

**Mestrado Integrado em Engenharia Química**

**Construção duma Instalação Experimental para o  
Estudo Didáctico da Inversão Enzimático da Sacarose**

**Tese de Mestrado**

desenvolvida no âmbito da disciplina de

**Projecto de Desenvolvimento em Ambiente Empresarial**

**Gaspar Quelhas Lima Tameeris**

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

**FEUP**

**Departamento de Engenharia Química**

Orientador na FEUP: **Doutor Adélio Mendes**

Orientador na empresa: **Eng. Luis Carlos Matos**

**Julho de 2008**

---

*Nothing tends to imprint chemical facts upon the mind so much as the exhibition of interesting experiments*

– Samuel Parkes, 1816

## **Agradecimentos**

Ao Professor Adélio pela orientação, a ajuda, as oportunidades que identificou, e pelas inúmeras horas que trabalha para que os alunos possam aprender mais e melhor.

Ao Luís Carlos por todo o apoio em todas as vertentes do trabalho realizado, a interminável paciência quando as coisas corriam mal e as ideias que “caíam do céu”.

Ao Hugo pela ajuda na análise de resultados e problemas e na elaboração da instalação e a camaradagem.

A Diana e a Elodie que me ajudaram imensamente para conseguir acabar tudo a tempo.

A todos os meus amigos que tornaram as longas horas ao decorrer de muitos anos muito mais fáceis de aturar.

A toda a minha família que mal me viu nos últimos tempos mas nunca deixou de me apoiar

## Resumo

As aulas laboratoriais são uma parte muito importante do ensino de Engenharia Química. Nestas aulas deverão existir trabalhos complexos com relevância industrial. Foi objectivo deste projecto desenvolver um novo trabalho laboratorial baseado num catalisador biológico para o estudo didáctico da inversão da sacarose. Este trabalho foi desenvolvido em oposição a um trabalho semelhante, já disponível nos laboratórios da FEUP-DEQ, mas baseado num catalisador inorgânico.

Foi estudada a cinética da inversão da sacarose em fase homogénea com dois métodos de detecção diferentes, nomeadamente um sistema FIA com um espectrofotómetro e um polarímetro. Os dados resultantes foram ajustados ao modelo de Michaelis-Menten. O ajuste dos dados do sistema FIA foi bom e as suas constantes aparentam estar de acordo com dados obtidos na literatura. Os dados obtidos com o polarímetro demonstram um forte desvio do modelo de Michaelis-Menten para concentrações altas de sacarose. Utilizou-se um novo método [10] que ajusta bem aos dados experimentais, porém as constantes cinéticas daí retiradas não se aproximam das constantes obtidas na mesma fonte.

Foram realizados uma série de ensaios simples que permitiram estimar a composição, e a quantidade, das esferas de enzima imobilizada para se conseguir conversões significativas no tempo disponível numa aula laboratorial. Estes dados permitem terminar a construção da instalação.

Por fim foi testada a inversão em fase heterogénea na instalação finalizada. Vemos que uma coluna com cerca de 70 ml de esferas com uma composição na proporção 1 para 2 enzima – alginato, consegue conversões superiores a 50 % com concentrações de sacarose de 100 a 200 gramas por litro num tempo de 10 a 15 minutos.

**Palavras-Chave (Tema):** Sacarose Inversão Enzimas Laboratório Ensino

## Abstract

Laboratory classes are an important component in the teaching of Chemical Engineering. These classes should contain complex, and industrially relevant, experiments. This body of work consists of the development of a new laboratory experiment based on a biological catalyst for the study of sucrose inversion. This experiment is developed as a counterpoint on a similar experiment already used in the laboratories of FEUP-DEQ, which uses a non-organic catalyst.

The kinetics of sucrose inversion was studied in a homogenous phase reactor using two methods of glucose detection, i.e. a FIA system with a spectrophotometer and a polarimeter. Resulting data was adjusted to the Michaelis-Menten model. The data collected via the FIA setup adjusted well and its constants appear to be in agreement with those found in literature. The data collected from the polarimeter however demonstrates a strong deviation from the Michaelis-Menten model for high sucrose concentration. Another method was used [10] which adjusts well to the data however the constants there from obtained are not similar to those obtained from the same article.

A series of isolated reaction were performed in a closed heterogeneous reactor which allowed a good estimate of the composition and quantity of spheres with immobilized enzymes so as to manage significant conversion of a sucrose solution in the class timeframe. This information allowed the experimental installation to be completed.

Finally, the inversion reaction was tested in the completed installation. With approximately 70 ml of spheres with a composition with a 1 to 2 enzyme-alginate proportion a 50% conversion was possible for sucrose solutions of 100 to 200 grams per litre in 10 to 15 minutes.

# Índice

<b>Índice</b> .....	<b>vi</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Enquadramento e Apresentação do Projecto</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2 Contributos do Trabalho</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3 Organização da Tese</b> .....	<b>10</b>
<b>2 Estado da Arte</b> .....	<b>11</b>
<b>3 Descrição Técnica e Discussão dos Resultados</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1 Meio Homogéneo</b> .....	<b>12</b>
3.1.1 Instalação Inicial .....	12
3.1.2 Calibração do Espectrofotómetro .....	14
3.1.3 Cinética com Espectrofotómetro .....	17
3.1.4 Calibração do Polarímetro .....	21
3.1.5 Cinética com Polarímetro em Meio Homogéneo.....	22
3.1.6 Inibição da Reacção.....	23
3.1.7 Efeitos da Variação da Enzima .....	25
3.1.8 Meio Heterogéneo em Batch .....	26
3.1.9 Meio Heterogéneo em Coluna.....	27
<b>4 Conclusões</b> .....	<b>26</b>
<b>5 Avaliação do trabalho realizado</b> .....	<b>28</b>
<b>5.1 Objectivos Realizados</b> .....	<b>28</b>
<b>5.2 Outros Trabalhos Realizados</b> .....	Error! Bookmark not defined.
<b>5.3 Limitações e Trabalho Futuro</b> .....	<b>28</b>
<b>5.4 Apreciação final</b> .....	<b>29</b>
<b>Referências</b> .....	<b>31</b>
<b>Anexo 1</b> .....	<b>31</b>

## Notação e Glossário

$Abs$	Absorvência	
$Abs_{corr}$	Absorvência corrigida	
$Abs_{obs}$	Absorvência observada	
$n$	Número de injeções efectuadas anteriores à última reposição de God-Pap	
$V_{max}$	Velocidade máxima observada	$g\ l^{-1}\ s^{-1}$
$K_m$	Concentração que se observa para metade da velocidade máxima	$g\ l^{-1}$
$[G]$	Concentração mássica de glicose	$g\ l^{-1}$
$V$	Velocidade observada	$g\ l^{-1}\ s^{-1}$
$X$	Conversão	%
$C_i$	Concentração inicial	$g\ l^{-1}$

### *Letras gregas*

$\alpha$	Ângulo de rotação lido no polarímetro	°
$\beta$	Factor de correcção de concentração de God-Pap	

### *Lista de Siglas*

FIA	Flow Injection Analysis
UV-VIS	Ultravioleta-Vísivel

# 1 Introdução

## 1.1 Enquadramento e Apresentação do Projecto

O método científico requer observação, experimentação e dedução. Não surpreende que vários autores consideram as aulas laboratoriais como componentes chave no ensino [1] [2]. Já foi estudado o decréscimo acentuado de matéria retida na memória ao longo duma palestra [3]. Após quinze minutos é retida 40 % da informação. Após trinta minutos apenas 25 % e aos quarenta e cinco minutos já só se retém 20 %. Desta forma uma palestra é equivalente à leitura não acompanhada.

As aulas laboratoriais não são de forma alguma isentas de defeitos. Pelo facto de existirem não é suficiente. Um protocolo fechado, do tipo duma receita de bolos, e a falta de interesse dos alunos podem tornar uma aula laboratorial numa sequência de tarefas com um impacto mínimo na aprendizagem [2]. Nestas aulas um aluno procede com as tarefas que lhe estão estipuladas mas não compreende a razão por detrás de cada passo nem aprende.

Tanto no caso das palestras como nas aulas laboratoriais, mencionadas anteriormente, são obviamente casos limite. À medida que mudam as mentalidades, o conhecimento e a tecnologia, também observamos uma mudança na forma das aulas. A construção das aulas está tradicionalmente centrada no ensino – “dar uma aula”, enquanto o objectivo será normalmente de aprendizagem – construir uma aula com os alunos. A convergência da forma de construção das aulas com os objectivos estabelecidos resulta num aumento da eficácia da aprendizagem. O recurso a exercícios práticos durante uma aula teórica, ou a aulas laboratoriais com uma forte componente de discussão, são exemplos de metodologias mais centradas na aprendizagem.

Os avanços tecnológicos trazem mais um elemento de incerteza para as aulas laboratoriais. É sugerido [3] que em vez de discutir muitos equipamentos de complexidade moderada, será favorável o aluno compreender bem um equipamento complexo. Desta forma o aluno ganha a coragem que necessita para enfrentar equipamentos desconhecidos com a mente virada para a experimentação e aprendizagem em vez da hesitação e o receio.

Por fim existe ainda outro factor importante que se pode considerar na tentativa de melhorar o ensino nas aulas laboratoriais. Se um aluno não compreender a importância da realização duma experiência, e.g. por não compreender a sua relevância em termos industriais, este aluno irá

perder a motivação para entender o seu funcionamento [3]. Um trabalho laboratorial próximo dum processo industrial é normalmente percebido pelos alunos como mais motivador.

É neste enquadramento que surge a presente dissertação. A inversão da sacarose é um processo já muito estudado. É de grande valor para muitas indústrias alimentares; na produção de refrigerantes reduz drasticamente o custo do açúcar e na desidratação de frutos permite uma perda menor de massa no fruto seco [4]. O processo de inversão da sacarose é cada vez mais relevante para conseguir acompanhar o aumento constante de derivados sucroquímicos [5]. Esta reacção pode ocorrer em meio ácido, enzimático, em fase homogénea ou por catálise heterogénea [6]. A análise da glicose à saída do reactor pode ser efectuada através de variados métodos: FIA – flow injection analysis [11], polarimetria, cromatografia, entre outros.

O objectivo desta tese é de construir uma nova instalação experimental para o laboratório das aulas de Práticas de Engenharia Química V no Departamento de Engenharia Química da Universidade do Porto. Está será constituída a partir de um reactor de leito fixo com enzima imobilizada com detecção por polarimetria. Esta instalação similar existirá como contrapartida a uma instalação já existente no local que utiliza um catalisador inorgânico e um sistema de detecção de FIA com espectrofotómetro.

## **1.2 Contributos do Trabalho**

A nova instalação permite aos alunos contactarem com um reactor com biocatalisador e, por consequência, um mecanismo reaccional muito mais complexo. Os alunos também irão utilizar um polarímetro, sistema anteriormente ausente das aulas laboratoriais.

A instalação experimental permite atingir conversões significativas, para concentrações facilmente detectáveis no polarímetro, no tempo útil de uma aula

### **1.3 Organização da Tese**

No capítulo 2 será traçado uma breve análise sobre o estado da arte do ensino, da inversão da sacarose e a sua ligação a esta dissertação.

O capítulo 3 irá apresentar a maneira que se analisou a cinética da reacção de inversão e os resultados aí obtidos. Começará com a cinética em meio homogéneo com concentrações baixas e a utilização do sistema FIA. Passará para concentrações mais altas e a utilização do polarímetro. Terminará com o teste da instalação experimental concluída em meio heterogéneo num reactor de leito fixo.

O capítulo 4 junta as conclusões essenciais tiradas do capítulo anterior.

## 2 Estado da Arte

Existem inúmeras teorias sobre o ensino e a aprendizagem, desenvolvidas ao longo das décadas. As teorias vão alterando e evoluindo e os estabelecimentos de ensino devem seguir em certa medida estas teorias de forma a conseguir transmitir melhor a informação aos alunos.

Estudos [2] [3] sugerem que o ensino pode melhorar significativamente ao incluir aulas laboratoriais com experiências cuja aplicabilidade seja clara para os alunos. Existe uma tendência geral para estas aulas serem integradas no processo de ensino e para as aulas existentes incluírem experiências com maior relevância industrial.

A inversão da sacarose já é um processo estudado de forma exaustiva. Já se estudou a sua variação com a temperatura, com o pH, com catalisadores, e suportes de catalisadores, diferentes, envenenamento com metais pesados, e muitas outras variáveis. Este processo já é estudado de forma didáctica em alguns laboratórios de ensino como na Universidade de Maryland [7] e na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

A instalação existente no FEUP-DEQ é de um reactor catalítico aberto, tubular, heterogéneo, de leito fixo. Esta instalação permite o estudo da inversão da sacarose com uma cinética da reacção de primeira ordem. O reactor está ligado a um sistema FIA para permitir a análise da corrente de saída com um espectrofotómetro.

Instalações baseadas na instalação já existente são comercializadas pela empresa Armfield sob o nome de CEU Catalytic Reactors

## 3 Descrição Técnica e Discussão dos Resultados

### 3.1 Meio Homogéneo

#### 3.1.1 Instalação Inicial

O projecto iniciou-se com a determinação das constantes de Michaelis-Menten para um reactor enzimático homogéneo fechado. Para este fim recorreu-se á seguinte instalação experimental:

O reactor tem agitação magnética e ira funcionar de forma semi-aberta; só é alimentado antes do início da reacção mas é removida uma corrente continuamente. Tem ainda uma manga ligada a um banho termostático.

O sistema FIA recebe três correntes líquidas com o auxílio de uma bomba peristáltica. A primeira corrente é de God-Pap que esta num frasco próprio e é alimentado a um dos *loops* do FIA. A segunda corrente vem do reactor perfeitamente agitado e alimenta o outro *loop*. A última corrente é a água que serve de liquido de arraste. Quando o FIA muda da posição de recarga para a posição de injeccção, a água invade os dois *loops* forçando a amostra a contactar o God-Pap ao longo de um percurso longo num banho termicamente isolado. Esta corrente é alimentada ao espectrofotómetro e de seguida rejeitada para um recipiente de resíduos. O espectrofotómetro está ligado a um sistema de aquisição de dados. Todo o God-Pap que é rejeitado do *loop* é recuperado no fim para reutilização.

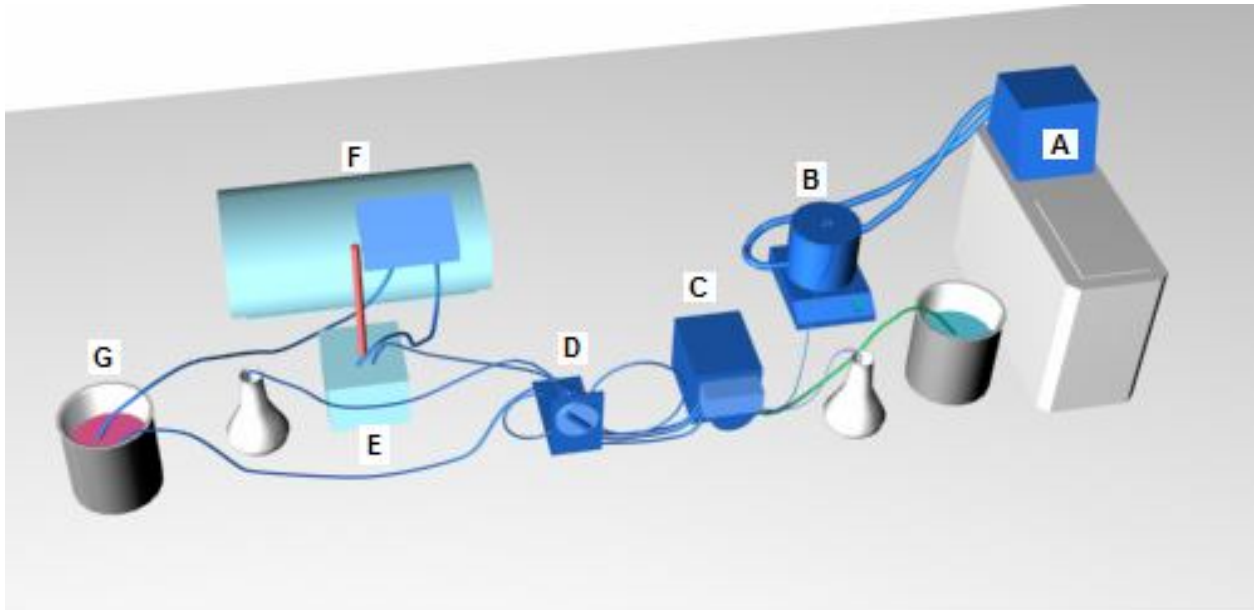


Figura 1: Representação simbólica da instalação experimental inicial. A.) Banho termoeestático; B.) Reactor Homogéneo; C.) Bomba peristáltica; D.) Sistema FIA; E.) Reactor God-Pap; F.) Espectrofotômetro; G.) Recolha de God-Pap não reagido.

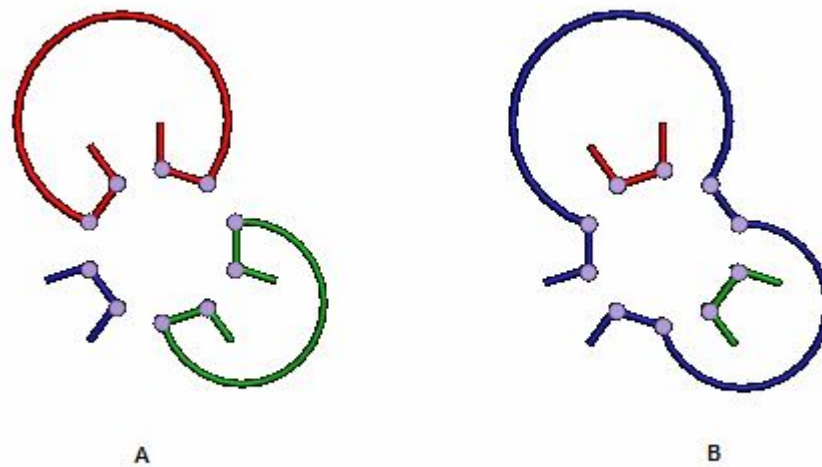


Figura 2: Na posição A, a de Recarga, a corrente vermelha representa a alimentação de meio reaccional, a verde a corrente de God-Pap e azul a corrente de água. Na posição B, a de Injecção, a corrente de água liga aos depósitos de meio reaccional e de God-Pap encaminhando tudo para o reactor de God-Pap.

### 3.1.2 Calibração do Espectrofotómetro

Como a absorvência da sacarose não apresenta diferença significativa da absorvência da glicose nem da frutose em parte alguma do espectro UV – Vis (Ultravioleta -visível) recorreu-se a um meio de detecção indirecto. Utilizando a preparação God-Pap é possível criar um composto possível de detectar num espectrofotómetro em quantidade proporcional á concentração de glicose.

Foi feita a calibração do espectrofotómetro recorrendo a concentrações conhecidas de glicose que são introduzidas na instalação da mesma forma que serão retiradas as amostras durante a fase experimental. Desta calibração resultou a seguinte recta:

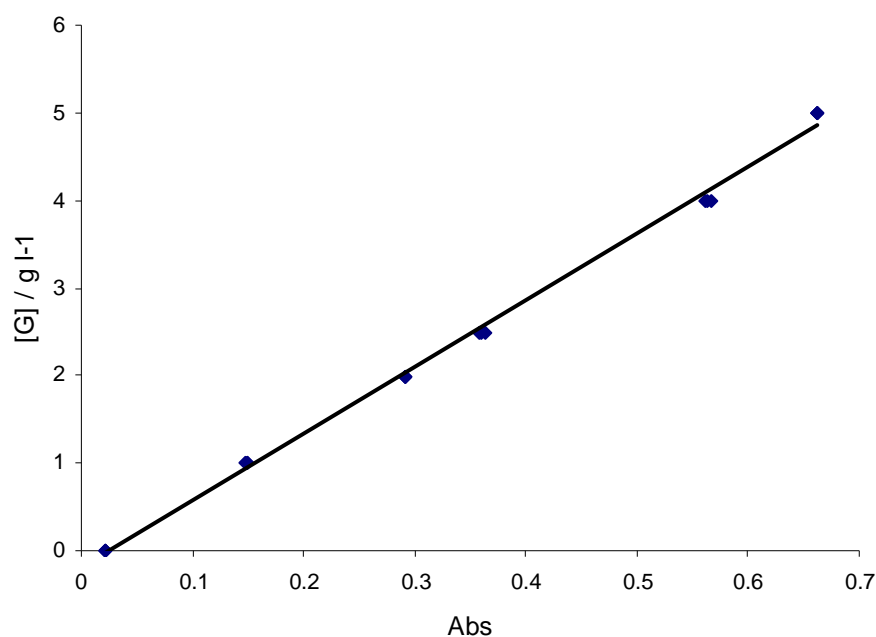


Figura 3: Calibração do espectrofotómetro representando a concentração mássica de glicose versus a absorvência medida

A recta traçada permite obter a seguinte relação entre a concentração mássica de glicose e a absorvência medida:

$$\underline{[G] = 7,6186 \times Abs - 0,187} \quad (1)$$

O reagente God-Pap não consumido é recolhido para poder ser reutilizado. Isto levou a uma ligeira diluição do reagente e, por sua vez, uma absorvência menos intensa para a mesma concentração de glicose. Esta diluição deve-se ao fluido de arraste ocupar o *loop* do God-Pap quando o sistema FIA esta na posição de injeção. Quando se volta a colocar o FIA na posição de recarga este fluido é descarregado para a recolha do God-Pap.

Para se conseguir medir, e corrigir, o efeito da diluição foram efectuadas reacções com soluções de concentração inicial conhecida com God-Pap novo, e novamente com God-Pap com uma diluição conhecida.

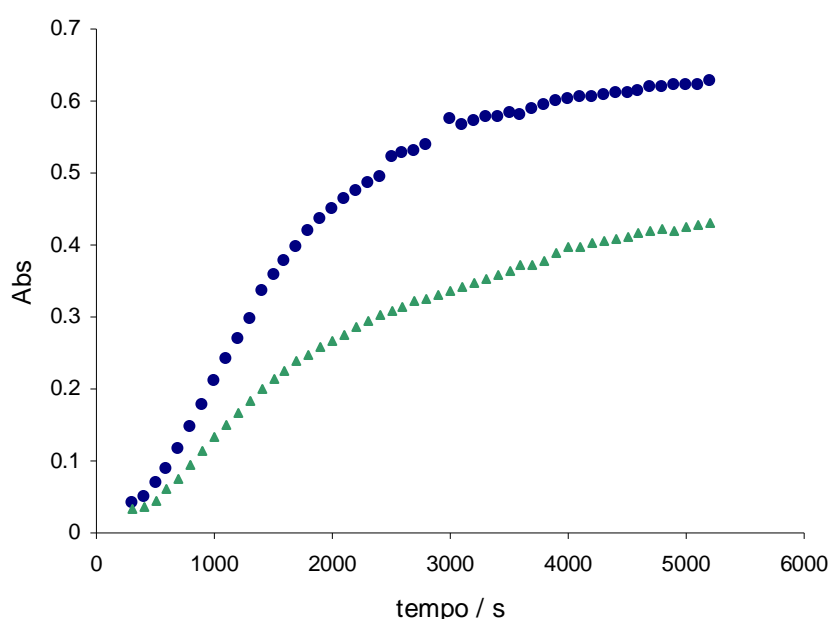


Figura 4: Ensaios com concentração inicial idêntica. Triângulos verdes indicam a progressão da absorvência para o God-Pap diluído e círculos azuis indicam um ensaio idêntico com God-Pap novo.

Deduzindo a forma que a diluição afectara a absorvência e com as experiencias acima indicadas foi possível determinar a seguinte equação para a correcção da absorvência em função da quantidade de injeções anteriores a ultima reposição. Esta equação é valida para todas as experiencias anteriores à determinação das constantes envolvidas.

$$Abs_{corr} = Abs_{obs} \times \frac{100 + n \times \beta}{100} \quad (2)$$

Após a determinação das constantes o God-Pap novo foi aproveitado para a experiência alterando a equação para a seguinte.

$$Abs_{corr} = Abs_{obs} \times \frac{150 + n \times \beta}{150} \quad (3)$$

Em ambos os casos  $n$  indica o número de injeções efectuadas anteriores à última reposição de God-Pap e  $\beta$  é a constante de correcção relacionada à diluição. Esta constante tem o valor de 0,129.

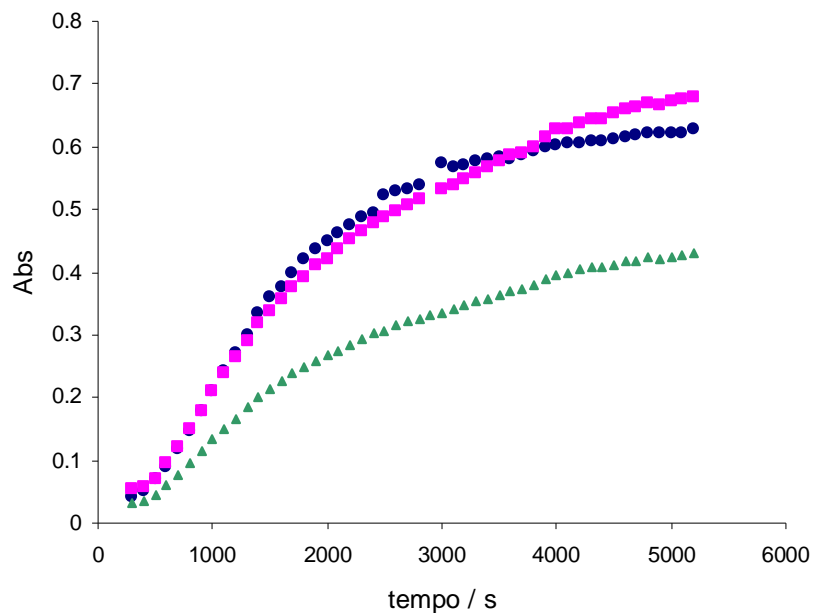


Figura 5: verifica-se que a equação que corrige a diluição nos da uma boa aproximação á absorbência esperada se fosse utilizado sempre God-Pap novo.

Todas as medições de absorbência seguintes foram tratadas com esta equação para que a calibração inicial mantenha a sua validade.

### 3.1.3 Cinética com Espectrofotómetro

As constantes de Michaelis-Menten são obtidas da velocidade de reacção para varias concentrações de sacarose. Para se obter estes dados foi seguido o seguinte procedimento experimental.

Liga-se o espectrofotómetro para que este possa aquecer e estabilizar o sinal do branco. No reactor agitado são colocados 200 ml de uma conhecida solução de sacarose. Coloca-se ácido acético suficiente para conseguir atingir o pH óptimo de 4.5 [8], a concentração do meio reaccional calculado com base no volume final reaccional. No banho termostático é inserido o *set-point* de 55°C [8] e é permitido que a temperatura no reactor estabilize. A bomba é preparada para 30 rpm de forma a reduzir o atraso nas leituras, garantindo assim uma amostragem mais correcta do meio reaccional, sem causar grande gasto do reagente God-Pap, visto que a quantidade inicial tem de servir para o ensaio completo para a calibração ser valida.

Uma vez tudo preparado é passado água destilada pelo sistema todo inclusive o espectrofotómetro que é acertado no zero. Inicia-se o programa de aquisição de dados ligado ao espectrofotómetro e liga-se a bomba. Injecta-se 10 ml da solução com a enzima e dá-se a reacção como iniciada. A solução enzimática contém 0.0648 gramas de invertase de 114 U/mg por litro [7]. Prossegue-se as injeções periódicas do sistema FIA sempre que o sinal volte ao zero, cerca de 2 minutos. Dá-se a reacção como terminada quando o máximo do pico da injeção for constante deixar de apresentar variação.

Tratando os dados recolhidos pode-se retirar as constantes da equação de Michaelis-Menten por dois métodos distintos.

O método tradicional para o cálculo das constantes é o seguinte. Construi-se o gráfico da velocidade media contra a concentração de substrato. A velocidade máxima observada é igual a  $V_{max}$ . A concentração que se observa para metade dessa velocidade máxima é  $K_m$ . Para auxiliar a compreensão é apresentado um gráfico tipo para esta equação.

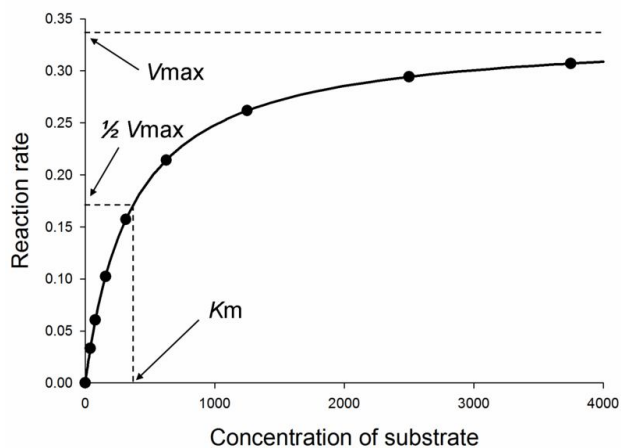


Figura 6: gráfico tipo para a equação de Michaelis-Menten para uma enzima genérica. [Public Domain]

O procedimento foi repetido para varias concentrações e foi necessário ultrapassar os limites da calibração. Esta foi assumida como constante na zona utilizada e extrapolada para esse efeito. Foram corridas no mínimo dois ensaios para cada concentração. Os dados foram apresentados na figura seguinte.

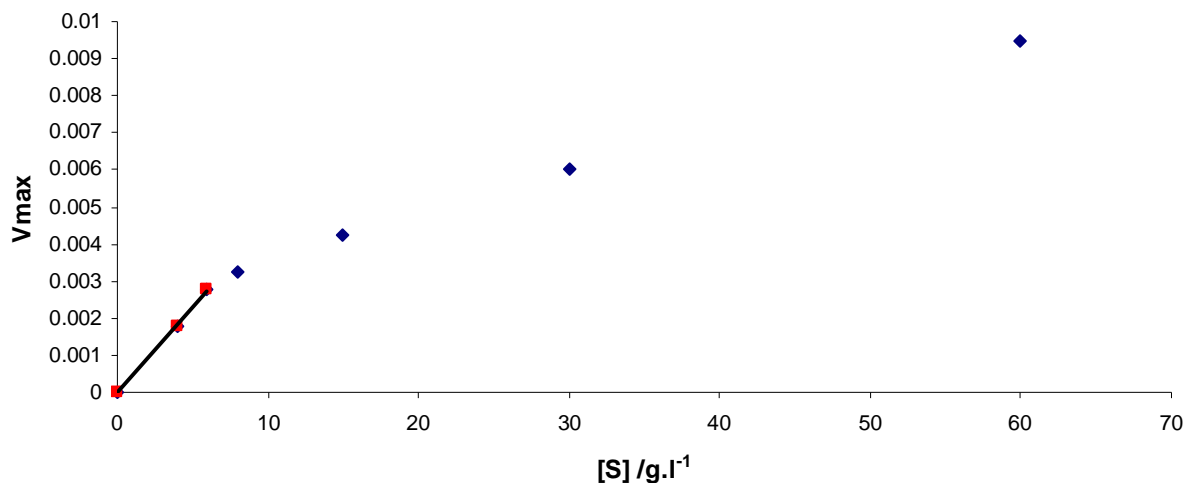


Figura 7: Velocidade máxima versus concentração inicial de Sacarose

Como se pode ver na figura os primeiros dois pontos, juntamente com a origem, criam uma recta. Nesta zona observa-se uma cinética de primeira ordem. Esta é uma característica conhecida da equação de Michaelis-Menten mas no caso presente não se observa o patamar de velocidades para concentrações altas. Esta observação levou a vários ensaios com concentrações cada vez mais alta porém, não foi possível “encontrar” este patamar devido as limitações de operação do espectrofotómetro. Desta forma tentou-se aproximar a velocidade calculada à velocidade observada variando as constantes numa folha de cálculo.

Tabela 1: Constantes Michaelis-Menten

Vmax =	0.0137
Km =	30.51

Em alternativa pode-se seguir o método de Weaver-Burk. Para seguir este método apresenta-se o inverso da velocidade máxima da reacção contra o inverso da concentração de substrato. A recta resultante segue a equação seguinte.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad 4$$

O valor da abcissa quando a recta corta o eixo da ordenada é igual ao inverso de  $V_{\max}$  e o valor da ordenada quando a recta corta o eixo das abcissas é igual ao simétrico do inverso de  $K_m$ . Desta forma podemos obter facilmente os valores das constantes de Michaelis-Menten.

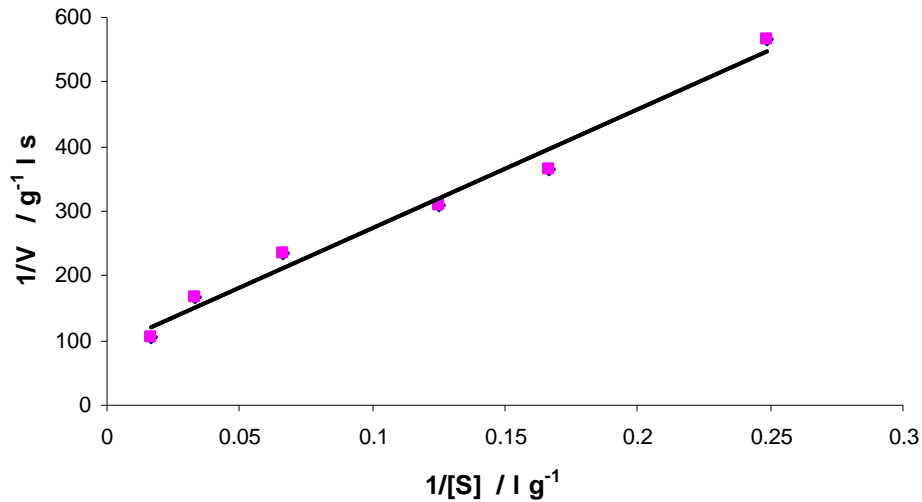


Figura 8: inverso da velocidade máxima versus o inverso da concentração de substrato

Da forma acima descrito foi possível obter as constantes cinéticas. Estas estão apresentadas na seguinte tabela.

Tabela 2: Constantes de Michaelis-Menten obtidos pelo método de Weaver-Burk.

$$\begin{aligned} V_{max} &= 0.0112 \\ K_m &= 20.52 \end{aligned}$$

Parâmetros experimentais similares na bibliografia [9] sugerem as seguintes constantes:

Tabela 3: Constantes Michaelis-Menten da referencia [9]

$$\begin{aligned} V_{max} &= 0.0389 \\ K_m &= 29.16 \end{aligned}$$

É de esperar que os valores das constantes variem drasticamente entre protocolos experimentais diferentes. Desta forma unicamente podemos comparar ordens de grandeza e vemos que os dados experimentais e os obtidos na referência [9] estão concordantes.

### 3.1.4 Calibração do Polarímetro

De seguida a combinação do sistema FIA com o espectrofotómetro foi substituído por um polarímetro com célula de fluxo. A sacarose é fortemente dextro gira [7] e a medida que se verifica a inversão para glicose e frutose a solução irá tender para um sinal leve gira. Desta forma pode ser medido directamente o avanço da reacção de forma contínua sem ser necessárias as injeções periódicas. Foi aumentada consideravelmente a concentração inicial de sacarose para que a concentração possa ser detectável no polarímetro.

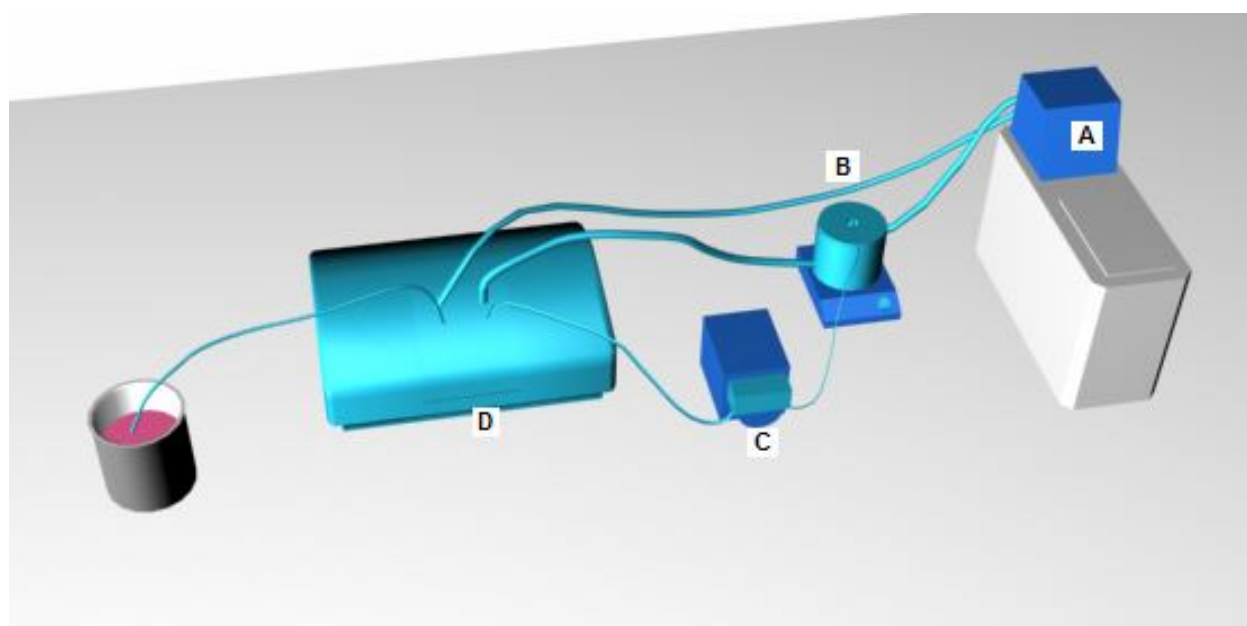


Figura 9: Nesta instalação o espectrofotómetro é substituído por um polarímetro. A.) Tanque termoeletrónico; B.) Reactor perfeitamente agitado; C.) Bomba peristáltica; D.) Polarímetro.

Existe no entanto uma ligeira complicação. O sinal medido não será unicamente afectado pela proporção dos açúcares mas também a sua concentração total. Conclui-se então que é necessário construir uma calibração tridimensional. Começando com concentrações iniciais variadas de sacarose e utilizando soluções que representam diversas fases da conversão a partir de cada concentração inicial.

Desta forma obteve-se a seguinte calibração

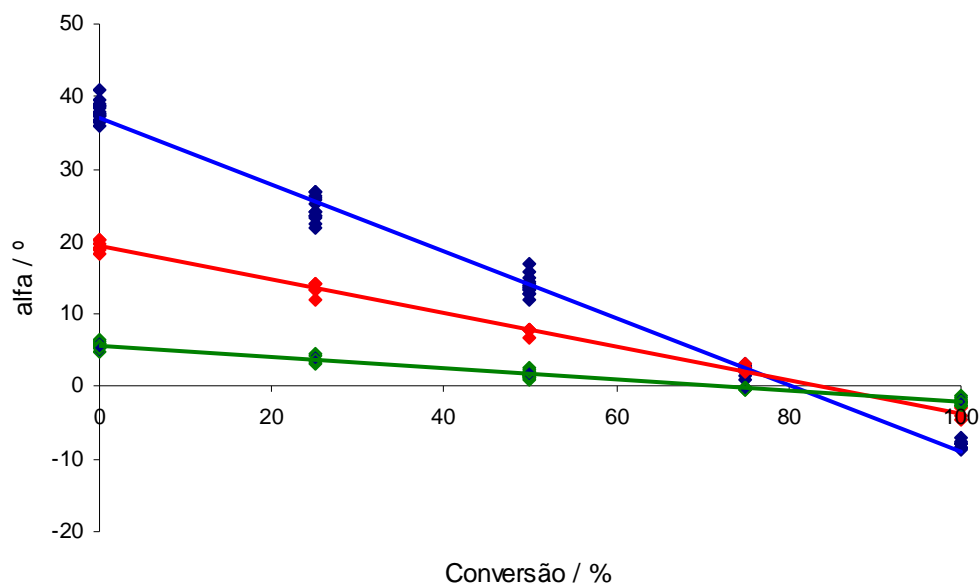


Figura 10: A variação do ângulo de rotação com a conversão para soluções padrão com concentrações de 0, 300 e 100 gramas por litro em azul, vermelho e verde respectivamente.

Com estes dados tiramos a seguinte relação entre concentração inicial, ângulo de rotação e conversão do meio reaccional.

$$X = \frac{\left( \frac{\alpha}{C_i} - 0.609 \right)}{-0.00077} \quad (5)$$

### 3.1.5 Cinética com Polarímetro em Meio Homogéneo

Com o aumento da sacarose em cerca de vinte vezes foi também aumentada a concentração da enzima pela mesma proporção levando a uma solução enzimática de 1,412 gramas por litro

Com a calibração feita foram corridos vários ensaios com concentrações iniciais diferentes de forma similar a fase anterior quando se usava o espectrofotómetro. Uma vez feitos os cálculos para a velocidade media para cada reacção foi construído o seguinte gráfico

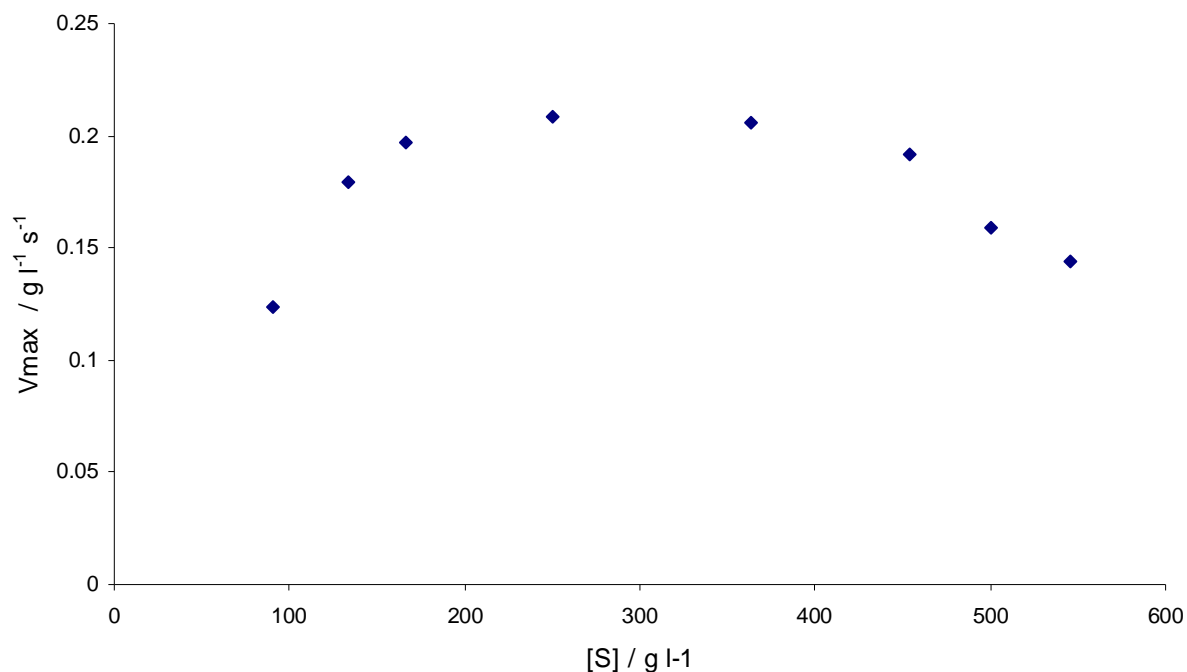


Figura 11: Velocidade média contra Concentração inicial de sacarose

Na figura anterior vemos um claro desvio da tendência iniciada pela equação de Michaelis-Menten. Este efeito já foi observado antes [10].

### 3.1.6 Inibição da Reacção

O modelo de Michaelis-Menten apresenta algumas limitações para concentrações altas de sacarose [10]. Este efeito já foi estudado anteriormente e foi concluído que a própria sacarose pode inibir a reacção. Foi também concluído que a quantidade de água influencia a reacção e o aumento de concentração da sacarose reduz a quantidade de água disponível na solução. Estes efeitos passam a ser significantes para concentrações superiores a 0,29 molar, cerca de 105 gramas por litro, mas que anterior a este ponto continua a ser válida a equação de Michaelis-Menten.

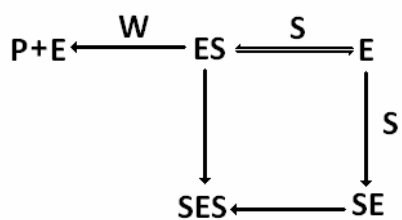


Figura 12: A reacção proposta pelo modelo de inibição. Aonde ES representa o complexo activo aonde a enzima se juntou de forma correcta à sacarose e SE e SES são complexos inactivos aonde a enzima se juntou de forma incorrecta. [Adaptado de F]

O seguinte gráfico apresenta estes conceitos de forma condensada.

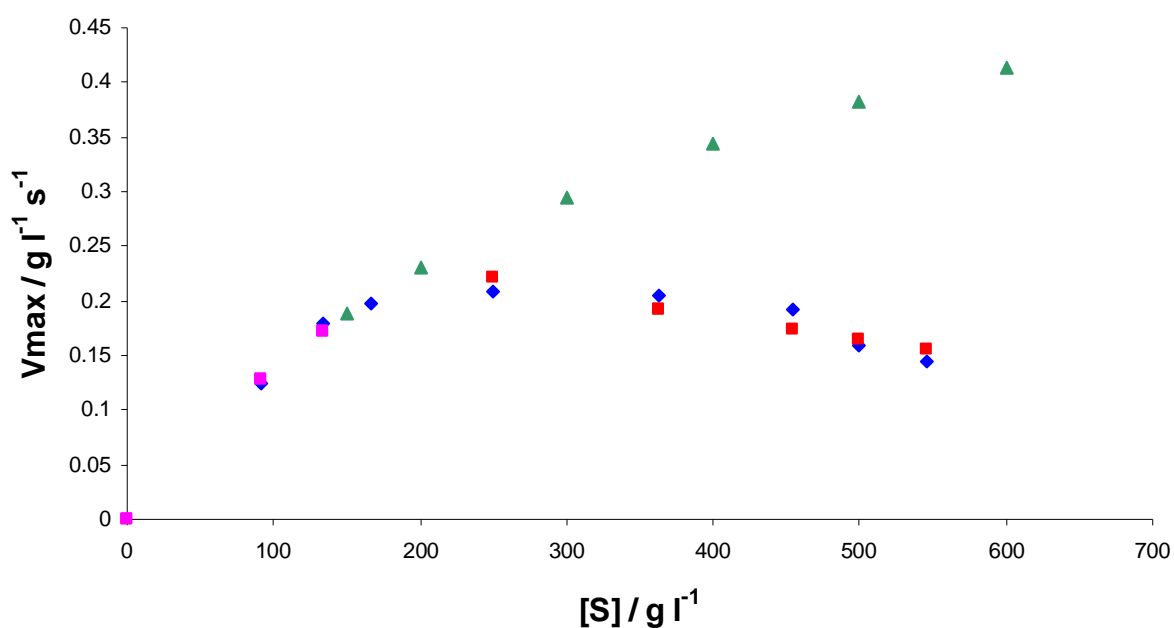


Figura 13: Os pontos a azul (idêntico ao gráfico da reacção anteriormente apresentado) apresentam os dados experimentais. Os pontos a vermelho indicam a queda de velocidade de reacção prevista para concentrações superiores. Os pontos a rosa indicam os pontos calculados ao aproximar os pontos experimentais, de concentração baixa, à equação de Michaelis-Menten, e por fim os pontos verdes indicam a tendência prevista do modelo de Michaelis-Menten na ausência de inibição.

Usando os dados da extrapolação vê-se que a velocidade só se estabiliza perto dos 5 kg por litro, muito para além da sua solubilidade à temperatura ambiente.

Tabela 4: constantes da reacção com inibição

$k_2k_s[E_0]$	80.3864
$k_s+kt$	261.1123
$k_{skt}'$	0.275506

Tabela 5: constantes da reacção com inibição retirados da literatura

$k_2k_s[E_0]$	0.014981811
$k_s+kt$	0.017416667
$k_{skt}'$	5.60185E-05

### 3.1.7 Efeitos da Variação da Enzima

Ainda em meio homogéneo foi estudado brevemente o efeito da concentração da enzima sobre a velocidade de reacção. A figura seguinte mostra a velocidade de reacção em função a concentração de sacarose para três concentrações de enzima.

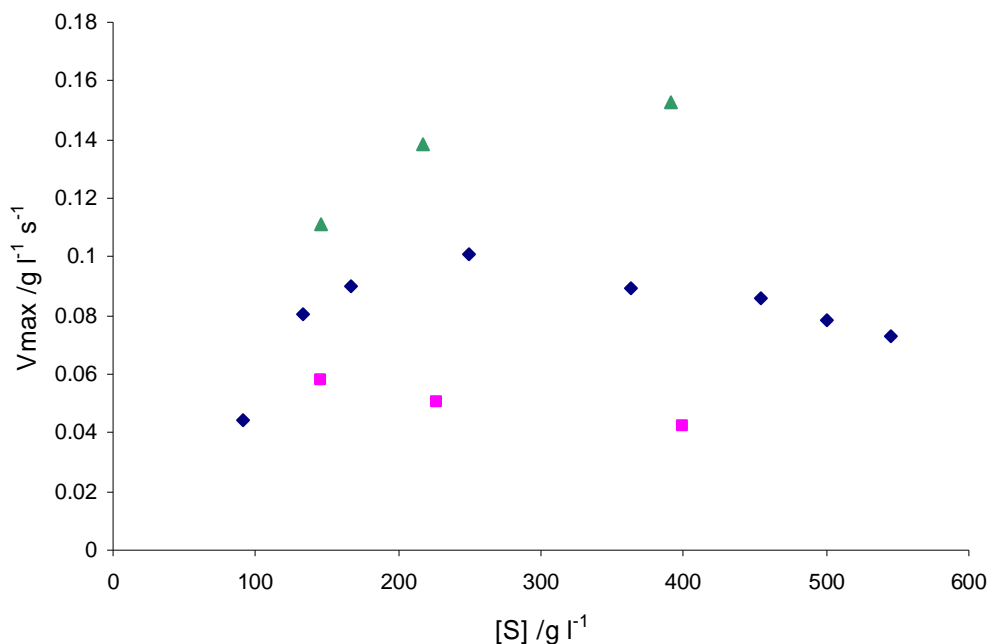


Figura 14: A curva a azul apresenta a velocidade média de reacção para cada ensaio. A curva a vermelho tem metade da concentração de enzima e a curva verde tem o dobro da concentração de enzima.

Ao aumentar a concentração de enzima não só aumentamos a velocidade mas também atrasamos a inibição pela concentração de água e sacarose. A redução da concentração tem claramente o efeito contrário. Recorrendo unicamente a estes ensaios não é claro se o aumento da velocidade é consequência apenas do atraso da inibição.

### **3.1.8 Meio Heterogéneo em Batch**

De forma a reduzir as despesas associadas ao gasto de enzima esta mesma foi imobilizada de forma a ser possível ser recuperado no fim de cada ensaio. Para este fim foi dissolvida a massa de enzima pretendida num volume de 300 ml de água destilada juntamente com 3 gramas de alginato. Esta solução é gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica para um recipiente com 500ml de uma solução de cloreto de cálcio. O diâmetro da tubagem final e a velocidade da bomba ambos influenciam o tamanho das esferas produzidas.

Foram feitos vários ensaios únicos em meio heterogéneo para estimar a proporção esferas/sacarose adequada para a aula.

Foi determinado que uma altura útil de coluna de 19 cm com esferas pequenas com uma razão de 1:2 enzima –alginato, terão uma conversão no intervalo de 50-80 % no espaço de tempo de 10-15 minutos com concentrações altas o suficientes para ser facilmente detectável no polarímetro.

### 3.1.9 Meio Heterogéneo em Coluna

Nesta fase montou-se a instalação já na sua forma final. O reactor perfeitamente agitado da primeira instalação é substituído por uma coluna de leito fixo, o sistema FIA e o espectrofotômetro são substituídos por um polarímetro com célula de fluxo termostática. A corrente de God-Pap é completamente removida.

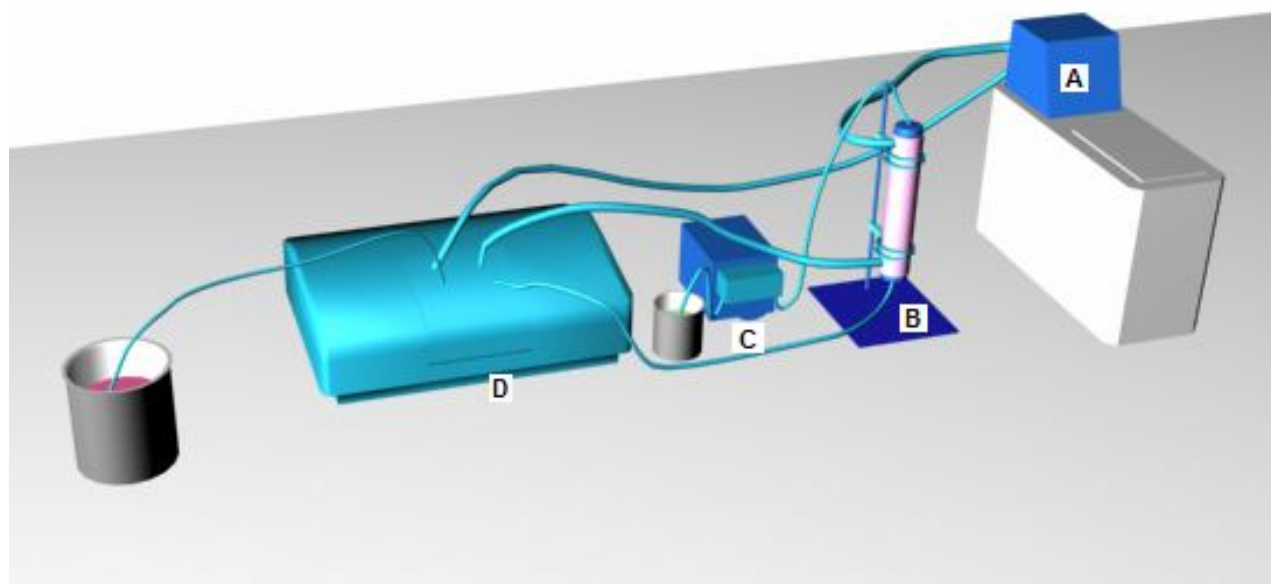


Figura 15: A instalação final substituiu o reactor agitado por uma coluna. A.) Tanque termoestático; B.) Coluna com enzima imobilizada; C.) Bomba peristáltica; D.) Polarímetro.

Variando a velocidade da bomba peristáltica variou-se o caudal, e por consequência o tempo de passagem, do meio reaccional. Para cada caudal foi permitido ao reactor atingir o estado estacionário. O sinal resultante no polarímetro indica a conversão de estado estacionário. O gráfico resultante segue o seguinte formato.

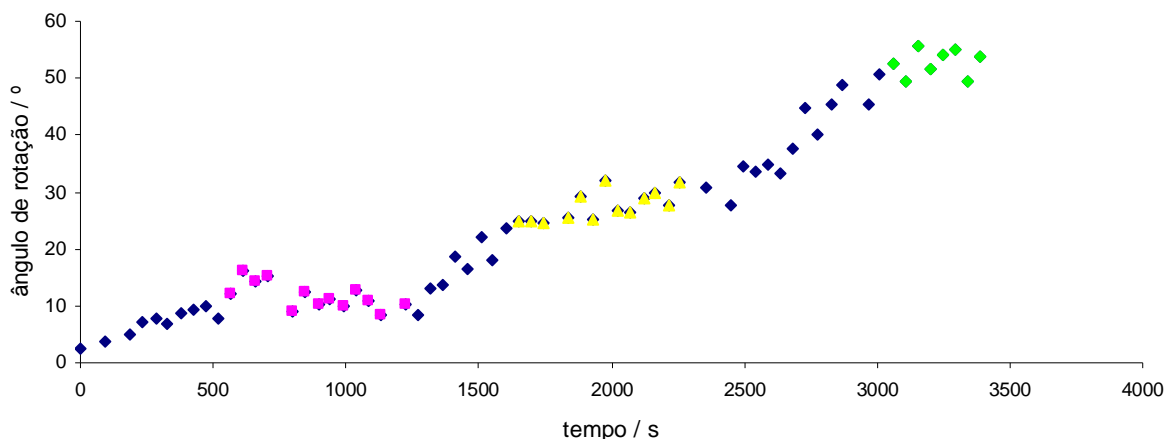


Figura 16: Sinal de saída de um ensaio com a nova instalação. Esta apresentada a cores os patamares estáveis para cada caudal.

Na figura anterior vemos o atraso que se obtém em cada alteração de caudal. Este atraso é de grande relevância visto que a duração da aula impõe certos limites de tempo sobre a duração de cada experiência.

Corridos vários ensaios utilizando o método acima descrito foi possível determinar conversões para diferentes atrasos com concentrações iniciais diferentes. Estes dados foram resumidos no seguinte gráfico.

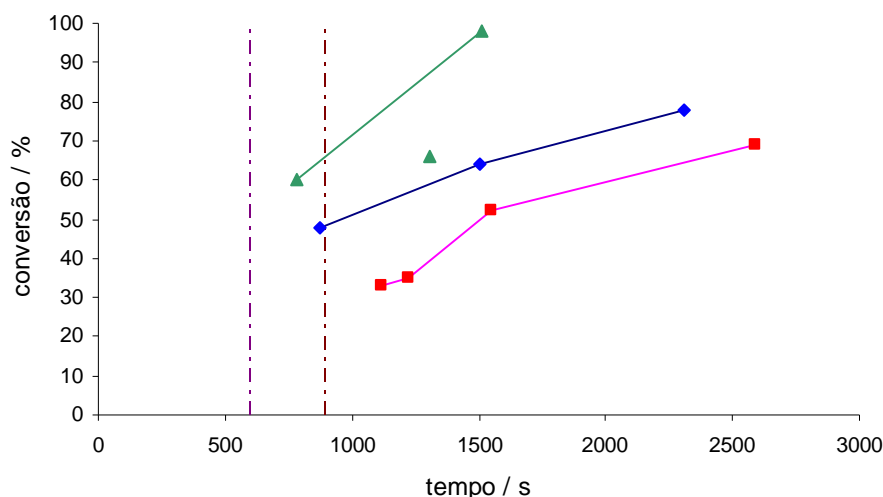


Figura 17: Está apresentado o atraso entre a alimentação e o sinal estável contra a conversão do patamar. Os dados a vermelho representam os dados para a concentração inicial de 400 gramas por litro, os dados a

azul 200 gramas por litro e os dados a verde 100 gramas por litro. As linhas verticais indicam os limites de 10 e 15 minutos.

Na figura anterior vê-se que menores concentrações têm maior conversão para o mesmo atraso. Vê-se também que concentrações entre 100 e 200 gramas por litro conseguem conversões perto dos 50% dentro dos limites de tempo estabelecidos para uma experiência de aula laboratorial. É ainda importante comentar o ponto verde que se encontra afastado da recta. Este ponto vem de um ensaio separado que pretendia estudar a perda de eficiência da coluna após varias utilizações. Esta perda de poder de conversão deve-se à degradação das esferas que retêm a enzima. Uma inspecção visual mostra que as esferas deformam reduzindo drasticamente a área disponível para reacção. Este foi o primeiro ponto em que este efeito foi claramente visível e todos os ensaios seguintes sofram de uma conversão muito baixa quase independente ao tempo de residência.

## 4 Conclusões

A equação de Michaelis-Menten foi ajustada aos resultados experimentais da conversão da sacarose em reactor fechado e em fase homogénea, obtidos à temperatura de 55 °. Foi obtido o valor de  $V_{\max} = 30 \text{ g}_{\text{glicose}} \text{ s}^{-1}$ , parâmetro do modelo relativo à velocidade máxima, e de  $K_m = 0,014 \text{ g l}^{-1}$ , parâmetro de Michaelis-Menten. Foi ainda ajustado o modelo de Weaver-Burk, obtendo-se os valores de  $V_{\max} = 20 \text{ g}_{\text{glicose}} \text{ s}^{-1}$  e  $K_m = 0,011 \text{ g l}^{-1}$ . Estes valores são próximos dos valores reportados na literatura para o modelo de Michaelis-Menten,  $V_{\max} = 29,16 \text{ g}_{\text{glicose}} \text{ s}^{-1}$  e  $K_m = 0,039 \text{ g l}^{-1}$  [L].

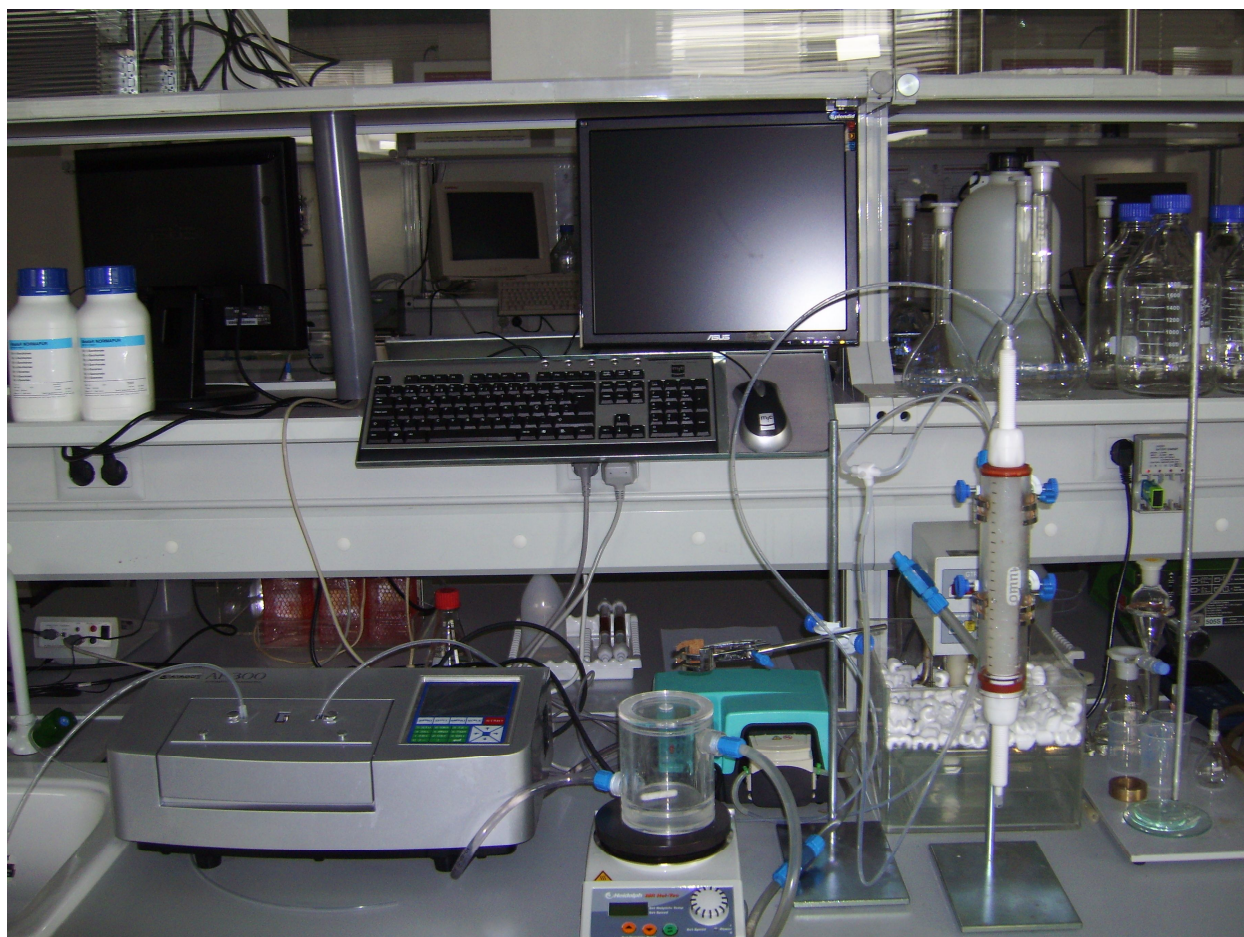
A cinética da reacção com concentrações de sacarose superiores a 0,29 molar evidencia a inibição causada pelo próprio substrato e pela diminuição da concentração da água (um dos reagentes) [F]. Foram determinados os parâmetros para este modelo que permitem um ajuste muito bom, porém, os valores calculados demonstram uma grande variação face aos valores do ajuste feito na literatura. A concentração a partir da qual se começa a verificar discrepância com o modelo de Michaelis-Menten, para concentrações de sacarose superiores a 0,29 molar, é próxima da indicada na literatura [F]. Não se pode concluir aonde origina esta discrepância visto que não se encontrou mais literatura a suportar nem os valores obtidos nem os valores da literatura.

Quando se variou a concentração da enzima foi observado que a concentração limite de sacarose aonde se dá o desvio de Michaelis-Menten aparenta variar com a concentração da enzima. A tendência observada é da equação de Michaelis-Menten continuar válida para uma gama maior de concentrações de sacarose quando se aumenta a concentração de enzima.

Ensaio simples em fase heterogénea em reactor fechado indicaram que a melhor proporção enzima – alginato ronda os 1 para 2 m/m e o volume ideal de esferas de alginato ronda os 70 ml, que equivale a cerca de 19 cm de altura na coluna. Estas indicações foram seguidas na montagem da instalação final. Esta instalação permite conversões superiores a 50 % com tempos de passagem de cerca 10 a 15 minutos quando alimentado com soluções de sacarose com concentrações entre 100 e 200 gramas por litro. Abaixo da concentração de 100 gramas por litro perde-se resolução na leitura no polarímetro.

Foi ainda observado que as esferas de alginato perdem a sua forma à medida que são utilizadas repetidamente. Prevê-se que as esferas têm uma vida útil de cerca de uma semana de utilização regular.

Por fim a verdadeira conclusão do trabalho não podia ser outra senão a própria instalação:



## 5 Avaliação do trabalho realizado

### 5.1 Objectivos Realizados

Foi desenvolvido uma instalação experimental, baseada numa instalação já existente, que contactará os alunos com um processo com grande relevância industrial, com um método de detecção mais complexo. Esta mesma instalação atinge uma conversão muito superior á instalação já existente. O estudo do impacto desta instalação sobre o interesse e o grau de aprendizagem do aluno está fora do âmbito deste trabalho.

### 5.2 Limitações e Trabalho Futuro

A nova instalação traz algumas complicações novas.

- A calibração tridimensional é mais complicada, e impõe mais trabalho, que a calibração da instalação já existente.
- O polarímetro muitas vezes não consegue a estabilidade que se conhece no espectrofotómetro, causando uma oscilação forte num sinal que deverá ser estável. Isto pode ser corrigido com um ajuste dos resultados experimentais a uma curva de segunda ordem.
- O tempo útil das esferas de alginato é de uma semana, forçando a reposição após esse tempo.

De forma a melhorar a instalação são sugeridos mais alguns tópicos de estudo que poderão melhorar a compreensão dos fenómenos envolvidos e melhorar a própria instalação

- Um estudo mais aprofundado sobre influência da quantidade de enzima sobre a reacção pode levar a um menos consumo de enzima que aumenta em contrapartida o consumo de sacarose.
- O estudo da influência do tamanho das esferas, e as maneiras de criação das esferas com tamanho controlado pode aumentar significativamente a eficiência da coluna podendo reduzir o consumo de enzima.
- A utilização de outros meios de imobilização terá certamente influência sobre a reacção. Uma vez conhecida a vantagem e desvantagem de cada meio de imobilização poderá ser

possível reduzir a quantidade de enzima na coluna ou a frequência com que se tem de trocar o enchimento da coluna.

- Um estudo da degradação das esferas poderá levar a maneiras de combater este fenómeno.
- A lixiviação da enzima das esferas na coluna pode impor outro limite temporal na vida útil das esferas. Esta possibilidade tem de ser estudada para eventualmente poder ser combatida.

### **5.3 Apreciação final**

Este trabalho, e trabalhos deste género deverão ter um impacto positivo nas aulas laboratoriais. O processo é interessante mas sem deixar de ser complicado. Espera-se que os alunos gostem do trabalho, aprendam muito com ele, mas acima de tudo é importante que desperte a curiosidade de forma a que todo o processo de aprendizagem, seja no laboratório nas aulas ou mesmo a vida privada, ganhe um novo sabor.



## Referências

- [1] Aladejana, F. Aderibigbe, O. *Science Laboratory Environment and Academic Performance*, J. Sci. Educ. Technol., 16,500-506 (2007)
- [2] Mc Donnell, C. O'connor, C. Seery, M. *Developing Chemistry Skills by Means of Student Driven Problem Based learning Mini-projects*. Chemistry Education Research and Practice 8(2)m 130-139 (2007)
- [3] Wenzel T. J. *The Teaching/Learning Process in Analytical Chemistry*, Microchimica Acta, 142, 161-166 (2003)
- [4] Dionello, R. G. Berbert, P. A. Molina, M. A. B. Viana, A. P. Carlesso, V.O. Queiroz, V.A. V. *Desidratação por imersão-impregnação de abacaxi em soluções de sacarose e em xarope de açúcar invertido*, Ciênc. Tecnol. Aliment., 27 (4), 701-709 (2007)
- [5] Almeida, A. C. *Estudo do processo em contínuo para produção de açúcar invertido por via enzimática*. Dissertação de mestrado, Centro de Tecnologia e Goeciência da Universidade Federal de Pernambuco, Recife –pe, Brasil, 2003
- [6] Tomotani, E. J. Vitolo, M. *Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor*, Journal of Food Engineering, 80, 662-667 (2007)
- [7] <http://www.glue.umd.edu/~nsw/ench485/lab14.htm>
- [8] Villegas, T. R. *Determinación de la Cinética de la Reacción Enzimática de Inversión de Sacarosa*. Proyecto Fin de Carrera, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2003
- [9] Mutlu, M. Turhan, N. Ercan, M. T. *Kinetics of Invertase Immobilised on Poly(phenyls) Coated Polystyrene Beads*. Biotechnology Techniques, 10 (2), 71-76 (1996)
- [10] Bowski, L. Saini, R. Ryu, D. Y. Vieth, W. R. *Kinetic Modeling of the Hydrolysis of Sucrose by Invertase*. Biotechnology and Bioengineering, XIII, 641-656 (1971)
- [K] W.G. Perry in *Improving learning: new perspectives*, (Paul Ramsden, ed.), Ch. 7 (pp.145-161), Kogan Page, London, 1988.
- [11] Mendes, A. *Laboratórios de Engenharia Química. Reactores em Fase Homogénea, Reactores Catalíticos, Separações não Convencionais e Tecnologia dos Sólidos Divididos*. FEUP Edições, Porto 2002

## Anexo 1

São apresentados alguns gráficos tipo para cada bloco de experiências. Primeiro para o reactor agitado em meio homogéneo com o sistema FIA, seguindo a resposta do polarímetro e por fim a coluna heterogénea.

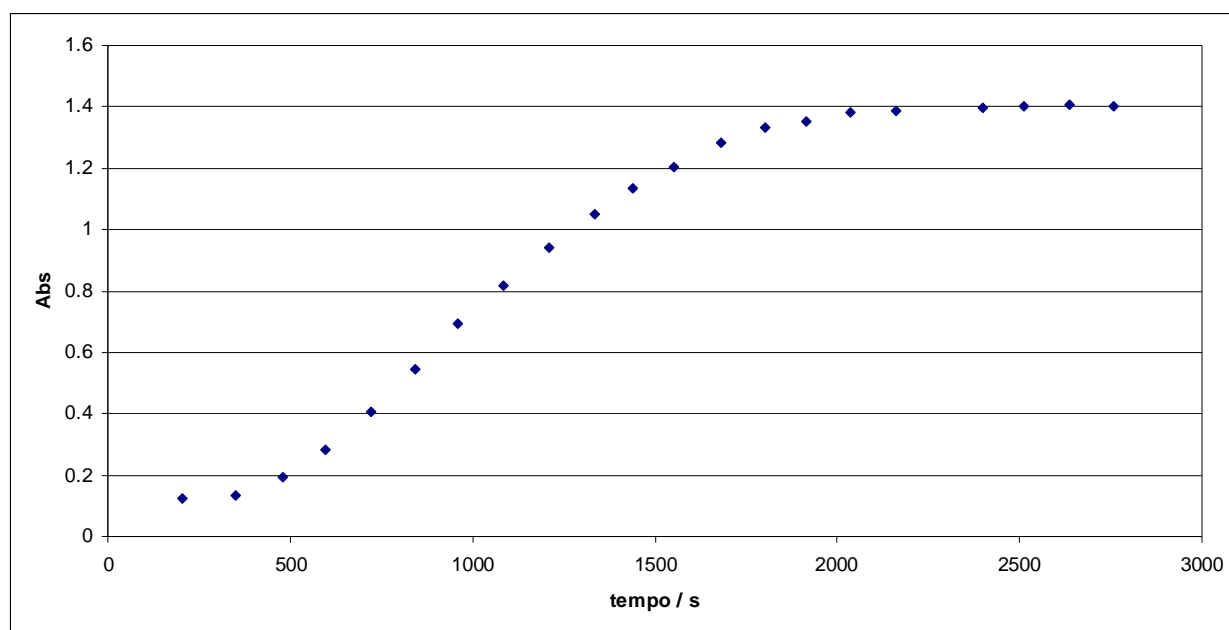


Figura A.1: Exemplo de dados obtidos do espectrofotômetro da experiência em meio homogéneo. Neste caso concreto a concentração inicial é de 60 gramas por litro de sacarose.

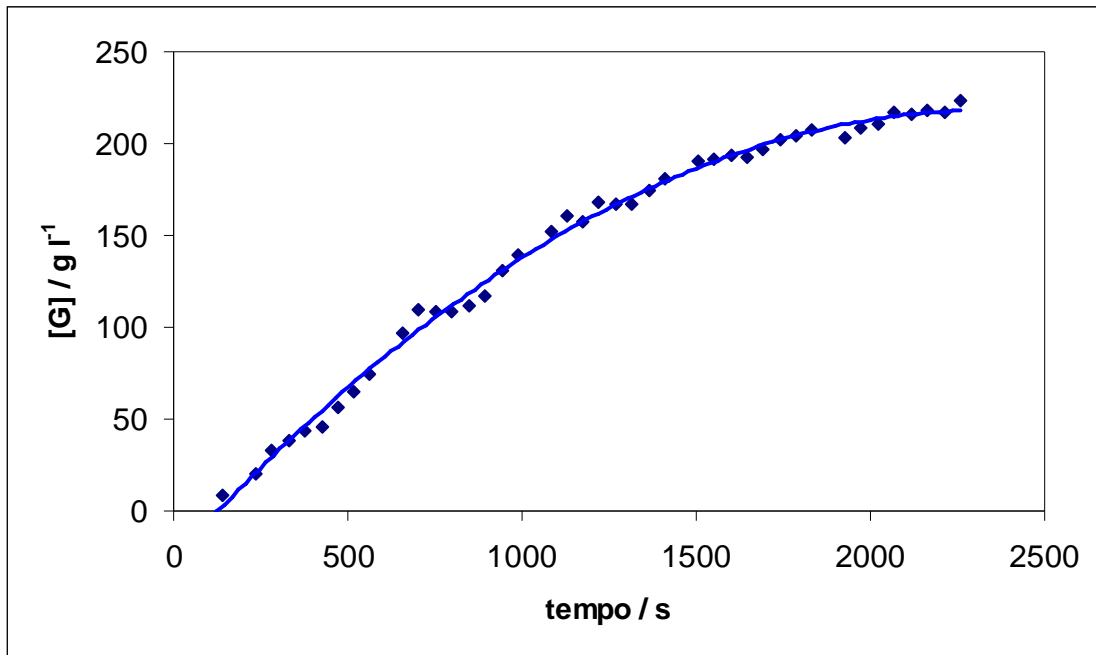


Figura A.2: Exemplo de dados obtidos do polarímetro da experiência em meio homogéneo. É juntamente apresentado o ajuste feito aos dos dados experimentais a um polinómio de segundo grau. Neste caso concreto a concentração inicial é de 250 gramas por litro de sacarose

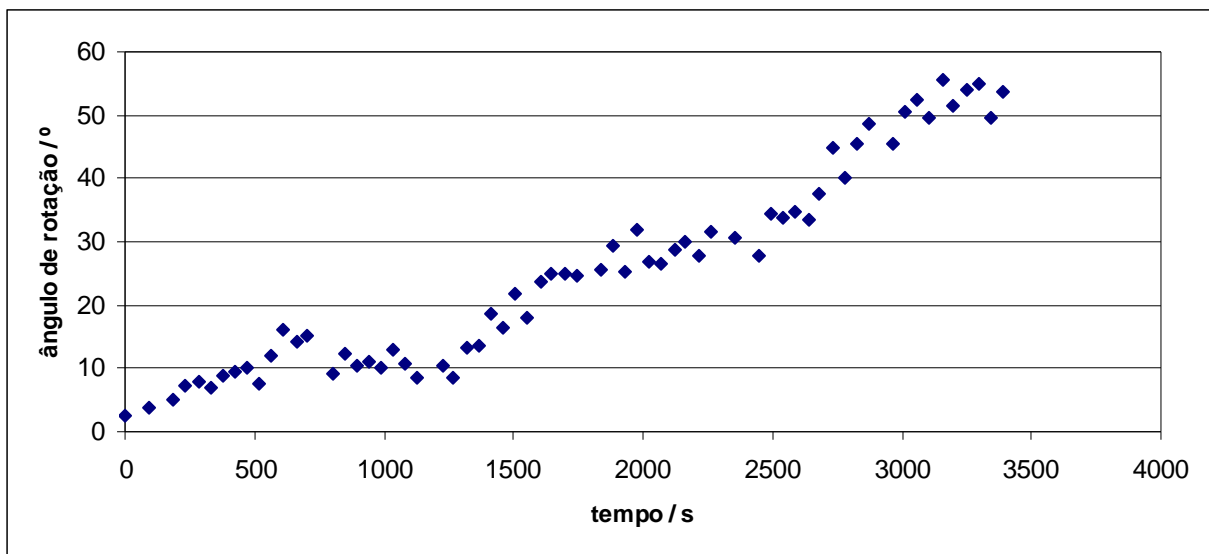


Figura A.3: Exemplo de dados obtidos do polarímetro da experiência em meio heterogéneo com reactor de leito fixo. São visíveis os patamares correspondentes a caudais diferentes. Neste caso concreto a concentração inicial é de 250 gramas por litro de sacarose. O primeiro patamar tem um caudal de 7ml por minuto, o segundo patamar 3,5 ml por minuto e o ultimo é 1,5 ml por minuto