RAPORT STIINTIFIC

privind implementarea proiectului ***PN-III-P4-ID-PCE-2016-0007,***
contract nr. 6/2017
Etapa 2

Conform programului experimental prevăzut în acest proiect, obiectivele principale şi activităţile de cercetare aferente acestei etape pot fi redate unitar astfel: **Pertractia sinergica a cefalosporinei C, acidului 6-aminopenicilanic, mupirocinului, acizilor hialuronic si 2-cetogluconic, metilbenzilaminei si acetofenonei.**

Activităţile prevăzute au fost realizate în totalitate şi au inclus studiile dedicate:

1) Pertractia sinergica a cefalosporinei C, acidului 6-aminopenicilanic, mupirocinului, acizilor hialuronic si 2-cetogluconic, metilbenzilaminei si acetofenonei din soluţii pure;

2) Pertractia sinergica a cefalosporinei C, acidului 6-aminopenicilanic, mupirocinului, acizilor hialuronic si 2-cetogluconic, metilbenzilaminei si acetofenonei din medii simulate.

In continuare, avaând în vedere volumul de informaţii şi limitările tehnice ale redactării raportului, va fi prezentată o sinteză a rezultatelor experimentale derulate în acestă etapă a proiectului.

Unul dintre compuşii studiaţi şi care, prin problematica abordată, include numeroase dintre aspectele relevante întâlnite în studiile celorlaltor compuşi de biosinteză, este acidul 2-cetogluconic. Acidul 2-cetogluconic este principalul compus secundar din tehnologia de obținere a vitaminei C, care se găsește în lichidul de fermentație în concentrații reduse. În scopul stabilirii condițiilor optime de separare a celor doi compuși cu ajutorul membranelor lichide și pe baza datelor experimentale obţinute pentru extracţia reactivă a acidului 2-cetogluconic, s-a realizat separarea acestuia prin pertracție în aceleași condiții utilizate la separarea vitaminei C. Aceasta deoarece cea mai eficientă metodă pentru a îmbunatăți performanța selectivității și a permeabilității membranelor lichide constă în adăugarea în faza organică a unui agent purtător capabil să reacționeze reversibil cu solutul (pertracția facilitată). Astfel, pe baza specificității interacțiilor Amberlite LA-2 – acid 2-cetogluconic, în funcție de tipul legăturii și de celelalte caracteristici ale sistemului de pertracție se pot separa selectiv fie acidul, fie vitamina C din amestec.

Cercetările experimentale s-au efectuat utilizându-se instalaţia de pertracţie care constituie subiectul brevetului acordat colectivului de cercetare (*Instalatie pentru studiul extractiei si transportului printr-o membrana lichida, Brevet RO119690 B1/2005*). Soluţiile apoase au fost alimentate separat cu un

debit volumic de 1,85 l/h, membrana lichidă a fost alcătuită din diclormetan în care a fost dizolvat, în diferite concentraţii variind între 0 şi 100 g/l ($2{,}63\cdot10^{-1}$ M) Amberlite LA-2. Concentraţia acidului 2-cetogluconic în faza apoasă inițială a fost 1 g/l ($5{,}15\cdot10^{-3}$ M), iar pH-ul acestei soluții a fost modificat între 1 şi 6, cu ajutorul unor soluţii de 4% acid sulfuric, respectiv 4% hidroxid de sodiu. Faza apoasă finală a constat din soluţii de hidroxid de sodiu, cu valori ale pH-ului cuprinse între 7 şi 12. Corectarea valorii pH-ului celor două faze apoase s-a efectuat pe baza indicaţiilor unui pH-metru digitalic. .

Evoluţia procesului s-a urmărit prin intermediul fluxurilor masice iniţiale şi finale ale celor doi acizi şi a factorilor de permeabilitate prin membrana lichidă, calculate pe baza dozărilor HPLC.

Gradientul de pH dintre fazele apoase, concentraţia agentului purtător dizolvat în membrana lichidă şi intensitatea amestecării fazelor sunt principalii parametri care controlează eficiența pertracției. În figura 1 este reprezentat mecanismul de separare al acidului 2-cetogluconic prin pertracție utilizând un agent purtător aminic.

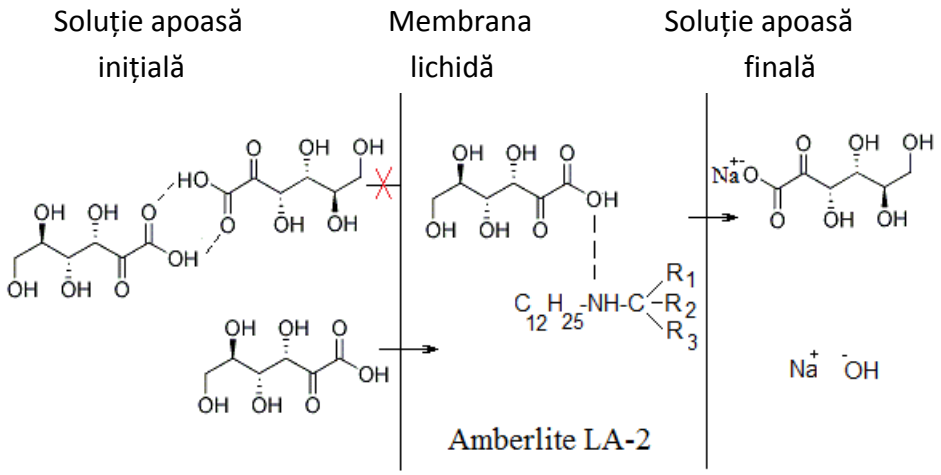


Figura 1. Mecanismul pertracției facilitate sinergice a acidului 2-cetogluconic

În faza apoasă inițială acidul 2-cetogluconic se găsește în formă liberă sau sub formă de dimeri, în strânsă legătură cu pH-ul fazei apoase. La interfața dintre soluția inițială și membrana lichidă se formează, doar între forma liberă nedisociată a acidului și agentul purtător (Amberlite LA-2), prin extracție reactivă, complecși puternic hidrofobi care traversează membrana lichidă. La interfața dinspre soluția apoasă finală, prin reacții de reextracție, complexul se descompune eliberând agentul purtător, care poate participa la un nou transport, și acidul care reacționează cu hidroxidul de sodiu formând sarea de sodiu.

Coeficientul de distribuție este principalul parametru care descrie eficiența extracției reactive de la interfața membrană lichidă/faza apoasă inițială, iar în cazul acidului 2-cetogluconic acesta este în strânsă legatură cu pH-ul soluției. Influența pH-ului fazei apoase inițiale și finale asupra fluxurilor masice ale acidului 2-cetogluconic este redată în figura 2. Pentru fluxul masic inițial, rezultatele indică un maxim corespunzător valorii de pH = 3, atât pentru fluxul masic inițial cât și pentru cel final (variaţie mai pronunţată în cazul fluxului masic iniţial), urmat de o reducere accentuată odată cu apropierea de domeniul neutru.

Această variație a fluxului masic de la interfața de separare a membranei lichide cu faza apoasă inițială este rezultatul mecanismului extracției reactive cu Amberlite LA-2:

- datorită prezenței dimerilor, la un pH puternic acid, care blochează gruparea carboxil făcând imposibilă reacția cu agentul purtător, eficiența extracției și implicit fluxul masic inițial au valori mici în domeniu de pH < 3.

- creșterea pH-ului determină reducerea semnificativă a dimerizării acidului 2-cetogluconic (determinând creșterea eficienței separării), dar și disocierea acidului (cu efect negativ asupra extracţiei reactive), astfel încât la pH = 3 fluxul masic inițial este maxim.

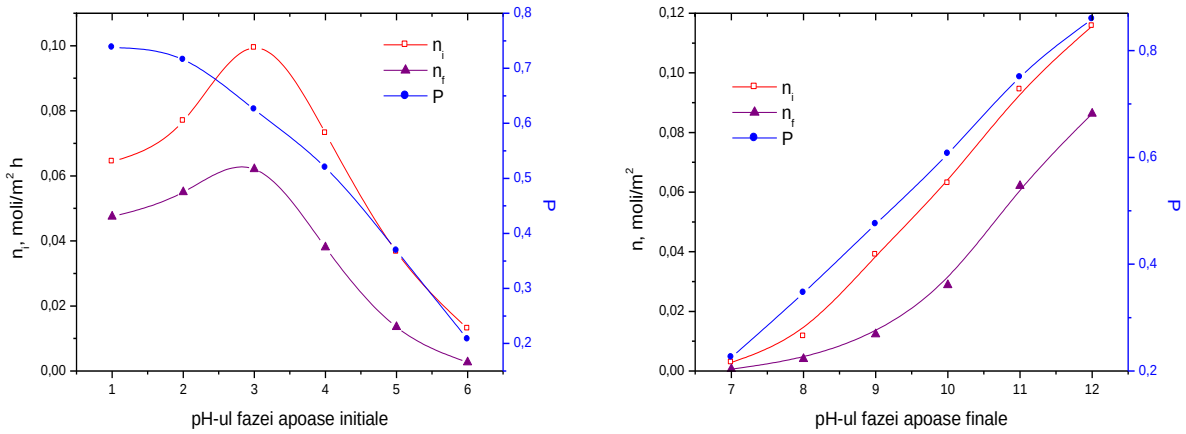


Figura 2. Variația fluxurilor masice inițial și final a acidului 2-cetogluconic și a factorului de permeabilitate în funcție de pH-ul fazei apoase inițiale și finale (pH_i = 3, pH_f = 11, turația = 500 rpm, concentrația Amberlite LA-2 = 40 g/l)

Fluxul masic final are o alură similară celui inițial, datorită dependenței de concentrația acidului 2-cetogluconic din membrana lichidă.

În cazul pertracţiei facilitate cu Amberlite LA-2, reextracţia acidului în faza apoasă finală se bazează pe reacţia interfacială dintre compusul existent în membrana lichidă şi hidroxidul de sodiu la interfața de separare membrană lichidă/soluție finală:

$$C_5H_9O_5\text{-}COOH.Q_{(o)} + NaOH_{(aq)} \leftrightarrow C_5H_9O_5\text{-}COO^-Na^+_{(aq)} + Q_{(o)} + H_2O$$

Creșterea pH-ului fazei finale, prin concentrația mai mare a hidroxidului de sodiu, induce mărirea vitezei de reextracție și implicit, determină accelerarea semnificativă a fluxului masic final al acidului 2-cetogluconic. Prin creșterea gradientului de pH dintre cele două faze apoase și a gradientului de concentraţie al acidului între cele două interfeţe ale membranei lichide, se induce intensificarea fluxului masic iniţial.

Creşterea gradientului de pH dintre fazele apoase determină creşterea permeabilităţii prin membrana lichidă. Această variație se datorează eficienței ridicate a procesului de reextracție în domeniul puternic bazic și a acumulării acidului în membrana lichidă la pH_i = 3 (în domeniul puternic acid, eficiența extracției reactive nu este foarte ridicată, fluxul masic final compensându-l pe cel inițial, însă odată cu apropierea de pH-ul neutru scade eficiența extracției, din membrană fiind reextras acidul 2-cetogluconic acumulat la pH_i = 3). Creșterea factorului de permeabilitate cu pH_f sugerează faptul că accelerarea vitezei de reextracţie a acidului 2-cetogluconic devine mai importantă decât a vitezei de extracţie.

Transportul acidului 2-cetogluconic între cele două soluții apoase depinde atât de pH-ul fazelor apoase, cât și de proporția de agent purtător din membrana lichidă. Rezultatele experimentale din figura 3 au evidențiat faptul că atât fluxurile masice, cât și factorul de permeabilitate cresc cu mărirea concentrației Amberlite LA-2 în membrana lichidă.

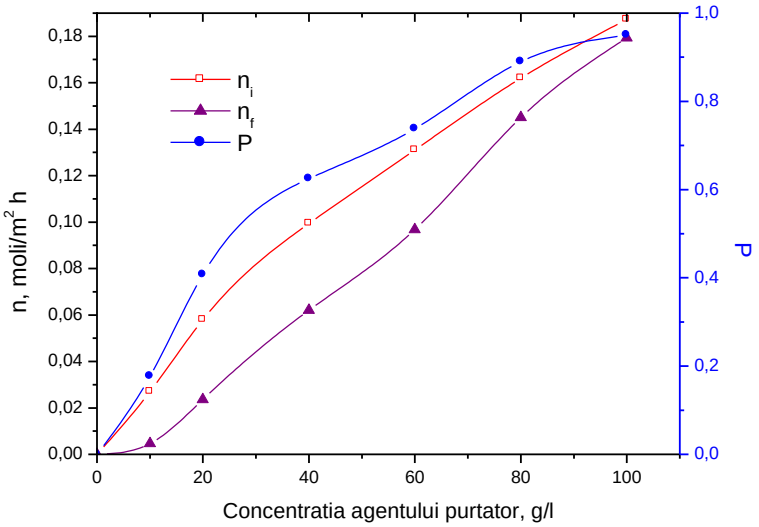


Figura 3. Variația fluxurilor masice inițial, final și a factorului de permeabilitate în funcție de concentrația Amberlite LA-2 (pH_i = 3, pH_f = 11, turația = 500 rpm)

Această evoluție a fluxurilor masice este consecința creșterii concentrației unuia dintre participanții la extracția reactivă care se desfășoară la interfața de separare dintre faza apoasă inițială și solvent, care conduce la o viteză mai mare de formare a complexului (o cantitate mai mare de acid 2-cetogluconic fiind extras în membrana lichidă). Această mărire a concentrației complexului în stratul de solvent determină și creșterea fluxului masic final, dependent de concentrația acidului extras.

Aceeași evoluție crescătoare o înregistrează și factorii de permeabilitate, datorită rezistenței de natură cinetică superioară care afectează procesul global de separare.

Stabilirea influenței proceselor de difuziune și a vitezelor reacțiilor chimice asupra fluxurilor masice este foarte importantă pentru a studia eficiența transportului acidului 2-cetogluconic prin membrana lichidă. Prin micșorarea straturilor limită de la ambele interfețe de separare ale stratului de solvent organic cu fazele apoase, intensitatea agitării fazelor poate influența semnificativ performanța pertracției. Turația agitatoarelor a variat în intervalul 0 - 600 rpm, din figura 4 observându-se o creștere accentuată a fluxurilor și a factorului de permeabilitate cu intensitatea agitării până la 500 rpm, ceea ce sugerează o reducere a grosimii stratului limită din vecinătatea celor doua interfețe.

Variaţia înregistrată este specifică unui regim difuzional de realizare a pertracției (scăderea grosimii straturilor limită induce reducerea rezistenței datorate difuziei și, implicit creșterea fluxurilor masice). Peste 500 rpm, fluxurile masice rămân constante, ceea ce corespunde atingerii unei grosimi minime a straturilor limită și trecerea la regimul cinetic de realizare a pertracției.

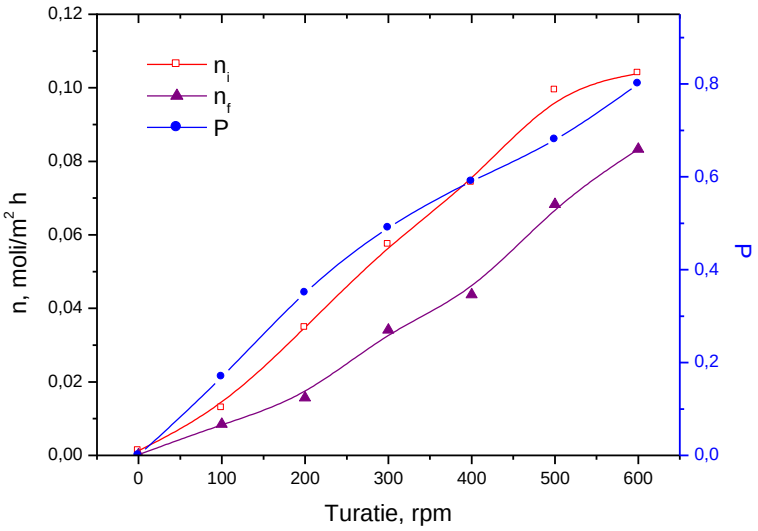


Figura 4. Variația fluxurilor masice inițial, final și a factorului de permeabilitate în funcție de turație (pH_i = 3, pH_f = 11, concentrația Amberlite LA-2 = 40 g/l)

Creșterea factorului de permeabilitate cu turația indică o rezistență superioară la difuzie a 2-cetogluconatului de sodiu comparativ cu difuzia acidului liber din faza apoasă inițială.

*

* *

Din punct de vedere al obiectivelor generale ale programului PCE-IDEI, **rezultatele obţinute** în cadrul proiectului până în au fost diseminate pe parcursul anului 2018 după cum urmează:

1) transmiterea spre publicare a **2 articole** in reviste cotate ISI (*incluzând acknowledgements*);

2) înregistrarea unei **cereri de brevet OSIM** pentru un procede de separare inclus în proiect;

3) transmiterea spre publicare a **unui capitol** intr-o monografie publicată la o editură internaţională de prestigiu;

4) **6 participări** la conferinţe internaţionale;

5) includerea rezultatelor într-o **teză de doctorat** al unui membru al echipei de cercetare;

6) susţinerea unui **raport de cercetare** al unui doctorand membru în echipa proiectului;

7) obţinerea unei **Medalii de aur** la Saloanele intenaţionale de Inventică;

8) **continuarea şi dezvoltarea colaborării** cu alte universităţi din ţară (U.M.F. „Gr.T. Popa” din Iaşi).

Director proiect,
Prof.univ.dr.ing. Dan Caşcaval