxiliam numa seleção preliminar;
- estabilidade química e térmica. Estes parâmetros são importantes para a limpeza e esterilização dos equipamentos;
- eficiência no fracionamento;
- concentração desejada e tipo de fluido.

Há vários tipos de módulos comerciais disponíveis: o de quadros e placas, o tubular, o de fibras capilares e o espiral. Segundo MAUBOIS (1980), cada tipo possui vantagens e desvantagens com relação a desempenho, custo de investimento e custo operacional, volume morto e eficiência de limpeza.

- Quadros e Placas:

Usado tanto no processo de ultrafiltração quanto no de osmose inversa, o módulo quadros e placas, consiste de pilhas de membranas de superfície plana, dispostas alternadamente com placas de suporte poroso, cuja superfície possui ranhuras por onde flui o permeado após passar pelas membranas e chegar a um tubo central onde é coletado (Figura 2.3):

Figura 2.3: Módulo Quadros e Placas.



Fonte - NOBREGA (1995).

Segundo DZIEZAK (1990) e STRATHMANN, CROSS e COX (citados por SILVA, 1995), este módulo apresenta as seguintes vantagens:

- o equipamento apresenta flexibilidade para controle da velocidade de fluxo e pressão, o que é crítico em aplicações viscosas;
- tem moderado tempo de resistência e custo;
- fácil de desmontar para limpeza e substituição;
- pode-se trocar a membrana sem descartar a unidade inteira;
- disponibilidade de várias unidades:
- baixo requerimento de energia.

Dentre as desvantagens pode-se citar conforme PAULSON & WILSON, (citado por DZIEZAK, 1990):

- quantidade de mão de obra requerida para limpeza manual ou troca de membranas;
- o número de conexões que devem ser feitas para prevenir vazamentos.

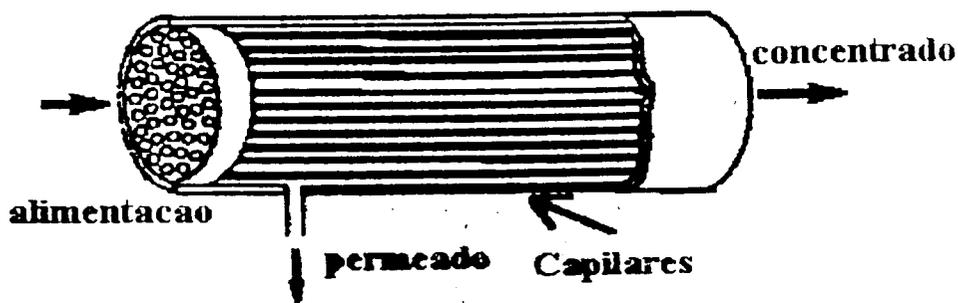
Por causa da baixa densidade, o módulo quadros e placas, vem sendo mais usado em pesquisas do que em aplicações comerciais.

- Tubular:

O módulo tubular (figura 2.4), consiste de um conjunto de feixes paralelos de tubos, de paredes rígidas, porosos ou perfurados, revestidos internamente pela membrana. A alimentação pressurizada flui no interior dos tubos e o permeado pela superfície externa e é coletado por ductos ou vasos apropriados (DZIEZAK, 1990).

Os elementos tubulares são encontrados nos sistemas de MF, UF, e OI, sendo mais usados no sistema de OI (DZIEZAK, 1990).

FIGURA 2.4: Módulo Tubular.



Fonte: NOBREGA (1995)

Segundo DZIEZAK (1990) e STRATHMANN, PHILIP, FREEMAN e COX (citados por SILVA, 1995), este módulo apresenta as seguintes vantagens:

- utilização eficiente em soluções com altos níveis de sólidos suspensos;
- tempo de vida longo das membranas;
- facilidade de limpeza, por ser feita manualmente;
- polarização de concentração e entupimento podem ser facilmente controladas através de apropriada velocidade do fluxo;
- capacidade de somente desativar o tubo defeituoso.

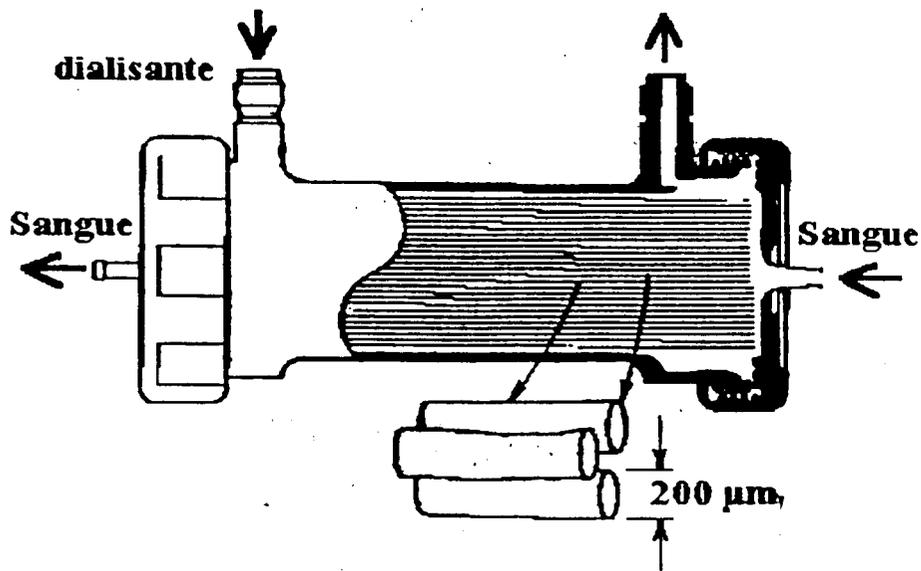
Como desvantagens segundo, DZIEZAK (1990) e CROSS, GOVIDAN, PHILIP (citados por SILVA, 1995) pode-se citar:

- não há tamanho padrão, sendo limitada para cada processo em particular;
- baixa densidade e área por unidade de volume e portanto usada para pequeno fluxo junto com o suporte estes parâmetros resultam numa desvantagem econômica.
- alta energia requerida no bombeamento.
- não pode ser usada em fluidos com alta viscosidade, por ser difícil controlar as condições de fluxo no tubo.

- Fibra oca

Caracteriza-se por cartuchos contendo centenas de fibras com pequeno diâmetro (figura 2.5), que podem ser obtidas graças a desenvolvimentos na tecnologia de extrusão. Em osmose inversa as fibras possuem diâmetro em torno de 40 microns, parecendo cabelo humano e o fluxo de alimentação é feito de fora para dentro da fibra (SILVA,1995).

Figura 2.5: Módulo Fibra Oca.



Fonte: NOBREGA (1995)

Possui as seguintes vantagens segundo MALDONADO (1991) e CROSS, PHILIP e COX (citados por SILVA, 1995).

- alta densidade de empacotamento. Possui maior área de membrana por unidade de volume, tendo melhor produção que os outros módulos.
- baixo tempo de retenção.
- baixo custo .
- resiste a alta pressão.
- pequeno espaço requerido.

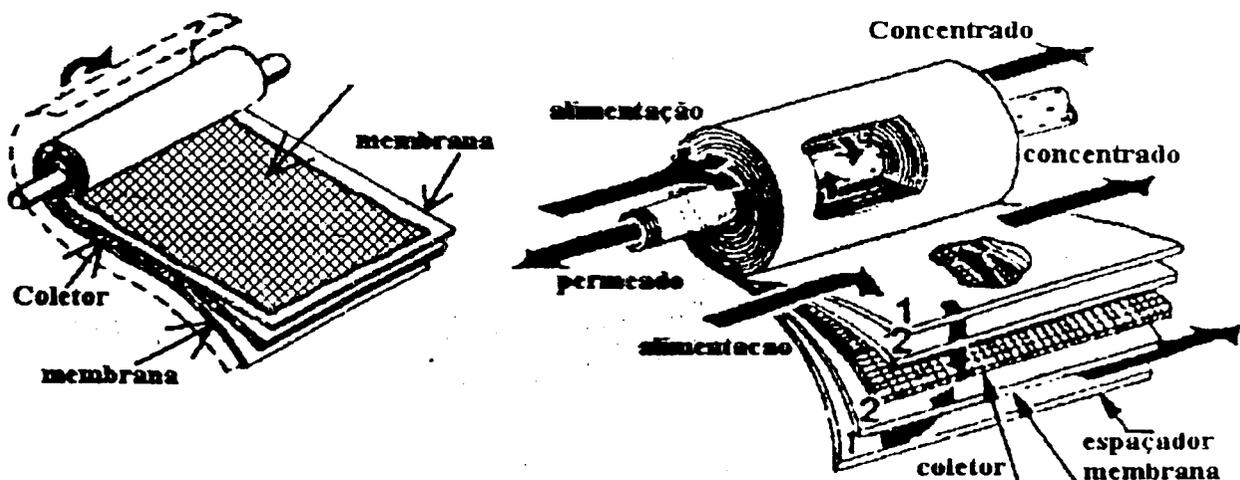
A principal desvantagem segundo STRATHMANN, CROSS e PAULSON & WILSON (citados por DZIEZAK, 1990) é que a presença de sólidos faz com que o sistema seja sensível ao entupimento. As soluções devem ser clarificadas através da ultrafiltração ou terra diatomácea.

- Espiral

Dentre as membranas de superfície plana constitui-se a mais popular (DZIEZAK, 1990), principalmente por oferecer maior relação de área/tamanho físico (FREEMAN e MERRY, citados por SILVA, 1995) menciona que foram inicialmente desenvolvidas para o processo de dessalinização da água do mar e que vem aumentando o uso na indústria de alimentos, devido a ter "designers" higiênicos.

É constituído por um envoltório de membrana em torno de um espaçador. Este conjunto é ligado a um tubo perfurado, localizado numa das extremidades do envoltório da membrana. Toda a estrutura do envoltório da membrana é enrolado em torno do tubo, sendo o conjunto inserido em um vaso de pressão cilíndrica. O fluido escoa sobre a membrana, enquanto o permeado flui para um sistema coletor por intermédio de um tubo externo (figura 2.6) (MALDONADO, 1991).

Figura 2.6: Módulo espiral



Fonte: NOBREGA (1995).

Segundo MALDONADO (1991) e STRATHMANN, WAGNER, CROSS, GOVINDAN e COX (citados por SILVA, 1995) e este módulo possui as seguintes vantagens:

- "design" extremamente compacto;
- baixo consumo de energia - 0,05 Kw/m<sup>2</sup> de área de membrana e de 6 a 12 Kw/1000 l de permeado;
- grande número de membranas disponíveis;
- fácil e rápida troca de membrana - 8000 a 12000 h o intervalo de troca;
- fácil manipulação em manutenção;
- preço favorável e possibilidade de instalar grande área de membrana a baixo custo;
- alto fluxo;
- baixo tempo de residência;
- moderada queda de pressão;
- em geral tem o menor custo por m<sup>2</sup> de área de membrana.

E possui as seguintes desvantagens segundo, WAGNER, GOVINDAN, e CROSS (citados por SILVA, 1995):

- sensível a sólidos suspensos e à alta viscosidade, por causa dos pequenos canais, e tendência para o entupimento, sendo mais vulnerável do que a tubular;
- difícil limpeza, que não pode ser feita por meios mecânicos;

#### **2.4.1.2. Aplicações da Ultrafiltração e Osmose Inversa na Separação e Concentração de Sucos**

A ultrafiltração e a osmose inversa têm sido utilizadas com sucesso para separação e concentração de sucos de frutas e outros produtos fluídos ( MERSON & MORGAN, 1968; MATSURA et al. 1974; BRADDOCK et al. 1991; CHOU et al. 1991; SHEU & WILEY, 1993, 1994; DZIEZAK, 1994).

Os processos de ultrafiltração e osmose inversa na concentração de sucos oferecem baixos custos operacionais e não há degradação oxidativa ou térmica do produto (MALDONADO, 1991). Provém um alto grau de retenção de componentes de aroma quando comparado com processos convencionais que utiliza o aquecimento a exemplo dos concentradores à vácuo. Oferecem também, a possibilidade de substituir as etapas de filtração e decantação do processo convencional, obtendo uma produtividade mais alta. Asseguram ainda a esterilidade do produto final e possibilita a etapa de pasteurização (TANADA, 1996).

Os sucos de frutas são normalmente concentrados por evaporadores, que são operados a temperaturas reduzidas com a finalidade de diminuir a degradação térmica do aroma, o que torna os evaporadores menos eficientes. O processo de Osmose Inversa para a concentração de sucos é muito eficiente e pode ser operado a temperatura ambiente (ANON, 1983).

RAMTEKE (citado por TANADA, 1996) e PETRUS (1997), relataram que o sucesso da tecnologia de membranas na clarificação e concentração de sucos de frutas depende do desenvolvimento de membranas adequadas e módulos de membranas que possam produzir produtos de boa qualidade, com isso, reter os componentes do aroma.

Segundo HACKERT (citado por KOSEOGLU et al, 1990), na produção de 70.000litros/dia de suco de maçã clarificado com o processo de ultrafiltração, pode-

se economizar anualmente cerca de U\$ 50.000 dólares. Isso é devido principalmente a eliminação de coadjuvantes de filtração, redução no uso de enzimas em 50%, aumento do rendimento em 5 - 7% e melhoria da qualidade do produto.

MERSON e MORGAN (1968), concentraram suco de maçã e laranja pelo processo de osmose inversa, com membranas de acetato de celulose modificado, com o objetivo de mostrar as vantagens e limitações desse processo. A performance da membrana é dada pelo índice de permeação e pela seletividade da membrana. Os sucos foram concentrados com excelente retenção de açúcar. Os autores também observaram neste estudo, que a retenção de aromas é dependente da natureza química da molécula.

CHUA et al (1987), estudaram a concentração de suco de maçã em uma unidade em escala piloto de osmose inversa, utilizando módulo espiral provido de membranas de acetato de celulose com 97% (CA - 97) e 99% (CA - 99) de rejeição ao NaCl e uma membrana de poliamida experimental (PA - 99), tendo esta, 99% de rejeição ao NaCl. A temperatura de trabalho do suco foi ambiente, variando de 21,1 °C a 26,7°C. A pressão média através da membrana variou de 476kpa a 485 Kpa. O fluxo de permeado para as membranas de acetato de celulose (CA - 97 e CA - 99) e para a membrana de poliamida (PA - 99), decresceram linearmente com o aumento do brix do concentrado. Quando comparadas as membranas CA - 99 e C - 97 observaram que a CA - 97 teve um maior fluxo na concentração, isso era esperado, já que esta, possui menor rejeição ao sal, com poro de maior tamanho, o que permite um maior fluxo. A membrana PA - 99 apresentou maiores fluxos e taxa de concentração do que as membranas de acetato de celulose (CA).

Foi realizado também uma análise cromatográfica de amostras retiradas da corrente de alimentação, do permeado e do concentrado e o balanço de massas dos compostos voláteis ativos. A membrana de poliamida PA - 99, reteve 45% do total de voláteis ativos, enquanto que a membrana de acetato de celulose CA - 99 reteve 23%.

CHOU et al (1991), tiveram como objetivo do seu trabalho de pesquisa estudar os efeitos das configurações e tipos de membranas, e a pressão e temperatura do processo de osmose inversa na recuperação de compostos do “flavor” em suco de maçã. Foram utilizadas as configurações Quadros e Placas (PF) da DDS e Espiral (SW). O módulo espiral possuía um diâmetro nominal de 6,4 cm<sup>2</sup>. As membranas usadas no estudo foram de poli-éster de filme composto fino (PEU) compostas por filme composto de uma nova geração de poliamida (PA). Os elementos da membrana espiral contém uma área efetiva de membrana de 1,95 m<sup>2</sup> em cada dois elementos de membrana, e o módulo quadros e placas usou no total 20 membranas de área total de 0,36m<sup>2</sup>. O estudo foi realizado as pressões de 35, 43 e 50 bar, para cada configuração, com cada membrana. Cada uma das pressões foram estudadas a 20°C, 30°C e 40°C. O suco inicialmente a 10° Brix foi concentrado à 20° Brix. As condições de baixa temperatura, 20°C, e alta pressão, 50 bar, foram os parâmetros de operação mais efetivos para a recuperação de “flavor”.

Comparando-se as duas configurações, quadros e placas e espiral, observou-se que a espiral (SW), apresentou um fluxo de permeado bem maior para atingir a concentração desejada, 20° Brix. O aumento da pressão resultou em um fluxo maior, reduzindo o tempo do processo, e as consequências desse aumento foram a diminuição das perdas de compostos aromáticos, atribuídas a volatilização e adesão à membrana. Já um aumento da temperatura de processo, acarretou na diminuição da retenção de aromas.

SHEU e WILEY (1983), realizaram um estudo para avaliar a eficiência do processo de osmose inversa na concentração de suco de maçã e determinar a qualidade do produto concentrado. Neste estudo, os autores utilizaram suco de maçã concentrado a 72° brix, diluído para 10° brix antes do início do processo. Para execução dos experimentos de osmose inversa foi utilizado um sistema de ultrafiltração/osmose inversa, da The De Danske Sukkerfabrikker (DDS) Lab Module

20, módulo quadros e placas. Foram avaliadas quatro tipos de membranas comerciais de acetato de celulose (CA-865 e CA-990) e alta resistência (HR-95 e HR98). A concentração do suco do maçã foi determinada a 20° brix ou 25° brix respectivamente, devido aos limites de concentração dos tipos de membranas. Para avaliar o efeito da pressão na concentração por osmose inversa, os autores conduziram os experimentos a 35 bar, 40 bar e 45 bar e a temperatura mantida a 20°C.

As membranas HR-95 , HR-98 e CA-990, possuíram características similares de capacidade de processo e limites de concentração. O suco de maçã quando concentrado a 20°C e 35 bar de pressão, obteve limite de 20° brix, e a média de fluxo foi de 8,1 L/hm<sup>2</sup>, usando membranas HR-98; e 8,8L/hm<sup>2</sup> usando membrana CA-990. Operando a 45 bar 15,4 L/hm<sup>2</sup> e 17,9 L/hm<sup>2</sup> respectivamente. A membrana CA-865, a de maior porosidade, apresentou os maiores fluxos, 22,0 L/hm<sup>2</sup> e 26,9 L/hm<sup>2</sup> e foi possível concentrar o suco de maçã a 25° brix e 35° brix sob 35 e 45 bar de pressão transmembrânica, respectivamente. Os fluxos acima de 15 L/hm<sup>2</sup> são considerados economicamente viáveis para o processo de osmose inversa.

A recuperação de aroma usando membranas CA e HR, a baixas pressões de operação, é menor do que a altas pressões. Isso foi devido ao aumento da pressão osmótica do suco durante o processo de concentração. Assim, a baixas pressões de operação, os aromas voláteis tiveram uma maior oportunidade de difundir através da membrana para o lado do permeado. Os autores conseguiram a recuperação de 97% de solutos e 87% dos aromas voláteis da maçã usando as membranas HR-95 e HR-98.

SHEU e WILEY (1984), estudaram os efeitos da pressão, temperatura e tipos de membranas para retenção de açúcar, no processo de concentração de suco de maçã por osmose inversa. Foi utilizado, para conduzir o processo, o equipamento

de planta piloto, módulo quadros e placas (DDS), com área efetiva da membrana de 0,36m<sup>2</sup>. Trinta litros de suco de maçã a 10° Brix, diluído a partir de suco concentrado a 72° Brix e congelado, foram processados para 20° Brix.

O suco usado na corrente de alimentação do primeiro experimento possuía 5,54% de frutose, 2,59% de glicose e 1,77% de sacarose, enquanto que o suco usado na segunda série de experimentos continha 6,03% de frutose, 2,46% de glicose e 1,51% de sacarose. Na primeira série de experimentos foram avaliadas as membranas de acetato de celulose (CA) e alta resistência (HR). Cada membrana foi operada a 35 bar, 40 bar e 45 bar de pressão a temperatura de 20°C. Na segunda série dos experimentos, a temperatura HR-95 foi operada utilizando quatro temperaturas diferentes (30°C, 40°C, 50°C e 60°C) e duas pressões (35 e 40 bar). Na primeira série de experimentos, as membranas HR, que são caracterizadas pela ampla faixa de pH e temperatura que podem suportar, e superior resistência à compactação e estabilidade química, mostraram-se significativamente maiores recuperadoras de sólidos solúveis do que as membranas CA. Na segunda série de experimentos, o fluxo médio de permeado aumentou com o aumento da temperatura de operação. Estes estudos mostraram que as membranas de alta resistência (HR), são mais eficientes na retenção dos açúcares do que as membranas de acetato de celulose (CA), e que tanto a temperatura quanto a pressão possuíram um efeito significativo na recuperação desses açúcares. As condições de operação ótimas para as membranas HR foram a 40°C, 40 bar, com 98% de retenção de açúcares e fluxo de 16,7 L/hm<sup>2</sup>.

TANADA, (1996) utilizou, com sucesso, o processo combinado de ultrafiltração e osmose inversa para obtenção de um extrato Concentrado de banana e isento de enzimas polifenol oxidases. Com este foi produzido um licor. Inicialmente, fez-se a extração do suco de banana, com inibição prévia da enzima polifenol oxidase, com solução de metabissulfito e ácido ascórbico, 0,15% e 1% respectivamente, a fim de evitar escurecimento inicial. Os processos de ultrafiltração

e osmose inversa foram realizados em Equipamento Lab UNIT M20 da DDS. A ultrafiltração foi realizada com membrana de polisulfona com peso molecular de corte de 20.000 daltons a duas pressões transmembrânicas, 6 e 8 bar. O processo à 6 bar foi o que apresentou fluxo de permeado mais estável e menor diminuição deste com o tempo e concentração. Para osmose inversa foram utilizadas membranas de filme composto (HR 95). Foram realizados quatro processos, dois a 40 bar, um do suco ultrafiltrado a 6 bar e outro a 8 bar, e dois processos a 60 bar, dos mesmos sucos ultrafiltrados.

Os processos a 60 bar foram superiores, dentre eles o suco ultrafiltrado a 6 bar, pois foi o que apresentou maior fluxo de permeado, (27,8 L/hm<sup>2</sup>) e concentração do suco a 31° Brix e menor tempo de processo.

HERNANDEZ et al (1992) estudaram o efeito da ultrafiltração de suco de laranja para recuperação de sólidos em suspensão no permeado e no retentado, tais como conteúdo de pectina, sólidos solúveis e viscosidade, usando um sistema piloto de ultrafiltração de fibra oca, com membranas de polissulfona de 50.000 daltons. O sistema foi operado a 15 psig de pressão transmembrânica e 25°C. O processo de ultrafiltração removeu totalmente os sólidos em suspensão, resultando um soro transparente de cor âmbar. Apesar do peso molecular da pectina da laranja ser menor do que 20.000 daltons, foi aparente que as membranas foram capazes de retê-la devido a associação de pectina com protopectina e material celulósico do suco. O efeito de polarização da concentração das membranas do sistema de ultrafiltração pode permitir a remoção de sólidos em suspensão de peso moleculares menores do que o peso molecular de corte da membrana. Não foi detectado no permeado nenhuma atividade da enzima pectina metilesterase.

Após análise da viscosidade do soro concentrado verificou-se que esta foi apreciavelmente menor do que a do suco fresco concentrado. Isso já era previsto, pois sabe-se que os sólidos em suspensão contribuem muito para a viscosidade do

suco. Essa redução da viscosidade permitiu que o evaporador TASTE concentrasse o permeado de suco de laranja a altos valores, como 55-58° Brix para o suco não ultrafiltrado e 72-75° Brix para o suco ultrafiltrado, nas mesmas condições de temperatura e taxas de fluxo no evaporador.

SILVA, (1995) utilizou o processo combinado de ultrafiltração e osmose inversa em módulos de placas para a concentração de suco de laranja obtendo fator de concentração de 3.9 a pressão de 60 bar. A etapa de Ultrafiltração se mostrou eficiente para a retenção de compostos de alto peso molecular e na produção de um permeado clarificado, facilitando o processo de concentração por osmose inversa.

JOHNSON et al (1996), estudaram as perdas de compostos voláteis em suco de laranja durante o processo de ultrafiltração e subsequente evaporação. Os álcoois e esteres, predominaram no permeado, enquanto terpeno (d-limoneno e valenceno) e aldeídos não polares, (octanal e decanal) foram mostrados no retentado do sistema de ultrafiltração. Algumas frações de componentes do aroma foram perdidas durante o processo. As essências aquossolúveis, foram recuperadas durante o processo de concentração por evaporação. Quando concentraram o suco integral, verificaram que tanto a fase oleosa quanto a fase aquosa foram recuperadas. A eficiência da recuperação individual dos componentes de aroma do permeado foi de 3 para 13% e < 5% quando concentrado o suco integralmente.

KERR et al (1985) realizaram um estudo, com o objetivo de recuperar sólidos solúveis de cogumelos *Agaricus bisporus* e estabelecer as melhores condições de processamento. Para isso, submeteram resíduos de cogumelo à extração sólido líquido. O extrato sofreu um pré tratamento com ultrafiltração, importante para evitar entupimento, e o ultrafiltrado, foi concentrado por osmose inversa, chegando a 18-20% de sólidos solúveis.

Os autores utilizaram para os processos de ultrafiltração e osmose inversa, o sistema UF/OI em escala piloto, módulo quadros e placas, da DDS. Para a ultrafiltração os autores trabalharam com membranas de boa resistência GR-51PP, cujo peso molecular de corte é de 50.000 daltons à pressão transmembrânica de 5 bar a uma faixa de temperatura de 10°C a 20°C. Para o processo de osmose inversa foi utilizado membranas de alta resistência, HR-95, com menos de 5% de permeabilidade ao NaCl, à pressão transmembrânica de 40 bar a uma faixa de temperatura de 10°C a 20°C.

Os aromas voláteis foram analisados por cromatografia gasosa tanto no suco fresco como no permeado e no retentado. Os primeiros e mais importantes voláteis encontrados no cogumelo incluíram o 1-octen 3-ol e 3 octanona e foram analisados no suco fresco, no permeado e no retentado. O tempo de retenção desses compostos sob as condições utilizadas foi de 9,05 e 9,28 minutos respectivamente.

CHIANG et al.(1986) propuseram processo alternativo para a recuperação dos compostos responsáveis pelo aroma de cogumelo ( *Agaricus bisporus* ) já que a recuperação de componentes do aroma de cogumelo da água de branqueamento é feita, tradicionalmente, pelo processo de concentração á vácuo ou em caldeiras com injeção de calor, o que acarreta em danos consideráveis. A solução rica em compostos do aroma foi obtida pela concentração por osmose inversa do permeado da ultrafiltração. O produto obtido foi analisado por cromatografia líquida de alta pressão, (HPLC) e por cromatografia gasosa ( C.G.) tendo sido comprovado alta concentração dos compostos responsáveis pelo aroma.

Como matéria prima para o processo, os autores utilizaram a água de branqueamento do cogumelo. Com a finalidade de prevenir o entupimento da membrana o processo foi conduzido em dois estágios. A água de branqueamento do cogumelo inicialmente foi processada por ultrafiltração, e o permeado da ultrafiltração foi posteriormente concentrado por osmose inversa. A ultrafiltração foi conduzida a uma pressão de operação de 120 Kpa a uma velocidade de 0,43

m/seg, já a osmose inversa foi conduzida a uma pressão de operação de 500kpa e uma vazão de 7,31L/min.

Quando o permeado da ultrafiltração foi concentrado por osmose inversa, observou-se uma relação linear entre pressão e fluxo, nos diferentes testes. A água de branqueamento foi concentrada de 2% para 13% de sólidos totais a 60°C e pressão de operação de 5000kpa com fluxo de 15L/hm<sup>2</sup>. O máximo de concentração foi obtida a 20% de sólidos totais e 90% de recuperação de não voláteis. A recuperação de voláteis foi de aproximadamente 50%.

## 2.5. Identificação de Compostos Voláteis

Para a identificação dos compostos responsáveis pelo aroma de um alimento é importante que se trabalhe com amostras que representem aromaticamente o material de estudo.

No isolamento dos compostos voláteis de um produto é importante que se evite a manipulação excessiva da amostra em função da sua volatilidade. As principais técnicas utilizadas no preparo de amostras para a análise de voláteis são:

### 2.5.1. Headspace

Esta técnica consiste em amostrar a atmosfera gasosa existente no frasco que contém o produto que se deseja avaliar. A principal vantagem desta técnica é a obtenção de uma amostra rica em compostos voláteis sem a necessidade de aquecimento. Os compostos voláteis podem ser retidos em adsorvedores, condensados em superfície fria ou transferidos diretamente para o cromatógrafo. A principal desvantagem desta técnica está na quantificação, que se necessária, é feita de maneira trabalhosa e demorada (HACHENBERG & SCHIMIDIT, 1979; SCHEIER, 1984 e GROSCH, 1994)

### **2.5.2. Simultaneous Distillation and Extraction - SDE**

A tradução do nome dessa técnica significa, extração e destilação simultâneas que, consiste em destilar, através de arraste de vapor, os voláteis da amostra, que posteriormente são extraídos da água por um solvente orgânico, não miscível com a água. O inconveniente deste método é o aquecimento necessário para gerar o arraste de vapor d'água, podendo gerar subproduto oriundos de reações térmicas, descaracterizando a amostra. A vantagem é que o material extraído já se encontra em uma quantidade reduzida de solvente, não sendo necessário uma etapa de concentração (HACHENBERG & SCHIMIDIT, 1979; SCHEIER, 1984 e BLANCH et al, 1993).

### **2.5.3. Solid Phase Micro Extraction - SPME**

Recentemente, essa técnica, relativamente nova denominada de microextração em fase sólida, vêm sendo empregada na determinação de voláteis. A técnica consiste em extrair para uma fase sólida compostos dissolvidos em uma matriz não solúvel na fase sólida usada, podendo ser de duas maneiras, por contato direto com a amostra ou por headspace. Esta técnica apresenta como vantagem o fato de ser livre de qualquer tipo de solvente, evitando etapas de concentração, além de evitar perdas por adsorção em grande superfície (STEFFEN & PAWLISZYN, 1996).

### **2.5.4. Destilação**

Trata-se do método clássico de extração de voláteis de uma amostra usando a técnica de arraste por vapor d'água. O inconveniente deste método é a grande quantidade de solvente necessária para a extração, o que requer uma etapa de concentração muito demorada. Além da possibilidade de reações térmicas, um outro

inconveniente, é que muitas vezes é necessário se fazer partição com solvente caso seja necessário analisar a amostra por cromatografia gasosa, visando eliminar compostos que não cromatografem (HACHENBERG & SCHIMIDIT, 1979; GROSCH, 1994 e HIATT, 1994).

#### **2.5.5. Purge - and - Trap**

Esta técnica também vem sendo muito usada mais recentemente por ser bastante eficiente e não requer uma manipulação excessiva da amostra. Consiste em se passar um gás inerte através da amostra, forçando a saída dos voláteis para fora da amostra. A seguir, os compostos arrastados pelo gás são trapeados em um adsorvente, podendo ser concentrado (HIATT, 1994 e STEFFEN & PAWLISZYN, 1996).

#### **2.5.6. Extração Direta**

Normalmente é utilizada como uma última alternativa, caso nem uma das anteriores seja suficiente ou passível de serem utilizadas pois, fornece uma amostra muito complexa, exigindo muitas etapas de purificação, encarecendo e aumentando o tempo de análise. Não é uma técnica muito utilizada na determinação de voláteis (HACHENBERG & SCHIMIDIT, 1979).

Atualmente existe uma grande quantidade de métodos analíticos disponíveis para o isolamento e identificação de compostos orgânicos. A espectrometria de massa, a ressonância magnética nuclear de próton e a espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier são as mais difundidas. A baixa quantidade de "flavor" no alimento exige a utilização de técnicas de alta sensibilidade.

Para a caracterização e isolamento de “flavor” em alimentos, as técnicas analíticas mais utilizadas são a cromatografia gasosa acoplada a “sniffing port” e a cromatografia gasosa multidimensional.

### **2.5.7. Cromatografia Gasosa Sniffing Port**

Para a caracterização dos voláteis na amostra é possível usar a técnica de cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a um detetor olfativo, “sniffing port”, conhecida como cromatografia gasosa olfatométrica (CG -O) (ACREE & TERANISH, 1993). Esta técnica permite relacionar o pico do cromatograma com o aroma percebido no “sniffing port”.

### **2.5.8. Cromatografia Gasosa Multidimensional**

A cromatografia de alta resolução é uma ferramenta essencial e poderosa para a análise de amostras complexas e na determinação de constituintes minoritários em diferentes tipos de amostra. Quando se analisa uma amostra contendo substâncias com propriedades físico-químicas semelhantes, existe a possibilidade de haver coeluição durante a cromatografia gasosa dessa substância, comprometendo a sua identificação e/ou quantificação. Para solucionar este problema é que se utiliza a cromatografia multidimensional ou etapas onde se utiliza duas ou mais cromatografias sucessivas, sob diferentes condições, buscando uma maior eficiência na separação dos constituintes, através do aumento do número de pratos teóricos e da seletividade, visando uma resolução satisfatória no menor tempo possível.

Devido a sua eficiência, esta técnica vem sendo muito usada em análises de alimentos, óleos essenciais, análise de frações de petróleo, amostras de solo e meio

ambiente (CORTES, 1992 e ACREE & TERANISH, 1993).

De maneira simplificada pode considerar a separação cromatográfica como resultado de uma interação entre a fase móvel (gás de arraste) e a fase estacionária (fase da coluna). O que define a separação é o equilíbrio entre as duas fases caracterizado pelo coeficiente de partição gás-líquido existentes na condição de análise. pode-se fazer uma analogia com a coluna de destilação para melhor entendimento, onde quanto maior o número de pratos, maior a eficiência da separação. Assim pode-se introduzir o conceito de pratos teóricos como sendo dependente do comprimento da coluna, onde quanto maior a coluna, maior o número de pratos.

Em cromatografia, o conceito número de pratos ( $n$ ) é um conceito teórico e está associado ao cromatograma pelos tempos de retenção ( $TR$ ) e a largura ( $L$ ) do pico através da pressão:

$$n = 16 (TR_1/L_1)^2 = 16 (TR_2/L_2)^2$$

esta relação traduz a medida da eficiência de uma coluna cromatográfica para efetuar separação. A separação em uma coluna cromatográfica depende, ainda, do fator de separação ( $FS$ ), definido por:

$$FS = TR_2/TR_1$$

### III. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados parte na Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUCCAMP), no Centro Nacional de pesquisa de Tecnologia Agro-industrial de Alimentos CTAA/EMBRAPA e Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), ambos situados no Rio de Janeiro.

#### 3.1. Material

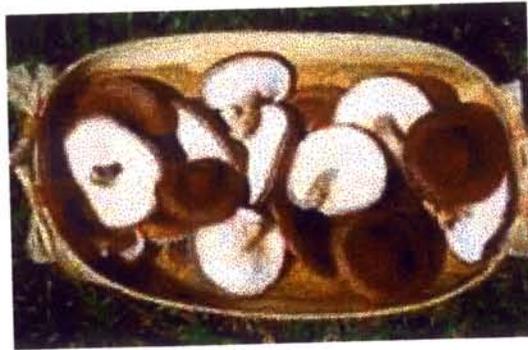
##### 3.1.1. Matéria Prima

Os cogumelos shiitake (*Lentinula edodes* Sing.) foram adquiridos na SUN SHIITAKE - Cogumelos Naturais, localizada na cidade de Vinhedo - S.P., levados ao Laboratório de Farmacognosia da PUCCAMP e mantidos sob refrigeração para manutenção de suas qualidades em embalagens individuais de 250 g.

Foram utilizados, para realização dos experimentos, 35kg do cogumelo originários de mesma cepa a fim de que o produto possua semelhança quanto sua composição.

Os cogumelos utilizados estavam no grau de maturação ideal para o consumo de acordo com as preferências exigidas pelos consumidores brasileiros, ou seja, o corpo frutífero apresentava-se totalmente “aberto”, com aproximadamente 7 cm de diâmetro, conforme figura 3.1.

Figura 3.1: Cogumelo shiitake, corpo frutífero totalmente aberto



### 3.1.2. Solvente

Água: foi utilizado água destilada, preparada no laboratório de Farmacognosia da PUCAMP

### 3.1.3. Equipamentos

- Ultrafiltração (UF)

Módulo: Lab Unit M-20 da DDS (Figura 3.2)

Configuração: quadros e placas

Membrana:

Material: polissulfona

Fluxo de água ( $l/m^2 \cdot h$ ): 250-400

Peso molecular de corte: 20.000 daltons (GR 61 PP)

Área:  $0,72 m^2$

pH: 1-13

Temperatura: 0-75°C

Pressão: 1-10 bar

- Osmose Inversa (OI)

Módulo: Lab Unit M-20 da DDS (Figura 3.2)

Configuração: quadros e placas

Membrana:

Material: filme composto

Fluxo de água (l/m<sup>2</sup>.h): 115-155

Permeabilidade ao NaCl: menos de 5% (HR 95).

Área: 0,72 m<sup>2</sup>

pH: 2-11

Temperatura: 0-60°C

Pressão: 1-60 bar

- Cromatógrafo

Cromatógrafo gasoso HP5890

Coluna DB 1; 30m x 0,25mm x 1,0 μm

- Refratômetro

Cat n° 121 – A Hand Refratometes, economic hight – contrast type 0-32%  
SHIBUYA OPTICAL CO. LTDA.

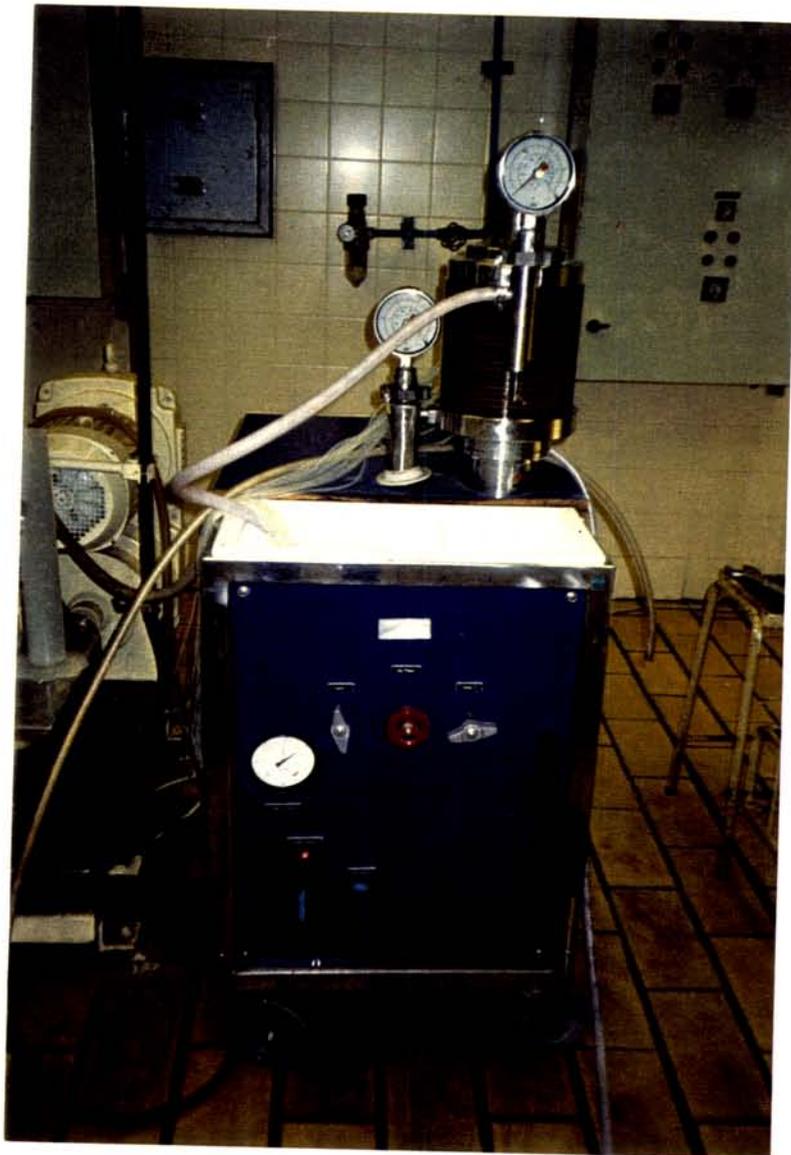
- Potenciômetro

- Triturador

Walita - Beta

- Banho maria

Figura 3.2: Foto do equipamento de UF e OI - Lab UNIT M20 DDS



### 3.1.4. Limpeza da Membrana

Para limpeza das membranas de Ultrafiltração e Osmose Inversa, foram necessários os seguintes reagentes:

- hidróxido de sódio (1%) para UF e (0,5%) para OI
- ácido fosfórico (1%) para UF e (0,5%) para OI
- água corrente

A lavagem obedeceu a seguinte sequência:

- lavagem com água durante 20 minutos (sem recirculação)
- lavagem com hidróxido de sódio durante 20 minutos (com recirculação)
- lavagem com água durante 20 minutos (sem recirculação)
- lavagem com ácido fosfórico durante 20 minutos (com recirculação)
- lavagem com água durante 20 minutos (sem recirculação)

As membranas são armazenadas em solução de ácido propiônico a 5%.

### 3.2. Processamento

O concentrado natural de aroma e sabor de cogumelo shiitake foi produzido de acordo com o fluxograma apresentado na figura 3.3:

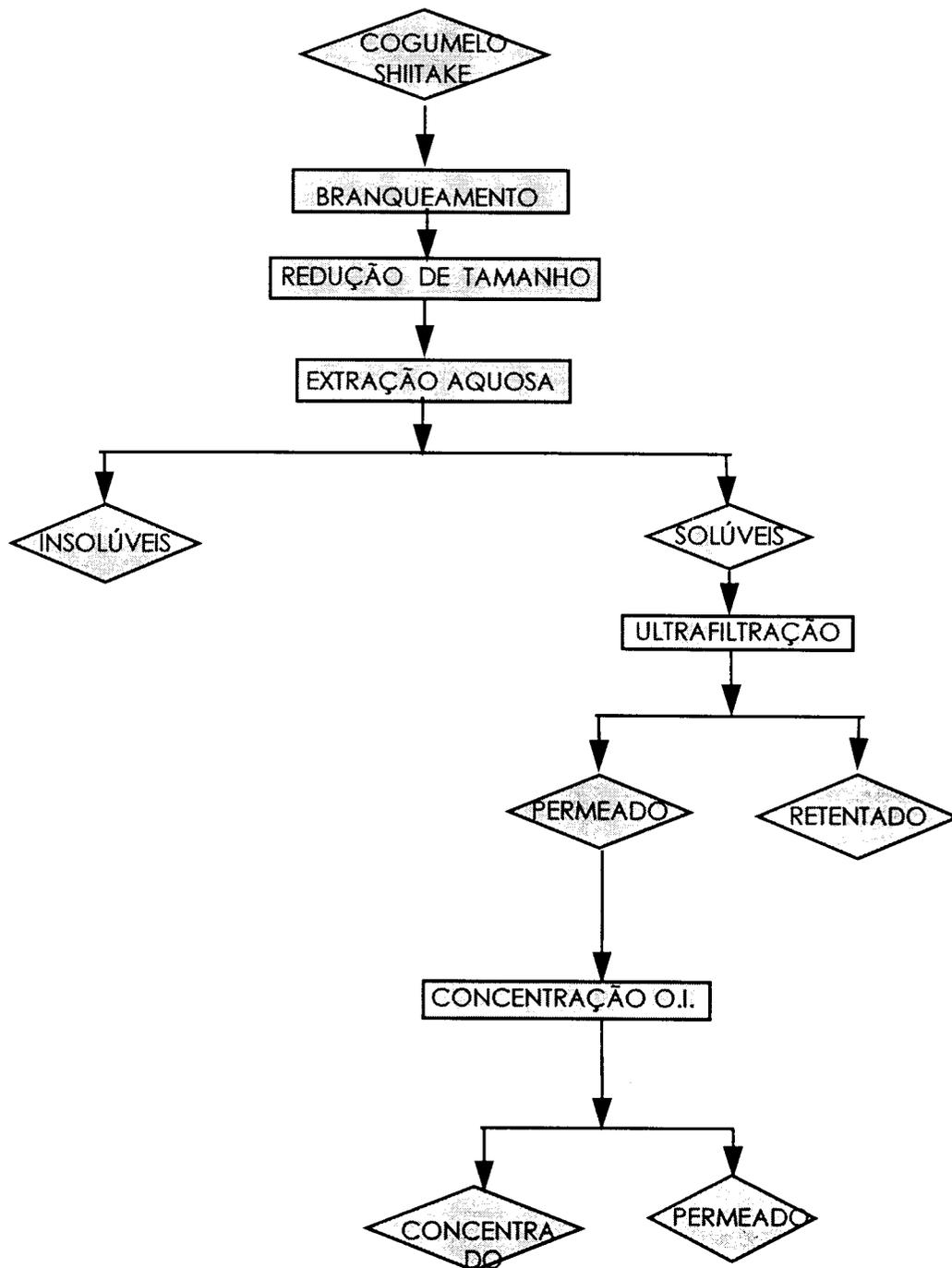


Figura 3.3 - Fluxograma básico do processo para obtenção do concentrado de aroma e sabor de cogumelo Shiitake

### 3.2.1. Testes Preliminares para Definição do Processo de Extração:

Inicialmente foram realizados uma série de experimentos para verificar quais seriam as melhores condições de extração dos compostos responsáveis pelo aroma e sabor do cogumelo. Foram utilizados diferentes temperaturas (27°C, 50°C, 70°C e 90°C) variando-se a proporção solvente cogumelo e o pH.

Os procedimentos utilizados nos testes I, II, III, IV, V, VI e VII, foram os mesmos, alterando apenas as condições de extração (proporção solvente/cogumelo, temperaturas e pH).

Inicialmente, lavou-se os cogumelos, e fez-se a redução do tamanho à aproximadamente 1,0 cm para facilitar a trituração. Triturou-os com água, na proporção solvente shiitake, pH e temperatura especificada para cada teste. Feito isso o triturado foi mantido em banho-maria na temperatura especificada para cada teste, por cinco minutos, sob agitação de tempos em tempos.

Passado os cinco minutos, o triturado foi filtrado em pano até exaustão, obtendo com isso o extrato aquoso de cogumelo.

Foram determinados os pesos do extrato e do resíduo, e a concentração de sólidos solúveis do filtrado em refratômetro.

Esse primeiro extrato obtido foi denominado de (L1), e armazenado em freezer.

Ao resíduo (R1) obtido, adicionou-se mais solvente, obedecendo as mesmas condições desse teste e agitou até total homogeneização. A suspensão resultante foi mantida em banho-maria por cinco minutos e filtrado em pano até exaustão obtendo um novo extrato, denominado de (L2). Novamente foi determinado, os pesos do extrato (L2) e do resíduo (R2), e a concentração de sólidos solúveis do extrato (L2) em refratômetro.

O resíduo (R2) foi descartado, e o extrato (L2) foi utilizado para uma nova extração com mais 250g de cogumelo fresco. O triturado (cogumelo fresco mais extrato (L2), foi filtrado em pano até exaustão, obtendo-se um resíduo (R3) e um novo extrato, denominado de (L3). Foi determinado os pesos do extrato (L3) e do resíduo, e a concentração de solúveis do extrato (L3) em refratômetro.

O extrato (L3) também foi armazenado em freezer.

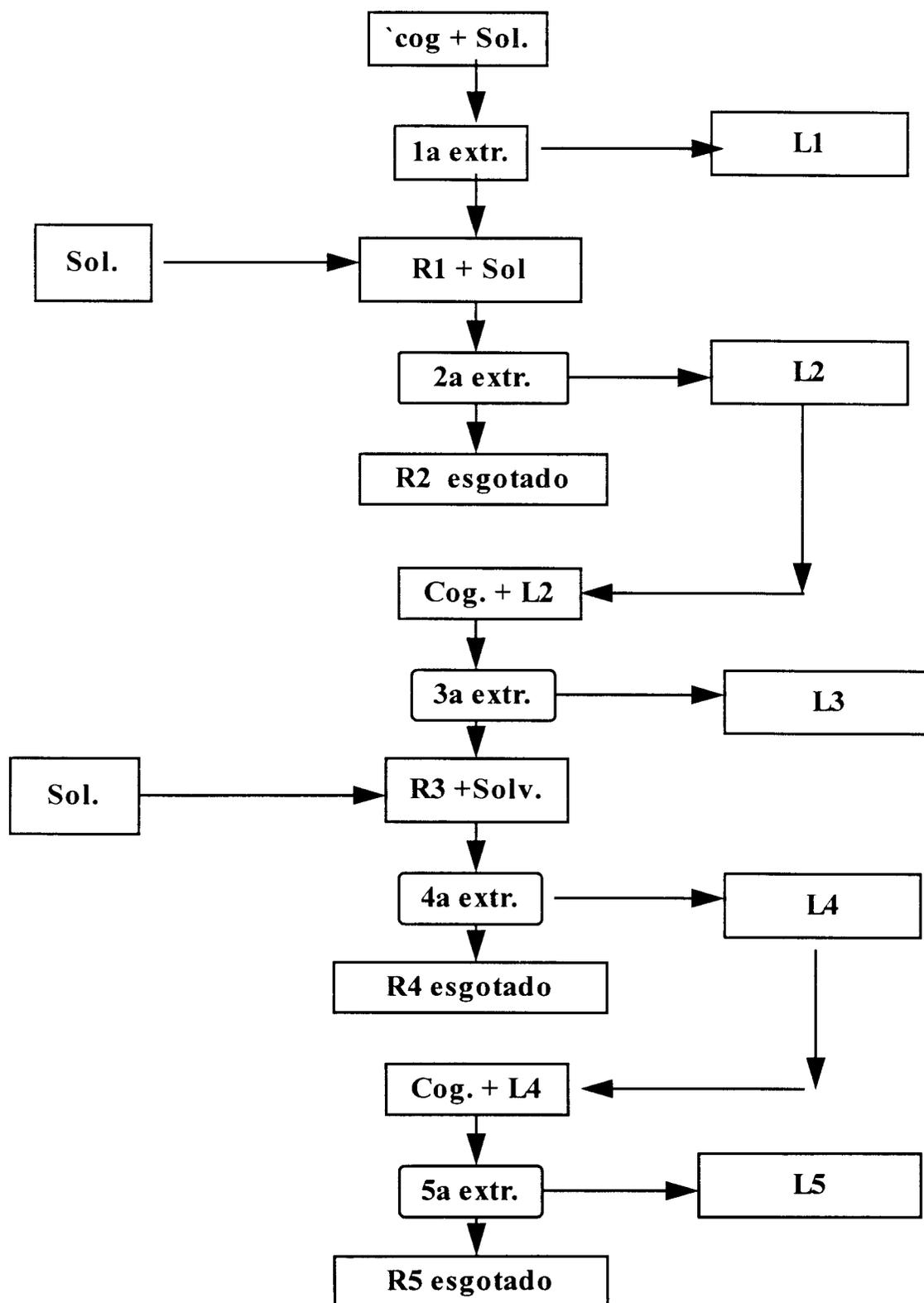
Ao resíduo (R3) obtido dessa terceira extração, adicionou-se solvente, e agitou até total homogeneização. Após homogeneização o triturado foi mantido em banho-maria por cinco minutos e filtrado em pano até exaustão obtendo um novo extrato, denominado de (L4). Novamente foi determinado, os pesos do extrato (L4) e do resíduo (R4), e a concentração de sólidos solúveis do extrato (L4) em refratômetro.

O resíduo (R4) dessa quarta extração foi descartado e o extrato (L4) foi adicionado a 250g de cogumelo para uma nova extração.

Após triturar cogumelo/extrato (L4), este, foi filtrado em pano até exaustão, obtendo-se o um novo extrato denominado de (L5), e um resíduo. Como nos procedimentos anteriores, determinou-se os pesos do resíduo (R5) e do extrato (L5), e a concentração de sólidos solúveis do extrato (L5). O resíduo (R5) foi descartado e o extrato (L5) foi armazenado em freezer.

A soma dos extratos (L1), (L3) e (L5) representam o extrato total de aroma de cogumelo. Como pode ser observado pelo procedimento descrito e o esquema apresentado na figura 3.4, o procedimento de extração adotado representa um processo de extração contínuo em contracorrente.

Figura 3.4: Esquema de extração contínua em contra corrente onde L1, L2, L3, L4 e L5 representam os extratos e R1, R2, R3, R4 e R5 os resíduos:



TESTE I:

- Proporção solvente/cogumelo:1:1
- Temperatura: 50°C
- pH: 7,0

TESTE II:

- Proporção solvente/cogumelo:1:1
- Temperatura: 70°C
- pH: 7,0

TESTE III:

- Proporção solvente/cogumelo:1:1
- Temperatura: 90°C
- pH: 7,0

TESTE IV:

- Proporção solvente/cogumelo:1:1
- Temperatura: ambiente (27°C)
- pH: 7,0

TESTE V:

- Proporção solvente/cogumelo:2:1
- Temperatura: ambiente (27°C)
- pH: 7,0

TESTE VI:

- Proporção solvente/cogumelo: 5:1
- Temperatura: ambiente (27°C)
- pH: 7,0

TESTE VII:

- Proporção solvente/cogumelo: 2:1
- Temperatura: ambiente (27°C)
- pH: 5,0

Avaliação sensorial preliminar:

Foi realizado uma avaliação sensorial comparativa dos extratos obtidos nos sete testes, com a finalidade de verificar a diferença na intensidade do aroma. O método adotado foi o de diferença em teste de ordenação.

**3.2.2. Planejamento Experimental:**

Foi realizado um planejamento experimental fatorial ortogonal balanceado  $2^{3-1}$  com duas réplicas.

- Definição dos Parâmetros do Processo

Os parâmetros do processo abrangem as variáveis independentes (fatores), que influenciam o processo, e as variáveis dependentes (resposta), que determinam ou refletem o comportamento do processo.

Os fatores de maior influência sobre o processo foram estabelecidos de acordo com os testes preliminares anteriormente realizados, com base na literatura,

bem como considerando as faixas de interesse experimental (níveis de cada um dos fatores). Foram definidos os seguintes fatores e as seguintes faixas.

- Proporção solvente/cogumelo: 1:1 e 2:1
- Temperatura: 27°C e 90°C
- pH: 5 e 7

As respostas de interesse para otimização do processo foram definidas a seguir:

- Brix

Objetivou-se extrair o máximo de sólidos solúveis, determinados indiretamente em refratômetro.

- Intensidade de “Flavor”

Pretendia-se com a extração maximizar a intensidade de aroma, o que foi verificado através de uma avaliação sensorial.

Os níveis codificados das variáveis independentes para o ensaios estão apresentados na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Níveis codificados das variáveis independentes para os ensaios

Nº de ensaios	Temperatura	pH	Sol/cog
1	-1	+1	+1
2	+1	+1	-1
3	-1	-1	-1
4	+1	-1	+1

A tabela 3.2 apresenta os níveis descodificados de cada uma das variáveis independentes do experimento.

Tabela 3.2: Níveis descodificados das variáveis independentes

Nº de ensaios	Temperatura	pH	Sol/cog
1	27°C	7	2:1
2	90°C	7	1:1
3	27°C	5	1:1
4	90°C	5	2:1

Os ensaios foram feitos em duplicata, somando, no total, 8 ensaios.

Através da análise estatística e dos testes preliminares anteriormente feitos, estabeleceu-se as condições experimentais ótimas para obtenção do extrato, e os experimentos foram conduzidos sob essas condições:

- Proporção solvente/cogumelo: 2:1
- Temperatura: 27°C
- PH: 7,0

A análise estatística, assim como, a descrição matemática do processo, foram obtidas através do programa *MiniTab*.

### 3.2.3. Extração dos Compostos do “Flavor”

O extrato natural de aroma e sabor de cogumelo Shiitake foi obtido conforme descrito à seguir.

Inicialmente, triturou-se os cogumelos com água. Feito isso, o triturado foi mantido à 27°C por cinco minutos, sob agitação de tempos em tempos.

Passados os cinco minutos, o triturado foi filtrado em pano até exaustão, obtendo com isso o extrato.

Esse primeiro extrato obtido, denominado de (L1), foi armazenado separadamente, para posteriormente ser juntado aos extratos (L3) e (L5), para ser utilizado nas etapas posteriores.

Ao resíduo (R1) obtido, adicionou-se mais solvente, sempre obedecendo as condições estabelecidas inicialmente, e triturou-o novamente. Esse triturado também foi mantido à 27°C por cinco minutos sob agitação de tempos em tempos e filtrado em pano até exaustão obtendo um novo extrato, denominado de (L2).

O resíduo (R2) foi descartado, e o extrato (L2) foi utilizado para uma nova extração com cogumelo fresco.

O triturado cogumelo fresco mais extrato (L2), foi mantido a 27°C por cinco minutos sob agitação de tempos em tempos, e posteriormente foi filtrado em pano até exaustão, obtendo-se um resíduo (R3) e um novo extrato, denominado de (L3).

O extrato (L3) foi adicionado ao extrato (L1) e armazenado sob refrigeração.

Ao resíduo (R3) obtido dessa terceira extração, adicionou-se mais solvente, e triturou novamente. A suspensão foi mantida a 27°C por cinco minutos, sob agitação de tempos em tempos e filtrada em pano até exaustão obtendo-se um novo extrato, denominado de (L4).

O resíduo (R4) dessa quarta extração foi descartado e o extrato (L4) foi adicionado a cogumelo fresco para uma nova extração.

Após ser triturada, a permaneceu à 27°C por cinco minutos sob agitação de tempos em tempos e foi filtrada em pano até exaustão, obtendo-se um novo extrato denominado de (L5). O resíduo (R5) foi descartado e o extrato (L5) foi adicionada aos extratos (L1) e (L3) completando-se assim o processo de extração e armazenado em freezer, para as etapas posteriores do processo.

#### **3.2.4. Filtração**

O extrato foi filtrado para remover os sólidos insolúveis a fim de facilitar a etapa seguinte.

A filtração foi realizada a baixa temperatura, aproximadamente 10°C, em filtros de nylon, formato de cesta, presente na forma de preparo de queijo.

#### **3.2.5. Ultrafiltração**

Antes do início do processo de Ultrafiltração, fez-se a lavagem das membranas conforme descrito no item Limpeza da Membrana e determinou-se o fluxo de água em quatro diferentes pressões 4 bar, 6 bar, 8 bar e 10 bar. O extrato aquoso de aroma e sabor de cogumelo só foi ultrafiltrado após estabilidade do fluxo nas diferentes pressões, o que garantiu a eficiência do processo de limpeza e a reprodutibilidade dos resultados.

O volume total de extrato filtrado utilizado no processo de ultrafiltração foi 21.620 ml, e a pressão transmembrânica estudada foi de 5 bar. Pressão transmembrânica é definida como a diferença de pressão a jusante (média entre a pressão de entrada e de saída) e a montante (pressão atmosférica). O experimento foi realizado a baixas temperaturas, variando de 7-10°C. Determinou-se o fluxo de permeado a cada 10 minutos de processo aproximadamente, sendo coletado 500ml do permeado. O fluxo (J) de permeado foi calculado pela fórmula:

$$J = V / AT$$

Onde:

V = volume de permeado da ultrafiltração

T = tempo

A = área da membrana

O permeado foi recolhido em recipiente mantido sob refrigeração e o retido foi mantido em recirculação.

Durante o processo de ultrafiltração, foram coletadas amostras da corrente de alimentação, permeado e do retido para as análises físicas, químicas e cromatográficas. As amostras para as análises foram congeladas e armazenadas em freezer a temperatura inferior a  $-18^{\circ}\text{C}$

Ao final do processo, procedeu-se a lavagem do módulo seguindo as mesmas etapas do início.

### **3.2.6. Osmose Inversa**

Anteriormente ao processo de Oi, procedeu-se a limpeza das membranas conforme descrito no item Limpeza da Membrana e determinou-se o fluxo de água em três pressões diferentes 20 bar, 40 bar e 60 bar até estabilidade dos mesmos nas 3 pressões verificadas.

O volume de permeado da UF utilizado no processo de OI foi 20800 ml. A pressão empregada no experimento foi de 40 bar. Esta etapa foi realizada em duas bateladas. Foram realizadas determinações do fluxo do permeado da OI a cada 10 minutos, coletando-se em cada determinação 500ml de permeado e mantendo o retentado sempre em recirculação, para cada batelada.

O fluxo de permeado (J) foi calculado pela fórmula:

$$J = V / AT$$

Onde:

V = volume de permeado da osmose inversa

A = área da membrana

T = tempo

O processo foi concluído quando o volume total de retentado não era suficiente para manter a recirculação.

Durante o processo de osmose inversa, foram coletadas amostras da corrente de alimentação, permeado e do retido para as determinações físicas, químicas e cromatográficas. As amostras para as análises foram congeladas e armazenadas em freezer a temperatura inferior a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Ao final do processo, procedeu-se a lavagem do módulo do mesmo modo que no início.

### **3.2.7. Análises Físicas e Químicas:**

Foram realizadas análises físicas e químicas, das amostras recolhidas nos processos de UF e OI, da matéria-prima e dos resíduos da extração. As amostras

dos processos de UF e OI foram recolhidas da corrente de alimentação, do permeado e do retido.

### **3.2.7.1 Sólidos Solúveis**

Os graus Brix foram determinados por refratometria de acordo com o método 13.6.1. do Instituto Adolfo Lutz (1985). A leitura no refratômetro, foi utilizada como medida do teor de sólidos solúveis. Os valores medidos foram corrigidos em relação a temperatura de 20°C, de acordo com a Tabela Internacional de Correção de Temperatura 936.19 (HELRICH,1990).

### **3.2.7.2. Sólidos Totais**

Determinados em duplicata, segundo o método 22.019 (AOAC,1980).

### **3.2.7.3. Umidade**

Determinados em duplicata, segundo o método 934.06 (HELRICH,1990).

### **3.2.7.4. Lipídeos Totais**

Determinados em duplicata, por hidrólise de acordo com o método 936.15 (HELRICH,1990).

### **3.2.7.5. Proteína Bruta**

Determinada, em duplicata, de acordo com o método 46-12 (American Association of Cereal Chemists,1983)

### **3.2.7.6. Cromatografia Gasosa**

Foi utilizado o cromatógrafo HP 5890 dotado de coluna capilar DB1 de 30 metros de comprimento, diâmetro de 0,25 mm e 1,0 micra de espessura da fase estacionária. O gás de arraste utilizado foi Hélio.

Condições Cromatográficas:

Inj.: 240°C

Det.:300°C

Tipo de Injeção: Tpleitess com 2 minutos de válvula

Os aromas foram extraídos com dicloro metano e injetado diretamente no cromatógrafo.

### **3.2.7.7. Avaliação Sensorial**

O extrato concentrado de aroma e sabor de cogumelo shiitake foi submetido a testes sensoriais de aceitação, utilizando-se uma escala hedônica de 9 pontos. Foram recrutados 16 provadores, entre eles alunos professores e funcionários da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUCCAMP). A ficha utilizada para as avaliações encontra-se no anexo A.

Em se tratando de concentrado de sabor e aroma, os testes sensoriais foram realizados através da preparação de três produtos convencionais, conforme descrito a seguir, adicionando-se a estes 0,2% do concentrado de aroma e sabor de cogumelo shiitake:

- Macarrão tipo oriental:

Ingredientes do macarrão: farinha de trigo, gordura vegetal e sal. Contém: Beta Caroteno, e glúten.

Ingredientes do tempero: sal, glutamato monossódico, condimentos, cebola, carne de galinha, tomate, pimentão vermelho, levedura seca inativa, açúcar, gordura de galinha, especiarias, salsa, pimenta do reino, e inosinato de sódio. Contém: aroma natural de cebola.

- Creme de legumes

Ingredientes após o preparo: farinha de trigo, sal, gordura vegetal, glutamato monossódico, alho porró, batata, amido de milho, repolho, óleo de milho, gordura de galinha, cebola, vagem, levedura seca inativa, cenoura, pimentão vermelho, açúcar, aipo, salsa, e especiarias.

- Creme de frango

Ingredientes após o preparo: farinha de trigo, amido de milho, sal, glutamato monossódico, carne de galinha, gordura vegetal hidrogenada, leite desnatado, açúcar, gordura de galinha, condimentos, extrato de carne, salsa, pimenta do reino e especiarias. Contém aroma natural de alho.

## IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Testes de Extração

Os parâmetros e rendimentos dos testes de extração em dois estágios e em contra corrente, que tiveram como objetivo verificar as melhores condições para extração dos compostos responsáveis pelo sabor e aroma, estão apresentados nas tabelas 4.1 a 4.7.

Tabela 4.1: Parâmetros do processo de extração contínua em contra corrente para o teste 1.

EXTRAÇÕES	Etapa de Extração				
	1 <sup>a</sup> extração	2 <sup>a</sup> extração	3 <sup>a</sup> extração	4 <sup>a</sup> extração	5 <sup>a</sup> extração
Cogumelo Fresco (g)	250,3		250,0		250,0
Solvente (g)	250,3	250,1		250,1	
Extrato (g)			241,1		233,5
Resíduo (g)		76,58		89,7	
<b>RENDIMENTO</b>	<b>L1/R1</b>	<b>L2/R2</b>	<b>L3/R3</b>	<b>L4/R4</b>	<b>L5/R5</b>
Extrato (g)	361,07	241,1	353,7	233,5	353,1
Resíduo (g)	76,58	71,6	89,7	69,6	80,7
S. S. Totais dos Extratos (%)	3,0	1,0	3,0	1,0	3,2

Tabela 4.2.: Parâmetros do processo de extração contínua em contra corrente para o teste 2.

EXTRAÇÕES	Etapa de Extração				
	1 <sup>a</sup> extração	2 <sup>a</sup> extração	3 <sup>a</sup> extração	4 <sup>a</sup> extração	5 <sup>a</sup> extração
Cogumelo Fresco (g)	250,8		250,3		250,3
Solvente (g)	250,1	250,3		250,0	
Extrato (g)			239,1		211,7
Resíduo (g)		79,0		70,0	
<b>RENDIMENTO</b>	<b>L1/R1</b>	<b>L2/R2</b>	<b>L3/R3</b>	<b>L4/R4</b>	<b>L5/R5</b>
Extrato (g)	357,0	239,1	343,6	211,7	430,5
Resíduo (g)	79,0	76,3	70,0	66,4	76,0
S. S. Totais dos Extratos (%)	2,6	0,6	3,2	0,8	3,6

Tabela 4.3.: Parâmetros do processo de extração contínua em contra corrente para o teste 3.

EXTRAÇÕES	Etapa de Extração				
	1 <sup>a</sup> extração	2 <sup>a</sup> extração	3 <sup>a</sup> extração	4 <sup>a</sup> extração	5 <sup>a</sup> extração
Cogumelo Fresco (g)	250,1		250,3		250,1
Solvente (g)	250,0	250,1		250,3	
Extrato (g)			179,2		184,0
Resíduo (g)		81,2		81,0	
<b>RENDIMENTO</b>	<b>L1/R1</b>	<b>L2/R2</b>	<b>L3/R3</b>	<b>L4/R4</b>	<b>L5/R5</b>
Extrato (g)	347,8	179,2	275,0	183,8	314,1
Resíduo (g)	81,2	71,4	81,0	70,0	79,0
S. S. Totais dos Extratos (%)	3,0	1,0	3,8	1,0	3,9

Tabela 4.4.: Parâmetros do processo de extração contínua em contra corrente para o teste 4.

EXTRAÇÕES	Etapa de Extração				
	1 <sup>a</sup> extração	2 <sup>a</sup> extração	3 <sup>a</sup> extração	4 <sup>a</sup> extração	5 <sup>a</sup> extração
Cogumelo Fresco (g)	250,6		250,5		250,1
Solvente (g)	250,3	250,6		2502	
Extrato (g)			237,4		326,1
Resíduo (g)		78,1		77,4	
<b>RENDIMENTO</b>	<b>L1/R1</b>	<b>L2/R2</b>	<b>L3/R3</b>	<b>L4/R4</b>	<b>L5/R5</b>
Extrato (g)	377,5	237,4	376,0	326,1	381,6
Resíduo (g)	78,1	69,8	77,4	68,1	80,0
S. S. Totais dos Extratos (%)	2,8	0,8	3,0	1,0	3,6

Tabela 4.5.: Parâmetros do processo de extração contínua em contra corrente para o teste 5.

EXTRAÇÕES	Etapa de Extração				
	1 <sup>a</sup> extração	2 <sup>a</sup> extração	3 <sup>a</sup> extração	4 <sup>a</sup> extração	5 <sup>a</sup> extração
Cogumelo Fresco (g)	250,4		250,1		250,5
Solvente (g)	500,7	500,0		500,0	
Extrato (g)			468,0		528,2
Resíduo (g)		79,0		70,9	
<b>RENDIMENTO</b>	<b>L1/R1</b>	<b>L2/R2</b>	<b>L3/R3</b>	<b>L4/R4</b>	<b>L5/R5</b>
Extrato (g)	611,0	468,0	586,4	528,2	559,0
Resíduo (g)	79,0	72,3	70,9	66,9	86,0
S. S. Totais dos Extratos (%)	2,0	0,5	2,2	0,4	2,1

Tabela 4.6.: Parâmetros do processo de extração contínua em contra corrente para o teste 6.

EXTRAÇÕES	Etapa de Extração				
	1 <sup>a</sup> extração	2 <sup>a</sup> extração	3 <sup>a</sup> extração	4 <sup>a</sup> extração	5 <sup>a</sup> extração
Cogumelo Fresco (g)	250,6		250,3		250,3
Solvente (g)	1250,0	1250,0		1250,0	
Extrato (g)			1279,0		1235,5
Resíduo (g)		89,0		85,1	
<b>RENDIMENTO</b>	<b>L1/R1</b>	<b>L2/R2</b>	<b>L3/R3</b>	<b>L4/R4</b>	<b>L5/R5</b>
Extrato (g)	1336,4	1279,0	1326,0	1235,5	1336,5
Resíduo (g)	89,0	89,0	85,1	98,0	88,3
S. S. Totais dos Extratos (%)	0,8	0,1	0,8	0,1	0,8

Tabela 4.7.: Parâmetros do processo de extração contínua em contra corrente para o teste 7.

EXTRAÇÕES	Etapa de Extração				
	1 <sup>a</sup> extração	2 <sup>a</sup> extração	3 <sup>a</sup> extração	4 <sup>a</sup> extração	5 <sup>a</sup> extração
Cogumelo Fresco (g)	250,2		250,0		250,4
Solvente (g)	500,2	500,5		500,1	
Extrato (g)			522,1		493,4
Resíduo (g)		78,0		75,0	
<b>RENDIMENTO</b>	<b>L1/R1</b>	<b>L2/R2</b>	<b>L3/R3</b>	<b>L4/R4</b>	<b>L5/R5</b>
Extrato (g)	673,0	522,1	638,0	493,4	604,7
Resíduo (g)	78,0	66,0	75,0	63,1	79,0
S. S. Totais dos Extratos (%)	1,6	0,4	2,0	0,4	2,0

A figura 3.4. (página 56) ilustra as etapas realizadas no processo de extração. Observou-se que na primeira extração, (L1) e (R1) equivalem às correntes obtidas em processo de extração de um único estágio. A segunda extração tem o objetivo de “lavar” os sólidos solúveis do resíduo (R1) da primeira extração. A terceira extração adiciona estes sólidos (L2) aos sólidos a serem extraídos do Shiitake fresco, e o líquido obtido nesta etapa (L3) é mais rico em sólidos solúveis que (L1), mas ainda não representa um estágio de equilíbrio do sistema. Já a quarta extração é semelhante à segunda, apenas o resíduo (R3) possui um teor de sólidos solúveis superior. A quinta extração é semelhante à terceira, obtendo o líquido (L5) muito semelhante ao (L3) indicando a proximidade do equilíbrio. Portanto, após cinco extrações, o experimento em contra corrente de dois estágios representou situação de equilíbrio obtido em sistemas contínuos de extração.

Os resultados neste trabalho foram obtidos de experimentações laboratoriais, tentando-se vincular o desempenho de uma unidade industrial de extração trabalhando em regime contínuo em contra corrente. As conclusões estão fundamentadas nesta simulação, não tendo sido possível comprovar na prática pela falta de infra-estrutura industrial para aplicação.

#### **4.2. Planejamento Experimental para Extração**

A tabela 4.8 mostra as respostas de interesse, Brix e intensidade do flavor, para cada ensaio. Na tabela 4.9 são apresentados os valores dos efeitos estimados e coeficientes para a variável Brix e na tabela 4.10. os valores da análise de variância para a variável Brix.

Tabela 4.8. : Respostas obtidas de cada ensaio do Planejamento Experimental

Nº de ensaios	Temperatura	PH	Sol/cog	Brix	Intensidade de Flavor
1	27°C	7	2:1	4,2*	9,25
2	90°C	7	1:1	3,5	5,25
3	27°C	5	1:1	3,03	6,25
4	90°C	5	2:1	5,8*	----
5	27°C	7	2:1	4,2*	9,25
6	90°C	7	1:1	3,3	5,25
7	27°C	5	1:1	3,06	6,25
8	90°C	5	2:1	4,4*	----

\* Valores de Brix multiplicado por 2, para a proporção Sol/cog. = 2:1.

Tabela 4.9.: Efeitos estimados e coeficiente para a variável Brix:

Termo	Efeito	Coef.	StDevCoef	T	P
Constante		3,9363	0,1768	22,26	0,000
Temperatura	0,6275	0,3137	0,1768	1,77	0,151
PH	-0,2725	-0,1362	0,1768	-0,77	0,484
Sol/Cog	1,4275	0,7138	0,1768	4,04	0,016

Tabela 4.10.: Análise de variância par a variável Brix

Fonte	DF	Seq SS	Adj SS	Adj Ms	F	P
Ef Principal	3	5,012	5,012	1,6705	6,68	0,049
Erro resid.	4	1,000	1,000	0,2501	----	----
Erro puro	4	1,000	1,000	0,2501	----	----
Total	7	6,012	----	----	----	----

Analisando estatisticamente os resultados para cada resposta, Brix e intensidade de aroma, observamos que:

- Brix:

Para o Brix, só a proporção solvente cogumelo foi estatisticamente significativo, sendo a proporção 2:1 a melhor.

A temperatura e o pH não foram estatisticamente significativos, como mostra a figura 4.1.

Na situação proporção solvente/cogumelo de 2:1, foi considerado os valores de Brix dobrado.

- Intensidade de aroma:

Como mostrou a figura 4.2., a temperatura de 27°C, foi a escolhida por apresentar maior intensidade de aroma.

O experimento à 90°C, mostrou-se desbalanceado.

Figura 4.1.: Efeitos principais para a variável Brix

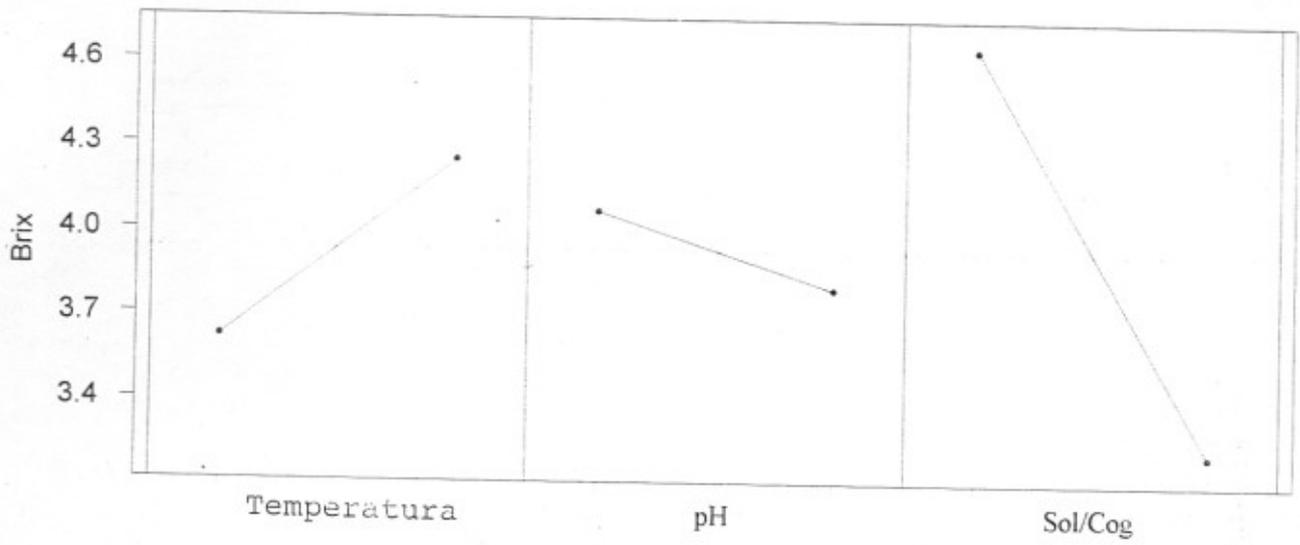
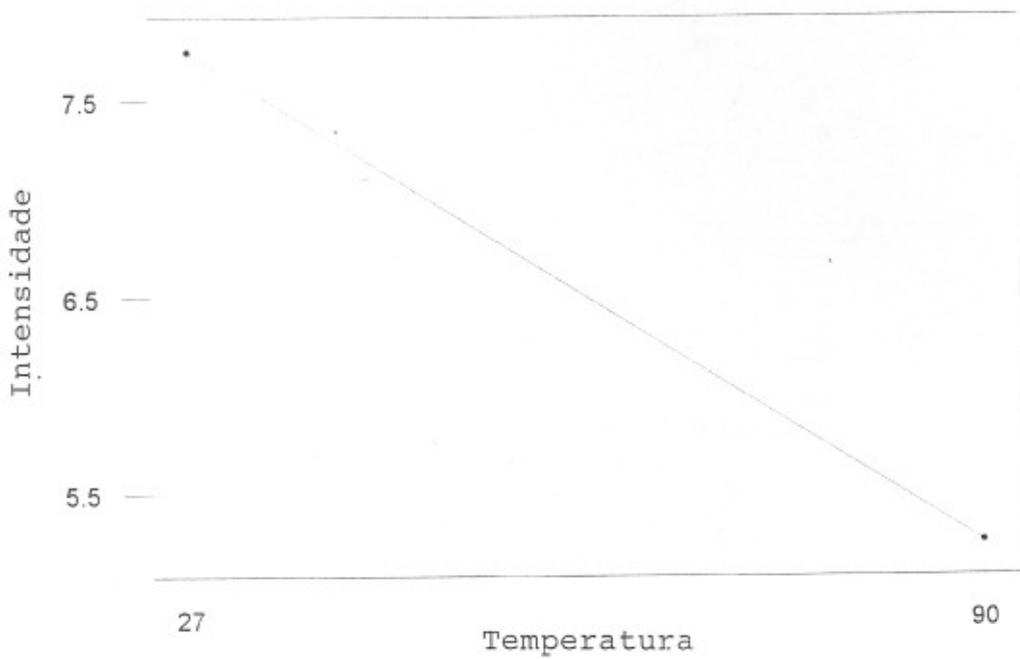


Figura 4.2.: Efeito da temperatura para resposta Intensidade de aroma



Não foi possível analisar os feitos estimados, coeficiente e a variância nos experimentos 4 e 8 pois não teve medição da intensidade de “flavor”.

Como o pH não interferiu no Brix e nem na intensidade de aroma, optou-se pelo pH 7, neutro, conforme menciona na literatura pesquisada e pela facilidade operacional do processo.

### 4.3. Composição Centesimal do Cogumelo Shiitake

Na tabela 4.11. são apresentados os valores da composição centesimal do cogumelo Shiitake fresco utilizado nos experimentos.

Tabela 4.11.: Composição centesimal do cogumelo Shiitake fresco utilizado no experimento.

Umidade	Proteína	Extrato Etéreo	Cinzas	Fibras	CH.Totais	Valor Calórico
88,88	2,89	0,13	0,42	0,63	7,68	40,93

Valores em g / 100g.

Valor calórico em cal / 100g.

Valor calórico não inclui fibras.

A tabela 4.12 mostra as porcentagens de sólidos solúveis, sólidos insolúveis em relação aos sólidos totais do cogumelo Shiitake fresco utilizado no experimento.

Tabela 4.12.: Teor de sólidos totais, sólidos solúveis e sólidos insolúveis do cogumelo Shiitake.

Sólidos Totais	Sólidos Solúveis	Sólidos Insolúveis
11,12	4,00	7,12

Valores em g / 100g.

Resultados em matéria úmida.

Os valores obtidos para composição centesimal e sólidos estão próximos àqueles apresentados por SINTESE NATURAL – MICÉLIO E ASSESSORIA EM COGUMELOS (1995).

#### **4.4. Extração dos Compostos de Aroma e Sabor**

Em função dos resultados obtidos no Planejamento Experimental, item 4.2., as condições de temperatura, pH e proporção solvente/cogumelo que proporcionam o melhor rendimento de extração dos compostos responsáveis pelo aroma e sabor são: temperatura 27°C, pH 7,0 (neutro) e proporção solvente/cogumelo 2:1.

O processo de extração utilizado foi o contra corrente, em dois estágios, conforme descrito no item 3.2. Processamento, esquematicamente representado na figura 3.4.

A tabela 4.13 mostra os valores obtidos de rendimento de extração.

Tabela 4.13.: Rendimento da extração dos sólidos solúveis:

Sólidos Líquidos/Resíduos	Sólidos solúveis	Sólidos insolúveis	Umidade
L1	2,0	0,18	97,82
L3	2,2	Nd	97,80
L5	2,1	Nd	97,90
L1 + L3 + L5	2,1	Nd	97,84
R2	nd	18,40	82,14
R4	nd	18,10	83,57
R5	nd	18,60	79,75
R2 + R4 + R5	nd	18,34	81,82

Valores em g / 100g.

Comparando-se os valores de sólidos solúveis de cogumelo Shiitake apresentados na tabela 4.12. com os valores de sólidos solúveis apresentados na tabela 4.13. conclui-se que a extração em contra corrente de dois estágios proporcionou um rendimento de extração dos sólidos solúveis de 100%, valor superior ao rendimento obtido por KERR et al (1985).

#### 4.5. Ultrafiltração

Com o objetivo de reter as macromoléculas dos princípios ativos medicinais, , 21.620 ml do extrato de aroma e sabor de cogumelo Shiitake foi submetido ao processo de Ultrafiltração. Este produziu um permeado clarificado, que posteriormente facilitará a etapa da Osmose Inversa. Tendo em vista o peso molecular de corte da membrana utilizada microorganismos e a enzima polifenol oxidase também foram retidos.

Os volumes finais obtidos no processo foram os seguintes:

- V permeado = 20.800 ml
- V retentado = 430 ml

Foi determinado o teor de sólidos solúveis da corrente de alimentação, do permeado e do retentado da Ultrafiltração tendo sido obtido os seguintes valores:

- Sólidos Solúveis da alimentação: 2,1° Brix
- Sólidos solúveis do permeado: 1,1° Brix
- Sólidos solúveis do retentado: 3,0° Brix

O permeado obtido na Ultrafiltração foi posteriormente, concentrado pelo processo de osmose inversa.

O retentado é constituído basicamente pelos compostos solúveis de alto peso molecular presente no shiitake, que são princípios ativos medicinais (MIZUNO, 1995)

O fluxo de permeado foi obtido através de medições a cada 10 minutos de processo aproximadamente. A cada tempo foi coletado 500 ml de permeado. Os resultados estão apresentados na tabela 4.14. A figura 4.3. mostra que a variação do fluxo de permeado após 120 minutos de processo foi pequena. Essa variação foi mais acentuada nos primeiros 65 minutos se mantendo praticamente constante até o final do processo, aos 120 minutos.

O fluxo de permeado diminui continuamente com o tempo de processo por ser limitado pela pressão osmótica em adição a formação da camada de entupimento. Há uma gradual formação de uma camada de sólidos na superfície da membrana devido a sólidos em suspensão e substâncias pécticas. A resistência, que provoca o abaixamento de fluxo é devido a formação dessa camada (RAO et al, 1987). Outro efeito dessa camada, reduzindo fluxo de permeado, se deve a redução

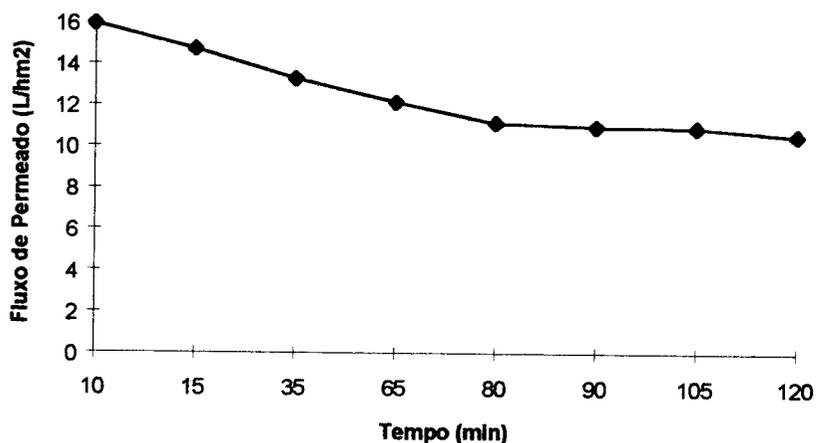
do tamanho efetivo dos poros da membrana. O efeito de polarização da concentração nas membranas pode permitir a remoção de sólidos em suspensão de peso molecular menor do que o peso molecular de corte da membrana pela associação entre essas substâncias, formando compostos de peso molecular maiores (HERNANDEZ et al, 1992). Esse fenômeno, diminui o fluxo de permeado, tornando o processo mais lento porém, favorece a retenção de compostos solúveis com peso molecular próximo ao peso molecular de corte da membrana. A formação dessa camada parece não envolver nenhuma interação específica com a membrana como reportado por CAMPANNELLI et al (1992), uma vez que o procedimento convencional de limpeza foi suficiente para restaurar o fluxo, quando passa água pura, ao seu valor inicial.

Tabela 4.14: Variação do Fluxo de permeado em função do tempo de processo de Ultrafiltração.

Tempo (h.)	Volume permeado (Litro)	Fluxo permeado (L/hm <sup>2</sup> )
0,043	0,5	15,92
0,047	0,5	14,70
0,052	0,5	13,27
0,057	0,5	12,14
0,062	0,5	11,14
0,063	0,5	10,96
0,064	0,5	10,92
0,066	0,5	10,55

No início do processo de ultrafiltração, o equipamento funcionou por 10 minutos sem separar o permeado de retido. Esse tempo foi necessário para estabilizar o equipamento. Somente então, iniciou-se, a determinação do fluxo de permeado.

Figura 4.3.: Gráfico da Variação do Fluxo de Permeado em função do Tempo de processo de Ultrafiltração.



#### 4.6. Osmose Inversa

O permeado da ultrafiltração (1,1° Brix), foi concentrado pelo processo de osmose inversa, em duas bateladas, que após recirculação, produziram concentrados de 10,0° Brix.

Os volumes finais obtidos no processo foram os seguintes:

- 1ª batelada
  - V permeado = 0,83 L
  - V retentado = 9 L
  
- 2ª batelada
  - V permeado = 0,75 L
  - V retentado = 8,42 L

O fluxo de permeado foi obtido através de medições a cada 10 minutos de processo aproximadamente. A cada tempo foi coletado 500 ml de permeado. Os resultados, de cada batelada, estão apresentados nas tabelas 4.15 e 4.16, respectivamente. As figuras 4.4. e 4.5. mostram a variação do fluxo de permeado durante o processamento.

Tabela 4.15.: Variação do fluxo de permeado em função do tempo de processo de OI, 1ª batelada.

Tempo (h)	Volume de permeado (L)	Fluxo (L/hm <sup>2</sup> )
0,010	0,5	64,10
0,014	0,5	49,8
0,019	0,5	35,71
0,022	0,5	31,25

Tabela 4.16.: Variação do fluxo de permeado em função do tempo de processo de OI, 2ª batelada.

Tempo (h)	Volume de permeado (L)	Fluxo (L/hm <sup>2</sup> )
0,014	0,5	48,08
0,021	0,5	31,65
0,032	0,5	21,74
0,040	0,5	17,40

No início do processo de Osmose inversa, o equipamento funcionou por 10 minutos sem separar o permeado de retido. Esse tempo foi necessário para estabilizar o equipamento. Somente então, iniciou-se, a determinação do fluxo de permeado.

Figura 4.4.: Gráfico da Variação do Fluxo de Permeado em função do Tempo de processo de Osmose Inversa (1ª batelada).

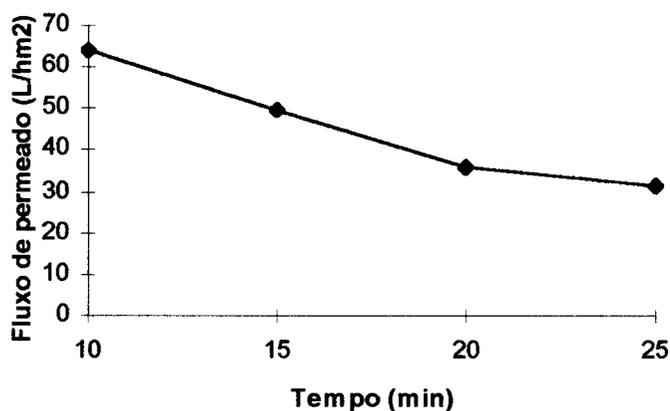
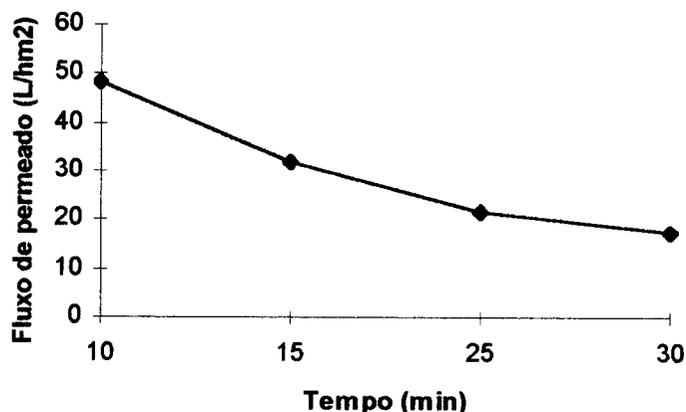


Figura 4.5.: Gráfico da Variação do Fluxo de Permeado em função do Tempo de processo de Osmose Inversa (2ª batelada).



A figura 4.4. mostra que a variação do fluxo de permeado após 25 minutos de processo foi pequena, o que também pode ser observado na figura 4.5., após 30 minutos de processo. A diminuição contínua do fluxo de permeado com o tempo se deveu-se ao efeito da elevação da pressão osmótica em função do aumento da concentração dos sólidos solúveis do extrato ao longo do processo e a formação da camada de entupimento da membrana, fenômeno esse ocorrido na etapa de ultrafiltração, discutido no item 4.5.

#### 4.7. Cromatografia Gasosa

Os cromatogramas dos compostos aromáticos estão apresentados nas figuras de 4.6. a 4.9.

As tabelas de 4.17 a 4.20 mostram os valores de tempo de retenção e as áreas dos componentes aromáticos registrados nos cromatogramas.

A caracterização dos componentes do aroma identificados nos cromatogramas encontram-se nas tabelas 4.21 a 4.24.

Comparando as figuras 4.6. e 4.7., observa-se que alguns dos compostos voláteis ficaram retidos no processo de ultrafiltração do extrato aquoso de cogumelo, o que sugere o uso de membrana de peso molecular de corte superior ao utilizado, reduzindo a perda de voláteis no retido.

A figura 4.8. representa o cromatograma da fração retido do tratamento do extrato por osmose inversa, portanto o cromatograma do extrato concentrado de aroma e sabor de cogumelo shiitake. Comparando esse cromatograma com o da figura 4.6., que representa o cromatograma do extrato aquoso de cogumelo shiitake, é confirmado que houve concentração dos princípios ativos responsáveis pelo aroma do produto, o que pode ser confirmado nas tabelas 4.17 e 4.19. A figura 4.9., cromatograma do extrato aquoso de cogumelo shiitake permeado na osmose inversa confirma que praticamente não houve perda de voláteis para a fase de permeado no processo de concentração por osmose inversa.

O processo de concentração provocou o surgimento do aroma de compostos sulfurados e alho, representativos do aroma de cogumelo Shiitake, confirmando as indicações de CHEN & HO (1986) e KERR (1985).

Figura 4.6.: Cromatograma do extrato aquoso de cogumelo shiitake.

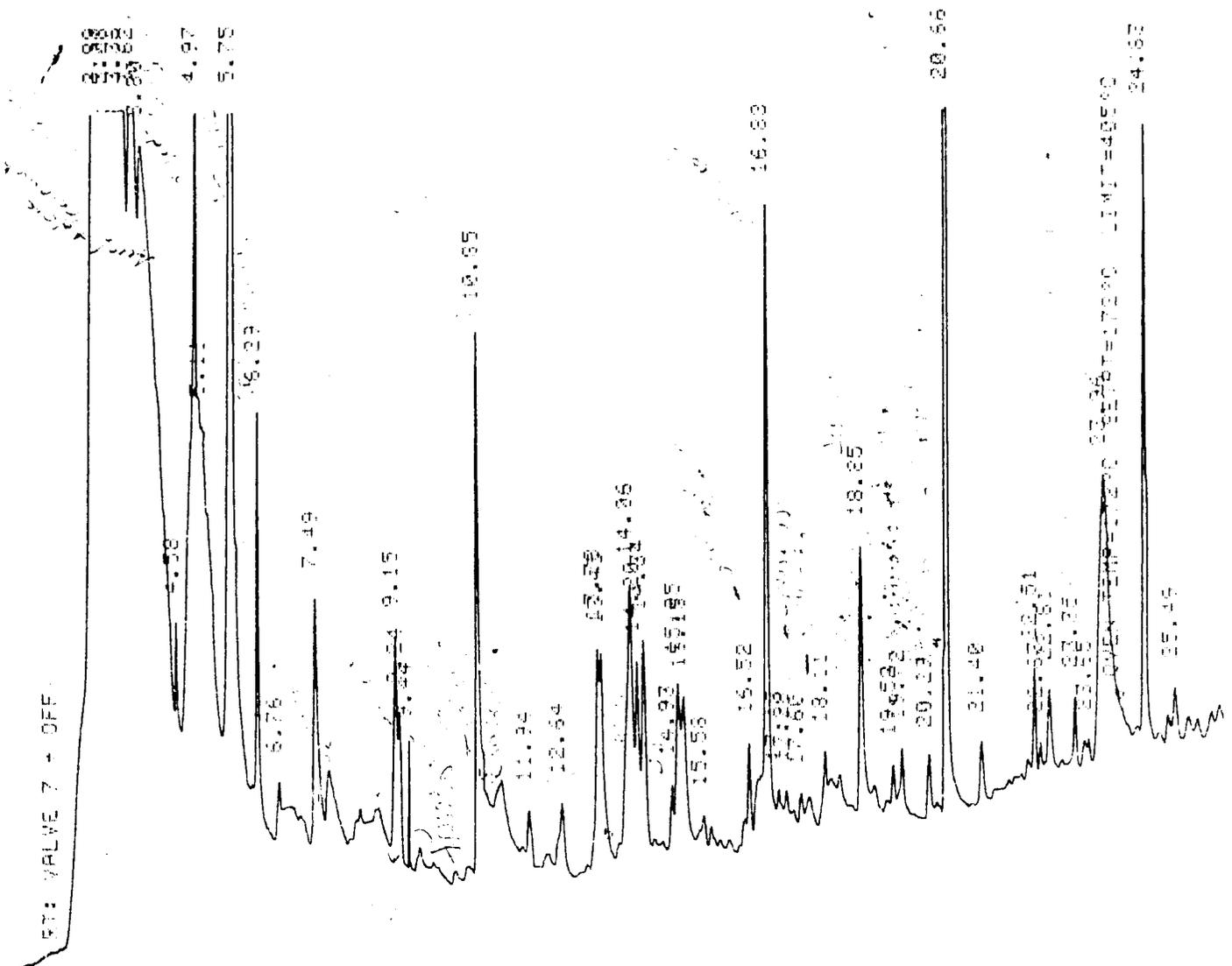


Figura 4.7.: Cromatograma do extrato aquoso de cogumelo shiitake permeado na ultrafiltração.

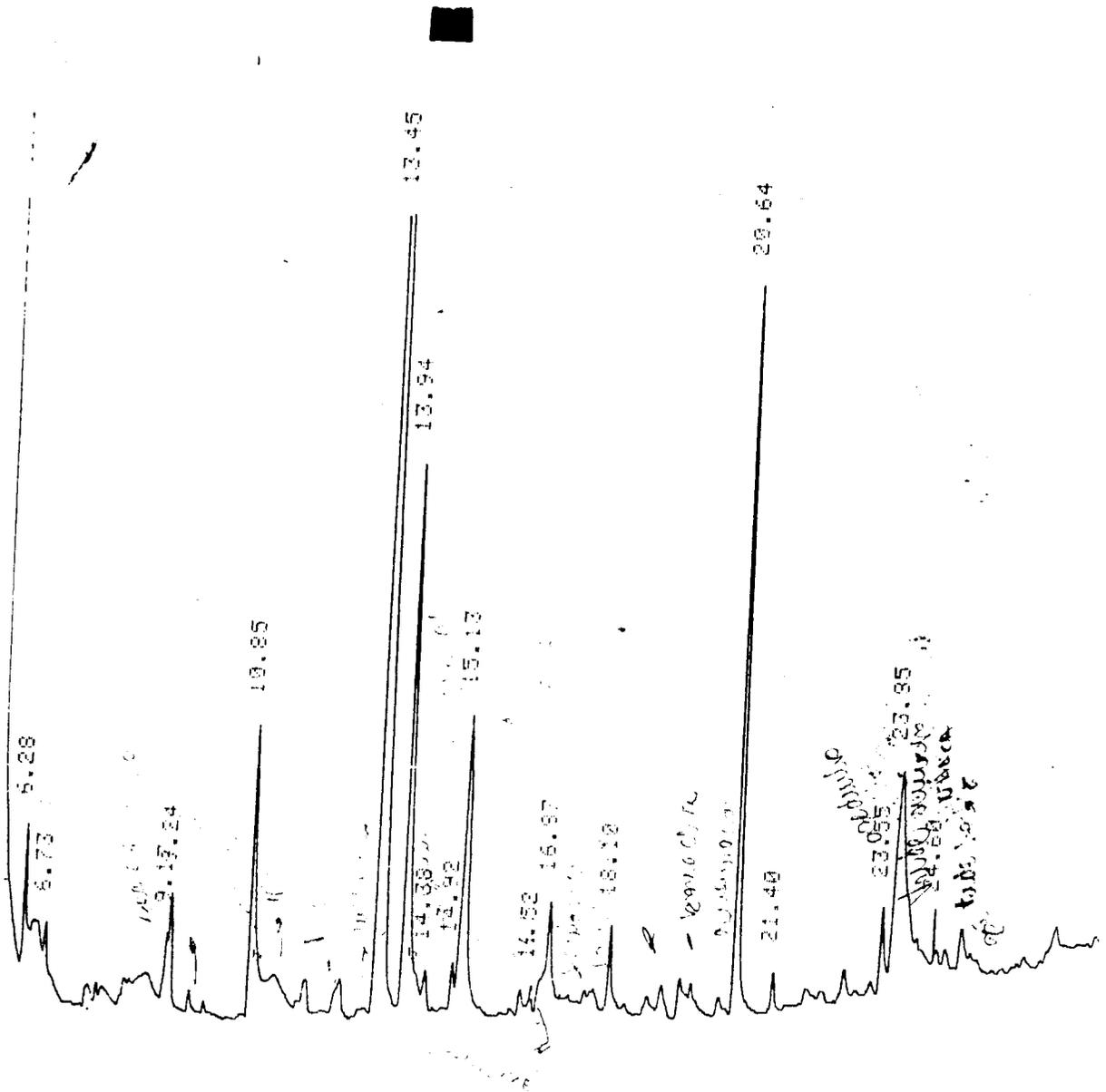




Figura 4.9.: Cromatograma do extrato aquoso de cogumelo shiitake permeado na osmose inversa.

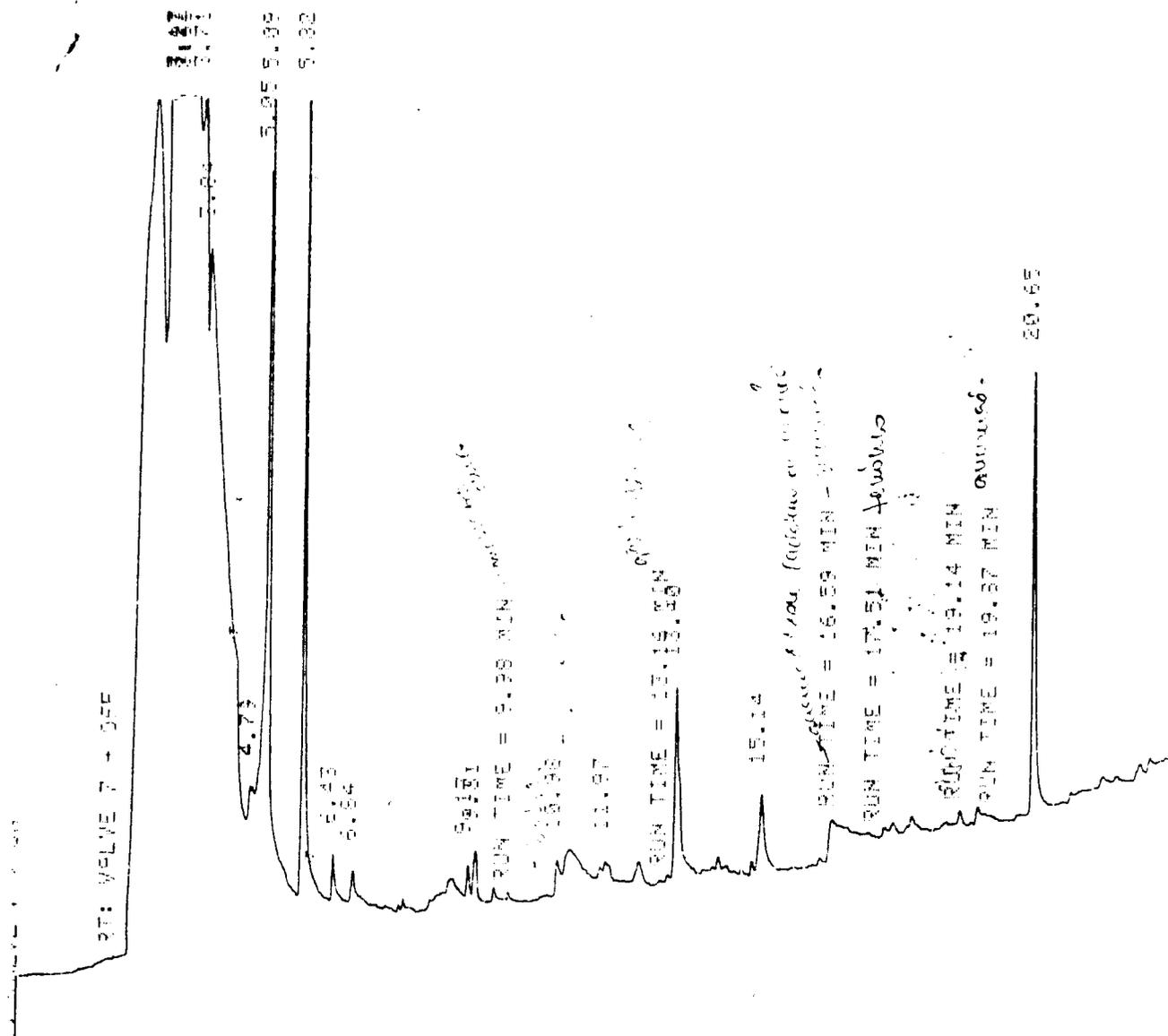


Tabela 4.17.: Valores do tempo de retenção, área e área % para extrato aquoso de cogumelo shiitake.

Tempo de Retenção	Área	Área %
2,88	83,75	5,307
3,08	30,00	19,391
3,36	11,40	0,722
3,62	24,93	1,580
3,80	20,84	1,321
4,58	3,55	0,225
4,97	35,82	2,270
5,11	1,23	0,078
5,75	224,71	14,240
6,29	17,63	1,117
6,76	2,42	0,153
7,49	25,85	1,638
9,15	15,96	1,011
9,24	11,50	0,729
9,44	1,10	0,070
10,85	51,13	3,240
11,94	4,39	0,278
12,64	3,11	0,197
13,38	16,59	1,051
13,45	20,49	1,299
14,06	36,63	2,321
14,20	17,21	1,091
14,34	19,21	1,217
14,93	2,25	0,142
15,05	10,76	0,682
15,15	14,02	0,889
15,58	1,24	0,078
16,52	4,77	0,303
16,88	44,00	2,788
17,13	0,96	0,061

---

17,28	1,00	0,063
17,60	1,69	0,0107
18,11	3,17	0,201
18,85	21,19	1,343
19,52	2,26	0,143
19,72	2,79	0,177
20,29	5,13	0,325
20,66	138,26	8,761
21,40	4,63	0,294
22,51	6,04	0,363
22,63	1,34	0,085
22,81	6,44	0,408
23,35	4,12	0,261
23,65	0,61	0,039
23,96	80,16	5,080
24,83	48,83	3,095
25,49	3,76	0,238
26,86	2,57	0,163

---

Tabela 4.18.: Valores do tempo de retenção, área e área % para extrato aquoso de cogumelo shiitake permeado na ultrafiltração.

Tempo de Retenção	Área	Área %
2,60	123,44	11,021
2,68	20,73	1,850
2,91	0,39	0,035
3,06	73,96	6,603
3,42	1,34	0,119
3,47	59,34	5,298
3,91	21,06	1,880
4,97	35,86	3,201
5,06	53,05	4,736
5,71	165,57	14,783
6,28	6,41	0,572
6,73	2,27	0,203
9,17	4,14	0,369
9,24	8,09	0,722
10,85	27,86	2,487
13,45	245,45	21,914
13,94	50,39	4,543
14,38	2,65	0,236
14,92	2,09	0,187
15,13	31,18	2,784
16,52	0,75	0,067
16,87	5,47	0,432
18,10	4,84	0,488
20,64	47,82	4,269
21,40	2,27	0,203
23,55	6,18	0,552
23,85	42,03	3,752
24,60	0,38	0,034
28,64	2,60	0,232

Tabela 4.19.: Valores do tempo de retenção, área e área % para extrato aquoso de cogumelo shiitake concentrado na osmose inversa.

Tempo de Retenção	Área	Área %
2,82	0,67	0,022
3,59	6,71	0,219
3,69	7,94	0,256
4,61	110,79	3,607
5,18	12,04	0,392
5,72	22,87	0,744
5,87	9,27	0,302
7,16	1,84	0,060
7,77	1,85	0,060
9,27	1,11	0,036
9,59	0,53	0,017
9,98	2,27	0,074
10,41	17,57	0,572
11,22	5,01	0,163
11,45	4,96	0,162
12,48	2,84	0,092
12,99	29,54	0,962
13,36	1201,94	39,129
13,80	2,41	0,079
13,91	50,57	1,646
14,20	11,39	0,371
14,75	1,93	0,063
14,88	2,53	0,082
15,04	35,31	1,150
15,68	4,05	0,132
15,78	5,69	0,185
16,27	32,34	1,053
16,36	8,68	0,282
16,44	9,40	0,306
16,57	2,97	0,097
16,84	31,53	1,027
17,26	3,28	0,107
17,54	3,34	0,109
17,69	7,87	0,256
18,11	24,32	0,792
18,76	31,85	1,037
19,11	1,03	0,034
19,49	13,76	0,448
19,63	4,29	0,140

20,20	1,43	0,046
20,30	1,00	0,032
20,59	76,51	2,491
21,11	4,23	0,138
21,36	16,59	0,540
22,50	1,16	0,038
22,61	1,54	0,050
22,76	3,330	0,108
23,32	0,91	0,030
23,72	1,32	0,043
24,81	26,80	0,872
25,19	3,77	0,123
25,48	11,09	0,361
25,96	2,16	0,070
26,51	1,34	0,044

Tabela 4.20.: Valores do tempo de retenção, área e área % para extrato aquoso de cogumelo shiitake permeado na osmose inversa.

Tempo de Retenção	Área	Área %
3,13	91,45	21,545
3,17	34,52	8,132
3,22	7,56	1,781
3,31	0,30	1,070
3,71	13,21	3,112
3,84	27,47	6,471
4,74	0,44	0,104
4,79	0,11	0,027
5,05	33,93	7,994
5,09	32,35	7,623
5,82	53,05	12,500
6,43	2,48	0,584
6,84	1,81	0,427
9,17	1,64	0,385
9,31	3,37	0,795
10,98	1,71	0,403
11,97	0,30	0,070
13,40	17,82	4,198
15,14	7,96	1,876
20,65	29,02	6,837

A seguir estão as tabelas de caracterização dos componentes do aroma.

Tabela 4.21.: Caracterização dos componentes do aroma do extrato aquoso de cogumelo Shiitake.

<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Aroma</b>
3:36 / 3:80	Sulfurado + caramelo (doce)
4:97	Azedo / sulfurado
5:75	Cloro
6:29	Cloro
7:49	Queimado
9:44	Mosto / azedo
10:85	Torrado / batata cozida
12:64	Sulfurado
13:43	Borracha queimada
14:34	Queimado
14:93	Borracha queimada
16:52	Açúcar queimado
16:88	Queimado
17:28 / 17:60	Fenólico
18:85	Fenólico
19:72	Borracha queimada
20:29	Sulfurado
20:66	Queimado
23:35	Frutal
23:96	Amargo / seco
24:93	Sulfurado

Tabela 4.22.: Caracterização dos componentes do aroma do extrato aquoso de cogumelo Shiitake permeado da ultrafiltração.

Tempo de Retenção	Aroma
2:60 / 3:06	Sulfurado
4:00	Marisia
5:80	Cloro
9:80	Mosto / azedo
10:85	Torrado
12:50	Doce
13:00	Metálico
14:92	Borracha
15:13	Floral
16:52	Açúcar queimado
16:87	Pó de café
18:10	Poereuto
19:50	Borracha
20:64	Queimado
23:50	Azedo
23:90	Amargo / seco

Tabela 4.23.: Caracterização dos componentes do aroma do extrato aquoso de cogumelo Shiitake concentrado na osmose inversa.

Tempo de Retenção	Aroma
2:82	Sulfurado / alho
3:69	Sulfurado
4:61	Sulfurado / alho
6:50	Alho
7:17	Alho
9:59	Floral / Poereuto
9:98	Mosto / azedo
12:48	Gás
16:57	Queimado / doce
16:84	Pó de café
17:54	Pó de café (fenólico)
19:49	Sulfurado / alho
20:30	Cola / Solvente
21:11	Gás

Tabela 4.24.: Caracterização dos componentes do aroma do extrato aquoso de cogumelo Shiitake permeado na osmose inversa.

Tempo de Retenção	Aroma
9:98	Mosto / massa pão crua
10:00	Batata cozida
10:98	Queimado
13:16	Metálico
16:59	Açúcar queimado
17:51	Fenólico
19:14	Doce
19:87	Queimado

#### 4.8. Avaliação Sensorial

Os resultados obtidos da avaliação sensorial estão apresentados em histogramas (figuras 4.10., 4.11. e 4.12.).

As médias ponderadas das respostas sensoriais para os dois atributos julgados, foram as seguintes:

- Macarrão tipo oriental:
  - Aroma: 7,12
  - Sabor: 7,87
  
- Creme de legumes:
  - Aroma: 7,06
  - Sabor: 7,16

- Creme de frango:
  - Aroma: 6,92
  - Sabor: 7,12

Figura 4.10.: Histograma de distribuição das respostas sensoriais, em escala hedônica de 9 pontos, para macarrão tipo oriental. A: aroma; B: sabor

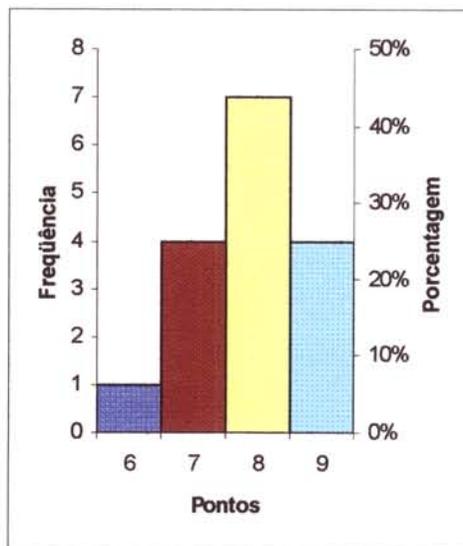
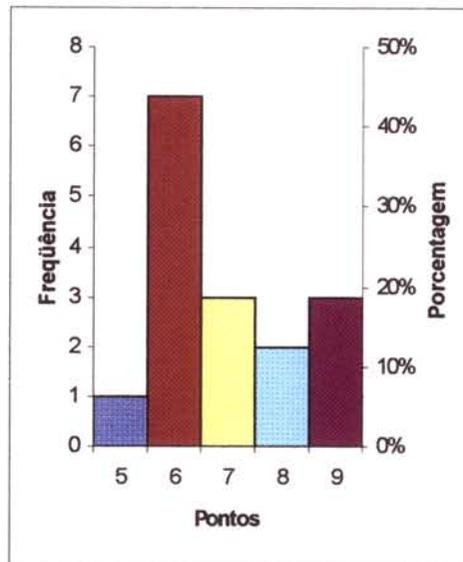


Figura 4.11.: Histograma de distribuição das respostas sensoriais, em escala hedônica de 9 pontos, para creme de legumes. A: aroma; B: sabor

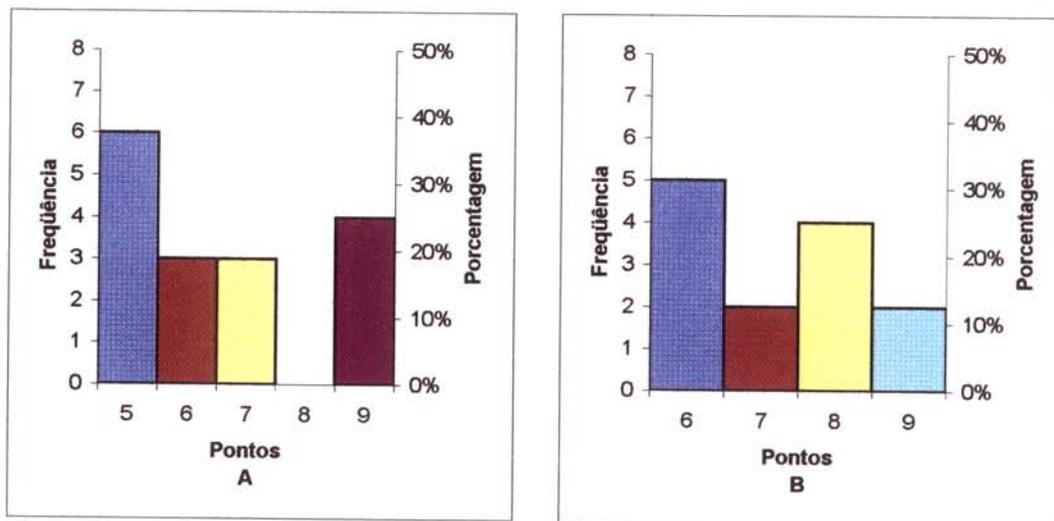
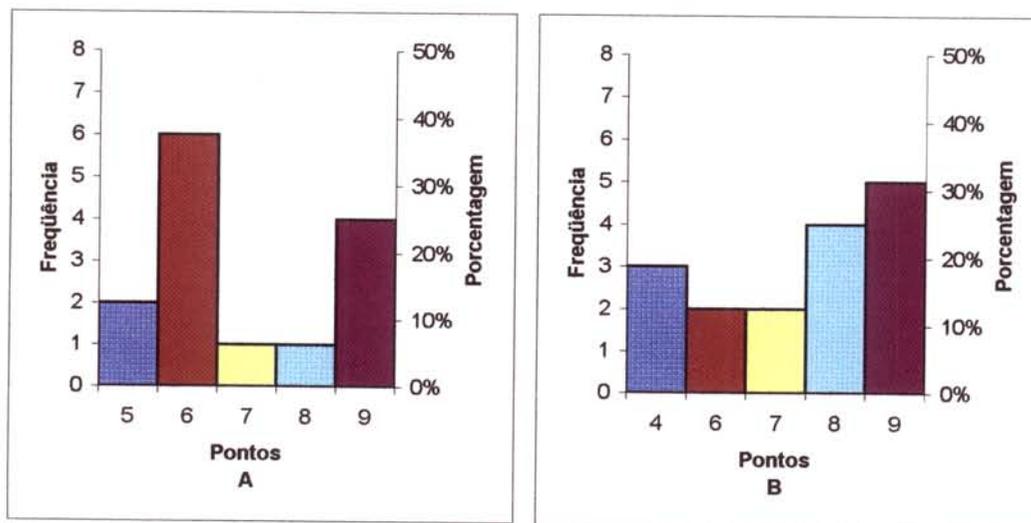


Figura 4.12.: Histograma de distribuição das respostas sensoriais, em escala hedônica de 9 pontos, para creme de frango. A: aroma; B: sabor



Percebe-se, pelos resultados, que os três produtos preparados com adição do concentrado de aroma e sabor de cogumelo shiitake tiveram boa aceitação geral, em relação aos dois atributos julgados.

## V. CONCLUSÕES

- Após cinco extrações, o experimento em contra corrente de dois estágios representou situação de equilíbrio obtido em sistemas contínuos de extração, o que pode ser comprovado pela semelhança entre os líquidos (L3) e (L5);
- Pelos rendimentos de extração apresentados nas tabelas de 4.1. a 4.7. pode-se concluir que as melhores condições de extração foram conseguidas quando se utilizou proporção solvente/cogumelo 2:1, temperatura de 27°C, e pH 7,0;
- O processo de ultrafiltração se mostrou eficiente na separação dos compostos de alto peso molecular acarretando pouca perda de compostos voláteis, o que pode ser confirmado comparando-se os cromatogramas das figuras 4.6. e 4.7.;
- Foi possível obter um concentrado de aroma e sabor de cogumelo shiitake, pelo processo de osmose inversa, de 10° Brix a partir do permeado da ultrafiltração, com 1,1° Brix, com perda mínima de voláteis conforme se vê no cromatograma do permeado da osmose inversa, figura 4.9.;
- O processo de concentração possibilitou a identificação de compostos voláteis sulfurados e alho no processo de cromatografia, não caracterizados nos demais produtos conforme mostram as tabelas de 4.21. a 4.24.;
- A avaliação sensorial dos três produtos preparados com a adição do concentrado de aroma e sabor de cogumelo shiitake tiveram boa aceitação geral em relação aos dois atributos julgados, obtendo as médias ponderadas para aroma de 6,92 para creme de frango a 7,12 para macarrão tipo oriental e as médias para sabor variando de 7,12 para creme de frango a 7,87 para macarrão tipo oriental;

- O trabalho alcançou o objetivo a que se propôs, já que, foi possível obter um concentrado de aroma e sabor de cogumelo shiitake com bom rendimento nos processos de extração e o mínimo de perda no processo de concentração, sendo bem aceito pela equipe provadora;
- Os resultados deste trabalho foram obtidos de experimentos laboratoriais, tentando-se vincular o desempenho de uma unidade industrial de extração, trabalhando em regime contínuo em contra corrente. As conclusões a cerca do processo de extração, estão fundamentadas nesta simulação, não tendo sido possível comprovar na prática por falta de infra estrutura industrial. Essa observação também se aplica aos processos de ultrafiltração e osmose inversa. Trabalho futuro poderá comprovar a viabilidade técnica e econômica do processo em unidade piloto de grande porte.

## VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACREE, T. E.; TERANISH, R.; Flavor Science, Sensible, Principles and Techniques: Professional Reference Book; American Chemical Society; Washington DC, 1993.
2. ANON. Reverse Osmosis for Juices. **Food Engineering International**, (5): 44-45, 1983
3. ANONIMO Membrane Separation Technology Offers Processors Unlimited Potential. **Food Technology**, 44 (9): 108 – 13, 1990.
4. AROMAS – IFF, 1996, 24p.
5. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (Washington, DC. USA). Official methods of analysis. 13.ed. Washington, 1980.
6. BAEK, H. H.; KIM, K. H.; KIM, D. M. Changes in Quality of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*) by Different Drying Methods **Korean J. Sci. Technol.** v. 21: 145-48, 1989.
7. BEATON, N. C. Ultrafiltration and Reverse Osmosis in the Dairy Industry – Na Introduction to Sanitary Conditions. **Journal Food Protection**, 42 (7): 584-590, 1979.
8. BELINKY, P.A.; MASAPHY, S.; LEVANON, D.; HADAR, Y.; DOSORETZ, C.; Effect of Medium composition on 1-octen-3-ol Formation in Submerged Cultures of *Pleurotus pulmonarius* **Applied Microbiology Biotechnology.** v. 40: 629-633, 1994.
9. BINKLEY, C.R.; WILEY, R.C. Continuous Diffusion-Extraction Method to Produce Apple Juice. **J. Food Sci.**, 43: 1019-1023, 1978.

10. BLANCH, G. P.; TABERA, J.; HERRAIZ, M.; REGLERO, G.; Simultaneous Distillation and Extraction. **Journal of Chromatography**, 628: 261-268, 1993.
11. BOLETIM INFORMATIVO DO GRUPO DE ESTUDOS "LUIZ DE QUEIROZ" – n 06, dezembro de 1996.
12. CHEN, C.-C.; HO, C.-T. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Cyclic Sulfur Compounds of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). Amsterdam. **Elsevier Science**, 1986. p.455-459.
13. CHEN, C.-C.; HO, C.-T. Identification of Sulfur Compounds of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). **J. Agrc. Food Chem.**, 34: 455-459, 1986.
14. CHEN, C.-C.; CHEN, S.D.; WU, C.-M. Effects of pH value on Formation of Voláteis of Shiitake (*Lentinus edodes*) an Edible Mushroom. **J.Agrc. Food Chem.**, 32: 999-1001, 1984.
15. CHEN, C.-C.; WU, C.-M. Volatile Components of Mushroom (*Agaricus subrufecens* ). **J. Food Sci.**, 49: 1208-1209, 1984
16. CHIANG, B.H.; CHU, C.L.; HWANG, L.S. Mushroom Blanch Water Concentration By Membrane Processes. **J. Food Sci.**, 51 (3): 608-613, 1986.
17. CHOU, F.; WILEY, R. C. SCHILIMME, D. V. Reverse Osmosis and Flavour in Apple Juice Concentration. **Journal of Food Science** 56 (2): 484-487, 1991.
18. CHUA, H. T.; RAO, M. A.; ACRRE, T. E.; CUNNINGHAM, D. G. Reverse Osmosis Concentration of Apple Juice: Flux and Flavor Retention by Cellulose Acetate and Polyamide **Membranes Journal os Food Process Engineering** 9: 231-245, 1987.
19. CORTES, H. C. **Journal of Chromatography**, 626: 3-23, 1992.

20. CRONIN, D. A.; & WARD, M.K.; The Characterization of Some Mushroom Volatiles. **J. Sci. Food Agric**, 22: 477-479, 1971.
21. DIJKSTRA, F.Y. & WIKEN, T.O. Studies on Mushroom Flavor - 1. Organoleptic Significance of Constituents of the Cultivated Mushroom *Agaricus bisporus*. **Lebensmittel - Untersuchung Und - Forschung**. 160: 255-262, 1976.
22. DIJKSTRA, F.Y. & WIKEN, T.O. Studies on Mushroom Flavor - 2..Flavor Componds in *Coprinus comatus* **Lebensmittel - Untersuchung Und - Forschung**. 160: 263-269, 1976
23. DOUSSE, R.; UGSTAD, E. Application of Solid-Liquid Extraction for the Production of Fruit Juice. **Lebensm. - Wiss. u. Technol.**, 8: 255, 1975
24. DZIEZAK, J.O. Membrane separation technology offers processes unlimited potential. **Food Technology**, 44 (9): 107-113, 1990.
25. GROSCH, W. **Flavor and Fragrance Journal**, 9: 147-158, 1994.
26. HADAR, Y.; DOSORETZ, C.G. Mushroom mycelium as a potential source of food flavour. **Trends in Food Sci. & Technology**, p.214-219, Sep. 1991.
27. HAGGIN, J. New Generation of Membranes Develop for Industrial Separation **Chem. Eng. News**, 66 (23): 7, 1988.
28. HERNANDEZ, E.; CHEN, C. S.; SHAW, P. E.; CARTER, R. D.; BARROS, S. Ultrafiltration of Orange Juice: Effect on Soluble Solids, Suspended Solids and Aroma. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** 40: 968-988, 1992.
29. HIATT, M. H. **Analytical Chemistry**, 66 (6): 905-908, 1994.
30. IWAMI, K.; YASUMOTO, K.; NAKAMURA, K. Properties of  $\gamma$ -glutamyltransferase from *Lentinus edodes*. **Agr. Biol. Chem.**, 39 (10): 1933-1940, 1975.

31. IWAMI, K.; YASUMOTO, K.; NAKAMURA, K. Properties of  $\gamma$ -glutamyltransferase from *Lentinus edodes*. **Agr. Biol. Chem.**, 39 (10): 1941-1946, 1975.
32. IWAMI, K.; YASUMOTO, K.; NAKAMURA, K. Properties of  $\gamma$ -glutamyltransferase from *Lentinus edodes*. **Agr. Biol. Chem.**, 39 (10): 1947-1955, 1975
33. IWAMI, K.; & YASUMOTO, K Chaotropic Ions in Action and Protection of  $\gamma$ -glutamyltransferase from Caps of Fruiting Bodies of *Lentinus edodes* **Agr. Biol. Chem.**, 46 (3): 761-765, 1982
34. IWAMI, K.; & YASUMOTO, K Substrate Preference of  $\gamma$ -glutamyltransferase from Caps of Fruiting Bodies of *Lentinus edodes* **Agr. Biol. Chem.**, 9: 2387-2388, 1982.
35. JARDINE, J.G. Redução da Viscosidade de Extrato de Café por Processo Enzimático Flavour. **Trends in Food Sci. & Technology**, p.214-219, Sep 1991 298p. Tese Doutorado.
36. JOHNSON, J. R.; BRADDOCK, R. J.; CHEN, C. S. Kinetics of Ascorbic Acid Loss and Nonenzymatic Browning in Orange juice Serum: Experimental Rate Constants. *Journal of Food Science* 60 (3): 502-505, 1995.
37. KAPLAN, N.O. *Methods in Enzymology*. **New York: Academic Press**, 1963. 6: p.819.
38. KERR, L.H.; WILEY, R.C.; SHEU, M.-J. Solid-Liquid Extraction of Mushroom Solids and Concentration by Reverse Osmosis. **J. Food Sci.**, 50: 1300-1305, 1985.
39. KESSLER, H. G. **Food Engineering and Dairy Technology** .,Freising Alemanha, Publishing House Ferlag <sup>a</sup> Kessler, 1981, 619p.
40. KÖSEOGLU, S. S. & LUSAS, E. W. Aqueous, Membrane and Adsorptive Separation of Vegetable Proteins. **Proceeding of the world congress on**

- vegetable protein utilization in human foods and animal feedstuffs.**  
**Conference Singapore**, october, 1985: 528-547,1989.
41. KÖSEOGLU, S. S.; LAWHON, J. T., LUSAS, E. W. Use of Membrane in Citrus Juice Processing **Food Technology** 44 (12): 90-97, 1990.
42. MALDONADO, J. **Membranas e Processos de Separação**. Instituto Nacional de Tecnologia. Maio 1991.
43. MATSURA, T.; BAXTER, A.G.; SOURIRAJAN, S. Studies on Reverse Osmosis for Concentration of Fruit Juices. **J. Food. Sci.**, 39: 704, 1974.
44. MAUBOIS, J. L. Ultrafiltration of Whey. **J. Soc. Dairy Technology**, 33 (2): 55 – 8, 1980.
45. MAUBOIS, J. L. New Application of Membrane Technology in Dairy Industry. **Austr. J. Dairy Techn.** 46 (2): 91-5, 1991.
46. MERSON, R.L.; MORGAN JUNIOR, A.I. Juice Concentration by Reverse Osmosis. **Food Technol.** 22: 631, 1968.
47. MEDINA, B. G. & GARCIA III, A. Concentration of Orange Juice by Reverse Osmosis. **Journal of Food Process Engineering** 10: 217-230, 1988.
48. MIZUNO, T.; SAKAI, T.; CHIHARA, G. Health Foods and Medicinal Usages of Mushrooms. **Food Reviews International**, 11 (1): 69 - 81. 1995.
49. MIZUNO, T. Shiitake *Lentinus edodes*: Functional Properties for Medicinal and Food Purpose, **Food Reviews International**, 11 (1): 111-128, 1995.
50. MOORE, S. On the Determination of Cystine as Cysteia Acial. **J. Biol Chem.**, 235-239, 1963.
51. MOORE, S.; STEIN, W.F. Chromatographic Determination of Aminoacids by the Use of Customatic Recording Equipment. In: COLOWICK, S.P.;

52. MOSANDL, A.; HEUSINGER, G.; GESSNER, M. Analytical and Sensory Differentiation of 1-octen-3-ol enantiomers. **J.Agrc. Food Chem.**, 34: 119-122, 1986.
53. MORITA, K. & KOBAYASHI, S.; Isolation, Structure, and Syntesis of Lenthionine and Its Analogs. **UCD** 581.19:582.287:547.279.4., 1967.
54. MORITA, K. & KOBAYASHI, S.; Isolation and Syntesis of Lenthionine an Odours Substance of Shiitake, an Edible Mushroom. **Tetrahedron Letter**. 6: 573-577, 1966.
55. MUSHROOM CONCENTRATE. **Food Processing** April, 1981.
56. NEUFELDET, V; GURALNIK, D. B.; Webstr'sNew World Dictionary, Simon & Schuster Inc. 3<sup>th</sup> edition, New York, 1988.
57. NOBREGA, R. Processos de Separação por Membranas – Workshop CTAA/EMBRAPA – Rio de Janeiro, dezembro de 1995.
58. PAULSON, D. J.; WILSON, R. L.; SPATZ, D. D. Crossflow Membrane Technology and its Applications. **Food Technology** (12): 77-87, 1984.
59. PEREIRA, I.M. Efeito do Uso de Polivinil-Polipirrolidona ( PVPP ) na Estabilidade de Vinhos Brancos. Campinas: UNICAMP: Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1995. 182p. Tese Doutorado.
60. PETRUS, J. C. C., Preparação, Modificação e Caracterização de membranas A Assimétricas Para Clarificação de Suco de Frutas: UNICAMP: Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1997. Tese Doutorado.
61. PICARDI, S.M.; ISSENBERG, P. Investigation of Some Volatile Constituents of Mushrooms (*Agaricus bisporus*): Changes Which Occur During Heating. **J. Agr. Food Chem.**, 21 (6): 959-962, 1973.
62. PYYSALO, H; Identification of Volatile Compounds in Seven Edible Fresh Mushroom. **Acta Chemica Scandinavia**, B (30): 235-244, 1976.

63. SCHEIER, P. **Chromatographic Studies of Biogenesis of Plant Volatiles**, v.1 Germany, 1984.
64. SHEU, F.; WILEY, R.C.; SCHLIMME, O.V. Reverse Osmosis and Flavor Retention in Apple Juice Concentration. **J. Food Sci.**, 56 (2): 484-487, 1991.
65. SHEU, M.J.; WILEY, R.C. Preconcentration of Apple Juice by Reverse Osmosis. **J.Food Sci.**, 48:422, 1983.
66. SHEU, M.J.; WILEY, R.C. Influence of Reverse Osmosis on Sugar Retention in Apple Juice Concentration. **J.Food Sci.**, 49: 304, 1984.
67. SILVA, F.T. Concentração de Suco de Laranja (*Citrus sinensis*) por Osmose Inversa. Campinas: UNICAMP: Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1995. Tese Mestrado.
68. SÍNTESE NATURAL LTDA. MICÉLIOS E ASSESSORIA EM COGUMELOS. Cultivo de Cogumelo (fungicultura). São Paulo, 1994.
69. STEFFEN, A.; PAWLISZYN, I. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44 (8): 2187-2193, 1996.
70. STONE, H.; SIDEL, J.; OLIVER, S.; WOOLSEY, A.; SINGLETON, R.C. Sensory Evaluation by Quantitative Descriptive Analysis. **Food Technology**, 28 (11):24,26,28,29,32,34, 1974.
71. SUN SHIITAKE - COGUMELOS NATURAIS Catálogo do Produtor.
72. SUTHERLAND, J. e FREE, M. J. A Method for Monitoring Leakage Through Membranes During Ultrafiltration of Milk. **Austr. J. Dairy Technol.** 46 (1): 40 - 2, 1991.
73. TANADA, P. S. Obtenção de Extrato de Banana (*Musa cavendishii*) Isento de Poli Fenol Oxidase Por Ultrafiltração e Concentrado por Osmose Inversa UNICAMP Faculdade de Engenharia de Alimentos 1996, Tese de Mestrado.

74. TRESSL, R.; BAHRI, D. & ENGEL, K. H.; Formation of Eight carbon and ten carbon in mushroom *Agaricus campestris* **J. Agrc. Food Chen** ; 30: 89-93, 1982.
75. VIOTTO, W. H. Ultrafiltração de Soro Doce de Queijo Minas Frescal: Efeito de pré tratamento do soro no desempenho da membrana e na composição e solubilidade do concentrado protéico de soro UNICAMP Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1991, Teses de Doutorado.
76. WADA, S.; NAKATAMI, H.; MORITA, K. A New Aroma-Bearing Substance from Shiitake, an Edible Mushroom. **Journal of Food Science** 32: 559-561, 1967.
77. WATANABE, K. A New Sawdust-Based Cultivation of Shiitake, *Lentinus edodes*, by Inhibition of Brown Mycelial Coats Formation. **Journal Antibact. Antifung. Agents**, 21 (12): 645-649, 1993.
78. WILEY, R.C.; LEE, Y.-N. Recovery of Betalaines from Red Beets by a Diffusion-Extraction Procedure. **J.Food Sci.**, 43: 1056-1058, 1978.
79. WOOD, D. Mushroom Biotechnology - **International Industrial Biotechnology**, Janeiro de 1989.
80. WILEY, R.C.; LEE, Y.-N.; SALADINI, J.J.; WYSS, R.C.; TOPALAIN, H.H. Efficiency Studies of a Continuous Diffusion Apparatus for the Recovery of Betalaines from the Red. Table Beet. **J. Food Sci.**, 44 (1):208-212, 1979.
81. WU, C.-M.; WU, J.P.L.; CHEN, C.-C.; CHOU, C.C. Flavor Recovery from Mushroom Blanching Water. In: THE QUALITY of Food and Beverage. **New York: Academic Press**, 1981. p.133.
82. ZANINI, J. M. Reaproveitamento de Água s de Lavagem das Lavadoras de Garrafas das Industrias de Bebidas. **Engarrafador Moderno** 36 (nov/dez): 8 - 13, 1994

## ANEXO

### FICHA PARA ANÁLISE DE ACEITAÇÃO ESCALA HEDÔNICA)

Por favor, prove a amostra. Classifique-a de acordo com a escala abaixo, segundo cada um dos atributos indicados (sabor e aroma):

1. Desgostei extremamente
2. Desgostei muito
3. Desgostei moderadamente
4. Desgostei ligeiramente
5. Não gostei nem desgostei
6. Gostei ligeiramente
7. Gostei moderadamente
8. Gostei muito
9. Gostei extremamente

( ) AROMA      ( ) SABOR

Observações: