

**URI – CAMPUS DE ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**SÍNTESE DO 2,4 DIMETIL-2 NAFTIL-1,3 DIOXOLANE EMPREGANDO  
CATALISADORES HETEROGÊNEOS EM SISTEMA DE ULTRASSOM LIVRE  
DE SOLVENTE**

**ÁLVARO LUÍS MALVESTI**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

**ERECHIM, RS – BRASIL**

**JUNHO DE 2011**

**SÍNTESE DO 2,4 DIMETIL-2 NAFTIL-1,3 DIOXOLANE EMPREGANDO CATALISADORES HETEROGÊNEOS EM SISTEMA DE ULTRASSOM LIVRE DE SOLVENTE**

**ÁLVARO LUÍS MALVESTI**

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Sibele Berenice Castellã Pergher, D. Sc.

Orientadora

---

José Vladimir de Oliveira, D. Sc.

Orientador

---

Rogério Marcos Dallago, D. Sc.

Orientador

---

Marco Di Luccio, D. Sc.

URI-Campus de Erechim

---

Gean Delise Leal Pasquali Vargas, D.Sc.

UFFS

Erechim, junho de 2011

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

Dedico este trabalho:

Ao meu pai Luiz Alberto Malvesti e minha mãe Vanilse Malvesti, viga mestre da minha família, que sempre estiveram ao meu lado, dedicando carinho, atenção e incentivando para a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nas horas difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas minhas necessidades;

Aos meus pais, Luiz Alberto Malvesti e Vanilse Malvesti, que pela convivência, me permitiu os primeiros ensinamentos, formação, aprendizado e crescimento, sempre apoiando dia a dia para que mais esta etapa se concretizasse e que nunca mediram esforços para que meus sonhos pudessem se realizar, que sempre estiveram e não tenho dúvidas que sempre estarão do meu lado me apoiando em minhas decisões, incentivando, encorajando, me dando força, carinho e o amor incondicional a vocês meus pais, muito obrigado;

Aos meus Orientadores, José Vladimir de Oliveira, Sibebe Berenice Castellã Pergher e Rogério Dallago, pelo incentivo, apoio, esforço, atenção e tempo dedicado à orientação, competência, paciência e por seus conhecimentos compartilhados;

Ao professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, pelos ensinamentos e bons momentos compartilhados;

Aos colegas de mestrado e do laboratório - Laqam, pela convivência, amizade e bons momentos vividos juntos, em especial a Camile Prigol, pelo apoio e ajuda prestada e também pelo tempo disponibilizado em me auxiliar nos experimentos;

A Daiane Boschetto (Daia), pela amizade, incentivo, apoio e ajuda, que contribuiu muito na realização deste trabalho;

Ao meu irmão, Allan Malvesti, pelo incentivo e apoio e por sempre estar ao meu lado;

A todos meus amigos, mas que não citarei nome a fim de não esquecer nenhum, alguns mesmos que distantes, mas que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda”.

(Confúcio)

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos parciais necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**SÍNTESE DO 2,4 DIMETIL-2 NAFTIL-1,3 DIOXOLANE EMPREGANDO CATALISADORES HETEROGÊNEOS EM SISTEMA DE ULTRASSOM LIVRE DE SOLVENTE**

ALVARO LUÍS MALVESTI

Orientadores: José Vladimir de Oliveira  
Rogério Marcos Dallago  
Sibele Berenice Castellã Pergher

O acetal metil naftil cetona, é um composto com aroma de flor de laranjeira, que caracteriza-se economicamente pelo seu elevado valor agregado. Ele é obtido comercialmente mediante a acetalização do metil naftil cetona com propilenoglicol, na presença de solvente e catalisado por ácidos fortes como o ácido p-toluenosulfônico, características que inviabilizam seu emprego (principalmente pelo fato de empregar solventes orgânicos durante sua síntese), na elaboração de determinados produtos. Visando contornar os problemas vinculados à catalise homogênea, mencionados anteriormente, além de evitar a utilização de solventes, característica desaconselhável em se tratando de aromas alimentícios, neste estudo foram avaliados três catalisadores heterogêneos (um biológico - a enzima Novozym 435, e duas argilas KSF e K10) para a síntese do acetal metil naftil cetona, a qual foi conduzida ultrasonicamente, na ausência de solvente. A síntese do 2,4-dimetil-2-naftil-1,3 dioxolane foi conduzida empregando 0,029 mols (5 g) de metilnaftilcetona e 0,058 mols (4,41 g) de 1,2 propanodiol e 10% em massa (0,94 g) dos três catalisadores. Foram avaliadas as variáveis agitação mecânica (sem e com (240 rpm)) e tempo reacional (2, 6 e 12 h). Para cada tempo reacional foi conduzido um ensaio independente. A atividade reacional foi acompanhada em função da quantidade de reagente limitante consumido (metilnaftilcetona) e a para a seletividade considerou-se a presença de outros sinais nos cromatogramas. Dos três catalisadores avaliados, a enzima não apresentou atividade catalítica para a reação proposta. As argilas KSF e K10 apresentaram para a atividade e seletividade uma mesma tendência. Observa-se um aumento na atividade com tempo reacional e com a existência de agitação mecânica. Dentre as argilas a K10, independente da condição empregada, foi a que apresentou maior rendimento reacional, apresentando para 12 horas uma conversão de aproximadamente 18%. Esta tendência foi vinculada a sua elevada área superficial (224,5 m<sup>2</sup>/g), a qual é aproximadamente 18 vezes superior à da montmorillonita KSF (12,4 m<sup>2</sup>/g).

Além disto a argila K10 apresenta maior diâmetro de poro (54,3 Å) em relação à argila KSF (26,6 Å). Argilas com tamanho de poro reduzidos apresentam maiores limitações difusionais e com isso menor rendimento reacional. Em termos de seletividade, para todas as condições avaliadas, os cromatogramas apresentaram um único sinal a mais que os dois referentes aos reagentes, demonstrando a seletividade do processo.

**2,4 DIMETHYL-2 NAPHTHYL-1,3 DIOXOLANE SYNTHESIS BY  
HETEROGENEOUS CATALYSIS ON ULTRASOUND SOLVENT-FREE SYSTEM**

ÁLVARO LUÍS MALVESTI

Advisors: José Vladimir de Oliveira  
Rogério Marcos Dallago  
Sibele Berenice Castellã Pergher

In this work, the synthesis of 2,4-dimethyl-2-naphthyl-1,3-dioxolane, a compound with blossom orange scent, has been successfully carried out by acetalization reaction between methyl naphthyl ketone and propylene glycol using different heterogeneous solid catalysts. Such compound imitates the blossom orange flavor, a high-value product in the food industry and has been traditionally obtained using strong acid catalysts, which make its usage not viable for food purposes. In this context, three catalysts were employed in this work: a biological one, Novozym 435 enzyme, and two clays, KSF and K10, on ultrasound solvent-free system. The agitation speed (without and 240 rpm) and reaction time (2, 6 and 12 h) were employed for the reactions. The reaction activity was evaluated in terms of limiting reactant consumed (2-methyl-2-naphthyl-4-methyl-1,3-dioxolane methyl naphthyl ketone) and for the reaction selectivity it was considered the other chromatographic signals. It was experimentally verified that the enzyme did not present catalytic activity. The clays used, KSF and K10, presented similar reaction activity and selectivity. It was observed an increase in the catalyst activity with time evolved and mechanical agitation. K10, independently of the reaction conditions presented the best performance, leading to approximately 18% yield after 12 h reaction. This result was attributed to its superficial area ( $224.5 \text{ m}^2/\text{g}$ ), around 18 times greater montmorillonite KSF ( $12.4 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Besides, K10 presents a greater average pore diameter ( $54.3 \text{ \AA}$ ) compared to KSF ( $26.6 \text{ \AA}$ ), which may improve mass transfer between reagents and products.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	- 1 -
1.2 OBJETIVO GERAL.....	- 2 -
1.2.1 Objetivos específicos.....	- 2 -
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	- 3 -
2.1 ADITIVOS ALIMENTARES.....	- 3 -
2.1.1 Aromas.....	- 3 -
2.1.2 Classificação.....	- 5 -
Aromas Naturais.....	- 5 -
Aromas Sintéticos.....	- 5 -
2.1.3 Considerações Gerais.....	- 6 -
2.2 ULTRASSOM.....	- 8 -
2.2.1 Aplicações.....	- 15 -
2.2.2 Reações Orgânicas assistidas por Ultrassom.....	- 17 -
2.3 REAÇÃO DE ACETALIZAÇÃO.....	- 20 -
2.4 ENZIMA (LIPASES).....	- 22 -
2.5 ARGILAS KSF E K10.....	- 24 -
2.6 CARACTERIZAÇÃO DOS CATALISADORES.....	- 28 -
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	- 30 -
3.1 MATERIAIS.....	- 30 -
3.1.1 Catalisadores.....	- 30 -
3.2 MÉTODOS.....	- 31 -
3.2.1 Caracterização dos catalisadores.....	- 31 -
Difração de Raio X.....	- 32 -
Análise Textural por Adsorção de Nitrogênio.....	- 32 -
3.3 ENSAIO DE ACETILAÇÃO.....	- 32 -

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	- 35 -
4.1 Caracterização das Argilas.....	- 35 -
4.2 Síntese.....	- 37 -
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	- 42 -
5.1 Conclusões.....	- 42 -
5.2 Sugestões.....	- 43 -
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 44 -

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Região de frequência do som.....	- 10 -
Figura 2: Banho de ultrassom e transdutor.....	- 12 -
Figura 3: Reação de formação do 2-metil – 2-naftil – 4-metil, 1-3dioxolane 1 .....	- 21 -
Figura 4: Estrutura idealizada de uma Esmeclita (2:1). ○ - Átomos de Oxigênio; ● - Grupos –OH; • - Átomo de Silício e ° - Átomo de Alumínio.....	- 26 -
Figura 5: Difratoograma de raios-X das argilas comerciais KSF e K-10.....	- 35 -
Figura 6: Micrografia da argila montmorillonita comercial KSF.....	- 37 -
Figura 7: Cromatogramas referentes ao: (a) ensaio em branco, (b) ensaio enzimático e (c) ensaio com K10.....	- 38 -
Figura 8: Rendimento reacional.....	- 39 -
Figura 9: Evolução da área do sinal do 2,4 metil-2naftil-1,3 dioxolane para os catalisadores (a) KSF e (b) K10.....	- 40 -

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aplicação das ondas sonoras de alta potência.....	- 11 -
Tabela 2: Comparação do rendimento e de velocidade de reação de hidrólise de éster, para os métodos de obtenção sob refluxo e sob ultrassom.....	- 18 -
Tabela 3: Características físico-químicas de algumas argilas montmorillonitas comerciais (WOODS, 1977).....	- 27 -
Tabela 4: Análise química de algumas argilas montmorillonitas comerciais (WOODS, 1977).....	- 27 -
Tabela 5: Propriedades dos reagentes utilizados neste trabalho.....	- 30 -
Tabela 6: Condições cromatográficas de análise.....	- 33 -
Tabela 7: Área específica das argilas comerciais KSF e K-10.....	- 36 -

## 1. INTRODUÇÃO

A fabricação e o preparo de alimentos têm se modificado muito ao longo dos anos, particularmente nas últimas três décadas. No passado, os alimentos provinham da região onde eram produzidos ou de regiões muito próximas. Atualmente muitos alimentos provenientes de regiões longínquas necessitam frequentemente de aditivos para manter a sua qualidade. Além disso, a variedade e a apresentação dos alimentos são preocupações constantes das indústrias alimentícias. Estes fatores têm motivado as indústrias de alimentos a utilizarem agentes químicos para conservar, colorir ou aromatizar os alimentos, com o objetivo de atrair cada vez mais os consumidores (ANTUNES e ARAÚJO, 2000).

Neste contexto, destacam-se os aromas, os quais são os principais responsáveis pelas características sensoriais dos produtos, estando diretamente relacionadas à aceitação pelo consumidor. Os aromas podem ser naturais ou sintéticos.

Dentre os sintéticos, o acetal metil naftil cetona, um composto do aroma de flor de laranjeira, que caracteriza-se economicamente pelo seu elevado valor agregado, pode ser obtido mediante a acetalização do metil naftil cetona com propilenoglicol. No entanto, o processo comercial é conduzido na presença de solvente e catalisado por ácidos fortes como o ácido p-toluenosulfônico, características que inviabilizam seu emprego (principalmente pelo fato de empregar solventes orgânicos durante sua síntese), na elaboração de determinados produtos.

Visando contornar os problemas vinculados à catalise homogênea, mencionados anteriormente, além de evitar a utilização de solventes, característica desaconselhável em se tratando de aromas alimentícios, neste estudo foram avaliados três catalisadores heterogêneos (um biológico - a

enzima Novozym 435, e duas argilas KSF e K10) para a síntese do acetal metil naftil cetona, a qual foi conduzida ultrasonicamente, na ausência de solvente.

## **1.2 OBJETIVO GERAL**

Sintetizar o composto acetato metil naftil cetona empregando a catálise heterogênea, em meio isento de solvente, promovido com ultrassom.

## **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a atividade catalítica da enzima Novozym-435;
- Avaliar a atividade das argilas KSF e K10;
- Avaliar as influências do tempo reacional e da agitação na atividade catalítica;
- Avaliar o efeito do ultrassom.

A estrutura deste trabalho está organizada em seis capítulos, tratando o primeiro da contextualização do assunto e exposição dos objetivos do trabalho. O Capítulo 2 é destinado à fundamentação teórica, onde são abordados aspectos apresentados na literatura, relevantes ao desenvolvimento deste trabalho. No Capítulo 3 são apresentados a descrição dos materiais e métodos experimentais utilizados. Os resultados experimentais obtidos foram reportados e discutidos no capítulo 4. No Capítulo 5 expõe as conclusões obtidas e sugestões para trabalhos futuros e, por fim, as referências bibliográficas, apresentadas no capítulo 6.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 ADITIVOS ALIMENTARES**

Segundo Helvio Tadeu Collino, presidente da Associação Brasileira de Indústria e Comércio de Ingredientes e Aditivos para Alimentos (Abiam), o Mercado brasileiro de ingredientes e aditivos fatura anualmente entre R\$ 1,5 bilhão e R\$ 2 bilhões. Os aromas correspondem por cerca de 50% desse faturamento e o restante agrega todos os outros ingredientes e aditivos. Ainda, de acordo com Airton Vialta, vice-diretor do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital) “Uma tendência atual, são os alimentos semi-prontos, chamados “do freezer ao forno”, uma vez que se deseja cada vez mais reduzir o tempo gasto com o preparo de refeições” (GOUVEIA, 2006).

Existem várias razões pelas quais se consomem alimentos e, certamente, uma delas vem a ser a obtenção de nutrientes para a manutenção da saúde. No entanto, numa sociedade em que o consumo de alimentos é abastecido por uma grande variedade de produtos industrializados, a escolha pela sensação de prazer proporcionada vem crescendo em importância (CHIAPPINI, 2007). “É aí que entram os insumos da indústria química de ingredientes, com destaque para a indústria de aromas”, diz Vialta (GOUVEIA, 2006).

#### **2.1.1 Aromas**

Os aromas são aditivos que constituem um dos mais importantes atributos das indústrias de alimentos, bebidas e cosméticos. Em alimentos, os aromatizantes possuem especial importância por conferirem propriedades organolépticas que caracterizam o sabor e o aroma dos produtos. O processamento ou armazenamento de alguns alimentos, principalmente os

enlatados e congelados, podem ocasionar alteração de algumas características organolépticas, sendo necessária a adição de substâncias químicas para tornar o produto mais atrativo e despertar o interesse do consumidor (MARIOTTO, 2007).

Os aromas alimentares consistem numa preparação concentrada de substâncias aromáticas, as quais são adicionadas a produtos alimentícios para lhes conferir ou intensificar o odor ou mesmo sabor (LUERCE, 2002).

Segundo a legislação brasileira, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999), “aromatizante são substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e ou sabor dos alimentos”. Excluem-se desta definição:

- substâncias que conferem exclusivamente sabor doce, salgado ou ácido;
- substâncias e produtos alimentícios com propriedades odoríferas e ou sápidas consumidas sem transformação, com ou sem reconstituição;
- matérias de origem vegetal ou animal que possuam propriedades aromatizantes intrínsecas, quando não sejam utilizadas exclusivamente como fonte de aromas.

A definição de aroma e fragrância são distintas, mesmo que sejam compostos orgânicos de odores geralmente agradáveis. A diferença entre eles é conceitual, e refere-se à aplicação: *aromas* são de uma forma geral empregados em alimentos e bebidas, enquanto *fragrâncias* são usadas em perfumes e cosméticos (MARIOTTO, 2007).

## **2.1.2 Classificação**

Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999) os aromatizantes/aromas são classificados como naturais e sintéticos.

### **2.1.2.1 Aromas naturais**

São obtidos exclusivamente por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas aromatizantes/aromas naturais. Entende-se por aromatizantes/aromas naturais os produtos de origem animal ou vegetal, aceitáveis para consumo humano, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado como torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento, enzimático ou outros (ANVISA, 1999).

### **2.1.2.2 Aromas sintéticos**

São os compostos quimicamente definidos obtidos por processo químicos, compreendendo os aromatizantes idênticos aos naturais e os aromatizantes artificiais. (ANVISA, 1999).

- *aromatizantes idênticos aos naturais*: são substâncias quimicamente definidas, obtidas por síntese e aquelas isoladas por processos químicos a partir de matérias-primas de origem animal vegetal ou microbiana, que apresentam uma estrutura química idêntica à das substâncias presentes nas referidas matérias primas naturais processadas ou não.

- *aromatizantes artificiais*: são compostos químicos obtidos por síntese, que ainda não tenham sido identificados em produtos de origem animal vegetal ou microbiana utilizados por suas propriedades aromáticas, em seu estado primário ou preparados para o consumo humano.

### **2.1.3 Considerações gerais**

A aceitação dos produtos alimentícios pelo consumidor depende de sua qualidade. Particularmente o aroma está entre os principais atributos que determinam a escolha e o consumo. Historicamente, gregos e romanos perfumavam seus vinhos com rosas, violetas, ervas e condimento exóticos trazidos da China, Índia e Egito pelos mercadores venezianos. Na Europa, esses ingredientes foram também adicionados aos alimentos para torná-los mais palatáveis. No século XIX, os avanços na química orgânica tornaram possíveis a síntese de importantes substâncias aromatizantes, como a vanilina e a cumarina, contribuindo assim na popularização de suas adições aos produtos alimentícios (CHIAPPINI, 2008).

Os alimentos são consumidos principalmente pela sua aparência e textura, sendo que os aromas apresentam também uma importância especial. A sensação do gosto é atribuída à presença de compostos não voláteis nos alimentos (tais como açúcares, sais, ácidos), conferindo os quatro gostos básicos como: doce, salgado, ácido e amargo.

A sensação do aroma é bem mais complexa, pois o olfato humano pode discriminar milhares de compostos voláteis, sendo que estes são responsáveis pelo sabor característicos dos alimentos. Os compostos voláteis que chegam ao bulbo olfativo pela cavidade retro-nasal são os responsáveis pela percepção do aroma. No aroma existem compostos de impacto e compostos contribuintes. Os de impacto correspondem à maior porcentagem de compostos que perfazem o aroma característico do alimento (SIMÕES et al, 2009).

Pesquisas relacionadas à identificação de compostos voláteis nos alimentos compreendiam umas poucas centenas de constituintes. Com o avanço tecnológico e modernos instrumentos de análise, particularmente a cromatográfica gasosa acoplada à espectrometria de massas, o número de compostos identificados aumentou significativamente. Uma compilação recente apontou mais de 10.000 compostos identificados (MARIOTTO, 2007).

Na maioria das vezes, os compostos aromatizantes estão presentes em “traços” em sistemas heterogêneos, dificultando o seu isolamento e identificação. Os ésteres se destacam entre os compostos mais importantes na indústria de aromas de alimentos. Entretanto, vários são os compostos químicos responsáveis pelos aromas característicos e, apresentam diferentes funções químicas e grupos reativos como: álcoois, ácidos, ésteres, cetonas, lactonas, aldeídos, pirazinas, terpenos, compostos sulfurados, pironas e furanos (SIMÕES et al, 2009).

O aroma característico de cada produto é resultado da combinação de dezenas de substâncias voláteis, das mais diversas classes de compostos químicos e com propriedades físico-químicas diferentes. Nenhum constituinte individual é totalmente responsável pelo aroma característico de um alimento. Em alguns produtos existem um ou mais componentes que, sozinhos, lembram a qualidade característica de seu aroma (ARAGÃO, et. al., 2009).

Devido aos receptores olfativos específicos, os compostos moleculares de aromas podem ser percebidos em concentrações extremamente baixas, e diferenças significativas de limiar de detecção (“Threshold”) são observadas. Os valores de concentração de “Threshold” podem variar de um fator de  $10^6$  a  $10^7$ , dependendo da molécula. Portanto, os aromas são utilizados em concentrações totalmente diferentes, visando à necessidade de produção em escala, variando de poucos quilogramas a várias toneladas por ano. Outra característica importante dos compostos moleculares utilizados como aromas é o seu tamanho, geralmente muito pequenas, com massa molecular em torno de 200. Massas moleculares maiores de 300 são exceções (MARIOTTO, 2007).

Durante a segunda guerra mundial, pesquisas intensas foram efetuadas para o desenvolvimento da produção fermentativa do 2,3-butanodiol, visando sua utilização na manufatura da borracha e certos solventes. No entanto, com o rápido desenvolvimento da indústria petroquímica por volta de 1950, os processos fermentativos foram completamente substituídos (LUERCE, 2002).

Apesar de a maioria dos compostos de aromas utilizados no mundo (aproximadamente 80%) fazerem uso de processos químicos para sua obtenção (JUNIOR e PASTORE, 2007), observa-se uma nova tendência em países desenvolvidos, como Alemanha, onde 70% de todos os compostos de aromas utilizados em alimentos são “naturais”.

Na conversão de matérias primas em produtos finais alimentícios, três fatores devem ser levados em conta: viabilidade econômica, segurança e aceitabilidade. O aroma bem como a cor e a textura, desempenham um papel importante na aceitabilidade. Portanto, a conversão de precursores em compostos de aroma não é somente de importância científica, mas também é de interesse para a indústria de produtos alimentícios em geral (ARAGÃO, et. al., 2009).

## **2.2. ULTRASSOM**

O uso de ultrassom vem ampliando uma margem de novas pesquisas do ponto de vista industrial e acadêmica.

A utilização do ultrassom em tecnologia de alimentos tem diversas aplicações, tais como a estimulação de atividade enzimática, processos de extração, processamento de produtos cárneos, cristalização e congelamento, preparação de emulsão e suspensão, filtração e secagem. Também observa-se sua aplicação em outras áreas, como na degradação de polímeros, limpezas de materiais e preparação de catalisadores.

Em reações de síntese orgânica o uso do ultrassom desempenha um papel importante, reduzindo o tempo de reação e a quantidade de reagentes, aumento do rendimento e seletividade.

A descoberta do ultrassom ocorreu em 1880 por Curie enquanto estudava o efeito piezométrico. Quatorze anos depois Thornycroft e Barnaby observaram que na propulsão de mísseis, uma fonte de vibração era gerada, causando a implosão de bolhas e ou cavidades na água. Este fenômeno ficou conhecido como cavitação.

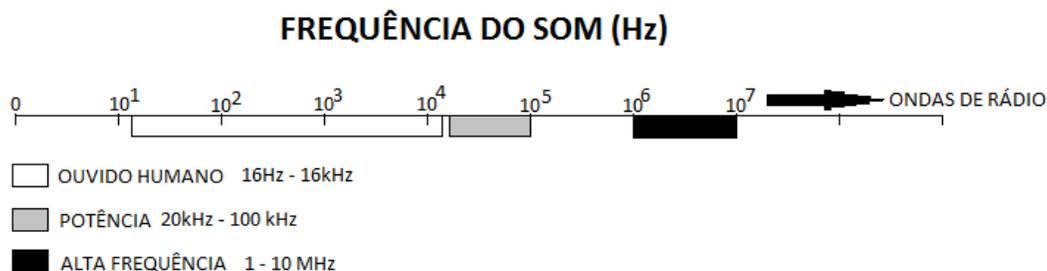
Lavegin, em 1912, desenvolveu o SONAR (*Sound Navigation and Ranging*), um aparelho capaz de medir a profundidade do mar. Em 1917, Lord Rayleigh, demonstrou que no lançamento de mísseis, a vibração é gerada devido à turbulência, calor e a pressão das cavidades implodindo. Contudo em 1927 o químico Alfredo Loomis reconheceu o efeito anômalo de ondas sonoras intensas se propagando pelo líquido, fenômeno este denominado de efeito sonoquímico (MARTINES et al, 2000).

Os estudos considerados pioneiros na caracterização dos efeitos químicos do ultra-som foram realizados na década de 1950, onde foram comercializados os primeiros aparelhos geradores de ondas ultra-sonoras. No entanto, somente a partir de 1980 a tecnologia sonoquímica desenvolveu-se intensamente e muitos trabalhos empregando diferentes sistemas foram publicados (TRINDADE, 2006).

No uso de ultra-som, transformações químicas e físicas podem ocorrer devido à interação da radiação com a matéria, (MARTINES et al, 2000).

Conforme estudos de sonoquímica evoluíam, percebeu-se que os efeitos notáveis do colapso da cavitação podem ser divididos em efeitos químicos e efeitos mecânicos. Portanto, quando pesquisadores começaram a estudar uma série de diferentes frequências na escala de 20 kHz a 1MHz, logo ficou claro que a escolha da frequência do ultrassom é muito importante em termos físicos e químicos (MASON et. al., 2010).

Para entender melhor, a sensibilidade do ouvido humano está na faixa de 16 Hz – 16 kHz, a frequência característica de ultra-som em geral, está no intervalo de 16 kHz à 1 MHz. A frequência de 1 - 10 MHz correspondem a região de alta frequência, conforme Figura 1.



**Figura 1** – Região de frequência do som

Portanto, a região do ultrassom basicamente pode ser dividida em alta potência e baixa potência: As ondas ultra-sonoras de alta potência (1 – 10 MHz) ocasionam permanentes mudanças físicas e químicas através de cavitação e microfluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás. Algumas aplicações das ondas ultrassônicas de alta potência são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Aplicação das ondas sonoras de alta potência

Área	Aplicação
Biologia	Homogeneização, rompimento de células, esterilização, extração em plantas.
Engenharia	Limpeza de metal, soldagem, teste de fadiga, refinamento de metal em pedaço, perfuração.
Geologia	Localização mineral e depósito de óleo, estabelecimento de profundidade.
Industrial	Filtração, cristalização, dispersão de sólidos, crescimento de cristais, degaseificação, produção de pó, tratamento de suspensão mineral, emulsificação, etc.
Medicina	Esterilização, fisioterapia, inalasões.
Física	Cavitação, fenômeno de ondas acústicas, velocidade do som.
Polímeros	Polimerização, despolimerização, degradação de massa molecular.

**Fonte:** Barboza e Serra (1992)

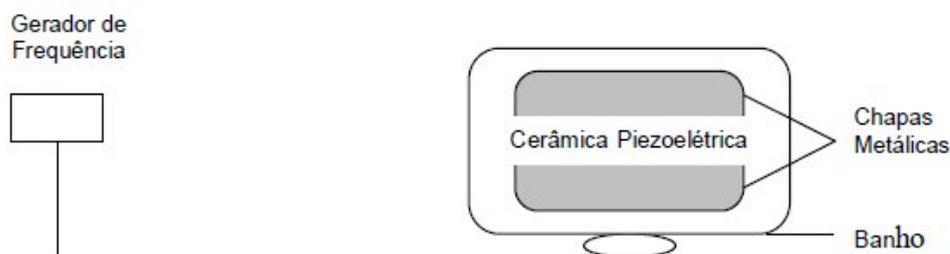
As ondas de ultrassons de baixa potência, com frequência maior que 20 kHz, são utilizadas nas áreas da ciência, engenharia e medicina, para testes e diagnósticos técnicos. Estas ondas são empregadas em exames de feto, inspeções de soldas e medidas de espessuras. Também são usadas por morcegos, pássaros noturnos e animais marinhos, para sua localização através do eco (BARBOZA e SERRA, 1992).

Para procedimentos que envolvem reações induzidas por ultrassons (processos sonoquímicos) normalmente são empregados banhos de ultrassom

e processadores ultra-sônicos (sendo o termo homogeneizador ultra-sônico o mais comumente empregado). Ambos são sistemas geradores de ondas para a condução de reações químicas (KORN et al 2003).

Os homogeneizadores são constituídos de dois módulos, que consiste em uma fonte geradora de corrente alternada, calibrada para geração de ondas ultra-sônicas de uma dada frequência, e uma sonda que contem o transdutor e amplificador, construída com materiais química e fisicamente resistente e inertes (ex. titanato de bário).

Os banhos de ultrassom (empregados no presente trabalho), podem ser caracterizados como vasos metálicos, no fundo dos quais são acoplados transdutores piezelétricos (cerâmica) que oscilam em determinada frequência (Figura 2) (KORN et al, 2003).



**Figura 2** – Banho de ultrassom e transdutor.

O gerador de frequência transmite um sinal ao transdutor piezelétrico, que transforma ondas elétricas em ondas mecânicas. Os vasos metálicos (chapas metálicas) amplificam estes sinais. O transdutor transmite os impulsos ultrassonoros ao meio reacional (BARBOZA e SERRA, 1992).

No banho, ao ser aplicada uma corrente alternada no transdutor, este assume vibrações características, essas vibrações na faixa dos ultrassons (comumente de 20 kHz ou 40 kHz), são transferidas para o banho, e

consequentemente para tudo que nele estiver contido. As reações induzidas pelo o ultrassom são realizadas em banhos. Os reatores são imersos nos vasos e estes devem conter água, pois a ausência de líquido no vaso pode conduzir a um superaquecimento, ocasionando danos para o equipamento (KORN et al, 2003).

A produção do ultrassom é um fenômeno físico baseado no processo de criar, aumentar e implodir cavidades de vapores e gases, denominado cavitação, onde o meio líquido favorece o efeito de ativação em reações químicas. Durante a etapa de compressão a pressão é positiva, enquanto que na expansão resulta em “vácuo”, chamado de pressão negativa, constituindo-se em um ciclo de compressão-expansão que gera as cavidades (GARBELLINI et al, 2008).

Em meio líquido o fenômeno de cavitação se deve ao fato que, durante a expansão, os gases adsorvidos no líquido ao redor da cavidade ou na interface evaporam-se, resultando na expansão da cavidade. Na etapa de compressão estes gases ou vapores não retornam completamente ao líquido, resultando num aumento efetivo da cavidade. Estes ciclos de compressão e expansão ocasionam aumento do tamanho da cavidade. Quando atinge um tamanho crítico implodem, liberando grande quantidade de calor e pressão em intervalos curtos de tempo, em pontos específicos do líquido (MARTINES et al, 2000).

Na cavitação, dois tipos de bolhas podem ser geradas: as estáveis e as transitórias. As estáveis oscilam no meio, com um tempo de vida grande, seu volume cresce por penetração de gás dissolvido no líquido na fase de descompressão. Elas precisam de vários ciclos de expansão e compressão, se atingirem o volume crítico, podem tornar-se transitórias, ou seja, bolhas com tempo de vida curto, de poucos ciclos. Seu volume cresce e implodem na fase de compressão (BARBOZA e SERRA, 1992).

Este fenômeno é evidenciado para ultrassons de baixa frequência, uma vez que o período de propagação da onda é suficientemente longo para permitir a formação das bolhas de cavitação. Portanto, pode se explicar a não

ocorrência da cavitação em meios líquidos assistidos por ultra-sons de frequência superior a 1 MHz (KORN et al, 2003).

Em um líquido com partículas sólidas, na etapa de compressão os gases são absorvidos para o interior da partícula. Na etapa de expansão são dirigidos para fora (BABICZ, 2009).

A frequência é um dos principais fatores que influenciam o colapso das bolhas de cavitação. No entanto, outros fatores como pressão de vapor e condutividade térmica do solvente, presença de sólidos no meio exposto ao campo ultrassônico, temperatura, pressão externa, viscosidade e tensão superficial, também podem influenciar (KORN et al, 2003).

Segundo Mason et al. (1996), citado por Korn et. al. (2003), a inserção dos ultrassons que aumentam a reatividade acontece devido a evidências acumuladas sobre os efeitos provocados por estas ondas em sistemas químicos. De acordo com Korn, et. al. (2003), os fatores que aumentam a reatividade, incluindo irradiação ultrassônica, são :

- Aumento da temperatura de reação;
- Aumento da concentração de um reagente;
- Aumento da pressão aplicada no sistema;
- Emprego de catalisadores;
- Irradiação do sistema com ultrassom de alta potência.

Estudos sob a influência das ondas de ultrassons em reações químicas, conhecida como sonoquímica, demonstram a existência de duas principais áreas de reatividade química, que consiste em sistemas homogêneos e heterogêneos.

Nos sistemas homogêneos existem duas regiões de reatividade. Uma corresponde à fase gasosa dentro da bolha, denominada de “ponto quente”, na qual se inicia a implosão, sendo que a eficiência desta implosão depende da

volatilidade do solvente e a outra trata-se de uma fina camada líquida em volta da bolha (BABICZ, 2009).

Em sistemas homogêneos a destruição da bolha se faz de forma assimétrica, dando origem a um jato de líquido dirigido para superfície sólida, podendo causar erosão localizada. No entanto, microfluxos de líquidos são formados, absorvendo grande quantidade de energia de vibração dentro do pequeno volume, com pouco ou nenhum aquecimento associado, isto acaba favorecendo o transporte de massa entre a fase líquida e a superfície sólida, acelerando a velocidade de algumas reações químicas (BARBOZA e SERRA, 1992).

Sistemas com líquidos imiscíveis o colapso das microbolhas podem promover uma eficiente agitação. Com o aumento na velocidade de formação das gotículas microscópicas, da superfície de contato e das forças coesivas podem ser formadas ainda micro-emulsões (BABICZ, 2009).

### **2.2.1 Aplicações**

A produção de iogurte é um processo importante na indústria alimentícia. Estudos recentes têm demonstrado que o uso de ultrassom ajuda na transformação, podendo proporcionar uma redução no tempo total de produção de até 40%. A sonificação reduziu a dependência normal do processo em função da origem do leite. Além disso, verificou-se uma melhora na consistência e na textura do produto final (MASON et al, 1996).

A extração de compostos orgânicos de plantas e sementes por solvente é significativamente melhorada com a utilização do ultrassom. Os efeitos mecânicos do ultrassom fornecem uma maior penetração do solvente para os materiais celulares e melhora a transferência de massa. Em alguns casos o uso do ultrassom aumentou a eficiência de extração em baixas temperaturas, gerando um produto mais puro em um tempo mais curto. A *helicid*,

normalmente é extraída por etanol em refluxo, quando utilizando o ultrassom obtem-se rendimentos aproximadamente 50% superiores aos obtidos empregando a técnica convencional de refluxo, empregando a metade do tempo e temperatura ambiente (MASON et al, 1996).

Estudos laboratoriais de descontaminação de água empregando o ultrassom em conjunto com outros tratamentos, como a adição de um biocida, por exemplo cloro ou ozônio, demonstram potencialidade para uma possível aplicação de tratamento em larga escala. O emprego associativo do ultrassom de baixa potência com o cloro apresentou uma significativa melhora do efeito deste biocida (MASON et. al., 2003).

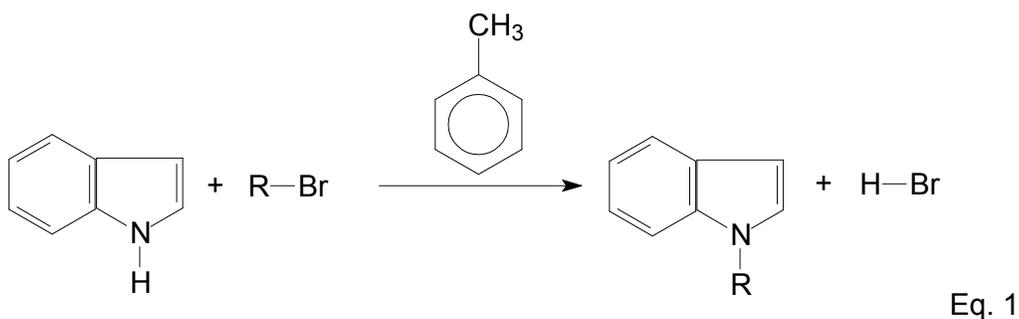
A utilização do ultrassom durante a preparação de catalisadores sólidos proporcionou uma melhora significativa (300%) na atividade catalítica da platina negra para as reações de hidrogenação de alcenos, decomposição de peróxido de hidrogênio e oxidação de etanol, quando comparado com catalisador preparado empregando apenas agitação mecânica. Este aumento de atividade foi vinculado aos aumentos da área de superficial de 62% e da susceptibilidade magnética de 98% observados para o catalisador preparado na presença do ultra-som (MARTINES et al, 2000).

Estudos realizados com níquel metálico demonstraram que na presença do ultrassom, a atividade catalítica apresenta um máximo. A perda de atividade foi vinculada ao favorecimento à agregação de partículas que é iniciada em paralelo com ativação por ultrassom (BOLDYREV, 1995).

Outra área promissora de pesquisas com ultrassom é a ativação de enzimas imobilizadas. Estudos demonstram que o ultrassom favorece o transporte de substrato para a enzima. Usando quimiotripsina-cz em gel de agarose e caseína como substrato, um duplo aumento de atividade foi observado em 20 kHz, o qual foi vinculado a maior penetração da caseína no gel, induzido pelos efeitos cavitacionais perto da superfície (MASON et al, 1996).

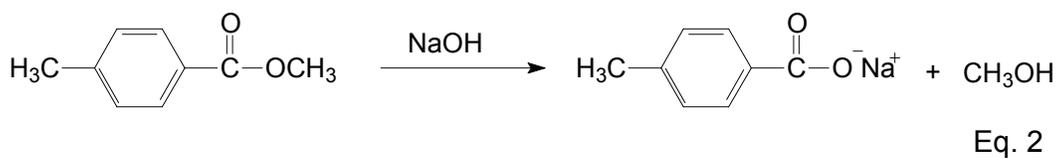
## 2.2.2 Reações orgânicas assistidas por ultrassom

Em reações químicas a aplicação do uso de ultrassom desempenha um papel importante. Em reações de alquilação do indol, equação 1, o ultra-som, favorece a interação entre diferentes fases e a migração do nucleófilo para a fase orgânica, tornando o ataque mais fácil.



O emprego do ultrassom conduziu a um aumento no rendimento de 19 para 90 %, diminuindo o tempo de reação de 3 para 1,3 horas, além de aumentar a pureza do produto obtido (MARTINE et al, 2000).

Na hidrólise de éster, equação 2, proporcionou um aumento no rendimento e na velocidade de reação (Tabela 2), (MARTINES et. al., 2000).



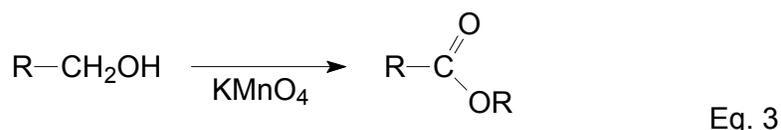
**Tabela 2** – Comparação do rendimento e de velocidade de reação de hidrólise de éster, para os métodos de obtenção sob refluxo e sob ultrassom.

Tempo de reação (min.)	Condição	Rendimento (%)
90	Refluxo	15
10	Ultrassom	15
60	Ultrassom	94

**Fonte:** Martines et al, 2000.

Este aumento foi vinculado ao favorecimento na formação de uma emulsão mais estável e partículas pequenas de reagentes (MARTINES, et. al., 2000).

Yamawaki e Cols, estudaram reações de oxidação de álcoois em cetonas ou aldeídos em presença de permanganato de potássio (equação 3) (BARBOZA e SERRA, 1992).



Os rendimentos empregando como solventes o benzeno ou o hexano, na maioria dos casos, foram superiores a 80% quando do emprego do ultrassom e inferiores a 15% na sua ausência (BARBOZA e SERRA, 1992).

As reações que necessitam do uso de reagente sólidos, apresentam alguns inconvenientes que limitam ou inibem seu desenvolvimento. Podem ser citados como exemplos as impurezas da superfície do catalisador (metal), sua pequena relação superfície/peso (pequena superfície de contato) e a presença de substâncias que se aglomeram na superfície do metal antes e durante as

reações. Estes fatores atuam principalmente na interface sólido líquido (BARBOZA e SERRA1992).

A utilização do ultrassom pode ser uma técnica excelente a ser aplicada à mistura de fases heterogêneas. Nas reações de transferências de fase, o ultrassom tem o poder de executar um bom efeito de dispersão física. Do ponto de vista físico existem duas classes deste tipo de reação; as que envolvem a mistura de duas fases líquidas imiscíveis, e as que envolvem a dispersão de um reagente sólido insolúvel, como a *N*-benzilação de indol, na presença de KOH e potietilenoglicol-metiléter, mediante a aplicação do ultrassom, obteve-se um rendimento de 95% em 2 h reacionais. Pelo método clássico obteve-se um rendimento de 80% em 8 h reacionais (TRINDADE, 2006).

Na reação de esterificação metílica de ácidos graxos derivados de óleos vegetais, pelo fenômeno da cavitação, o emprego do ultrassom promoveu uma melhor mistura dos reagentes e do catalisador, aumentando assim a transferência de massa e, conseqüentemente, a conversão da reação. Em um estudo comparativo constatou-se um rendimento de 82,4% para uma hora de reação, quando do emprego do ultrassom. Na ausência do ultrassom o rendimento foi de aproximadamente 53 % (MATOS, et. al., 2007).

O emprego do ultrassom em reações químicas apresenta uma série de vantagens, tais como: redução do tempo de reação, redução da quantidade de reagentes, aumento do rendimento e seletividade, favorecimento de reações que normalmente não ocorrem em condições normais, simplificação de alguns sistemas reacionais (implicando na redução de custos) (BARBOZA e SERRA, 1992, MARTINES, et.al., 2000).

As investigações científicas empregando o ultrassom como promotor reacional têm aumentado significativamente nos últimos anos. Na maioria dos casos observa-se, em relação às técnicas convencionais, melhores rendimentos reacionais, menor tempo de processamento e baixo consumo de energia. Com a tendência de se utilizar tecnologias cada vez mais limpas, o ultra-som, torna-se uma técnica promissora.

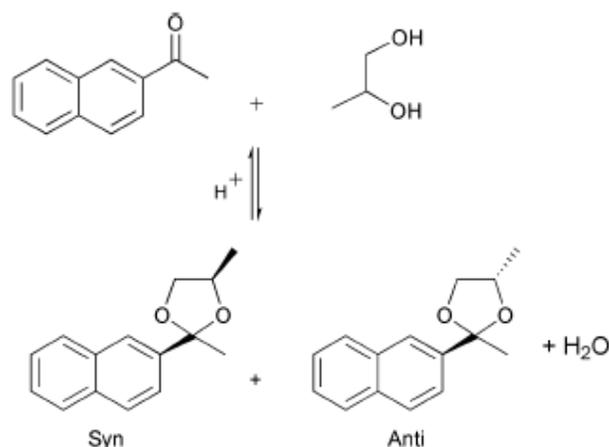
### 2.3. REAÇÃO DE ACETALIZAÇÃO

A reação de acetalização às vezes é um requisito necessário para proteger os grupos carbonila na presença de outros grupos funcionais, durante a manipulação de moléculas de compostos orgânicos multifuncionais. Os acetais são geralmente estáveis para as bases, reagentes de Grignard, reagentes de hidrogenação, hidretos metálicos, oxidantes, reagentes de tratamento com bromo e de estereificação.

Além do interesse de acetais como grupos de proteção, muitos deles encontram aplicações direta em perfumes, cosméticos, aditivos para alimentos e bebidas, produtos farmacêuticos e detergentes. As vezes, vários acetais, nomeados como “potencial fragrâncias” (que exibem pouco ou nenhum odor), são introduzidos juntos em diferentes formulações e, no contato com a pele os produtos são hidrolisados e as moléculas odoríferas são liberadas.

Sabe-se que a conversão de um composto carbonil em acetal, altera profundamente a sua pressão de vapor, solubilidade, características de aroma e geralmente atenua ou altera seu impacto sabor. Por exemplo, o propileno glicol de vanilina é usado em sabores de baunilha porque provoca atenuação do sabor (CLIMENT et al, 2002).

O método mais usado para a síntese de acetais é a reação entre compostos carbonílicos e álcoois ou ésteres (Figura 3), em presença de catalisadores ácidos, como ácidos próticos, ácidos de Lewis (zinco, cloreto de alumínio), montmorillonita, zeólitas e aluminosilicatos mesoporosos.



**Figura 3** – Reação de formação do 2-metil – 2-naftil – 4-metil, 1-3dioxolane 1.

**Fonte:** Climent et al, 2002.

A acetalização de aldeídos pode ser realizada na presença de ácidos fracos, enquanto que a de cetonas geralmente necessitam de ácidos fortes, como: sulfúrico, clorídrico ou p-toluenosulfônico, além de quantidades maiores de catalisador (CLIMENT et al, 2002).

Os sistemas homogêneos, baseados no emprego de ácidos de Brønsted ou de Lewis como catalisadores, apresentam limitações derivadas do uso de reagentes caros, procedimento onerosos e tedioso, além da necessidade de neutralização dos meios reacionais de caráter ácido, com a produção indesejável de resíduos.

Os sistemas heterogêneos, baseados principalmente no emprego de matérias zeolíticas, apresentam-se como promissores catalisadores para esta reação, pois agregam ao seu caráter ácido as vantagens da catálise heterogênea, como a fácil separação da mistura reacional, seletividade de forma, neutralização e total possibilidade de controlar a população, a força e a distribuição dos sítios ácidos (CLIMENT et al, 2002).

## 2.4 ENZIMA (LIPASES)

As Enzimas encontram-se amplamente distribuídas na natureza, estando presentes em animais, vegetais e microrganismos. Apresentam peso molecular entre 40-50 kda. São glicoproteínas nas quais a parte glicolisada hidrofóbica circunda o sítio ativo.

As Lipases são enzimas classificadas como hidrolases (triglicerol, acil-hidrolases EC 3.1.13); são biocatalisadores versáteis capazes de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito (CARVALHO et. al., 2005).

As lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente porque, além de apresentarem procedimentos mais simples de isolamento a partir do meio fermentativo são, geralmente, mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes (CARVALHO et. al., 2003).

A maioria das enzimas apresentam sua atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 a 40°C. Sua termoestabilidade varia consideravelmente em função de sua origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica.

A especificidade é uma característica importante das enzimas. De maneira geral quatro tipos de especificidades podem ser definidas:

1) *especificidade em relação a classe de lipídios*: a enzima pode ser específica em relação ao tipo de éster, por exemplo, tri-, di-, monoglicerídeo, colesterol éster, metil éster, etc;

2) *regioespecificidade*: promove a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula;

3) *especificidade em relação ao resíduo de ácido graxo*: a enzima é específica em relação ao comprimento da cadeia ou em relação à presença da dupla ligação nesta cadeia;

4) *esteroespecificidade*: algumas lipases catalisam apenas a hidrólise ou a esterificação de um ou dois esteroisômeros (FEIHRMANN, 2005).

A atividade enzimática está sujeita à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, os quais podem ocorrer quando estocadas ou durante o uso (CARVALHO et al. 2005). Fatores como pH (o substrato pode ser afetado pela variação do pH), temperatura (em temperaturas altas a atividade cai bruscamente, desnaturando a enzima), co-fatores (quase um terço das enzimas necessitam de um componente não protéico para a sua atividade) como os íons metálicos  $Fe^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$  ou moléculas orgânicas e inibidores, estes podem ocupar o centro ativo das enzimas por semelhança estrutural com o substrato original (inibidor competitivo) ou alterar a conformação espacial da enzima impedindo sua união ao substrato (inibidor não competitivo). Estes fatores podem alterar a atividade catalítica da enzima.

O desenvolvimento de técnicas de imobilização torna-se importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos.

A grande vantagem em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não devem ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e a estabilidade da enzima, entretanto não existe uma regra que preveja a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (VECCHIA et al, 2004).

As enzimas imobilizadas normalmente suportam temperaturas mais elevadas. Como exemplo, as enzimas comerciais Lipozyme IM e Novozym 435

possuem como temperaturas ótimas de atividade e estabilidade na faixa 30-70°C (NOVO NORDISK, 2001).

A tecnologia de imobilização trouxe novas perspectivas para a aplicação de enzimas e células em processos industriais. Aliada a novas metodologias, esta tecnologia pode ser utilizada como uma ferramenta para aumentar a eficiência de processos biotecnológicos e, conseqüentemente, reduzir custos de produção (CARVALHO et al, 2006).

A biocatálise é hoje uma das áreas mais promissoras dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. A exploração da biodiversidade na busca de novos catalisadores por técnicas de seleção de microrganismos, de plantas ou células animais, representam os métodos tradicionais de descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial. Microrganismos isolados no Brasil têm demonstrado excelente potencial biocatalisador frente a diferentes substratos orgânicos de interesse, como por ex. na hidrólise de óleos marinhos, na síntese de ésteres de ácidos graxos poliinsaturados e de ésteres de aromas (CARVALHO, et. al., 2005).

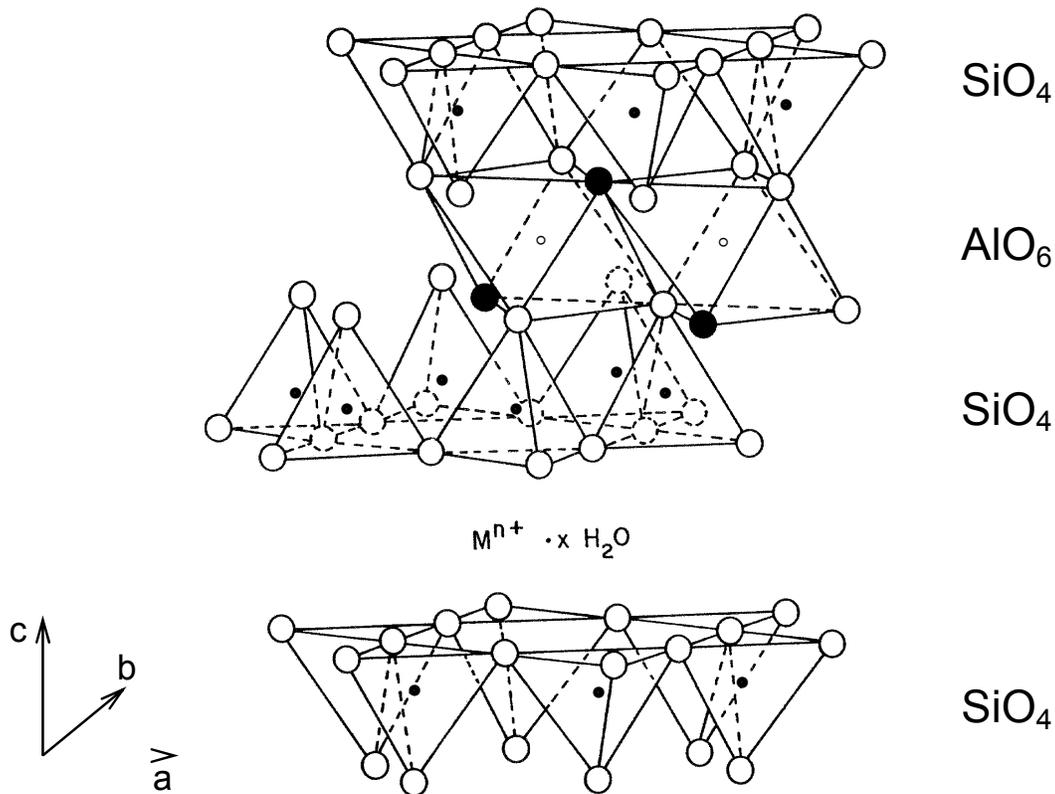
As aplicações das enzimas como catalisadores, vem sendo utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, óleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) e para tratamento de resíduos oleosos provindos da indústria do couro e de papel (CARVALHO et. al., 2005).

## **2.5 ARGILAS KSF E K10**

O termo argila geralmente se refere a aluminossilicatos que possuem tamanho de partícula na faixa de  $10^{-6}$  m (1  $\mu$ m), sendo estes capazes de exibir capacidade de troca catiônica (THOMAS e THEOCHARIS, 1989).

Sobre as diferentes variedades de argilas da família filossilicatos, a respeito da sua orientação estrutural, tem sido particularmente utilizada como catalisadores e são chamadas “argilas minerais”. Assim sendo, a camada básica de formação da maioria das argilas minerais são constituídas pela lamela tetraédrica (T) de  $\text{SiO}_4$  polimerizado e pela lamela octaédrica (O) de alumínio. Como o  $\text{SiO}_4$  tetraédrico, a alumina octaédrica pode também polimerizar em duas dimensões pelo compartilhamento de quatro átomos de oxigênio, os quais deixam dois oxigênios não compartilhados que fornecem a carga negativa de dois (-2). A carga negativa é contrabalanceada no seu estado natural pelos cátions hidratados, usualmente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , etc. que estão situados no espaço interlamelar. Esses cátions são geralmente permutáveis e sua quantidade indica a capacidade de troca catiônica da argila (CHITNIS e SHARMA, 1996).

Filossilicatos podem ser classificados em oito grupos maiores, baseando-se principalmente em três fatores, como por exemplo tipo de camadas (1:1 ou 2:1), carga da camada por célula unitária e tipos de intercamadas. Esses grupos são as caolínitas, pirofilitas, esmectitas, vermiculitas, mica, mica quebradiça, clorita e paligorsquita-sepiolita. Esses grupos podem ainda ser divididos em subgrupos e posteriormente em espécies (MOTT, 1988). A Montmorillonita é uma espécie membro das esmectitas dioctaédricas, onde a substituição do alumínio na camada octaédrica pelo magnésio produz uma deficiência de carga em torno de 0,6 e 1,2. Essa deficiência é balanceada pela presença de cátions permutáveis intercamadas (Figura 3). Numa cela unitária composta por 20 átomos de oxigênio e 4 hidroxilas, existem oito sítios tetraédricos e seis octaédricos. Quando todos esses sítios são ocupados por cátions, o filossilicato é chamado trioctaédrico. Quando somente dois terços são ocupados por cátions, trata-se de um filossilicato dioctaédrico (CHITNIS e SHARMA, 1996).



**Figura 4** - Estrutura idealizada de uma Esmeclita (2:1).  $\circ$  - Átomos de Oxigênio;  $\bullet$  - Grupos  $-\text{OH}$ ;  $\blacklozenge$  - Átomo de Silício e  $\circ$  - Átomo de Alumínio.

Fonte: PERGHER et al, 2005.

A Montmorillonita natural tem uma atividade catalítica limitada, a qual pode ser aumentada através de um tratamento ácido. As condições desse tratamento requeridas para máxima atividade catalítica dependem da reação a ser catalisada, do tamanho e forma das moléculas dos reagentes e suas propriedades físicas, como por exemplo, polaridade, basicidade, etc. (RHODES e BROWN, 1994). O tratamento ácido é realizado submetendo a argila a ácidos minerais concentrados, tais como ácido sulfúrico, fosfórico e hidrolórico. A natureza e tipo de argila, concentração do ácido, temperatura e tempo de tratamento são parâmetros importantes.

O tratamento ácido da argila resulta em mudanças na área superficial, porosidade e tipo e concentração dos íons nos sítios de troca (Tabelas 3 e 4). Durante a ativação ácida, íons de  $Al^{+3}$  e  $Mg^{+2}$  são removidos dos sítios octaédricos nas camadas da argila pela ação do ácido. Esses cátions são realocados nos espaços interlamelares, onde atuam como centros ácidos. Sendo assim, a ativação ácida promove a atividade catalítica pelo aumento do número de sítios ácidos de Brønsted e Lewis (CHITNIS e SHARMA, 1996). E pelo aumento da acessibilidade e área específica.

**Tabela 3** - Características físico-químicas de algumas argilas montmorillonitas comerciais (WOODS, 1977)

Nome comercial	KSF	K-10/SF	KSF/0	K-10
pH	2,1	2,4	2,4	3,6
Área Superficial ( $m^2/g$ )	18	108	189	268
Densidade de massa (g/l)	809	380	351	373
Gravidade específica	2,4 – 2,5	2,4 – 2,5	2,4 – 2,5	2,4 – 2,5

**Tabela 4** - Análise química de algumas argilas montmorillonitas comerciais (WOODS, 1977)

Análise aproximada (%)	KSF	K-10/SF	KSF/0	K-10
$SiO_2$	53,2	58	69,8	64,7
$Al_2O_3$	18,8	16,0	14,2	19,3
$Fe_2O_3$	5,1	5,0	3,2	5,1
CaO	2,9	1,0	0,8	0,9
MgO	2,8	3,0	0,9	2,8
Perda na ignição	8,1	6,0	6,1	7,2
$H_2SO_4$	6,0	5,0	5,0	--

## 2.6 CARACTERIZAÇÃO DOS CATALISADORES

A etapa de caracterização pode nos fornecer informações a respeito da superfície dos materiais e ajudar a compreender melhor a cinética das reações. A interpretação do conjunto de resultados obtidos pelas diferentes técnicas de caracterização pode tornar possível o entendimento e compreensão das estruturas, reatividades, força e quantidade de sítios nas superfícies dos catalisadores estudados. São diversas as técnicas de caracterização de um catalisador, dentre as mais utilizadas pode-se destacar: a análise química, o método de difração de raios-X (DRX), a análise textural e análise térmica.

A análise textural foi realizada por meio de dados de adsorção/dessorção de N<sub>2</sub> (isotermas de adsorção). Esta técnica permite obter informações sobre a área específica do material e sua distribuição de tamanhos de poros. O cálculo da área específica se realiza utilizando o método BET (Brunauer, Emmett, Teller).

A difração de raios X se baseia no efeito de difração da radiação X pelos planos do retículo cristalino das amostras, seguindo a lei de Bragg:

$$\lambda = 2d_{(h,k,l)} \text{ sen}\theta$$

Eq. 4

onde:  $\lambda$  = comprimento de onda da radiação incidente;

$d$  = distância entre os planos de reflexão que possuem índices de Miller (h,k,l);

$\theta$  = ângulo de incidência.

No caso de materiais lamelares, os difratogramas de raios X permitem determinar a distância interlaminar ( $d_{001}$ ) e sua variação, devido a tratamentos.

A microscopia eletrônica de varredura fornece informações sobre a morfologia dos materiais e presença de impurezas e outros materiais.

Análise térmica fornece informações quanto a variações de massas dos materiais em diferentes temperaturas podendo dar informações quanto aos constituintes dos materiais.

A análise química confirma a composição dos materiais bem como os sítios ativos presentes nos materiais.

Tendo em vista o exposto anteriormente, principalmente no que se refere a síntese do acetal metil naftil cetona (um composto do aroma de flor de laranjeira, de elevado valor agregado), a qual atualmente é conduzida industrialmente, na presença de solvente, empregando como catalisador o ácido p-toluenosulfônico (catalise homogênea).

Neste contexto, neste trabalho pretende-se avaliar a eficiência de três catalisadores heterogêneos (um biológico - a enzima Novozym 435, e duas argilas KSF e K10), na síntese do composto acima mencionado, a qual será conduzida em um meio isento de solvente, característica esta desejável em se tratando de aroma empregado pela indústria alimentícia.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

Para a realização do presente trabalho foram utilizados os reagentes 1,2-propanodiol comercial (99,0 % de pureza), proveniente da MERCK e Metil naftil cetona comercial (99,0 % de pureza), adquirido da SIGMA – ALDRICH. Suas propriedades físico-químicas encontram-se apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5** – Propriedades dos reagentes utilizados neste trabalho (dados do fabricante).

Compostos	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g/gmol)	Ponto de Fusão (°C)	Ponto de Ebulição °C)
Metil-naftil-cetona	$C_{10}H_7COCH_3$	170,21	52-56	300-301
1,2-propanodiol	$CH_3CH(OH)CH_2OH$	76,09	- 59°C	188°C

Como solvente para a diluição das amostras previamente à análise por Cromatografia Gasosa acoplado a um detector de massas (CG-MS), foi empregado o tetra-hidrofurano (THF), procedente da MERCK (99% de pureza). Tanto os reagentes como o solvente foram usados sem purificação suplementar.

##### 3.1.1 Catalisadores

Duas classes de catalisadores heterogêneos foram avaliados neste estudo. As argilas comerciais KSF e K10, ambas de caráter ácido foram

adquiridas da Sigma – Aldrich. A argila KSF comercial é obtida por um tratamento com ácido sulfúrico à temperatura ambiente que normalmente resulta numa simples troca iônica dos cátions Na, Ca e Mg por prótons. Este processo resulta em uma pequena extração de Al, Mg e Fe da estrutura da montmorillonita.

A argila K-10 é obtida por um processo similar ao da KSF, entretanto empregando altas temperaturas o que ocasiona, além dos efeitos antes mencionados, uma destruição parcial da estrutura da argila.

Previamente a seus empregos, as mesmas foram submetidas a uma etapa de ativação térmica, em estufa, a temperatura de 120°C *over night*, a fim de retirar o excesso de água.

O catalisador biológico empregado neste estudo foi a enzima Novozym 435 (*Candida antarctica*) produzida e fornecida pela Novozyme por fermentação submersa e imobilizada em resina acrílica macroporosa. Apresenta tamanho de partícula entre 0,3 – 0,9 mm, densidade de aproximadamente 430 kg/m<sup>3</sup> e conteúdo de água entre 1 – 2 %. É uma lipase termoestável com atividade ótima na faixa entre 70-80°C. Previamente ao ensaio de acetilação, a Enzima foi submetida a uma etapa de ativação térmica em estufa, a uma temperatura de 60°C por 1 hora.

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Caracterização dos Catalisadores**

As argilas KSF e K-10 foram caracterizadas por difração de raios – X (DRX) e análise textural por adsorção de nitrogênio.

### **3.2.1.1 Difração de Raios – X (DRX)**

A difração de raios – X baseia-se no efeito da difração de raios – X nos planos do retículo cristalino do sólido, segundo a Lei de Bragg.

O difratômetro de raios – X utilizado foi um DIFFRAKTOMETER modelo D5000 (Siemens), com filtro de Ni utilizando radiação  $Cu\text{-}K\alpha$  ( $\lambda = 1,54\text{\AA}$ ). As análises foram realizadas no Laboratório de Difractometria de raios - X - Instituto de Geociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### **3.2.1.2 Análise Textural por Adsorção de Nitrogênio**

A área superficial e o volume de poros foram calculados a partir das isotermas de adsorção de nitrogênio a 77 K usando um aparelho Quantachrome. Previamente às análises, as amostras foram submetidas a uma etapa de degaseificação a 300°C por 3 horas. Estas análises foram realizadas no laboratório de química ambiental – LAQAM da URI – Campus de Erechim.

## **3.3 ENSAIO DE ACETILAÇÃO**

A síntese do 2,4 metil-2naftil-1,3 dioxolane foi conduzida empregando 0,029 mols (5 g) de metilnaftilcetona e 0,058 mols (4,41 g) de 1,2 propanodiol, correspondendo a uma estequiometria 1:2, e 10% em massa (0,94 g) dos três catalisadores (a enzima 435 Novozyn e as argilas KSF e K10). Os ensaios foram conduzidos, na ausência de solvente, em banho de ultrassom, na ausência e na presença de agitação mecânica (240 RPM), empregando

diferentes tempos reacionais (2, 6 e 12 h). Cada tempo reacional corresponde a um ensaio independente.

Após cada condição estudada, todo conteúdo reacional (reagentes, produtos e catalisador) foi submetido a uma etapa de diluição em tetra-hidrofurano (THF) na proporção (1:1) em massa. Posteriormente, as amostras foram submetidas a uma etapa de separação, para remoção dos catalisadores, mediante centrifugação (argilas KSF e K-10) ou filtração (para a enzima) e re-diluídas em THF, empregando uma relação 1:25.

O conteúdo desta re-diluição foi analisado por CG-MS (marca Shimadzu – QP5050A, com Auto Injetor AOCi). As condições empregadas nas análise encontram-se discriminadas na Tabela 6.

**Tabela 6** - Condições cromatográficas de análise

PARÂMETROS	CONDIÇÕES
Temperatura Inicial	50°C
Tempo	2 min
Rampa de Aquecimento	25°C/min
Temperatura Final	300°C
Tempo Final	10 min
Coluna	DB- 5 (30mx0,25mmx0,25µ)
Gás de Arraste (Fluxo Constante)	hélio
Modo de Injeção	1:20
Velocidade Linear do Gás de Arraste	1 mL/min
Pressão da Coluna	variável
Tempo de Corrida	33 min

O rendimento reacional (%) foi calculado empregando a equação 5, a partir da variação da área do reagente limitante, o metilnaftilcetona, empregando como referência a área obtida no ensaio em branco.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{(A_i - A_o)}{A_o} \times 100$$

Eq. 5

onde:

$A_i$  = área referente à metil naftil cetona em distintas condições reacionais

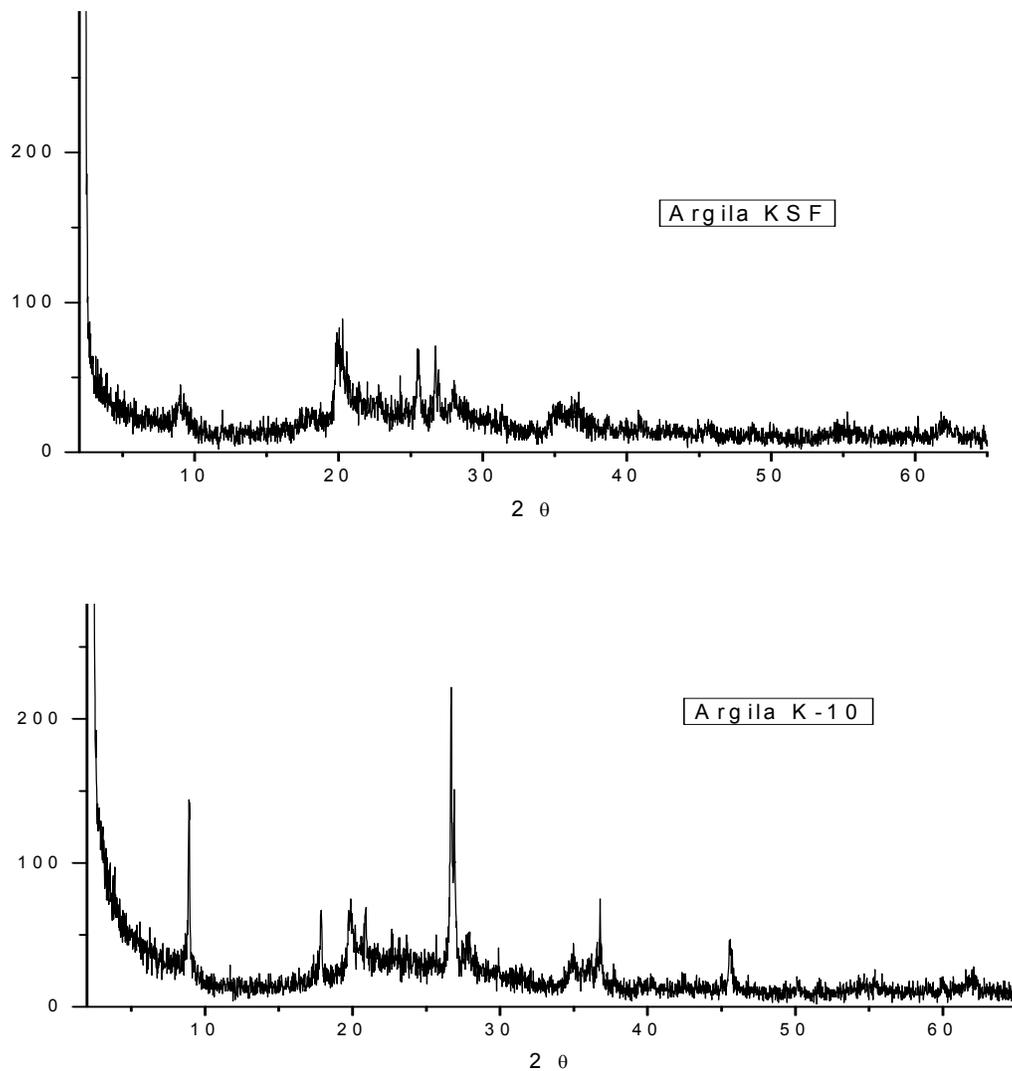
$A_o$  = área referente à metil naftil cetona no ensaio em branco

A seletividade foi acompanhada em função da variação da área referente ao produto, o acetal metil naftil cetona.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização das Argilas

A Figura 5 apresenta os difratogramas de raios X das argilas comerciais montmorillonita KSF e K10.



**Figura 5** - Difratograma de raios-X das argilas comerciais KSF e K-10.

O difratograma de raios X da argila K10 (Figura 5) apresenta uma larga reflexão a  $2\theta = 6^\circ$  ( $d=14,7\text{\AA}$ ), indicando a presença um argilomineral do grupo

da esmectita. Pode-se observar também reflexões a  $2\theta = 9^\circ$  ( $d=10,0 \text{ \AA}$ ) e  $2\theta = 18^\circ$  ( $d=4,9 \text{ \AA}$ ), sugerindo a presença de mica. A argila KSF apresentou também uma reflexão a  $2\theta = 6^\circ$  ( $d=14,7 \text{ \AA}$ ), equivalente ao grupo da esmectita. Ambas as argilas apresentaram uma reflexão em  $2\theta = 27,4^\circ$  ( $d= 3,25 \text{ \AA}$ ), indicando a presença de quartzo.

Os difratogramas dos materiais KSF e K10 apresentam as reflexões referentes ao grupo da esmectita (montmorillonita) menos evidenciados do que os obtidos em difratogramas de argilas naturais, indicando que o tratamento ácido empregado para a obtenção destes materiais provoca uma destruição parcial da estrutura.

As argilas comerciais KSF e K-10 são obtidas por diferentes tratamentos. A argila KSF é obtida mediante tratamento com ácido sulfúrico à temperatura ambiente, que normalmente resulta numa simples troca iônica dos cátions Na, Ca e Mg por prótons. Este processo resulta em uma pequena extração de Al, Mg e Fe da estrutura da montmorillonita (CSERI et. al., 1995). A argila K-10 é obtida por um processo similar ao da KSF, empregando altas temperaturas, o que ocasiona, além dos efeitos mencionados anteriormente, uma destruição parcial da estrutura da argila (CSERI et. al., 1995).

A Tabela 7 apresenta as áreas específicas das montmorillonitas KSF e K-10.

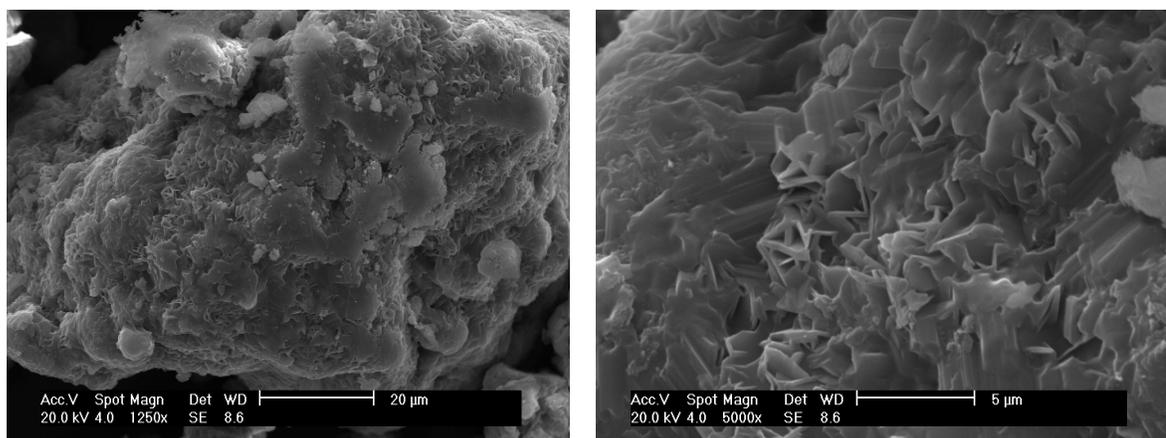
**Tabela 7** - Área específica das argilas comerciais KSF e K-10.

<b>Amostras</b>	<b>Área (<math>\text{m}^2 \text{ g}^{-1}</math>)</b>	<b>Tamanho de poro (A)</b>
K-10	224,5	54,3
KSF	12,4	26,6

A partir dos dados apresentados percebe-se que a argila comercial K-10 possui uma área específica muito superior à da argila KSF. Isto é mais um indicativo de que o tratamento ácido sofrido pela K-10 é mais rigoroso e está

ocasionando a destruição da estrutura e desorganização da mesma (Figura 5), provocando, desta forma, um aumento da área específica (CSERI, et. al. 1995).

Na micrografia da argila KSF, apresentada na Figura 6, pode-se observar sua morfologia lamelar e suas respectivas esfoliações, as quais estão vinculadas ao tratamento ácido a que foi submetida.



**Figura 6** - Micrografia da argila montmorillonita comercial KSF.

Pela a análise da micrografia pode-se observar agregados em faces e arestas indicando que o material se encontra desorganizado devido ao tratamento ácido, incrementando, desta forma, sua acessibilidade e, conseqüentemente, sua área superficial.

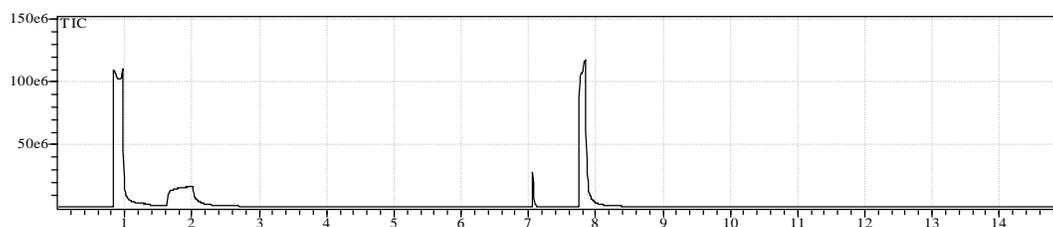
## 4.2. SÍNTESE

A Figura 7(a) apresenta o cromatograma referente ao ensaio em branco (conduzido sem catalisador). Nela podemos observar somente a presença dos reagentes 1,2 propanodiol ( $t_R = 0,97$  min.) e metilnaftilcetona ( $t_R = 7,81$  min.). O pico que aparece em 0,9 min corresponde ao solvente (THF).

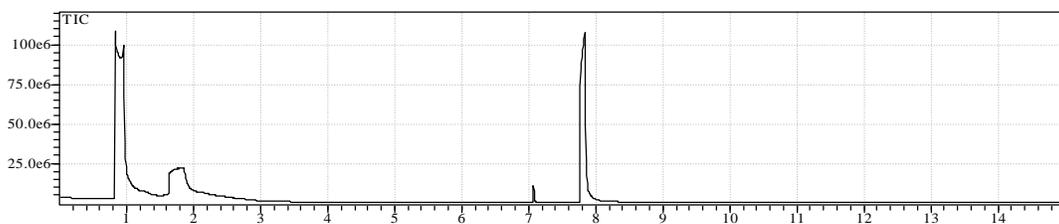
Na Figura 7(c), além dos picos referente aos reagentes, também podemos observar a presença de um pico em 8,5 min, o qual foi vinculado ao produto (2,4 metil-2naftil-1,3 dioxolane), identificado pela biblioteca do massas, com 87% de confiança, e empregado como indicativo de a reação ter ocorrido.

De acordo com as análises cromatográficas, em relação aos catalisadores avaliados, a enzima não apresentou atividade catalítica para a reação proposta. Para todas as condições avaliadas não se constatou nos cromatogramas a presença do sinal correspondente ao produto (ausência de sinal em 8,5 min (Figura 7(b))). Esta ausência de atividade pode estar vinculada a inexistência de acidez do meio reacional, a qual está vinculada à acidez dos compostos empregados como reagentes, ou a desnaturação da enzima.

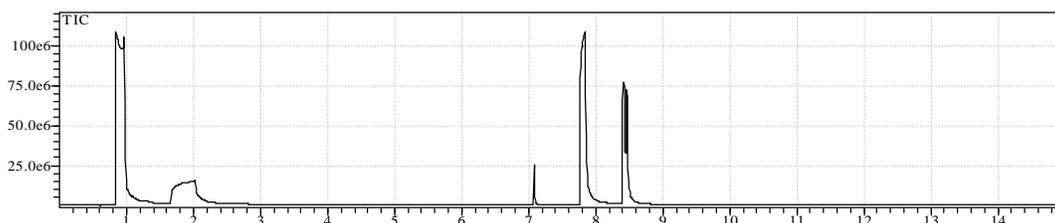
Diferentemente da enzima, nos cromatogramas referentes aos ensaios conduzidos empregando as argilas K10 e KSF como catalisadores constatou-se para todas as condições avaliadas a presença de um sinal em 8,5 min, referente ao produto (Figura 7(c)).



(a)



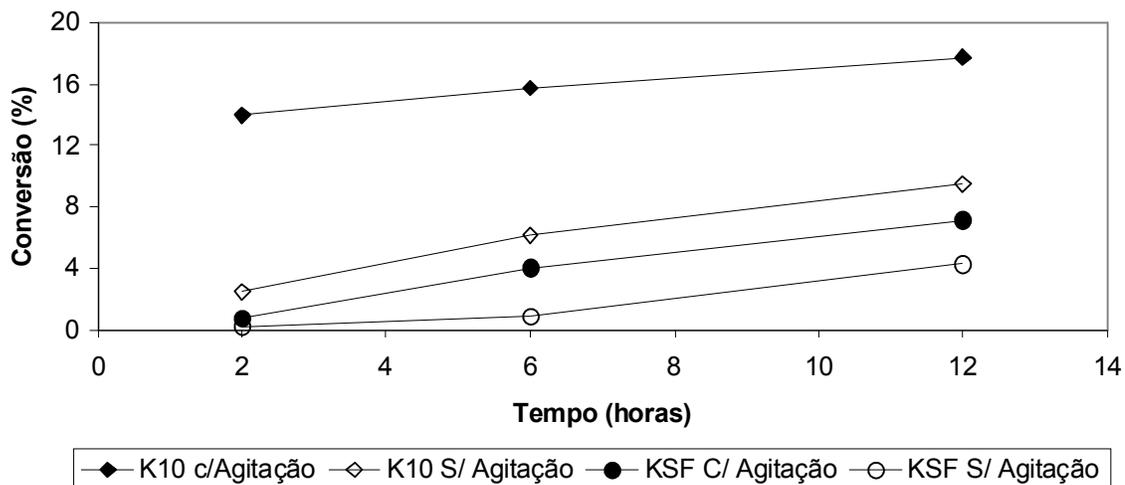
(b)



(c)

**Figura 7** - Cromatogramas obtidos por CG-MS, referentes ao: (a) ensaio em branco, (b) ensaio enzimático e (c) ensaio com K10

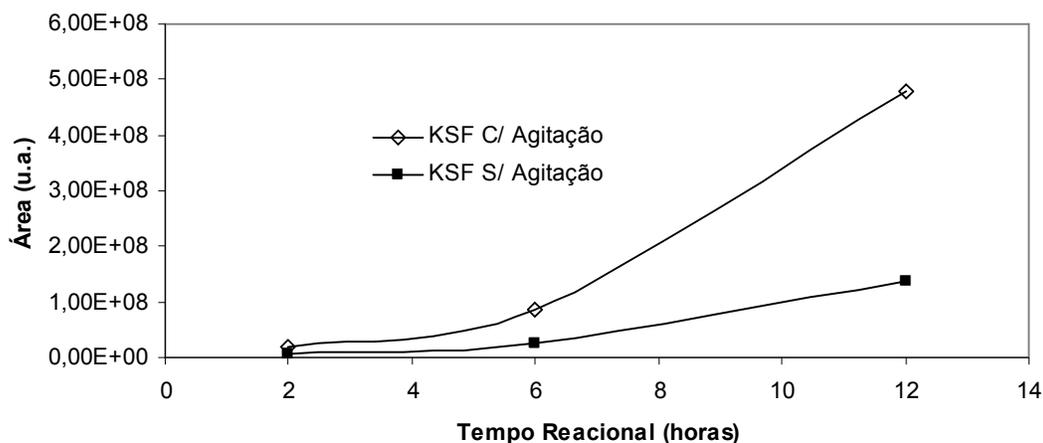
A variação do rendimento reacional, calculado empregando a equação 5, obtido para os catalisadores montmorillonitas K10 e KSF, com agitação e sem agitação, em função do tempo reacional encontra-se apresentada na Figura 8. Para todas as condições realizadas o rendimento aumenta com o tempo reacional.



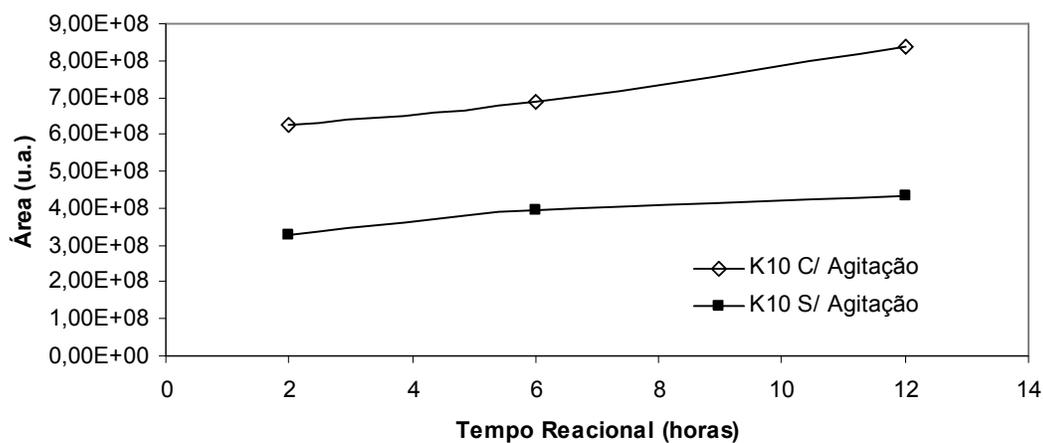
**Figura 8** - Rendimento reacional

Paralelamente foi acompanhada a evolução do sinal referente ao produto. A tendência observada para a variação da área do sinal, a qual esta diretamente vinculada à concentração deste na amostra, para todas as condições realizadas (Figuras 9(a) e (b)) é similar à observada para o

rendimento, corroborando assim com os resultados de rendimento calculados em função da variação da área do agente limitante, a metil naftil cetona .



(a)



(b)

**Figura 9** - Evolução da área do sinal do 2,4 metil-2naftil-1,3 dioxolane para os catalisadores (a) KSF e (b) K 10.

Para ambos os catalisadores, os ensaios conduzidos com agitação apresentaram maior rendimento reacional. Esta tendência foi vinculada à melhor homogeneidade da mistura reacional observada quando do emprego da

agitação, favorecendo o contato dos reagentes com os sítios ativos do catalisador e com isso aumentando o rendimento reacional. Além disto, a agitação favorece a difusão dos reagentes, melhorando a transferência dos mesmos para o interior dos catalisadores, onde encontram-se a maioria dos sítios ácidos responsáveis pela reação.

Dentre as argilas avaliadas como catalisador, independente das condições, a K10 foi a que apresentou maior rendimento reacional, apresentando para 12 horas reacionais uma conversão de aproximadamente 18%.

Os maiores rendimentos observados para a argila K10 foram vinculados à sua elevada área superficial ( $224,5 \text{ m}^2/\text{g}$ ), a qual é aproximadamente 18 vezes superior à da montmorillonita KSF ( $12,4 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Além disto, a argila K10 apresenta maior diâmetro de poro ( $54,3 \text{ \AA}$ ) em relação à argila KSF ( $26,6 \text{ \AA}$ ). Argilas com tamanho de poro reduzidos apresentam maiores limitações difusionais e com isso menor rendimento reacional (CLIMENT et al, 2002). Esta tendência está coerente com os resultados obtidos por Corma, et. al., (2002).

Apesar do menor rendimento reacional, máximo de 18%, em relação aos observados na literatura para outros catalisadores (entre 48 e 99%), cabe destacar que os ensaios aqui reportados foram conduzidos na ausência de solvente, característica esta desejada quando se trata da síntese de aromas com fins alimentícios, e à temperatura ambiente.

Corma et. al., (2002), empregando catalisadores zeolíticos, apresentaram rendimentos reacionais de até 99% em três horas de reação. No entanto, os mesmos conduziram seus ensaios na presença de solvente empregando elevadas temperaturas reacionais ( $150 \text{ }^\circ\text{C}$ ), o que torna o meio menos viscoso, facilitando a difusão dos reagentes até os sítios ácidos do catalisador.

## 5- CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1- CONCLUSÕES

Os resultados demonstram a possibilidade de síntese do 2,4-dimetil-2-naftil-1,3 dioxolano, em um meio ausente de solvente, empregando a catálise heterogênea promovida com ultra-som.

A maior atividade observada para a argila K10 foi vinculado a sua elevada área superficial ( $224,5 \text{ m}^2/\text{g}$ ), a qual é aproximadamente 18 vezes superior a da montmorillonita KSF ( $12,4 \text{ m}^2/\text{g}$ ), e ao maior diâmetro de poro ( $54,3 \text{ \AA}$ ), permitindo assim uma maior acessibilidade dos reagentes com os sítios ácidos do catalisador.

O tempo de contato e a agitação demonstraram efeitos positivos sobre a atividade reacional. As maiores atividade observadas para os ensaios conduzidos com agitação foram vinculadas à homogeneidade do sistema, o qual proporciona, além de um contato mais efetivo dos reagentes com os sítios ácidos dos catalisadores, uma melhor difusão dos reagentes e produtos, e com isso uma reação mais efetiva.

## 5.2- SUGESTÕES

- Realização de ensaios na ausência de ultra-som e com temperatura;
- Avaliar o efeito da temperatura;
- Avaliar outros catalisadores heterogêneos com elevada área superficial (argilas e zeólitas);
- Avaliar zeólitas incorporadas com outros metais, como por exemplo o ferro, visando aumentar sua acidez.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. **Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos Principais Corantes para Alimentos**. Rev. Nutr. Campinas, 13 (2), p. 81-88, maio/ago., 2000.
2. ARAGÃO, V. M.; ANSCHAU, A.; PORCINCULA, B. D. A.; KALIL, S. J. **Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lípases microbianas comerciais**. Química Nova. v.32, nº 2, p. 2268 – 2272, 2009.
3. BABICZ, I. **Produção de diacilgliceróis via hidrólise enzimática de óleo de palma**. 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado Tecnologia de Processo Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro.
4. BARBOZA, J.C.S.; SERRA, A.A. **Ultra-som: Influencia do ultra-som na química**. Química Nova. v.15, nº 4, p. 302-316, 1992.
5. BOLDYREV, V.V. **Mechanochemistry and sonochemistry**. Ultrasonics Sonochemistry. v.2, nº 2, p. 143-145. 1995.
6. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999. Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/Aromas. Diário Oficial [da União], Brasília, Poder Executivo, de 17 de maio de 1999.

7. CARVALHO, P.O.; CALAFATTI, S.A.; MARASSI, M.; SILVA, D.M.; CONTESINI, F.J.; BIZACO, R. **Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lípases microbiana**. Química Nova. v.28, nº 4, p. 614-621, 2005.
8. CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. **Aplicação de lípases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados**. Química Nova. v.26, nº 1, p. 75-80, 2003.
9. CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVIO, S.S. **Uso de biocatalisadores imobilizados: Uma alternativa para condução de bioprocessos**. Revista Analytica. nº23, p. 60-70, 2006.
10. CHIAPPINI, C. C. de J. **Aromas naturais produzidos por microrganismos**. 2008. Disponível em: <[www.revista-fi.com/materias/55.pdf](http://www.revista-fi.com/materias/55.pdf)>. Acesso em: 15 de outubro 2010.
11. CHITNIS, S. R.; SHARMA, M. M. **Alkylation of diphenylamine with  $\alpha$ -methylstyrene and diisobutylene using acid-treated clay catalysts**. Journal of Catalysis, v 160, pp. 84-94, 1996.
12. CLIMENT, M. J.; VELTY, A.; CORMA, A. **Design of a solid catalyst for the synthesis of a molecule with blossom orange scent**. Green Chemistry, v 4, p. 565-569, 2002.
13. CSERI, T., BÉKÁSSY, C.; FIGUERAS, F.; CSEKE, E.; MENORVAL; L. C.; DUTARTRE, R., **Characterization of clay-based K catalysts and their**

**application in Friedel-Crafts alkylation of aromatics**, Appl. Catal. A: General, p.132-141, 1995.

14. FEHRMANN, A.C. **Avaliação da atividade enzimática de lípases imobilizadas em fluido pressurizados**. 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – UFRJ, Campus de Erechim, Erechim.

15. GARBELLINI, G.S.; BANDA, G.R.S.; AVACA, L.A. **Aplicação do ultra-som em sistemas eletroquímicos: Considerações teóricas e experimentais**. Química Nova. v.31, n° 1, p. 123-133, 2008.

16. GOUVEIA, F. **Indústria de alimentos: no caminho da inovação e de novos produtos**. Inovação Uniemp. v.2 n° 5, p. 32-37 Campinas nov./dic. 2006.

17. JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. **Biotransformação de Limoneno: Uma revisão das principais rotas metabólicas**. Química Nova, v.30, n° 2, p. 382 – 387, 2007.

18. KORN, M.; ANDRADE, M.V.A.S.; BORGES, S.S. **Procedimentos analíticos assistidos por ultra-som**. Revista Analytica. n°3, p. 34-39, 2003.

19. LUERCE, R. F. **Produção de acetoína por *Bacillus polymyxa***. 2002. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis.

20. MARIOTTO, J. R. **Produção de acetoína e 2,3-butanodiol por *Bacillus polymyxa***. 2007. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis.
21. MARTINES, M.A.U.; DAVOLOS, M.R.; JÚNIOR, M.J. **O efeito do ultrassom em reações químicas**. Química Nova. v.23, n°2, p. 251-255, 2000.
22. MASON, T.J.; COBLEY A.J.; GRAVES, J.E.; MORGAN. D. **New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound**. Ulstrasonics Sonochemistry. 2010.
23. MASON, T.J.; JOYCE, E.; PHULL, S.S.; LORIMER, J.P. **Potential uses of ultrasound in the biological decontamination of water**. Ulstrasonics Sonochemistry. p. 319-323. 2003.
24. MASON, T.J.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J.P. **The uses of ultrasound in food technology**. Ulstrasonics Sonochemistry. p. 253-260. 1996.
25. MATOS, L.J.B.L.; SANTOS, F.P.; CARTAXO, S.J.M.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F.A.N. **Esterificação dos ácidos graxos do óleo de babaçu assistida por ultra-som**. 2007. Disponível em: <[www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/producao/23.pdf](http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/producao/23.pdf)> acesso em: 26 de outubro de 2010.
26. MOTT, C.J.B. **Clay Minerals – An Introduction**. Catalysis Today, v. 2, pp. 199-208, 1988.

27. NOVO NORDISCK. **Manual técnico das enzimas Lipozyme IM e Novozym 435**. 2001.
  
28. PERGHER, S.B.C.; DETONI, C.; MIGNONI, M.L. **Materiais Laminares Iarizados – Preparação, Caracterização, propriedades e aplicações**. EDIFAPES – Erechim, 2005.
  
29. RHODES, C.N.; BROWN, D.R. **Catalytic activity of acid-treated montmorillonite in polar and non-polar reaction media**. *Catalysis Letters*, v. 24, pp. 285- 291, 1994.
  
30. SIMÕES, D. R. S.; WASZCZYNSKYJ, N.; WOSIACKI, G. **Aromas em Maçãs, Suco e Sidra: Revisão**. B. CEPPA, Curitiba. V.27, n°1, p. 153-172, 2009.
  
31. THOMAS, J. M.; THEOCHARIS, C. R. **Clays, zeolites and other microporous solids for organic synthesis**. In: R. Scheffold (Ed.), *Modern Synthetic Methods*, Vol. 5. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 249-304, 1989.
  
32. TRINDADE, A.F. S. **Aplicação de ultra-som em hidrólise enzimática de acetatos alquílicos e arílicos: Síntese de Ferromônios**. 2006. 134 f. Dissertação (Mestrado Química Orgânica) – Universidade Federal Fluminense – UFF, Rio de Janeiro.
  
33. VECCHIA, R.D.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. **Aplicações sintéticas de lípases imobilizadas em polímero**. *Química Nova*. 27, 623-63, 2004.

34. WOODS, H. J. **Process for preparing diisopropyl ether.** United States Patent: 4042633, 1977.