RAPORT STIINTIFIC

privind implementarea proiectului ***PN-III-P4-ID-PCE-2016-0007,***
contract nr. 6/2017
Etapa 3

Conform programului experimental prevăzut în acest proiect pentru perioada menţionată, obiectivele principale şi activităţile de cercetare pot fi redate unitar astfel:

3. Pertractia sinergica a cefalosporinei C, acidului 6-aminopenicilanic, mupirocinului, acizilor hialuronic si 2-cetogluconic, metilbenzilaminei si acetofenonei si optimizarea sistemelor hibrid pentru obtinerea produselor fermentative si enzimatice.

Activităţile prevăzute până la data raportării au fost realizate în totalitate şi au inclus studiile dedicate:

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

3.2. Proiectarea şi constrcţia sistemelor hibrid

3.3. Aplicaţii ale sistemelor hibrid pentru obtinerea compuşilor studiaţi

3.4. Modelarea bioproceselor hibride

3.5. Optimizarea proceselor hibride.

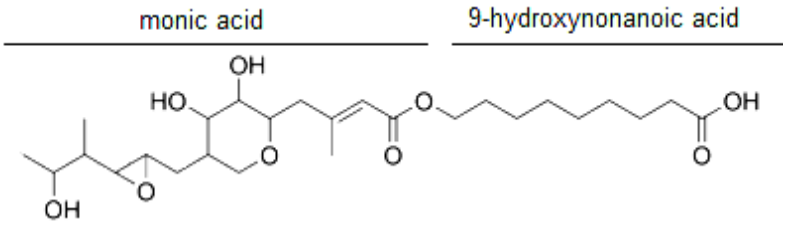
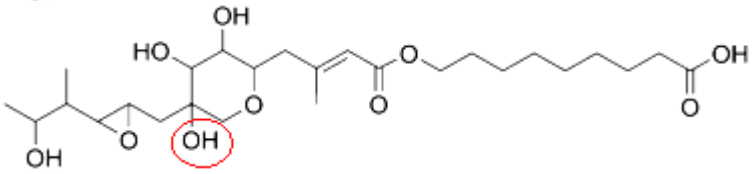
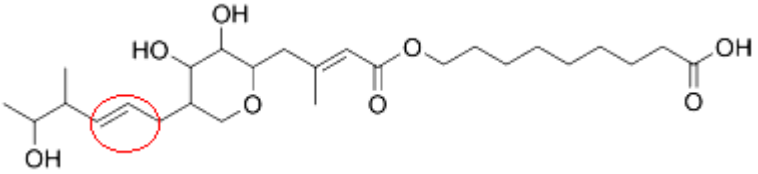
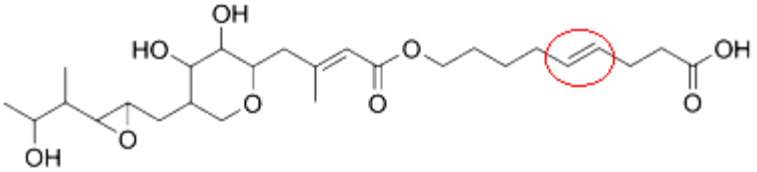
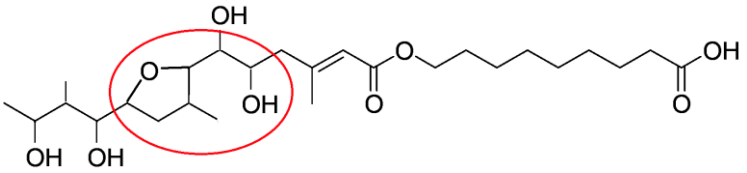
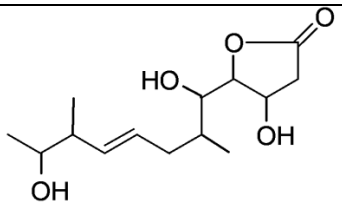
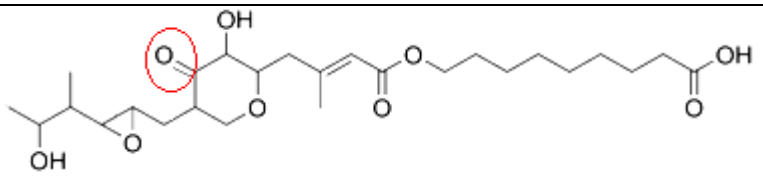
In continuare va fi prezentată o sinteză a rezultatelor experimentale derulate în această etapă a proiectului, insistând pe principalele rezultate.

Acidul pseudomonic A (Tabelul 1) reprezintă 90 - 95% din amestec și este principalul compus al Mupirocinului. Are o activitate antibacteriană largă asupra bacteriilor Gram pozitive și unele Gram negative și o adsorbție sistemică limitată: timpul de înjumătățire este de 15 minute, fiind transformat în acid monic (formă inactivă) excretat prin rinichi. Este cel mai utilizat antibiotic din lume, în acest moment, pentru tratarea infecțiilor țesuturilor moi și pielii cu *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA) sau pentru decolonizarea pacienților cu risc la această bacterie.

Pseudomonas fluorescens este microorganismul utilizat pentru producerea de Mupirocin prin fermentația submersă. Mulți cercetători au încercat să îmbunătățească performanța fermentației selectând tulpini noi sau aplicând diferite tehnici de control. Genul *Pseudomonas* include bacterii gram-negative, în formă de bacili, strict aerobe, care sunt capabile să producă mai mulți metaboliți secundari cu activitate antibiotică: pirrolnitrină, alchilresorcinol, piocianină. Prima tulpină care a fost izolată pentru producerea Mupirocinului a fost *P. fluorescens* NCIMB 10586, dar șapte tulpini noi: D7 și G11 (izolate dintr-un acvifer curat), W2Jun17, LMG 14677, W15Feb34, B329, W2Aug9 (din colecția râului Woluwe) au fost investigate și prezentate în tabelul 2. Toate tulpinile au fost izolate din apa și sol, cu excepția speciilor B329 care au fost obținute din rizosfera din iarbă, iar rezultatele sunt raportate pentru

creșterea pe același mediu (pe litru): 10 g de triptonă bacto, 5 g extract de drojdie, 5 g NaCl, 1 g glucoză, 0,7 g K_2HPO_4 și 0,3 g KH_2PO_4.

Tabelul 1. Structurile mupirocinului.

Nr.	Tipul de acid	Structura
1.	Acid Pseudomonic A	
2.	Acid Pseudomonic B	
3.	Acid Pseudomonic C	
4.	Acid Pseudomonic D	
5.	Mupirocin W	
6.	Mupirocin H	
7.	Mupirocin F	

Pentru a optimiza etapele de separare a Mupirocinului, am propus o tehnică neconvenţională, respectiv extracția reactivă, ca o cale selectivă pentru recuperarea de produse de biosinteză în concentrație scăzută dintr-un amestec complex. Acesta combină într-o singură operație extracția lichid-lichid și o reacție chimică între un extractant și produsul de interes, ceea ce poate duce la intensificarea procesului. Extracția reactivă implică, de obicei, două faze imiscibile: faza apoasă care conține produsul util și faza organică (solventul) care va reprezenta extractul. Etapa cheie a procesului este formarea unui

complex hidrofob și reversibil între extractant și produs, acesta din urmă fiind recuperat din complex printr-o altă etapă de extracție cu o soluție de bază diluată sau prin creșterea temperaturii.

În cadrul acestui studiu s-au urmărit următoarele obiective:

- Eficiența extractiei și variația coeficientul de distibuție în urma utilizării ca solvenți a diclormetanului și n – heptanului și ca extractanți: Amberlite LA – 2 și tri –n- octilamina TOA.
- Studiul influenței pH-ului asupra extracției reactive.
- Studiul influenței concentrației de extractant asupra eficienței separarii produsului.
- Selectivitatea separării prin metoda de extracție reactivă.

Tabelul 2. Tulpini de *Pseudomonas* utilizate pentru producerea de Mupirocin.

Nr.	Tipul de tulpină	Productivitate, µg/ml
1	*Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586	8,3
2	*Pseudomonas fluorescens* D7	1,8 - 3,5
3	*Pseudomonas fluorescens* G11	1,8 - 3,5
4	*Pseudomonas fluorescens* W2Jun17	1,0
5	*Pseudomonas fluorescens* LMG 14677	6,7
6	*Pseudomonas fluorescens* W15Feb34	5,8
7	*Pseudomonas fluorescens* B329	4,5
8	*Pseudomonas fluorescens* W2Aug9	15,2

Experimentele de extracție lichid-lichid pentru separarea Mupirocinului au fost efectuate într-o coloană de extracție cu amestecare vibratorie, care oferă posibilitatea obţinerii unor viteze de extracţie ridicate, datorită ariilor interfaciale foarte mari generate de agitarea vibratorie şi a atingerii rapide a echilibrului interfazic. Instalația de extracție este formată dintr-o coloană de sticlă cu un diametru interior de 3,6 cm și o înălțime de 25 cm prevazută cu un agitator vibrator (disc perforat cu 45 mm în diametru și o secțiune liberă de 20%), cu frecvență de 50 s^{-1} și amplitudinea de 5 mm, menținut la interfața inițială dintre cele două faze (apoasă și organică). Timpul de extracție a fost de 1 min și separarea fazei a fost făcută într-un separator centrifugal la 6000 rpm. Toate experimentele au fost efectuate la 25 ± 0,02 ^{0}C.

Concentrația inițială a acizilor pseudomonici în faza apoasă a fost de 0,0265 g / L ($5,3 \cdot 10^{-5}$ M), cu aceste proporții: 90,2% acid pseudomonic A, 5,82% acid pseudomonic B și 1,98% acizi pseudomonici C și D, iar cei doi agenti de extractie de tip aminic (lauril tri-alchilmetilamina, Amberlite LA-2 și trioctilamina, TOA) au fost dizolvați individual în doi solvenți cu constantă dielectrică diferită. Concentrația extractantilor în faza organică a variat între 0 și 20 g / L. Valoarea pH-ului fazei apoase a variat între 4 și 9, ajustată cu o soluție de acid sulfuric 3% sau hidroxid de sodiu 3%, în funcție de valoarea pH-ului prescris, folosind pH-metrul digital (CONSORT C 836).

Acizii pseudomonici au o structură complexă (Tabelul 1) cu o grupă carboxilică și o valoare teoretica pKa cuprinsa între 4,76 (acidul Pseudomonic B și C) și 4,83 (acidul Pseudomonic A și D). Mupirocinul este un acid puternic, dar activitatea antibiotică în soluții apoase depinde de pH: activitatea se menține doar între pH 4 și 9 (la pH 1, antibioticul suferă rearanjări moleculare în doar 30 de minute, în timp ce la pH 13 doar 30% compuși este degradat), deci experimentele de extracție au fost efectuate

în acest interval de stabilitate. Mecanismul de extracție reactivă pentru acizii pseudomonici este reprezentat în figura 1. Mupirocinul a fost extras din soluții apoase folosind două amine: una secundară (Amberlite LA-2) și una terțiară (TOA) dizolvate în diferiți solvenți organici: diclorometan, n-heptan și n-heptan cu 1-octanol. Complexul format între Mupirocin (solut) și extractant este solubil numai în faza organică și n reprezintă numărul de molecule de amine implicate în formarea complexului. Reacția chimică care duce la complexul solut-extractant este reversibilă, astfel încât, după separare, re-extracția cu o soluție alcalină și creștere a temperaturii duce la recuperarea acizilor pseudomonici în faza de reextracție .

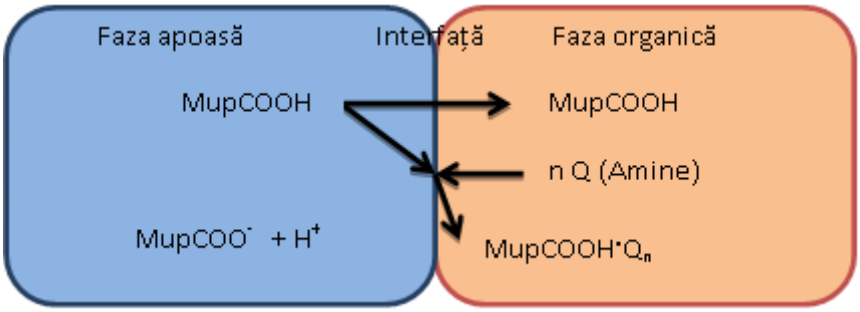


Figura 1. Extracția reactivă a Mupirocinului (MupCOOH) cu amine alifatice cu greutate moleculară mare (Q).

Sistemul de extracție reactivă este puternic influențat de bazicitatea aminei și de aciditatea solutului, dar și de concentrația inițială a extractantului și a acidului, de bariera sterică, valorile de pH ale fazei apoase, tipul de solvent și solubilitatea în apă.

Acizii pseudomonici cu o solubilitate scăzută în solvenții nepolari ca n-heptan, ceea ce generează eficiența scăzută a extracției fizice, pot fi separati prin adăugarea unui extractant sau a unui modificator de fază (1-octanol). În figura 2 sunt prezentate rezultatele acestor două moduri de îmbunătățire a eficienței recuperării acizilor pseudomonici din soluții apoase.

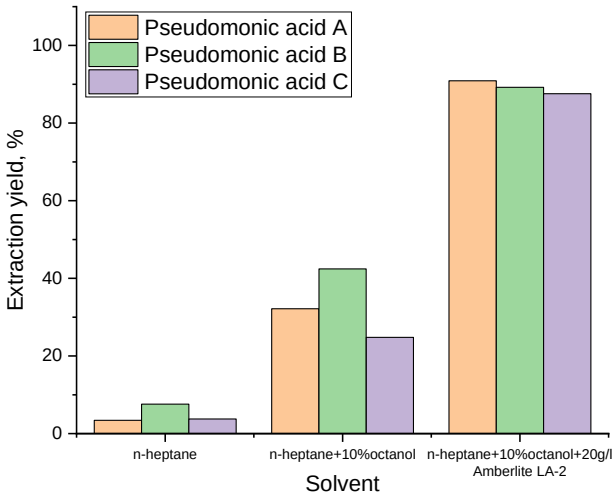


Figura 2. Eficiența de extracție a acizilor pseudomonici (pH 4).

Adăugarea de 1-octanol (constantă dielectrică 10,3 la 25 °C) a generat o creștere a polarității fazei organice și a îmbunătățit eficiența extracției în special pentru acidul pseudomonic A cu un factor de 9,38, atingând un maxim de 32,17%, comparativ cu un factor de numai 5,59 pentru acidul pseudomonic B și 6,57 pentru acidul pseudomonic C. Acizii carboxilici cu caracter hidrofil datorită polarității lor, au tendința de a forma asociații (dimeri, trimeri, etc.) în solvenți organici nepolari: (Mup-COOH) nQ, fenomene mai puțin importante în solvenții polari. În cazul utilizării unui solvent protic, ca 1-octanol, acest fenomen este inhibat datorită capacității acestor solvenți de a participa ca donatori la legarea de hidrogen. Un efect sinergic puternic a fost observat atunci când Amberlite LA-2 a fost amestecat cu 1-octanol și n-heptan, eficiența extracției atingând 89,23%, respectiv 87,56% atât pentru acidul pseudomonic B și C, și 90,89% pentru acidul pseudomonic A, datorită îmbunătățirii proprietățile hidrofobe ale acizilor complexați și abilităților de solvatare ale fazei organice, care îmbunătățesc eficiența extracției.

Influența pH-ului asupra extracției reactive a fost studiată atât pentru extractanți, cât și pentru solvenți diferiți: n-heptan, n-heptan / octanol și diclorometan și sugerează că legăturile de hidrogen reprezintă interacțiunea dominantă. Intervalul de pH= 4 - 9 a fost ales în corelație cu stabilitatea acidul pseudomonic A: în afara acestui interval, rearanjările moleculare au loc mai ales în condiții foarte acide prin deschiderea intramoleculară a inelului epoxidic.

După cum se poate observa din figura 3, variația eficienței extracției cu pH-ul sugerează că natura extractantului are o influență mai mică asupra performanței de separare în comparație cu polaritatea solventului. Pentru toți solvenții, eficiența extracției reactivă scade odată cu creșterea pH-ului, ceea ce sugerează formarea legăturii de hidrogen între acizii pseudomonici și amine, care necesită ca primul să fie sub formă nedisociată (forma moleculară a acizilor pseudomonici este extrasă în mod selectiv în faza organică în timp ce forma protonată rămâne în faza apoasă).

La valoarea pH-ului egală cu pKa a acidului, jumătate din cantitatea de acid pseudomonic este protonată, iar creșterea pH-ului generează o protonare completă care va induce o scădere mai accentuată a randamentului de extracție. Pentru domeniul considerat al valorilor pH-ului, pH-ul optim pentru extracția reactivă s-a dovedit a fi 4, pentru toți solvenții analizați, favorabil atât pentru separarea, cât și pentru stabilitatea și menținerea activității antibacteriene a antibioticului.

Gradul de extracție mai mare a fost obținut pentru diclorometan, datorită polarității sale superioare comparativ cu n-heptan, care este un solvent inactiv. În n-heptan, legăturile de hidrogen se pot forma între complexul (solut-extractant) și alte molecule de acizi suplimentari, datorită imposibilității formării legăturii de hidrogen a solutului cu solventul (figura 4). Cu toate acestea, datorită moleculei voluminoase a acizilor pseudomonici care induce impiedicări sterice cumulată cu o concentrație inițială mai mică comparativ cu extractantul, această posibilitate este puțin probabilă. În n-heptan acizii pseudomonici sunt insolubili, astfel încât extracția reactivă cu amine cu lanț lung are loc printr-o reacție interfațială, urmată de difuzarea complexului rezultat în faza organică. În cazul diclormetanului și n-heptanului cu 1-octanol la eficiența extracției contribuie atât extracția fizică, cât și cea reactivă. În cazul n-heptanului și 1-octanolului randamentul de extracție superior poate fi explicat prin formarea unui complex între solut, extractant și modificator de fază.

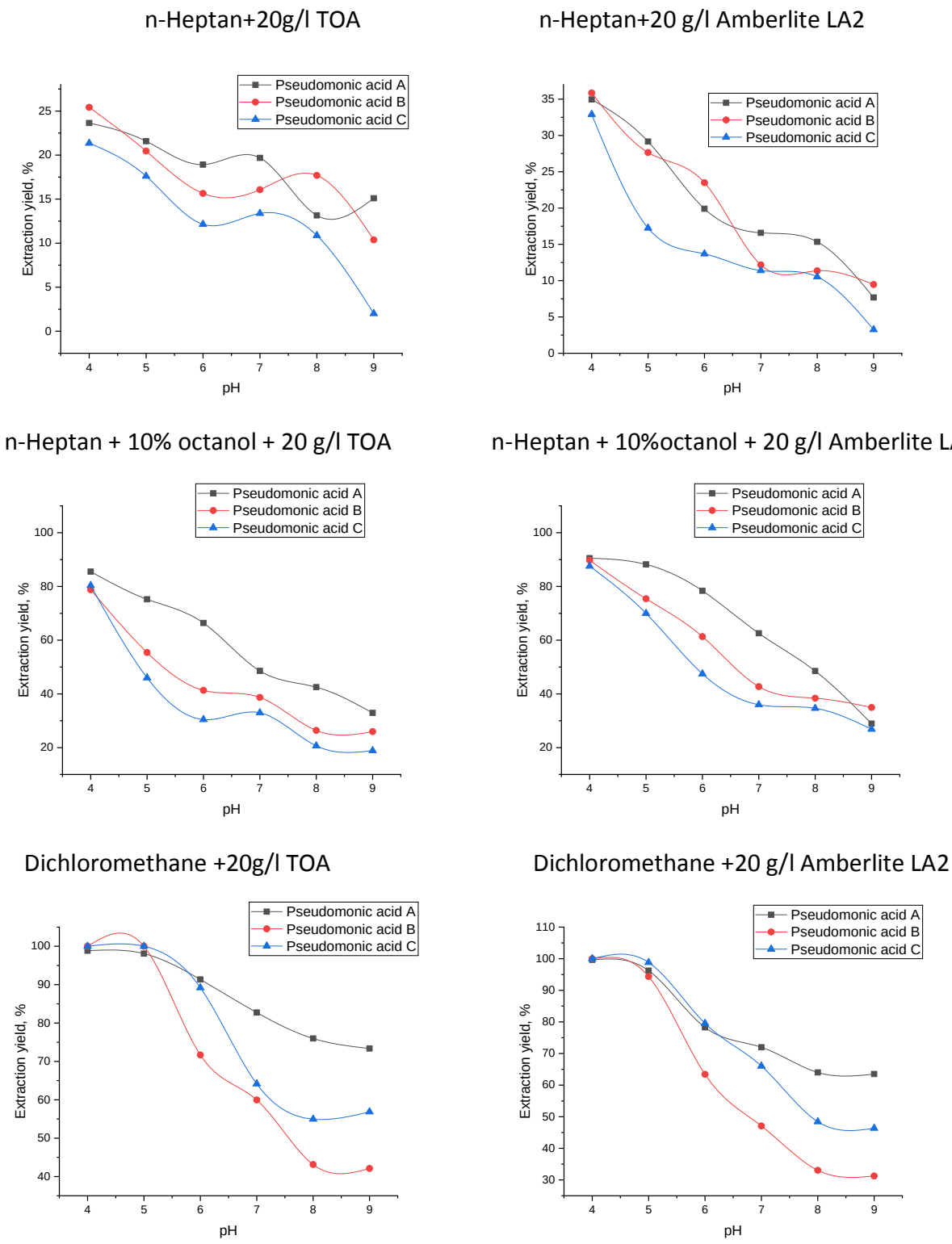


Figura 3. Influența pH-ului asupra extracției Mupirocinului folosind Amberlite LA-2 și TOA.

Pentru compuși carboxilici (muconici, succinici, lactici), complexul solut-extractant este format pe baza unei legături de hidrogen între hidrogenul din grupa hidroxil a acizilor pseudomonici și atomul central de azot al aminei (negativ polarizată). Formarea legăturii de hidrogen este mai ușoară pentru o polarizare negativă mai mare a atomului de azot, care este influențată atât de numărul cât și de lungimea lanțurilor de carbon, ultima cu influență mai mare. Acest lucru ar putea explica rezultatele mai bune care s-au obținut atunci când a fost utilizată Amberlite LA-2 (amină secundară) decât TOA (amină

terțiară), cumulată cu: densitatea superioară a gruparilor aminice, impiedicari sterice mai reduse în jurul gruparilor aminice reactiv și bazicitatea superioara a aminelor secundare. Având în vedere acest aspect, influența concentrației extractantului a fost analizată doar pentru Amberlite LA-2.

Extracția reactivă a acizilor pseudomonici cu Amberlite LA-2, Q, se bazează pe formarea la interfața de separare dintre fazele apoasă și organică a unui compus puternic hidrofob. În acest proces este implicată gruparea –COOH a acidului, procesul decurgând prin intermediul interacțiunilor dintre cei doi componenți, interacțiuni de tipul legăturilor de hidrogen, dacă acidul este nedisociat în faza apoasă. Reacție interfacială poate fi reprezentată astfel:

$$MUP\text{-}COOH_{(aq)} + n\,Q_{(o)} \longleftrightarrow MUP\text{-}COOHQ_{n\,(o)}$$

Pentru acest sistem, coeficientul de distribuție, D poate fi calculat cu ajutorul unui algoritm prezentat anterior, care conduce la expresia logaritmată:

$$\ln D + \ln\left(1 + \frac{K_d}{[H^+]}\right) = \ln K_E + \ln[Q_{(o)}] \quad (5)$$

Reprezentarea grafică a acestei ecuații este prezentată în figura 4 pentru sistemele de extracție studiate. Din panta dreptei date de ecuație este posibilă determinarea numărului de molecule de Amberlite LA-2, n, care participă la formarea complexului interfacial și din intersectiei cu ordonata valoarea constantei de extracție, K_E.

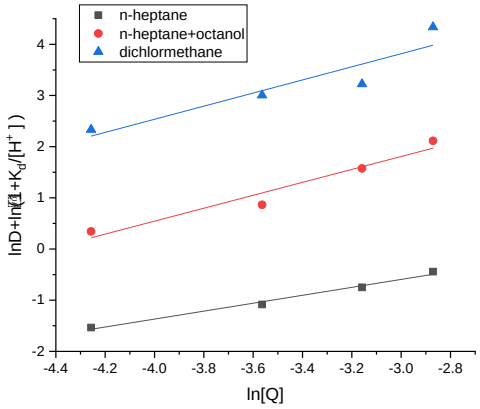


Figura 5. Reprezentarea grafică a ecuației (5).

Conform figurii 4, independent de polaritatea solventului, numărul de molecule extractante aminice implicate în aductele interfaciale este 1 (tabelul 3), dar valorile constantei de extracție (tabelul 3) depind de polaritatea fazei organice.

Tabelul 3. Valorile constantelor de extracție corespunzătoare sistemelor studiate și Amberlite LA2.

Solvent	n	Ke, (L mol^{-1})
n-heptan	0.77251	2.31
n-heptan/octanol	1.26328	269.93
diclormetan	1.28128	2122.45

Aceste rezultate indică faptul că, indiferent de valoarea pH-ului și polaritatea solventului, o moleculă din fiecare component a sistemului de extracție participă la reacția interfacială. Cu toate

acestea, din figura 5 se poate observa că pentru a obține un randament ridicat de extracție, concentrația de amină în faza organică trebuie să fie mult mai mare decât necesarul stoechiometric pentru reacția cu acizii pseudomonici. Acest comportament este cauzat de o reacție interfacială lentă (prin creșterea concentrației unui reactant viteza de reacție va crește și, respectiv, cantitatea de acizi pseudomonici extrași) cumulată cu o solubilitate redusă a gruparilor nereactive din structura solutului (tabelul 1), care poate fi depășită prin formarea de asociații aminice care includ complexul de solut-extractant în faza organică sau induc solvatarea acestuia. Datorită dimensiunii mari a ambelor molecule (extractant și solut), formarea de aducți aminice este inhibată de impiedicări sterice.

Factorul de selectivitate, calculat ca raportul dintre gradul de extracție reactivă a acidului pseudomonic A și gradul de extracție al acizilor pseudomonici B și C, este prezentat în figura 5. Rezultatele indică faptul că diferențele înregistrate între randamentele de extracție ale acizilor pseudomonici nu permit obținerea unei selectivități satisfăcătoare a separării lor, indiferent de solventul utilizat.

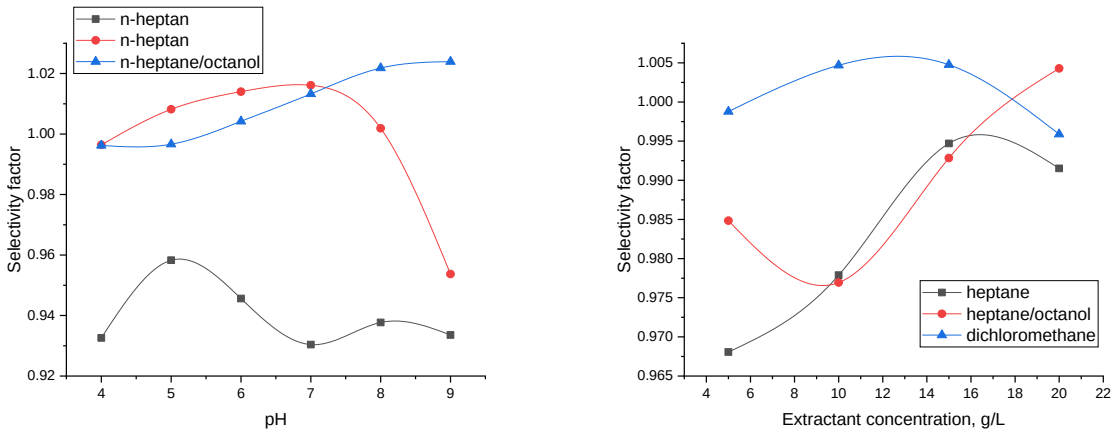


Figura 5. Influențele valorii pH-ului și concentrației extractantului asupra factorului de selectivitate al acidului pseudomonic A.

Acest comportament este cauzat de similitudinea structurii la cei patru acizi pseudomonici: radicalul care diferențiază acidul nu este unul activ din punct de vedere chimic (acid sau bazic), iar gruparea carboxil activă a Mupirocinului nu este afectat de tipul substituentului în radical, ca și în cazul separării selective a Gentamicinei.

* *
*

Din punct de vedere al obiectivelor generale ale programului PCE-IDEI, **rezultatele obţinute** în etapa a 3-a a proiectului au fost diseminate până în prezent după cum urmează:

1) publicarea a **4 articole** în reviste cotate ISI (inclusiv din „zona roşie") (*incluzând acknowledgements*);
2) **12 participări** la conferinţe internaţionale cu comunicări şi postere;
3) includerea rezultatelor în **2 teze de doctorat** ale membrilor doctoranzi ai echipei de cercetare;

4) includerea rezultatelor în **2 rapoarte de cercetare** prezentate de membrii doctoranzi ai echipei de cercetare;

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

6) 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