



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00800

(22) Data de depozit: 12/10/2018

(41) Data publicării cererii:
30/05/2019 BOPI nr. 5/2019

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA POLITEHNICA
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• CĂLINESCU IOAN, STR.GHIRLANDEI
NR.38, BL.D 1, SC.C, PARTER, AP.21,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• VÎNĂTORU MIRCEA, ALEEA MOINEȘTI
NR. 3, BL. 18, SC. 1, AP. 3, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• GAVRILA ADINA-IONUTA, STR.SIBIU
NR.10, BL.OS1, SC.E, ET.2, AP.172,
BUCUREȘTI, B, RO;
• VARTOLOMEI ANAMARIA,
STR.LOGOFATUL TAUTU NR.60, BLE,
AP.1, BUCUREȘTI, B, RO;
• IGNAT NICOLETA DANIELA,
STR.AUREL BARANGA NR.124,
SAT VALEA VOIEVOZILOR, DB, RO

Această publicație include și modificările descrierii,
revendicărilor și desenelor depuse conform art. 35,
alin. (20), din HG nr. 547/2008.

(54) INSTALAȚIE CU ULTRASUNETE DESTINATĂ STUDIULUI
REAȚIILOR ENZIMATICE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o instalație cu ultrasunete destinată studiului reacțiilor enzimatice. Instalația, conform invenției, permite intensificarea transferului de masă la suprafața enzimei imobilizate fără degradarea acesteia, având ca rezultat accelerarea reacției enzimatice și este alcătuită dintr-un reactor cu secțiune circulară, fixat într-un vas mai mare, care conține lichidul de cuplaj/termostatare, prevăzut cu o manta pentru circulația lichidului de termostatare, vasul care conține lichidul de cuplaj având o parte inferioară conică spre interior, pentru a asigura uniformitatea iradierii cu ultrasunete, un dispozitiv de generare a semnalului de atac al sonotrodei, cu posibilitatea de reglare a puterii ultrasonice, o sonotrodă fixată la o distanță prestabilită față de reactor cu ajutorul unui dispozitiv de fixare mecanic, o pompă dozatoare, un vas cu site moleculare, un răcitor și un vas colector. Instalația este flexibilă, permițând modificarea amplitudinii vibraționale a sonotrodei, ciclurilor de tip on/off, temperaturii, poziției sonotrodei și tipului de lichid de cuplare.

Revendicări inițiale: 2

Revendicări amendate: 2

Figuri: 2

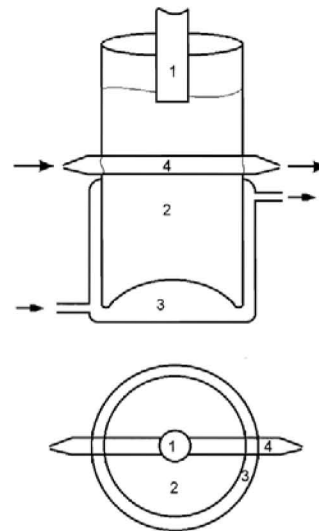
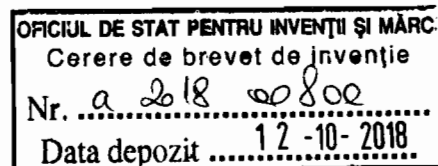


Fig. 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





DESCRIERE

INSTALAȚIE CU ULTRASUNETE DESTINATĂ STUDIULUI REACȚIILOR ENZIMATICE

Invenția se referă la o instalație în care se poate studia efectul ultrasunetelor asupra reacțiilor enzimaticе, în scopul intensificării acestora. Instalația descrisă se poate utiliza la scară de laborator (pentru cercetare) sau industrial (pentru producție).

Scopul invenției este descrierea unei instalații care să permită tratarea cu ultrasunete de putere redusă, în mod perfect controlat (din punct de vedere al energiei ultrasonice transmisă și al uniformității tratamentului) a unei enzime depuse pe suport care să fie utilizată într-o serie de reacții chimice de sinteză a unor compuși organici (de ex. esteri).

Mecanism general de acțiune al ultrasunetelor

Se cunoaște că efectul US asupra reacțiilor chimice nu este rezultatul interacției directe a US cu speciile moleculare [Suslick, "Sonochemistry" *Science* (1990) 247: 1439-1445]. Efectul US poate fi explicat prin două fenomene generate de trecerea ultrasunetelor prin medii lichide, la nivel macroscopic se observă fenomenul de deplasare accelerată a lichidului în zona sonotrodei (acoustic streaming), iar la nivel microscopic se observă cavitațiile care prin colaps pot genera atât temperaturi cât și presiuni foarte mari, dar în volume foarte mici (aprox $7 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^3$) și pentru timpi foarte scurți (0.1-0.5 ms) [Chivate and Pandit, "Quantification of cavitation intensity in fluid bulk" *Ultrasonics Sonochemistry* (1995) 2: S19-S25].

Cavitația acustică implică trei stadii: nucleația, creșterea bulei și implozia acesteia. De regulă tensiunea superficială a lichidului este suficient de mare pentru a împiedica apariția bulei la trecerea sunetului prin apă. În prezența însă a gazelor dizolvate în lichid sau a microparticulelor solide antrenate în lichid, la o intensitate suficient de ridicată și o frecvență potrivită a ultrasunetelor pot apare mici bule în lichid (nucleație).

Creșterea bulelor în mediul lichid implică două procese: difuzia și evaporarea produșilor volatili din faza lichidă în conținutul gazos al bulei (rectified diffusion) și coalescența bulelor.

În prezența ultrasunetelor de intensitate mare o bulă de dimensiuni mici poate crește rapid. Atunci când viteza de creștere este atât de mare încât nu mai are timp să se recomprime la creșterea din nou a presiunii acustice apare implozia. Acest proces are loc atunci când bula cavitațională are o dimensiune rezonantă cu câmpul de ultrasunete (la o frecvență de 20 kHz, în apă, aceasta dimensiune critică este de 170 μm). O astfel de bulă este în fază cu câmpul de ultrasunete și va crește rapid în câteva cicluri acustice, după care apare implozia. Implozia este ca o comprimare adiabată și poate genera local temperaturi și presiuni atât de mari încât se pot forma specii active de tipul radicalilor.

Atunci când bula colapsează în vecinătatea unei particule solide care are o dimensiune mai mare decât dimensiunea critică a bulei (150-200 μm), fenomenul de cavitație este diferit (implozie asimetrică), cea mai mare parte a energiei eliberate în timpul imploziei este

transferată către un microjet de lichid care lovește particula solidă cu viteze ce pot atinge sute de m/s [Wolloch and Kost, "The importance of microjet vs shock wave formation in sonophoresis" *J Control Release* (2010) 148: 204-211]. Acest fenomen sta la baza aplicației ultrasunetelor în curățarea suprafețelor.

La intensități mici de ultrasunete apare o creștere lentă a bulelor. Aceasta creștere este datorată fenomenului de "rectified diffusion" iar creșterea suprafeței bulei este mai mare în timpul expansiunii decât micșorarea suprafeței acesteia în timpul comprimării. În acest fel bula va crește dar nu are loc implozia, bula se va deplasa către suprafața lichidului [Suslick, "Sonochemistry" *Science* (1990) 247: 1439-1445]. Un astfel de fenomen este utilizat în degazarea lichidelor cu ajutorul ultrasunetelor.

Fenomenul de cavitație este dependent de caracteristicile generatorului de US utilizat (forma, frecvența, puterea, amplitudinea, suprafața ce transmite US către lichid) dar și de caracteristicile lichidului în care apare cavitația (densitate, presiune de vapori, tensiune superficială, prezența și tipul gazelor dizolvate, prezența de impurități mecanice, etc.). Este semnalată chiar și influența presiunii exterioare aplicată fazei lichide [Sauter, Emin, Schuchmann and Tavman, "Influence of hydrostatic pressure and sound amplitude on the ultrasound induced dispersion and de-agglomeration of nanoparticles" *Ultrasonics Sonochemistry* (2008) 15: 517-523].

Aplicații generale ale ultrasunetelor

Ultrasunetele au multe aplicații: curățarea suprafețelor (aplicații în reacțiile chimice catalitice), sudura materialelor plastice, activarea și intensificarea reacțiilor chimice, extracții de principii active din plante, diagnoza medicală, tratamente medicale și chiar analize chimice. Ele determină intensificarea proceselor fizice și chimice desfășurate în mediu omogen (îndeosebi prin generarea de specii active radicalice) sau heterogen (îndeosebi prin îmbunătățirea transferului de masă la interfața L/G sau mai ales L/S).

Mecanism de acțiune al US în cazul reacțiilor enzimatic

În ceea ce privește reacțiile enzimatic, efectul US poate fi de inactivare a enzimelor [Chandrapala, Oliver, Kentish and Ashokkumar, "Ultrasonics in food processing – Food quality assurance and food safety" *Trends in Food Science & Technology* (2012) 26: 88-98] (proces folosit îndeosebi în stabilizarea alimentelor) sau de activare a enzimelor.

Inactivarea enzimelor poate fi atribuită procesului de colaps cavitațional care conduce la apariția zonelor restrânse în care apar temperaturi și presiuni mari care determină formarea de specii active. Radicalii liberi OH care se formează atunci când faza lichidă conține apă, sunt cunoscuți pentru potențialul lor redox ridicat și pentru puterea mare de oxidare care face ca reacția lor cu aminoacizii, componenți ai enzimelor să aibă loc foarte rapid [Kadkhodae and Povey, "Ultrasonic inactivation of *Bacillus α-amylase*. I. effect of gas content and emitting face of probe" *Ultrasonics Sonochemistry* (2008) 15: 133-142].

Activarea reacțiilor enzimatic este citată în literatura dar mecanismul prin care aceasta activare are loc nu este pe deplin cunoscut. Este acceptată ipoteza că îmbunătățirea transferului de masa la interfață enzimă-amestec de reacție este datorată ultrasunetelor de

intensitate scăzută și poate fi cauza intensificării reacțiilor enzimatiche [Delgado-Povedano and Luque de Castro, "A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship" *Analytica Chimica Acta* (2015) 889: 1-21], [Khan and Rathod, "Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review" *Process Biochemistry* (2015) 50: 1793-1806]. Mai este citată în literatură, o ipoteză referitoare la schimbarea structurii conformaționale a enzimei pentru a îmbunătăți accesul reactanților la centrul activ [Berezin, Klivanov, Klyosov, Martinek and Svedas, "The effect of ultrasound as a new method of studying conformational transitions in enzyme active sites" *FEBS Letters* (1975) 49: 325-328]. Efectul de dezactivare a enzimelor este minimizat atunci când se folosesc enzime imobilizate pe suport [Delgado-Povedano and Luque de Castro, "A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship" *Analytica Chimica Acta* (2015) 889: 1-21].

Concluzia datelor de literatură existente este aceea că reacțiile enzimatiche pot fi intensificate de ultrasunetele de putere mică, capabile să crească transferul de masă la interfața enzimă-amestec de reacție dar care nu generează cavitații importante ce ar produce radicali liberi, potențial dăunători pentru enzime.

Reactoare ce pot fi utilizate pentru studierea proceselor fizico-chimice intensificate de US

Cele mai răspândite tipuri de reactoare ce pot fi utilizate pentru intensificarea reacțiilor chimice sau enzimatiche citate în literatură [Gogate, Sutkar and Pandit, "Sonochemical reactors: Important design and scale up considerations with a special emphasis on heterogeneous systems" *Chemical Engineering Journal* (2011) 166: 1066-1082], [Delgado-Povedano and Luque de Castro, "A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship" *Analytica Chimica Acta* (2015) 889: 1-21], [Khan and Rathod, "Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review" *Process Biochemistry* (2015) 50: 1793-1806] sunt cele care utilizează o sonotrodă direct introdusă în vasul de reacție (tip 1), cele care utilizează o baie de ultrasunete în care are loc reacția (tip 2) sau în care este plasat reactorul în care are loc reacția (tip 3), precum și dispozitive mai noi cum ar fi: celula de reacție cu două frecvențe de ultrasunete ('Dual Frequency reaction cell') (tip 4) sau reactor tubular de ultrasunete ('Clamp-on') (tip 5).

Fiecare dintre aceste tipuri de reactoare are limitări importante în ceea ce privește activarea reacțiilor enzimatiche. În reactoarele de tipul 1, 4 și 5 principalul inconvenient este distribuția profund neuniformă a câmpului de ultrasunete [Chivate and Pandit, "Quantification of cavitation intensity in fluid bulk" *Ultrasonics Sonochemistry* (1995) 2: S19-S25] ceea ce va determina apariția fenomenului de cavitație în imediata vecinătate a sonotrodei (tip 1) sau a suprafeței vibrante (tip 4 și 5), iar cavitația intensă produce radicali liberi care apoi dezactivează rapid enzima. În baia de ultrasunete (reactoare tip 2 și 3) este dificil să reglezi puterea de ultrasunete, amplitudinea acestora sau să măsoară energia ultrasunetelor efectiv transmisă către reactorul în care are loc reacția enzimatică propriu-zisă.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este realizarea unei instalații destinată studiului influenței ultrasunetelor asupra reacțiilor enzimatiche. În această instalație

ultrasunetele determină intensificarea transferului de masă la suprafața enzimei imobilizate fără degradarea acesteia. Rezultatul direct fiind accelerarea reacției enzimaticice.

Descrierea instalației pentru studierea influenței ultrasunetelor asupra reacțiilor enzimaticice

Se prezintă în continuare date și exemple de realizare a invenției în legatură cu figurile 1 și 2 ce reprezintă:

- Fig. 1 Instalație cu ultrasunete destinată studiului reacțiilor enzimaticice (1 – sonotroda; 2 lichid de cuplaj; 3 lichid termostatare; 4 reactor);
- Fig. 2 Schema de funcționare a reactorului ‘în buclă’ (1 reactor; 2 vas cu site moleculare pentru reținerea apei; 3 răcitor; 4 vas tampon; 5 pompa dozatoare; 6 prelevare probe)

Instalația propusă de noi și descrisă în figura 1 are următoarele caracteristici:

- Poate fi utilizată pentru studierea unor reacții catalizate de enzime depuse pe suport;
- Reactorul funcționează în mod continuu prin trecerea amestecului de reacție prin stratul de enzimă depusă pe suport ;
- Dacă timpul de reacție necesar conversiei dorite este mai lung decât timpul de staționare al amestecului de reacție în reactor, atunci se poate utiliza un sistem în buclă (vezi fig. 2) ;
- Reactorul este termostatat și iradiat cu ultrasunete pentru intensificarea reacției enzimaticice;
- Iradierea cu ultrasunete se realizează prin intermediul unui lichid de cuplaj. Caracteristicile lichidului (tensiunea superficială, presiunea de vapori, vâscozitatea) precum și temperatura la care este termostatat determină transferul ultrasunetelor de la sonotrodă la reactor;
- Drept sursă de ultrasunete se folosește un dispozitiv de tip sonotrodă alimentat de la un generator de ultrasunete ce permite controlul foarte fin al tratării cu ultrasunete prin modificarea amplitudinii, astfel se poate regla puterea efectiv transmisă către lichidul de cuplare și implicit în vasul de reacție;
- Prin ajustarea poziției sonotrodei față de reactor se poate regla puterea de US efectiv introdusă în vasul de reacție;
- Prin forma caracteristică a părții de jos a vasului care conține lichidul de cuplare/termostatare se asigură reflectarea undelor ultrasonore având ca efect uniformizarea tratării cu US a reactorului, pe toata lungimea lui;
- Prin modificarea tipului de lichid de cuplare utilizat se poate regla efectul US în reactor;
- Prin existența unei mantale de răcire-termostatare se poate menține constantă temperatura atât în vasul de reacție cât și în vasul care conține lichidul de cuplare, ceea ce permite tratarea cu US pe perioade lungi de timp cu aceeași intensitate și uniformitate.

Pentru demonstrarea calităților acestei instalații s-au efectuat experimentări prin care s-au evidențiat intensificarea transferului de masă, degradarea unor compuși organici datorită speciilor active generate de ultrasunete precum și efectul ultrasunetelor asupra unor reacții de esterificare catalizate de enzime.

Exemplul 1

Pentru studierea intensificării transferului de masa în reactor, s-a ales un model format din o sare colorată și un solvent în care sarea are o solubilitate limitată la temperatura de testare. Domeniul de temperatura a fost astfel ales încât să corespundă și cu temperatura la care se studiază și reacția de esterificare.

Drept sare s-a ales sulfatul de nichel hidratat (culoare verde), iar drept solvent un amestec apa-etanol 50%. În reactor s-a adăugat o cantitate de sare și de solvent astfel determinată încât, în condiții optime să se dizolve cam 25-30% din sare în solvent. Concentrația de sare dizolvată a fost determinată colorimetric, după terminarea tratamentului cu ultrasunete. Toate determinările au fost efectuate în triplicat și s-a efectuat și un experiment în care sarea s-a dizolvat natural, fără influența ultrasunetelor.

Influența temperaturii și a distanței dintre sonotroda și reactor este prezentată în tabelul 1. După cum se observă din analiza acestor date, odată cu creșterea temperaturii procesul de dizolvare naturală a sării are loc cu o viteză ușor mai mare. În experimentările în care s-au utilizat și ultrasunete viteza de dizolvare a sării este sensibil mai mare decât în procesul convențional, demonstrând influența ultrasunetelor asupra transferului de masă. Cantitatea de sare dizolvată este dependentă de distanța dintre sonotroda și reactor și de temperatură.

Rezultatele din tabelul 1 indică faptul că există o temperatură optimă la care sarea se dizolvă în cantitatea cea mai mare. Acest fapt este în concordanță cu datele de literatură care indică faptul că efectul ultrasunetelor în apă (apa este folosită drept lichid de cuplaj) scade când temperatura depășește o anumită valoare [Mason, Lorimer and Bates, "Quantifying sonochemistry: Casting some light on a 'black art'" *Ultrasonics* (1992) 30: 40-42].

Tabelul 1 Concentrația sulfatului de Ni dizolvat la diverse temperaturi: dizolvare naturală (convențională) și cu ultrasunete (sonda de sonicare la 3.5 cm respectiv 4.5 cm distanță de reactor), 20% amplitudine, putere de US de 7W, 3 on/3 off, timp de 30 min.

Temperatura, (°C)	Concentrația sulfatului de Ni dizolvat (g / L)		
	Dizolvare naturală	Dizolvare cu tratament de ultrasunete, la diferite distante ale sonotrodei față de reactor	
		3.5 cm	4.5 cm
30	91.4 ± 0.4	102.0 ± 1.3	111.2 ± 1.6
40	101.9 ± 0.4	114.7 ± 0.8	125.2 ± 1.2
50	103.0 ± 0.2	134.5 ± 1.4	164.9 ± 1.5
55	103.2 ± 1.4	142.6 ± 0.5	153.3 ± 0.9
60	103.9 ± 0.7	125.5 ± 0.8	126.8 ± 0.4

Pentru stabilirea mai exactă a influenței distanței dintre sonotrodă și reactor asupra intensificării transferului de masa, au mai fost efectuate un set de experimentări în care a fost

utilizată aceeași temperatură, același timp și aceeași putere de ultrasunete, modificându-se doar distanța dintre sonotroda și reactor. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2 Concentrația sulfatului de Ni dizolvat, după aplicarea ultrasunetelor, cu sonda de sonicare la diferite distanțe de reactor, la 50°C, 20% Ampl., 3 on/3 off, timp de 30 de min.

Distanța sonotroda – reactor (cm)	Concentrația sulfatului de Ni dizolvat (g / L)
2.2	103.9 ± 0.8
2.5	109.4 ± 1.4
3	123.9 ± 0.5
3.5	133.8 ± 1.4
4	151.4 ± 0.2
4.5	165.1 ± 0.5
5	175.5 ± 0.2
6	166.3 ± 0.8

Intensificarea transferului de masa la interfața cristale solide – solvent poate fi explicată prin forțele de forfecare ('shear waves') ce apar la interfața lichid-solid atunci când undele sonore longitudinale ajung la aceasta interfața [Dukhin and Goetz, "Fundamentals of Acoustics in Homogeneous Liquids" *Characterization of Liquids, Dispersions, Emulsions, and Porous Materials Using Ultrasound (Third Edition) (2017): 85-118*]. Acest fenomen duce la reînnoirea suprafeței de contact dintre faza lichidă și solid, prin transportul convectiv al unor elemente de fluid din masa acestuia la interfața.

Undele sonore longitudinale au o atenuare foarte scăzută în apă (folosită drept lichid de cuplaj), la 20 kHz, factorul de atenuare este de doar 0.04 dB/cm/MHz [Dukhin and Goetz, "Fundamentals of Acoustics in Homogeneous Liquids" *Characterization of Liquids, Dispersions, Emulsions, and Porous Materials Using Ultrasound (Third Edition) (2017): 85-118*]. Datorită acestui fapt adâncimea de pătrundere este de aproximativ 1000 m ceea ce face că pentru distanțele foarte scurte dintre sonotrodă și reactor atenuarea undelor sonore longitudinale să fie practic nulă. Creșterea eficienței de dizolvare a sării în solvent (respectiv un transfer de masa mai bun), odată cu creșterea distanței dintre sonotroda și reactor este datorată geometriei instalației ce conferă o uniformitate mai bună a iradierii ultrasonice.

Exemplul 2

Pentru cuantificarea speciilor active generate de ultrasunete s-a ales drept model degradarea p-nitro fenolului la p-nitro catehol. Atât în reactor cât și drept lichid de cuplaj s-a utilizat aceeași soluție diluată de p-nitrofenol ($5.6 \cdot 10^{-6}$ g/mL in apa). Degradarea p-nitrofenolului s-a urmărit prin spectrometrie în UV-VIS , la 401 nm.

În tabelul 3 sunt prezentate rezultatele obținute la tratarea cu US , 20% Ampl, 3on/3off și o energie de 107 J (timp 15 s). Se poate observa că efectul ultrasunetelor este mai mic în reactor decât în lichidul de cuplaj și ca acest efect scade odată cu creșterea distanței dintre sonotrodă și reactor. Acest fapt este coerent cu datele de literatură care indică o scădere abruptă a intensității efectelor de cavitație odată cu creșterea distanței față de sonotrodă

[Chivate and Pandit, "Quantification of cavitation intensity in fluid bulk" *Ultrasonics Sonochemistry* (1995) 2: S19-S25].

Tabelul 3 Eficiența degradării 4-nitrofenolului în funcție de distanța dintre sonotrodă și reactor în reactor și în lichidul de cuplaj, la 50°C, cu o energie de ultrasunete de 107 J (20% Ampl, 3on/3off).

Distanța sonotrodă – reactor (cm)	Eficiența degradării <i>p</i> -nitrofenolului (%)	
	În reactor	În lichidul de cuplaj
2.2	27.8 ± 0.12	29.5 ± 0.13
2.5	23.7 ± 0.04	28.5 ± 0.06
3	19.6 ± 0.07	24.7 ± 0.05
3.5	13.0 ± 0.04	19.2 ± 0.07
4.5	1.6 ± 0.01	10.8 ± 0.03

În alt set de experiențe, s-a utilizat în loc de apă, o soluție de 50% etanol în apă, păstrându-se aceeași concentrație de *p*-nitrofenol. Deoarece soluția de etanol are o presiune de vapori mai mare decât apa și o tensiune superficială mai mică, fenomenul de cavitație apare mai ușor în lichidul de cuplaj, dar datorită faptului că etanolul intra mai ușor în bula cavitațională energia ultrasunetelor se consumă (efect de amortizare – ‘cushioning effect’) mai rapid, iar efectul acestora în reactor este mai slab (vezi tabelul 4).

Tabelul 4 Eficiența degradării 4-nitrofenolului funcție de energia de US transmisă și de tipul de solvent: apă sau o soluție 50% alcool etilic-apă (20% Amplitudine, putere de US=7W, 3on/3off, la 50°C).

Energie US (J)	Eficiența degradării <i>p</i> -nitrofenolului (%)			
	Apă		Soluție 50% etanol în apa	
	Reactor	Lichid de cuplaj	Reactor	Lichid de cuplaj
107	15.7 ± 0.05	17.7 ± 0.06	2.3 ± 0.04	18.5 ± 0.12
161	19.4 ± 0.01	21.1 ± 0.04	6.5 ± 0.02	22.6 ± 0.06

Exemplul 3

Pentru a pune în evidența efectul ultrasunetelor asupra unei reacții de esterificare enzimatică s-au efectuat un set de experimentări în care s-a studiat reacția de esterificare dintre acidul acetic și alcoolul *i*-amilic (raport molar 1:2) în prezența unei enzime de tip lipază (*Mucor miehei*) imobilizată pe un suport macroporos de rășină schimbătoare de ioni anionică (Lipozyme 435 de la Novozymes). Pentru a deplasa echilibrul către obținerea esterului s-a utilizat un sistem de reactor în ‘bucla’ în care amestecul de reacție circulă în continuu prin reactor, un vas cu site moleculare pentru reținerea apei un răcitor și vasul tampon [Azocar, Navia, Beroiz, Jeison and Ciudad, "Enzymatic biodiesel production kinetics using co-solvent and an anhydrous medium: a strategy to improve lipase performance in a semi-continuous reactor" *N Biotechnol* (2014) 31: 422-429]. S-a utilizat o cantitate de enzimă de 0.047 g pe gramul de amestec de reacție. Iradierea cu US s-a efectuat la o amplitudine de 20 % (7 W) în ciclul de operare 3 on / 3 off cu utilizarea apei drept lichid de cuplaj. Probele au fost prelevate

după 1 sau 2 h și analizate cromatografic pentru determinarea concentrației de ester. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 5. Se poate observa că pe domeniul de temperatură studiat, efectul ultrasunetelor a fost deosebit de important. După o oră concentrația de ester a fost cu 76% mai mare decât cea obținută convențional la 30°C; cu 103% mai mare la 40°C și cu 70% mai mare la 50°C. După 2 h concentrația de ester obținută la tratamentul cu US continuă să fie mai mare decât cea obținută la convențional, dar diferențele sunt ceva mai mici deoarece concentrația obținută se apropie de concentrația la conversie totală, respectiv cu 51% mai mare la 30°C, cu 28% mai mare la 40°C și cu 6% mai mare la 50°C.

Tabelul 5 Evoluția concentrației de ester în timp, la diferite temperaturi, iradiere cu US vs convențional. Raport molar alcool amilic: acid acetic 1:2, viteza de curgere amestec reacție prin reactor 0.16 ml / min, încărcare enzimă 0.047 g enzimă/g amestec reacție, ultrasunete: amplitudine 20% puls: 3on/3off, distanța sonotroda-reactor 4.5cm. Concentrație maximă ester 560 mg/g.

Condiții reacție: temp. / tip tratament →	Concentrație ester (mg/g)					
	30 °C		40 °C		50 °C	
	US	conv.	US	conv.	US	conv.
Timp reacție (h) ↓						
1	132.9 ± 0.4	75.3 ± 0.7	203.5 ± 0.5	100.2 ± 0.5	374.8 ± 0.6	220.4 ± 1.0
2	278.7 ± 0.8	184.7 ± 0.4	383.5 ± 0.9	299.7 ± 0.8	472.9 ± 0.4	447.1 ± 0.9

REVEDICARI

1. Instalația cu ultrasunete destinată studiului reacțiilor enzimatice este alcătuită din:
 - Un reactor cu secțiune circulară, fixat într-un vas mai mare care conține lichidul de cuplaj / termostatare și care este prevăzut cu manta pentru circulația lichidului de termostatare (vezi fig. 1);
 - Vasul care conține lichidul de cuplaj are partea de jos conică înspre interior pentru a asigura uniformitatea iradierii cu ultrasunete
 - Un dispozitiv de generare a US, cu posibilitatea de reglare a puterii ultrasonice și sonotroda pentru transmiterea ultrasunetelor în lichidul de cuplaj;
 - Dispozitiv de fixare mecanică a sonotrodei la o distanță prestabilită față de reactor;
2. Cu ajutorul acestei instalații flexibile se poate modifica ușor iradierea cu ultrasunete a reactorului prin următoarele ajustări :
 - Prin modificarea amplitudinii generatorului de ultrasunete;
 - Prin modificarea ciclurilor de tip on/off;
 - Prin modificarea temperaturii la care este termostatat atât reactorul cât și lichidul de cuplaj;
 - Prin modificarea poziției sonotrodei față de reactor;
 - Prin modificarea tipului de lichid de cuplare.

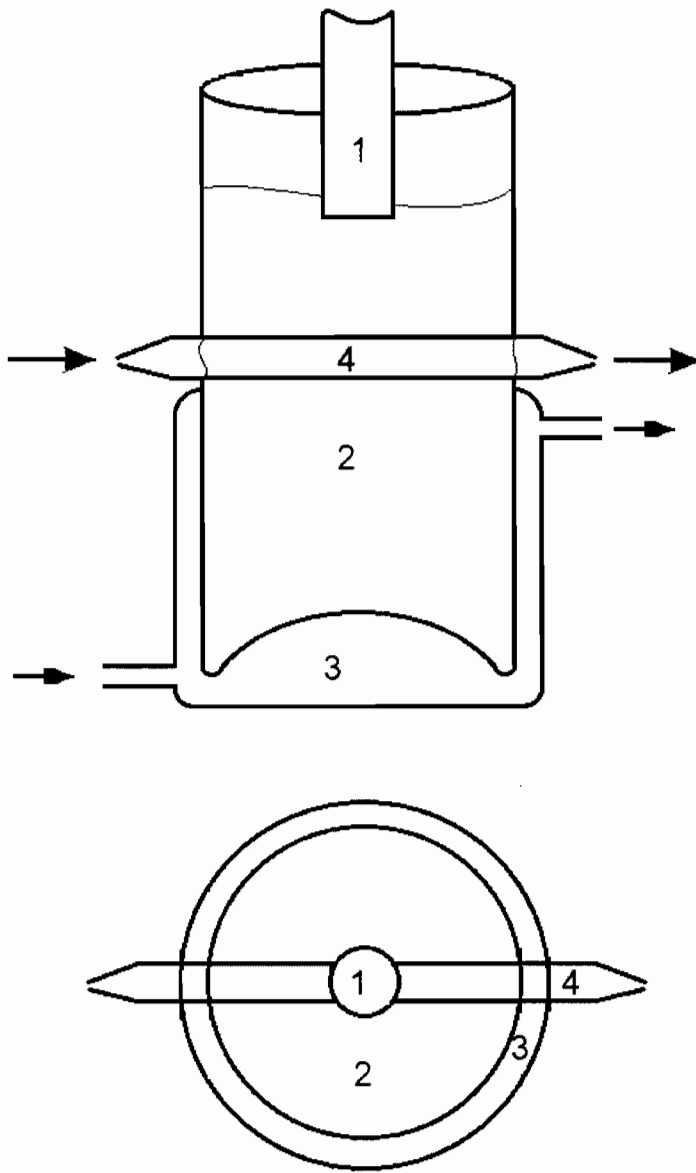


Figura 1

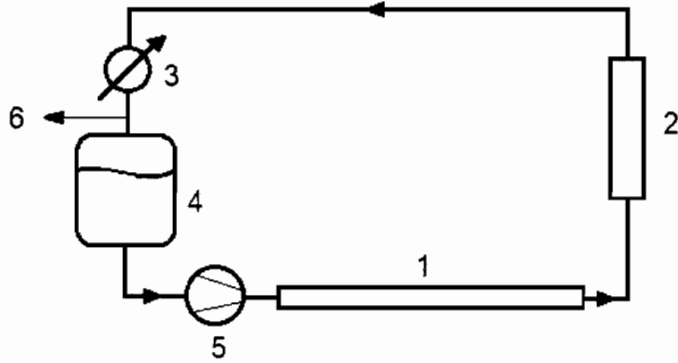


Figura 2

DESCRIERE

INSTALAȚIE CU ULTRASUNETE DESTINATĂ STUDIULUI REACȚIILOR ENZIMATICE

Invenția se referă la o instalație în care se poate studia efectul ultrasunetelor asupra reacțiilor enzimaticе, în scopul intensificării acestora. Instalația descrisă se poate utiliza la scară de laborator (pentru cercetare) sau industrial (pentru producție).

Scopul invenției este descrierea unei instalații care să permită tratarea cu ultrasunete de putere redusă, în mod perfect controlat (din punct de vedere al energiei ultrasonice transmisă și al uniformității tratamentului) a unei enzime depuse pe suport care să fie utilizată într-o serie de reacții chimice de sinteză a unor compuși organici (de ex. esteri).

Mecanism general de acțiune al ultrasunetelor

Se cunoaște că efectul US asupra reacțiilor chimice nu este rezultatul interacției directe a US cu speciile moleculare [Suslick, "Sonochemistry" *Science* (1990) 247: 1439-1445]. Efectul US poate fi explicat prin două fenomene generate de trecerea ultrasunetelor prin medii lichide, la nivel macroscopic se observă fenomenul de deplasare accelerată a lichidului în zona sonotrodei (acoustic streaming), iar la nivel microscopic se observă cavitațiile care prin colaps pot genera atât temperaturi cât și presiuni foarte mari, dar în volume foarte mici (aprox $7 \cdot 10^{-6}$ mm³) și pentru timpi foarte scurți (0.1-0.5 ms) [Chivate and Pandit, "Quantification of cavitation intensity in fluid bulk" *Ultrasonics Sonochemistry* (1995) 2: S19-S25].

Cavitația acustică implică trei stadii: nucleația, creșterea bulei și implozia acesteia. De regulă tensiunea superficială a lichidului este suficient de mare pentru a împiedica apariția bulei la trecerea sunetului prin apă. În prezența însă a gazelor dizolvate în lichid sau a micro-particulelor solide antrenate în lichid, la o intensitate suficient de ridicată și o frecvență potrivită a ultrasunetelor pot apare mici bule în lichid (nucleație).

Creșterea bulelor în mediul lichid implică două procese: difuzia și evaporarea produșilor volatili din faza lichidă în conținutul gazos al bulei (rectified diffusion) și coalescența bulelor.

În prezența ultrasunetelor de intensitate mare o bulă de dimensiuni mici poate crește rapid. Atunci când viteza de creștere este atât de mare încât nu mai are timp să se recomprime la creșterea din nou a presiunii acustice apare implozia. Acest proces are loc atunci când bula cavitațională are o dimensiune rezonantă cu câmpul de ultrasunete (la o frecvență de 20 kHz, în apă, aceasta dimensiune critică este de 170 μm). O astfel de bulă este în fază cu câmpul de ultrasunete și va crește rapid în câteva cicluri acustice, după care apare implozia. Implozia este ca o comprimare adiabată și poate genera local temperaturi și presiuni atât de mari încât se pot forma specii active de tipul radicalilor.

Atunci când bula colapsează în vecinătatea unei particule solide care are o dimensiune mai mare decât dimensiunea critică a bulei (150-200 μm), fenomenul de

cavitație este diferit (implozie asimetrică), cea mai mare parte a energiei eliberate în timpul imploziei este transferată către un microjet de lichid care lovește particula solidă cu viteze ce pot atinge sute de m/s [Wolloch and Kost, "The importance of microjet vs shock wave formation in sonophoresis" *J Control Release* (2010) 148: 204-211]. Acest fenomen sta la baza aplicației ultrasunetelor în curățarea suprafețelor.

La intensități mici de ultrasunete apare o creștere lentă a bulelor. Aceasta creștere este datorată fenomenului de "rectified diffusion" iar creșterea suprafeței bulei este mai mare în timpul expansiunii decât micșorarea suprafeței acesteia în timpul comprimării. În acest fel bula va crește dar nu are loc implozia, bula se va deplasa către suprafața lichidului [Suslick, "Sonochemistry" *Science* (1990) 247: 1439-1445]. Un astfel de fenomen este utilizat în degazarea lichidelor cu ajutorul ultrasunetelor.

Fenomenul de cavitație este dependent de caracteristicile generatorului de US utilizat (forma, frecvența, puterea, amplitudinea, suprafața ce transmite US către lichid) dar și de caracteristicile lichidului în care apare cavitația (densitate, presiune de vapori, tensiune superficială, prezența și tipul gazelor dizolvate, prezența de impurități mecanice, etc.). Este semnalată chiar și influența presiunii exterioare aplicată fazei lichide [Sauter, Emin, Schuchmann and Tavman, "Influence of hydrostatic pressure and sound amplitude on the ultrasound induced dispersion and de-agglomeration of nanoparticles" *Ultrasonics Sonochemistry* (2008) 15: 517-523].

Aplicații generale ale ultrasunetelor

Ultrasunetele au multe aplicații: curățarea suprafețelor (aplicații în reacțiile chimice catalitice), sudura materialelor plastice, activarea și intensificarea reacțiilor chimice, extracții de principii active din plante, diagnoza medicală, tratamente medicale și chiar analize chimice. Ele determină intensificarea proceselor fizice și chimice desfășurate în mediu omogen (îndeosebi prin generarea de specii active radicalice) sau heterogen (îndeosebi prin îmbunătățirea transferului de masă la interfața L/G sau mai ales L/S).

Mecanism de acțiune al US în cazul reacțiilor enzimatiche

În ceea ce privește reacțiile enzimatiche, efectul US poate fi de inactivare a enzimelor [Chandrapala, Oliver, Kentish and Ashokkumar, "Ultrasonics in food processing – Food quality assurance and food safety" *Trends in Food Science & Technology* (2012) 26: 88-98] (proces folosit îndeosebi în stabilizarea alimentelor) sau de activare a enzimelor.

Inactivarea enzimelor poate fi atribuită procesului de colaps cavitațional care conduce la apariția zonelor restrânse în care apar temperaturi și presiuni mari care determină formarea de specii active. Radicalii liberi OH care se formează atunci când faza lichidă conține apă, sunt cunoscuți pentru potențialul lor redox ridicat și pentru puterea mare de oxidare care face ca reacția lor cu aminoacizii, componenți ai enzimelor să aibă loc foarte rapid [Kadkhodae and Povey, "Ultrasonic inactivation of *Bacillus α-amylase*. I. effect of gas content and emitting face of probe" *Ultrasonics Sonochemistry* (2008) 15: 133-142].

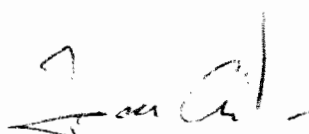
Activarea reacțiilor enzimatică este citată în literatura dar mecanismul prin care aceasta activare are loc nu este pe deplin cunoscut. Este acceptată ipoteza că îmbunătățirea transferului de masă la interfață enzimă-amestec de reacție este datorată ultrasunetelor de intensitate scăzută și poate fi cauza intensificării reacțiilor enzimatică [Delgado-Povedano and Luque de Castro, "A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship" *Analytica Chimica Acta* (2015) 889: 1-21], [Khan and Rathod, "Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review" *Process Biochemistry* (2015) 50: 1793-1806]. Mai este citată în literatură, o ipoteză referitoare la schimbarea structurii conformaționale a enzimei pentru a îmbunătăți accesul reactanților la centrul activ [Berezin, Klivanov, Klyosov, Martinek and Svedas, "The effect of ultrasound as a new method of studying conformational transitions in enzyme active sites" *FEBS Letters* (1975) 49: 325-328]. Efectul de dezactivare a enzimelor este minimizat atunci când se folosesc enzime imobilizate pe suport [Delgado-Povedano and Luque de Castro, "A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship" *Analytica Chimica Acta* (2015) 889: 1-21].

Concluzia datelor de literatură existente este aceea că reacțiile enzimatică pot fi intensificate de ultrasunetele de putere mică, capabile să crească transferul de masă la interfața enzimă-amestec de reacție dar care nu generează cavitații importante ce ar produce radicali liberi, potențial dăunători pentru enzime.

Reactoare ce pot fi utilizate pentru studierea proceselor fizico-chimice intensificate de US

Cele mai răspândite tipuri de reactoare ce pot fi utilizate pentru intensificarea reacțiilor chimice sau enzimatică citate în literatură [Gogate, Sutkar and Pandit, "Sonochemical reactors: Important design and scale up considerations with a special emphasis on heterogeneous systems" *Chemical Engineering Journal* (2011) 166: 1066-1082], [Delgado-Povedano and Luque de Castro, "A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship" *Analytica Chimica Acta* (2015) 889: 1-21], [Khan and Rathod, "Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review" *Process Biochemistry* (2015) 50: 1793-1806] sunt cele care utilizează o sonotrodă direct introdusă în vasul de reacție (tip 1), cele care utilizează o baie de ultrasunete în care are loc reacția (tip 2) sau în care este plasat reactorul în care are loc reacția (tip 3), precum și dispozitive mai noi cum ar fi: celula de reacție cu două frecvențe de ultrasunete ('Dual Frequency reaction cell') (tip 4) sau reactor tubular de ultrasunete ('Clamp-on') (tip 5).

Fiecare dintre aceste tipuri de reactoare are limitări importante în ceea ce privește activarea reacțiilor enzimatică. În reactoarele de tipul 1, 4 și 5 principalul inconvenient este distribuția profund neuniformă a câmpului de ultrasunete [Chivate and Pandit, "Quantification of cavitation intensity in fluid bulk" *Ultrasonics Sonochemistry* (1995) 2: S19-S25] ceea ce va determina apariția fenomenului de cavitație în imediată vecinătate a sonotrodei (tip 1) sau a suprafeței vibrante (tip 4 și 5), iar cavitația intensă produce radicali liberi care apoi dezactivează rapid enzima. În baia de ultrasunete (reactoare tip 2 și 3) este dificil să reglezi puterea de ultrasunete, amplitudinea acestora sau să măsoară energia ultrasunetelor efectiv transmisă către reactorul în care are loc reacția enzimatică propriu-zisă.



Prezidenția tehnică pe care o rezolvă invenția este intensificarea reacției chimice la suprafața enzimelor immobilizate fără degradarea acestora. **Rezultatul direct fiind accelerarea reacției enzimatice.**

Descrierea instalației pentru studierea influenței ultrasunetelor asupra reacțiilor enzimatice

Se prezintă în continuare date și exemple de realizare a invenției în legătură cu figurile 1 și 2.

Figura 1 reprezintă schița reactorului termostatat. Reactorul este generat de un corp cilindric din sticlă cu o înălțime de 1-2 cm și un diametru de 1-2 cm care conține enzima immobilizată pe suport și substratul de reacție. Corpul cilindric este prevăzut cu un fund steric orientat în direcția reacției cu ultrasunete (pentru dispersia cât mai uniformă a ultrasunetelor și a substratului de reacție). Acest corp cilindric conține lichidul de cupiaj (2) care permite transferul energiei ultrasunetelor de la sonotrodă (1) către reactorul (4). Lichidul de cupiaj poate să fie sau un alt lichid capabil să transfere energia de ultrasunete. Proprietățile fizice (tensiunea superficială, presiunea de vapor, vâscozitatea) precum și temperatura (care este termostatată) determină transferul ultrasunetelor de la sonotrodă la reactor. Temperatura de termostatare este necesară pentru menținerea temperaturii optime de reacție a reactorului, deoarece în timpul tratamentului cu ultrasunete lichidul de cupiaj se încălzește.

Figura 2 reprezintă schița de ansamblu a instalației cu ultrasunete destinate studiului reacțiilor enzimatice. Aceasta cuprinde următoarele componente: reactorul (4) prin care circulă în mod continuu amestecul de reacție cu ajutorul unei pompe (5) și al unui vas de cupiaj (8). La ieșirea din reactor amestecul de reacție trece prin vasul cu sifon (6) unde are loc răcirrea/încălzirea și deplasarea echilibrului reacției de esterificare în direcția dorită. Amestecul de reacție trece printr-un răcor (7) și ajunge în vasul de colectare (3) unde există o zonă existentă și posibilitatea prelevării probelor (9), pentru a determina concentrația de produs. Instalația conține o inovație structurală și funcțională față de instalațiile existente cu ultrasunete. Caracterul inovativ al instalației (descrisă în figura 1), constă în:

Complexitatea structurală și funcțională care permite studierea și catalizarea studiului reacțiilor catalizate de enzime depuse pe suport prin tratamentul cu ultrasunete.

- Reactorul funcționează în mod continuu prin trecerea amestecului de reacție prin stratul de enzimă depusă pe suport;
- Dacă timpul de reacție necesar conversiei dorite este mai lung, lichidul de reacție este de stăruire al amestecului de reacție în reactor, prin ce se poate realiza un sistem în buclă (vezi fig. 2);
- Prin forma caracteristică a părții de jos a vasului care are rolul de cupiaj/termostatare se asigură reflectarea undelor ultrasunetelor și astfel efectul uniformizării tratării cu US a reactorului, pe toată lungimea acestuia;
- Prin existența unei mantale de răcire/termostatare se poate realiza o temperatură constantă în vasul de reacție cât și în cupiajul de cupiaj.

[Signature]

sondă de cuplare, ceea ce permite tratarea cu ultrasunete pe o suprafață de timp cu aceeași intensitate și uniformitate.

7.3.3.3.3. Războiitatea structurală și funcțională prin:

Prin drept sursă de ultrasunete se folosește un dispozitiv de ultrasunete alimentat de la un generator de ultrasunete ce permite controlul și tratării cu ultrasunete prin modificarea amplitudinii, astfel încât puterea efectiv transmisă către lichidul de cuplare și vasul de reacție.

Prin ajustarea poziției sonotrodei față de reactor se poate realiza ultrasonică efectiv introdusă în vasul de reacție.

Iradieră cu ultrasunete se realizează prin introducerea sonda în lichid. Caracteristicile lichidului (tensiunea superficială, presiunea, viscozitatea) precum și temperatura la care este folosită influențează transferul ultrasunetelor de la sonotrodă la reactor.

Prin modificarea tipului de lichid de cuplare utilizat se poate realiza și ultrasunetelor în reactor;

Pentru utilizarea acestei instalații în vederea studierii reacțiilor chimice, trebuie să urmeze următoarele etape:

Etapa 1: Determinarea condițiilor optime de tratare cu ultrasunete în vederea urmării maximizării intensificării transferului de masă în reactor și minimizarea formării de specii radicalice active care ar putea denatura enzimele. Condiții optime sunt date de puterea de ultrasunete utilizată, de distanța dintre sonotrodă și reactor dar sunt dependente și de natura și temperatura lichidului de cuplare.

Pentru urmărirea intensificării transferului de masă cu ajutorul ultrasunetelor, adăuga în reactor o sare colorată (pentru a se putea determina coloranții din sare dizolvată) sub formă de cristale cu dimensiuni apropiate de cele ale sonotrodei și se fac experimentări cu modificarea distanței dintre sonotrodă și reactor.

Pentru a se determina formarea de specii radicalice active se poate realiza transformarea unui compus (4-nitrofenol) sub influența ultrasunetelor. Acest compus migrează într-un solvent care circulează prin reactor, dar este utilizat și ca sursă de radicali. Condițiile de tratare cu ultrasunete se aleg în așa fel încât degradarea compusului să fie minimă.

Etapa 2: Studiul reacțiilor enzimice. Doar după ce au fost determinate condițiile optime de utilizare ale ultrasunetelor pentru maximizarea transferului de masă și minimizarea formării de specii active ce pot degrada enzima, se poate face studierea reacțiilor enzimice activate de ultrasunete. În acest scop se va încălca reactorul cu o cantitate de enzimă pe suport și vasul tampon cu amestecul de reactanți. După știmul ultrasunetelor dozate se iau probe la intervale de timp prestabilite pentru urmărirea reacției.

Pentru demonstrarea calităților acestei instalații s-au efectuat experimentări prin care s-au evidențiat intensificarea transferului de masă, degradarea unor compuși organici datorită speciilor active generate de ultrasunete precum și efectul ultrasunetelor asupra unor reacții de esterificare catalizate de enzime.

Exemplul 1

Pentru studierea intensificării transferului de masă în reactor, s-a ales un model format din o sare colorată și un solvent în care sarea are o solubilitate limitată la temperatura de testare. Domeniul de temperatura a fost astfel ales încât să corespundă și cu temperatura la care se studiază și reacția de esterificare.

Drept sare s-a ales sulfatul de nichel hidratat (culoare verde), iar drept solvent un amestec apa-etanol 50%. În reactor s-a adăugat o cantitate de sare și de solvent astfel determinată încât, în condiții optime să se dizolve cam 25-30% din sare în solvent. Concentrația de sare dizolvată a fost determinată colorimetric, după terminarea tratamentului cu ultrasunete. Toate determinările au fost efectuate în triplicat și s-a efectuat și un experiment în care sarea s-a dizolvat natural, fără influența ultrasunetelor.

Influența temperaturii și a distanței dintre sonotroda și reactor este prezentată în tabelul 1. După cum se observă din analiza acestor date, odată cu creșterea temperaturii procesul de dizolvare naturală a sării are loc cu o viteză ușor mai mare. În experimentările în care s-au utilizat și ultrasunete viteza de dizolvare a sării este sensibil mai mare decât în procesul convențional, demonstrând influența ultrasunetelor asupra transferului de masă. Cantitatea de sare dizolvată este dependentă de distanța dintre sonotroda și reactor și de temperatură.

Rezultatele din tabelul 1 indică faptul că există o temperatură optimă la care sarea se dizolvă în cantitatea cea mai mare. Acest fapt este în concordanță cu datele de literatură care indică faptul că efectul ultrasunetelor în apă (apa este folosită drept lichid de cuplaj) scade când temperatura depășește o anumită valoare [Mason, Lorimer and Bates, "Quantifying sonochemistry: Casting some light on a 'black art'" *Ultrasonics* (1992) 30: 40-42].

Tabelul 1 Concentrația sulfatului de Ni dizolvat la diverse temperaturi: dizolvare naturală (convențională) și cu ultrasunete (sonda de sonicare la 3.5 cm respectiv 4.5 cm distanță de reactor), 20% amplitudine, putere de US de 7W, 3 on/3 off, timp de 30 min.

Temperatura, (oC)	Concentrația sulfatului de Ni dizolvat (g / L)		
	Dizolvare naturală	Dizolvare cu tratament de ultrasunete, la diferite distante ale sonotrodei față de reactor	
		3.5 cm	4.5 cm
30	91.4 ± 0.4	10.2.0 ± 1.3	111.2 ± 1.6
40	101.9 ± 0.4	114.7 ± 0.8	125.2 ± 1.2
50	103.0 ± 0.2	134.5 ± 1.4	164.9 ± 1.5
55	103.2 ± 1.4	142.6 ± 0.5	153.3 ± 0.9
60	103.9 ± 0.7	125.5 ± 0.8	126.8 ± 0.4

Ion Al.

Pentru stabilirea mai exactă a influenței distanței dintre sonotrodă și reactor asupra intensificării transferului de masa, au mai fost efectuate un set de experimentări în care a fost utilizată aceeași temperatura, același timp și aceeași putere de ultrasunete, modificându-se doar distanța dintre sonotroda și reactor. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2 Concentrația sulfatului de Ni dizolvat, după aplicarea ultrasunetelor, cu sonda de sonicare la diferite distanțe de reactor, la 50°C, 20% Ampl., 3 on/3 off, timp de 30 de min.

Distanța sonotroda – reactor (cm)	Concentrația sulfatului de Ni dizolvat (g / L)
2.2	103.9 ± 0.8
2.5	109.4 ± 1.4
3	123.9 ± 0.5
3.5	133.8 ± 1.4
4	151.4 ± 0.2
4.5	165.1 ± 0.5
5	175.5 ± 0.2
6	166.3 ± 0.8

Intensificarea transferului de masa la interfața cristale solide – solvent poate fi explicată prin forțele de forfecare ('shear waves') ce apar la interfața lichid-solid atunci când undele sonore longitudinale ajung la aceasta interfața [Dukhin and Goetz, "Fundamentals of Acoustics in Homogeneous Liquids" *Characterization of Liquids, Dispersions, Emulsions, and Porous Materials Using Ultrasound (Third Edition)* (2017): 85-118]. Acest fenomen duce la reînnoirea suprafeței de contact dintre faza lichidă și solid, prin transportul convectiv al unor elemente de fluid din masa acestuia la interfața.

Undele sonore longitudinale au o atenuare foarte scăzută în apă (folosită drept lichid de cuplaj), la 20 kHz, factorul de atenuare este de doar 0.04 dB/cm/MHz [Dukhin and Goetz, "Fundamentals of Acoustics in Homogeneous Liquids" *Characterization of Liquids, Dispersions, Emulsions, and Porous Materials Using Ultrasound (Third Edition)* (2017): 85-118]. Datorită acestui fapt adâncimea de pătrundere este de aproximativ 1000 m ceea ce face că pentru distanțele foarte scurte dintre sonotrodă și reactor atenuarea undelor sonore longitudinale să fie practic nulă. Creșterea eficienței de dizolvare a sării în solvent (respectiv un transfer de masa mai bun), odată cu creșterea distanței dintre sonotroda și reactor este datorată geometriei instalației ce conferă o uniformitate mai bună a iradierii ultrasonice.

Exemplul 2

Pentru cuantificarea speciilor active generate de ultrasunete s-a ales drept model degradarea p-nitro fenolului la p-nitro catehol. Atât în reactor cât și drept lichid de cuplaj s-a utilizat aceeași soluție diluată de p-nitrofenol ($5.6 \cdot 10^{-6}$ g/mL in apa). Degradarea p-nitrofenolului s-a urmărit prin spectrometrie în UV-VIS, la 401 nm.

În tabelul 3 sunt prezentate rezultatele obținute la tratarea cu US , 20% Ampl, 3on/3off și o energie de 107 J (timp 15 s). Se poate observa că efectul ultrasunetelor este mai mic în reactor decât în lichidul de cuplaj și ca acest efect scade odată cu creșterea distanței dintre sonotrodă și reactor. Acest fapt este coerent cu datele de literatură care indică o scădere abruptă a intensității efectelor de cavitație odată cu creșterea distanței față de sonotrodă [Chivate and Pandit, "Quantification of cavitation intensity in fluid bulk" *Ultrasonics Sonochemistry* (1995) 2: S19-S25].

Tabelul 3 Eficiența degradării 4-nitrofenolului în funcție de distanța dintre sonotrodă și reactor în reactor și în lichidul de cuplaj, la 50°C, cu o energie de ultrasunete de 107 J (20% Ampl, 3on/3off).

Distanța sonotrodă – reactor (cm)	Eficiența degradării <i>p</i> -nitrofenolului (%)	
	În reactor	În lichidul de cuplaj
2.2	27.8 ± 0.12	29.5 ± 0.13
2.5	23.7 ± 0.04	28.5 ± 0.06
3	19.6 ± 0.07	24.7 ± 0.05
3.5	13.0 ± 0.04	19.2 ± 0.07
4.5	1.6 ± 0.01	10.8 ± 0.03

În alt set de experiențe, s-a utilizat în loc de apă, o soluție de 50% etanol în apă, păstrându-se aceeași concentrație de *p*-nitrofenol. Deoarece soluția de etanol are o presiune de vapori mai mare decât apa și o tensiune superficială mai mică, fenomenul de cavitație apare mai ușor în lichidul de cuplaj, dar datorită faptului că etanolul intra mai ușor în bula cavitațională energia ultrasunetelor se consumă (efect de amortizare – ‘cushioning effect’) mai rapid, iar efectul acestora în reactor este mai slab (vezi tabelul 4).

Tabelul 4 Eficiența degradării 4-nitrofenolului funcție de energia de US transmisă și de tipul de solvent: apă sau o soluție 50% alcool etilic-apă (20% Amplitudine, putere de US=7W, 3on/3off, la 50°C).

Energie US (J)	Eficiența degradării <i>p</i> -nitrofenolului (%)			
	Apă		Soluție 50% etanol în apa	
	Reactor	Lichid de cuplaj	Reactor	Lichid de cuplaj
107	15.7 ± 0.05	17.7 ± 0.06	2.3 ± 0.04	18.5 ± 0.12
161	19.4 ± 0.01	21.1 ± 0.04	6.5 ± 0.02	22.6 ± 0.06

Exemplul 3

Pentru a pune în evidența efectul ultrasunetelor asupra unei reacții de esterificare enzimatică s-au efectuat un set de experimentări în care s-a studiat reacția de esterificare dintre acidul acetic și alcoolul *i*-amilic (raport molar 1:2) în prezența unei enzime de tip lipază (*Mucor miehei*) imobilizată pe un suport macroporos de rășină schimbătoare de ioni anionică (Lipozyme 435 de la Novozymes). Pentru a deplasa echilibrul către obținerea esterului s-a utilizat un sistem de reactor în ‘buclă’ în care amestecul de reacție circulă în continuu prin reactor, un vas cu site moleculare pentru reținerea apei un răcitor și vasul

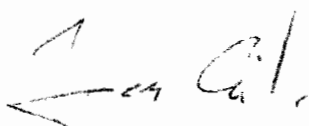
tampon [Azocar, Navia, Beroiz, Jeison and Ciudad, "Enzymatic biodiesel production kinetics using co-solvent and an anhydrous medium: a strategy to improve lipase performance in a semi-continuous reactor" *N Biotechnol* (2014) 31: 422-429]. S-a utilizat o cantitate de enzimă de 0.047 g pe gramul de amestec de reacție. Iradierea cu US s-a efectuat la o amplitudine de 20 % (7 W) în ciclul de operare 3 on / 3 off cu utilizarea apei drept lichid de cuplaj. Probele au fost prelevate după 1 sau 2 h și analizate cromatografic pentru determinarea concentrației de ester. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 5. Se poate observa că pe domeniul de temperatură studiat, efectul ultrasunetelor a fost deosebit de important. După o oră concentrația de ester a fost cu 76% mai mare decât cea obținută convențional la 30°C; cu 103% mai mare la 40°C și cu 70% mai mare la 50°C. După 2 h concentrația de ester obținută la tratamentul cu US continuă să fie mai mare decât cea obținută la convențional, dar diferențele sunt ceva mai mici deoarece concentrația obținută se apropie de concentrația la conversie totală, respectiv cu 51% mai mare la 30°C, cu 28% mai mare la 40°C și cu 6% mai mare la 50°C.

Tabelul 5 Evoluția concentrației de ester în timp, la diferite temperaturi, iradiere cu US vs convențional. Raport molar alcool amilic: acid acetic 1:2, viteza de curgere amestec reacție prin reactor 0.16 ml / min, încărcare enzimă 0.047 g enzimă/g amestec reacție, ultrasunete: amplitudine 20% puls: 3on/3off, distanta sonotroda-reactor 4.5cm. Concentrație maximă ester 560 mg/g.

Condiții reacție: temp. / tip tratament →	Concentrație ester (mg/g)					
	30 °C		40 °C		50 °C	
	US	conv.	US	conv.	US	conv.
Timp reacție (h) ↓						
1	132.9 ± 0.4	75.3 ± 0.7	203.5 ± 0.5	100.2 ± 0.5	374.8 ± 0.6	220.4 ± 1.0
2	278.7 ± 0.8	184.7 ± 0.4	383.5 ± 0.9	299.7 ± 0.8	472.9 ± 0.4	447.1 ± 0.9

REVEDICĂRI

1. Instalația cu ultrasunete destinată studiului reacțiilor enzimatică caracterizată prin aceea că este alcătuită din următoarele componente:
 - Un reactor cu secțiune circulară, fixat într-un vas mai mare care conține lichidul de cuplaj / termostatare și care este prevăzut cu manta pentru circulația lichidului de termostatare (vezi fig. 1);
 - Vasul care conține lichidul de cuplaj are partea de jos conică înspre interior pentru a asigura uniformitatea iradierii cu ultrasunete;
 - alte componente:
 - Un dispozitiv electronic de generare a semnalului necesar pentru ultrasunete, cu posibilitatea de reglare a puterii ultrasonice și sonotroda necesară pentru transmiterea ultrasunetelor în lichidul de cuplaj;
 - Pompa dozatoare pentru recircularea amestecului de reacție;
 - Vas cu site moleculare pentru reținerea apei și deplasarea echilibrului reacției;
 - Racitor;
 - Vas colector.
2. Instalația cu ultrasunete destinată studiului reacțiilor enzimatică caracterizată prin revendicării 1. caracterizată prin aceea că se asigură flexibilitatea și versatilitatea funcțională prin următoarele ajustări posibile:
 - Modificarea amplitudinii vibraționale a sonotrodei cu ajutorul dispozitivului electronic de semnal;
 - Modificarea ciclurilor de tip on/off ale generatorului de ultrasunete;
 - Modificarea temperaturii la care este termostată atât reacția cât și lichidul de cuplaj;
 - Modificarea poziției sonotrodei față de reactor;
 - Modificarea tipului de lichid de cuplare



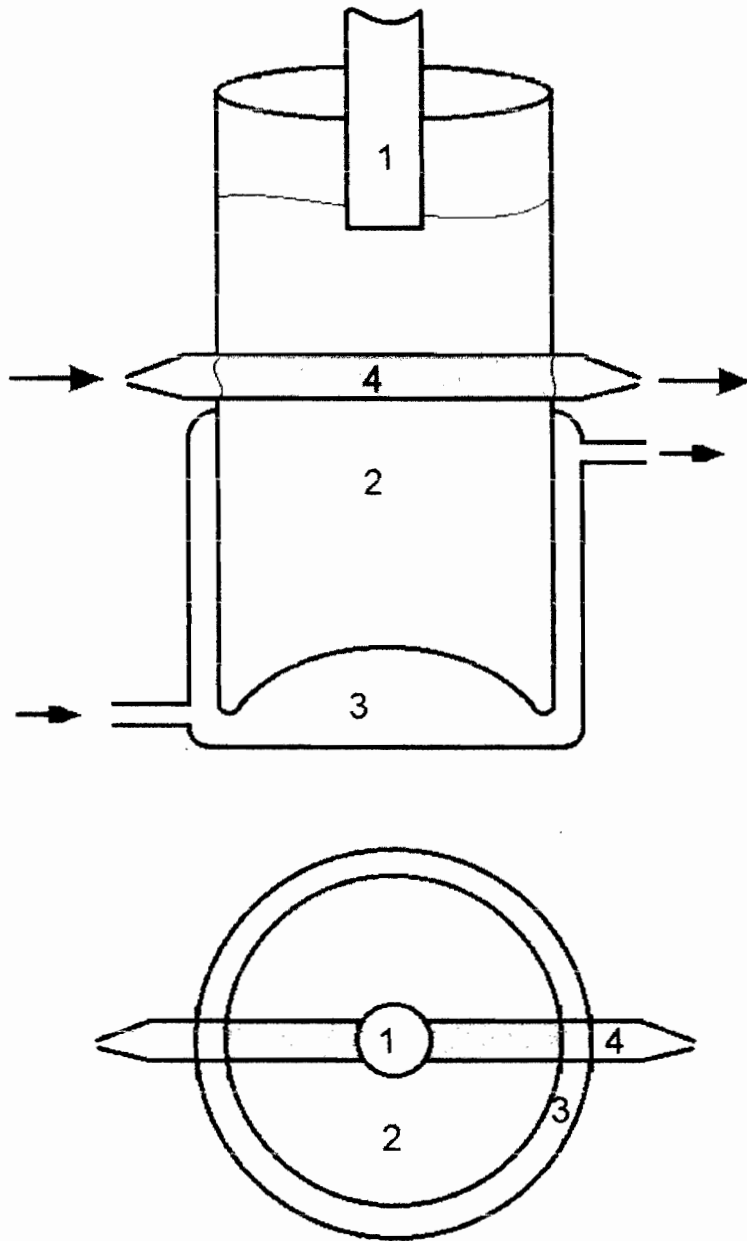


Figura 1

Handwritten signature

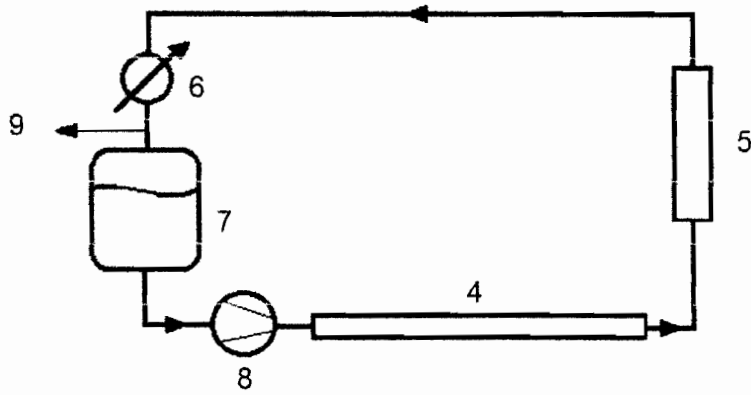


Figura 2

Handwritten signature