

SEPARAREA SELECTIVĂ A VITAMINEI C DIN AMESTEC CU ACIDUL 2-CETOGLUCONIC PRIN PERTRACȚIE FACILITATĂ

Alexandra Cristina Blaga¹, Anca-Irina Galaction², D. Cașcaval¹

Universitatea Tehnică "Gh. Asachi" Iași

Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului

1. Departamentul de Inginerie organică și biochimică

Universitatea de Medicină și Farmacie "Gr.T. Popa" Iași

Facultatea de Bioinginerie Medicală

2. Catedra de Tehnologie Protetică și Biotehnologii

SELECTIVE SEPARATION OF VITAMIN C AND 2-KETOGLUCONIC ACID BY FACILITATED PERTRACTION (Abstract): The removal of vitamin C from a mixture with 2-ketogluconic acid by using a bulk liquid membrane (BLM) has been investigated. The studies on facilitated pertraction of vitamin C with Amberlite LA-2 indicated the major parameters that affect the separation efficiency: pH gradient between the two aqueous phases, carrier concentration in the liquid membrane and phase mixing intensity. The overall results obtained in this work showed that liquid membrane system can effectively be used to selectively separate vitamin C from its mixture with the fermentation by-product, 2-ketogluconic acid. **Key words:** VITAMIN C, 2-KETOGLUCONIC ACID, AMBERLITE LA-2, CARRIER, PERTRACTION

Vitamina C (acid ascorbic) este un nutrient esențial vieții și poate fi sintetizată de către majoritatea speciilor animale și vegetale, excepție făcând primatelor și cobaiul. Este o vitamină hidrosolubilă implicată în metabolismul glucozei, al colagenului, al acidului folic și al anumitor acizi aminați, în neutralizarea radicalilor liberi și a nitrozaminelor, în reacții imunologice care facilitează absorbția fierului de către tubul digestiv, constituind un cofactor pentru o serie de enzime. În organismul uman, vitamina C deține un rol deosebit de important, datorită caracterului său antioxidant, proprietate care justifică și numeroasele utilizări în medicină și alimentație (1,2). În cosmetică, vitamina C constituie un ingredient valoros al multor loțiuni și creme, datorită acțiunii sale antioxidante și protectoare a pielii împotriva radiațiilor UV (3,4).

Acidul 2-cetogluconic este principalul produs secundar rezultat la obținerea vitami-

nei C prin biosinteză, dar poate fi obținut și individual prin fermentație pornind de la sorboză, având utilizări în industria de sinteză (obținerea xilitolului, fie prin decarboxilare, fie prin reducere chimică sau enzimatică) (3).

Vitamina C poate fi obținută la nivel industrial prin două procedee, și anume biosinteza cuplată cu transformarea chimică (procedeul Reichstein) și fermentația în două stadii cu ajutorul unor microorganisme modificate genetic (1,2,5,6). Indiferent de procedeul utilizat, un intermediar inevitabil în sinteza sau biosinteza vitaminei C îl reprezintă acidul 2-cetogluconic. Diferențele structurale între acești doi compuși sunt datorate doar structurii lactonice (fig. 1), astfel încât caracteristicile fizico-chimice ale acizilor sunt destul de asemănătoare.

Ambii compuși au caracteristici similare în ceea ce privește solubilitatea: sunt puternic solubili în solvenți polari, în special apă, și slab solubili în solvenți organici

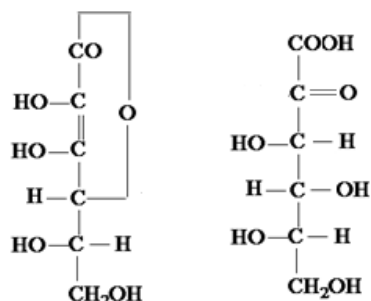


Fig. 1. Structurile chimice ale vitaminei C și acidului 2-cetogluconic

(2). În consecință, separarea prin extracție lichid-lichid din amestecul rezultat la fermentație este dificilă din punct de vedere economic. Bazându-se pe rezultatele anterioare privind mecanismul separării și influența factorilor determinanți în extracția reactivă a vitaminei C și a acidului 2-cetogluconic, studiile experimentale prezentate în continuare urmăresc stabilirea condițiilor optime pentru separarea selectivă a celor doi componenți prin pertracție facilitată cu Amberlite LA-2 (9,10).

MATERIAL ȘI METODĂ

Instalația de pertracție originală utilizată în vederea realizării experimentelor a fost prezentată în detaliu în lucrările anterioare (7,8). Aceasta utilizează o membrană lichidă liberă (cele două faze apoase miscibile sunt separate de stratul de solvent organic nemiscibil cu acestea care, însă, permite transportul masic al celor doi componenți). Experimentele au fost realizate în sistem pseudostaționar, soluțiile apoase fiind alimentate separat cu un debit volumic de 1,9 L/h.

Solventul organic care a constituit membrana lichidă a fost diclorometanul în care a fost dizolvat agentul purtător Amberlite LA-2 în concentrații cuprinse între 0 și 100 g/L). Faza apoasă inițială a constat dintr-un amestec de 1 g/L acid 2-cetogluconic și 7 g/L vitamina C, iar faza apoasă finală a constat din soluții de hidroxid de sodiu, cu diferite

valori ale pH-ului. Modificarea pH-ului celor două faze apoase la valorile prestabilite de programul experimental (intervalul 1 - 6 pentru soluția inițială și 7 - 12 pentru cea finală) s-a efectuat cu soluții 5% H_2SO_4 , respectiv 5% NaOH, utilizând un pH-metru digitalic de tip HI 213 (Hanna Instruments).

Pentru a urmări desfășurarea procesului s-au urmărit fluxurile masice inițiale, n_i , și finale, n_f , ale acizilor, factorul de permeabilitate prin membrana lichidă, P și factorul de selectivitate (S) (7,8). Fluxurile masice s-au calculat prin dozarea concentrației ambilor compuși din soluția inițială și din rafinat și efectuarea bilanțului de masă în sistemul de pertracție. Factorul de permeabilitate prin membrana lichidă, P, este definit ca raportul între fluxul masic final și inițial al celor doi compuși, iar factorul de selectivitate ca raportul între factorii de permeabilitate. Dozarea s-a realizat prin metoda HPLC, utilizând o coloană de tip Hamilton PRP-X300 (diametru 4,1 mm, lungime 150 mm), la temperatura de 25°C. Eluentul folosit a fost o soluție apoasă 4 mM de acid sulfuric, cu un debit de 0,5 mL/min. Detecția s-a realizat în domeniul UV la 210 nm.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În scopul optimizării condițiilor de operare pentru separarea selectivă a vitaminei C, s-au analizat efectul gradientului de pH dintre fazele apoase, al concentrației agentului purtător dizolvat în membrana lichidă și intensitatea amestecării fazelor, principalii parametri care controlează procesul.

În studiul influenței pH-ului fazelor apoase, trebuie ținut cont de faptul că atât procesul de extracție al celor doi compuși, cât și cel de reextracție se bazează pe dependența coeficientului de distribuție de pH-ul soluțiilor inițială și finală. Separarea vitaminei C și viteza transferului de masă al ambilor compuși din amestec sunt controlate de gradientul de pH dintre aceste

Separarea selectivă a vitaminei C din amestec cu acidul 2-cetogluconic prin pertracție facilitată

soluții. Astfel, s-au observat diferențe majore între variația fluxurilor masice în funcție de pH între cei doi compuși (fig. 2). Odată cu creșterea pH-ului soluției din care se realizează extracția, pH_i , are loc scăderea continuă a fluxurilor pentru vitamina C, în timp ce pentru acidul 2-cetogluconic graficul înregistrează un maxim corespunzător valorii de $pH = 3$.

În cazul vitaminei C, reducerea pH-ului soluției apoase inițiale determină intensificarea fluxului masic dinspre soluția apoasă inițială spre membrana lichidă, datorită mecanismului de realizare a extracției reactive. Vitamina C reacționează cu Amberlite LA-2, dizolvat în membrana lichidă, la interfața de separare dintre faza apoasă inițială și membrană formând complexul solut-agent purtător puternic hidrofob. Creșterea pH-ului fazei apoase inițiale controlează transformarea vitaminei C în acid dehidroascorbic, incapabil să reacționeze cu Amberlite LA-2 (determinând scăderea fluxului masic inițial) (1). Datorită capacității acidului 2-cetogluconic de a forma dimeri la pH puternic acid, acesta este extras cu eficiență ridicată doar la un pH al fazei apoase mai mare decât 2 (10). În același timp, depășirea valorii de pH corespunzătoare pK_a -ului acidului ($pK_a = 2,66$ la $25^\circ C$ (2)) determină disocierea grupării $-COOH$, împiedicând reacția cu agentul purtător la interfața dintre faza apoasă inițială și membrana lichidă (9). Fluxurile masice superioare ale acidului 2-cetogluconic în domeniul de $pH = 3-5$ se datorează acidității superioare a acestuia comparativ cu vitamina C, caracterul acid fiind cel care controlează viteza reacțiilor interfaciale dintre solut și agentul purtător. Din același motiv, reducerea fluxului masic inițial este mai accentuată pentru acest acid odată cu apropierea de domeniul neutru de pH (fig. 2).

Scăderea pH-ului fazei apoase inițiale induce creșterea concentrației vitaminei C în membrana lichidă, determinând creșterea

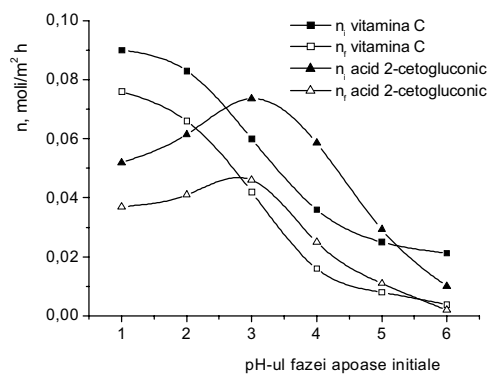


Fig. 2. Influența pH-ului fazei apoase inițiale asupra fluxurilor masice ale vitaminei C și acidului 2-cetogluconic ($pH_f = 11$, concentrația Amberlite LA-2 = 40 g/L, turația = 500 rpm)

fluxului masic final, deoarece fluxurilor masice finale ale celor doi compuși sunt direct dependente de concentrația acestora în membrana lichidă. În cazul acidului 2-cetogluconic, fluxul masic dinspre membrana lichidă înspre faza apoasă finală are o alură similară celui inițial. Acesta crește până la o valoare a pH_i -ului de 3, apoi se reduce, datorită unei eficiențe scăzute a extracției reactive, care induce o concentrație mai mică a acidului și în membrana lichidă.

Influența pH-ului fazei apoase finale asupra fluxurilor masice inițiale și finale ale celor doi compuși este reprezentată în figura 3. Se observă intensificarea acestora atât pentru vitamina C, cât și pentru acidul 2-cetogluconic, datorită creșterii vitezei de transformare în sarea de sodiu, și, respectiv, a vitezei de reextracție determinată de mărirea concentrației agentului de reextracție (hidroxid de sodiu) și, implicit, a gradientului de pH dintre cele două faze apoase (fig. 3).

Factorii de permeabilitate pentru amii componenți ai amestecului scad cu creșterea pH-ului fazei apoase inițiale, după cum se poate observa din figura 4. Limitările induse de difuzia dinspre membrana lichidă către faza apoasă finală, mai accentuate în cazul vitaminei C datorită structurii ciclice

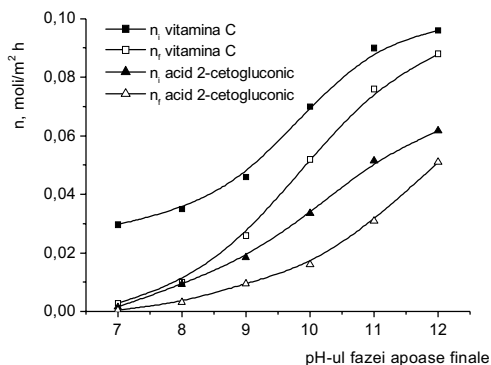


Fig. 3. Influența pH-ului fazei apoase finale asupra fluxurilor masice ale vitaminei C și acidului 2-cetogluconic ($pH_i = 1$, concentrația Amberlite LA-2 = 40 g/L, turația = 500 rpm)

mai voluminoase, cumulat cu faptul că fluxul masic inițial al acidului 2-cetogluconic este mult mai mic pentru $pH_i > 5$, explică valorile superioare ale factorului de permeabilitate al acidului comparativ cu cele corespunzătoare vitaminei C pentru $pH > 4$ al fazei apoase inițiale.

Factorul de selectivitate, F , calculat ca raportul între factorii de permeabilitate a vitaminei C și acidului 2-cetogluconic, înregistrează o valoare maximă la $pH = 3$ pentru faza apoasă inițială, care poate fi justificată prin diferența mare între concentrațiile din membrana lichidă a celor doi compuși, la această valoare a pH-ului. Pentru acidul 2-cetogluconic, viteza de extracție este superioară celei înregistrate pentru vitamina C, astfel încât cantitatea de acid extrasă în stratul de solvent este mult mai ridicată decât cea reextrasă, fluxul masic final neputându-l compensa semnificativ pe cel inițial (fig. 4).

Creșterea valorii pH-ului fazei apoase finale induce mărirea factorilor de permeabilitate, ceea ce evidențiază faptul că pe măsura apropierei de domeniul puternic acid, viteza de reextracție a celor doi compuși devine mai importantă decât viteza extracției reactive. Creșterea este mai accentuată pentru vitamina C, ca rezultat al vitezei

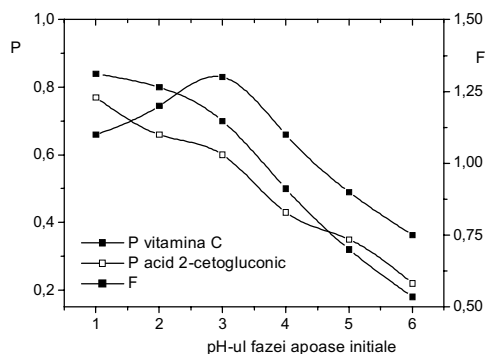


Fig. 4. Influența pH-ului fazei apoase inițiale asupra factorilor de permeabilitate a vitaminei C și acidului 2-cetogluconic și a factorului de selectivitate ($pH_f = 11$, concentrația Amberlite LA-2 = 40 g/L, turația = 500 rpm)

superioare de extracție la $pH_i = 1$ comparativ cu acidul 2-cetogluconic. Odată cu creșterea pH-ului acestei faze apoase, viteza de reextracție crește semnificativ, pentru $pH_f = 12$ fluxurile masice inițiale fiind echilibrate de cele finale ($P = 0,96$), aproape întreaga cantitate de vitamină fiind reextrasă din membrană.

Factorul de selectivitate crește cu creșterea pH-ului fazei apoase finale, observându-se atingerea unor valori maxime ale factorului de selectivitate pentru diferențe minime de pH dintre soluțiile apoase (fig. 5).

Un alt parametru care influențează eficiența transportului prin membrane lichide îl reprezintă intensitatea amestecării celor două faze apoase. Mărirea turației agitatorilor care realizează amestecarea acestora s-a realizat până la 600 rpm, rotație care a permis menținerea plană a interfeței de contact dintre cele trei soluții. Și în cazul pertracției, creșterea continuă a fluxurilor masice cu turația corespunde unui proces limitat de difuzia componentilor sistemului, în timp ce atingerea unui nivel constant de variație al fluxurilor indică trecerea în domeniul cinetic de desfășurare a separării.

Din figura 6 se poate observa că intensificarea amestecării induce creșterea fluxurilor masice inițiale și finale atât pentru

Separarea selectivă a vitaminei C din amestec cu acidul 2-cetogluconic prin pertracție facilitată

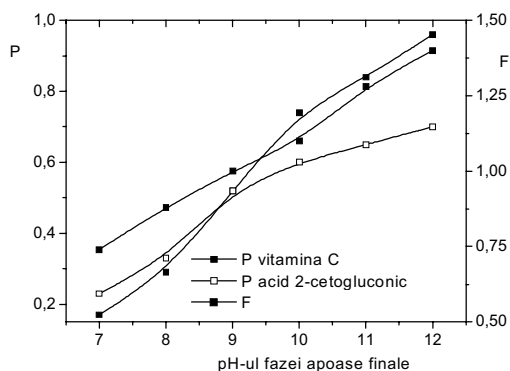


Fig. 5. Influența pH-ului fazei apoase finale asupra factorilor de permeabilitate a vitaminei C și acidului 2-cetogluconic și a factorului de selectivitate ($pH_i = 1$, concentrația Amberlite LA-2 = 40 g/L, turația = 500 rpm)

acidul 2-cetogluconic, cât și pentru vitamina C, ca efect al reducerii rezistenței datorate difuziei prin filmele de lichid din vecinătatea celor două interfețe de separare. Fluxurile masice sunt mai mici pentru acidul 2-cetogluconic, evidențiind un efect mai important al amestecării în cazul vitaminei C, datorită rezistenței mai mari la difuzia prin straturile limită (fig. 6).

Fluxul masic final al acidului este mult mai mic comparativ cu cel inițial, datorită stabilității superioare a complexului (acid 2-cetogluconic - Amberlite LA-2) în reacția de reextracție, respectiv formarea 2-cetogluconatului de sodiu.

Creșterea factorilor de permeabilitate cu turația, reprezentată în figura 7, sugerează faptul că difuzia ascorbatului de sodiu, respectiv a 2-cetogluconatului de sodiu, în faza apoasă finală creează o rezistență superioară celei opuse de difuzia din faza apoasă inițială, datorită structurii chimice mai voluminoase a sărurilor. Factorul de selectivitate scade cu creșterea turației, înregistrând un maxim atunci când fazele apoase sunt în repaus, caz în care, datorită diferențelor între gradele de extracție reactivă, fluxurile masice ale vitaminei C sunt mai mari decât cele ale acidului 2-cetogluconic (fig. 7).

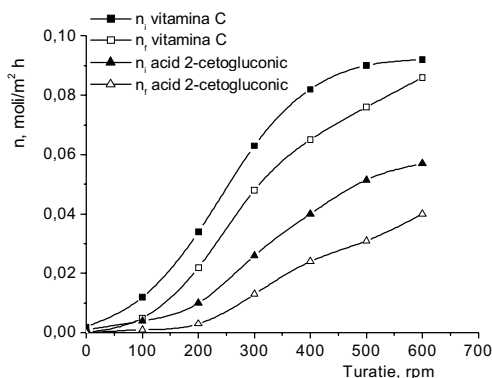


Fig. 6. Influența intensității amestecării fazelor apoase asupra fluxurilor masice ale vitaminei C și acidului 2-cetogluconic ($pH_i = 1$, $pH_f = 11$, concentrația Amberlite LA-2 = 40 g/L)

Concentrația agentului purtător, Amberlite LA-2, manifestă, de asemenea, o influență semnificativă asupra pertracției selective a vitaminei C, influențând atât capacitatea de transport a membranei (difuzia complexului prin membrană), cât și cinetica reacțiilor interfaciale. Conform rezultatelor experimentale reprezentate grafic în figura 8, se constată intensificarea fluxurilor masice inițiale și finale ale soluțiilor odată cu mărirea concentrației agentului purtător în membrana lichidă (fig. 8).

Această evoluție a fluxurilor masice este

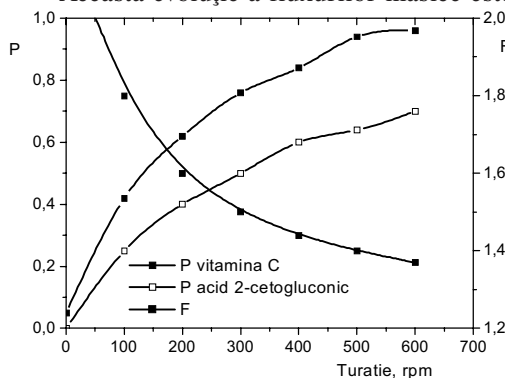


Fig. 7. Influența intensității amestecării fazelor apoase asupra factorilor de permeabilitate ale vitaminei C și acidului 2-cetogluconic și a factorului de selectivitate ($pH_i = 1$, $pH_f = 11$, concentrația Amberlite LA-2 = 40 g/L)

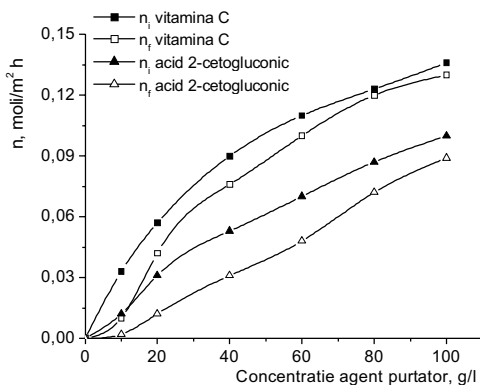


Fig. 8. Influența concentrației agentului purtător asupra fluxurilor masice ale vitaminei C și acidului 2-cetogluconic ($pH_i = 1$, $pH_f = 11$, turația = 500 rpm)

consecința creșterii concentrației unuia dintre participanții la reacția chimică care se desfășoară la interfața de separare dintre faza apoasă inițială și solvent. Creșterea concentrației Amberlite LA-2 în membrana lichidă manifestă un efect pozitiv mai accentuat asupra fluxurilor masice ale vitaminei C, datorită solvării complexului format de către moleculele de extractant.

Aceeași evoluție crescătoare a înregistrează și factorii de permeabilitate, fapt evidențiat de rezultatele expuse în figura 9, datorită rezistenței de natură cinetică superioară care afectează procesul global de separare. În cazul vitaminei C, factorul de permeabilitate crește până la o concentrație de Amberlite LA-2 de 40 g/L, peste această valoare efectul acestui parametru devenind neglijabil.

Aplatizarea curbei este rezultatul unor eficiențe apropiate între procesele de extracție și reextracție la cele două interfețe ale membranei lichide. Deoarece la $pH_i = 1$, acidul 2-cetogluconic se găsește sub formă de dimeri, factorul de permeabilitate este inferior celui corespunzător vitaminei C (fig. 9).

Factorul de selectivitate scade puternic cu creșterea concentrației agentului purtător, valoarea maximă ($F = 2,1$) fiind atinsă

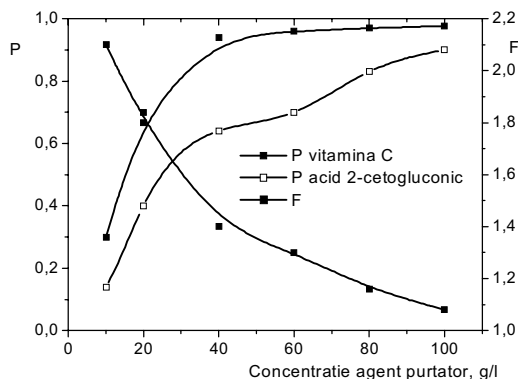


Fig. 9. Influența concentrației agentului purtător asupra factorilor de permeabilitate a vitaminei C și acidului 2-cetogluconic și a factorului de selectivitate ($pH_i = 1$, $pH_f = 11$, turația = 500 rpm)

pentru concentrația aminei de 10 g/L. La această valoare a concentrației, Amberlite LA-2 reacționează preferențial cu vitamina C, însă cu creșterea concentrației agentului purtător crește probabilitatea reacției și cu acidul 2-cetogluconic.

CONCLUZII

Rezultatele obținute au demonstrat faptul că vitamina C poate fi extrasă selectiv din amestecul cu acidul 2-cetogluconic, produs secundar rezultat din procesul de fermentație. Parametrul cu importanța decisivă asupra eficienței pertracției a fost pH-ul soluției apoase. Astfel, pentru a separa selectiv vitamina C este necesară menținerea pH-ului fazei apoase inițiale la valoarea 1, corespunzătoare unor fluxuri masice superioare datorate mecanismului de realizare a extracției reactive. Agitarea fazelor inițială și finală are un efect pozitiv, însă nu similar, asupra vitezelor de extracție și, respectiv, de reextracție, sugerând faptul că, în timp ce procesul de extracție este controlat atât difuzional, cât și cinetic, cel de reextracție este controlat predominant de difuzie.

Experimentele au fost realizate în cadrul grantului ID 317/2007, finanțat de UEFISCSU - CNCSIS

Separarea selectivă a vitaminei C din amestec cu acidul 2-cetogluconic prin pertracție facilitată

BIBLIOGRAFIE

1. Neamțu G. *Substanțe naturale biologice active. 1. Vitamine*. București : Ed. Ceres, 1996.
2. *** *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Berlin : VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1996.
3. Buchholz K, Seibel J. Industrial carbohydrate biotransformation. *Carbohydrate Res* 2008 ; 343 : 1966-1979.
4. Kulikowska-Karpińska E, Moniuszko-Jakoniuk J. The antioxidative barrier in the organism. *Polish J Environ Stud* 2004 ; 13 (1) : 5-13.
5. *** *BASF - Annual Report*, 2003, appendix 4.2, 5.1.
6. Bremus C, Herrmann U, Bringer-Meyer S, Sahm H. The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *J Biotech* 2006 ; 124 : 196-205.
7. Cașcaval D, Galaction AI, Oniscu C. Selective pertraction of carboxylic acids obtained by citric fermentation. *Sep Sci Technol* 2004 ; 39 : 1907-1925.
8. Cașcaval D, Galaction AI, Turnea M. Study of the influence of solute and carrier characteristics on facilitated pertraction mechanism in pseudosteady-state conditions. *J Membr Sci* 2009 ; 328 : 228-237.
9. Blaga AC, Galaction AI, Folescu E, Cașcaval D. Separation of vitamin C by reactive extraction 1. Mechanism and influencing factors. *Rom Biotech Lett* 2004 ; 9 (6) : 1917-1924.
10. Blaga AC, Galaction AI, Cașcaval D. Reactive extraction of 2-keto-gluconic acid. Mechanism and influencing factors. *Rom Biotech Lett* 2010 ; 15 (3) : 5253-5259.

NOUTĂȚI

EFECTELE ANTIDEPRESIVE ALE UNEI FRAȚIUNI POLIZAHARIDICE ACIDE DIN GINSENG

Rădăcinile speciei *Panax ginseng* C. A. Meyer (*Araliaceae*) sunt utilizate pentru proprietățile tonice generale. Profilul farmacologic al extractelor de Ginseng este foarte complex ; extractele de Ginseng modulează axa hipotalamo-pituitară-adrenergică și activitatea sistemelor monoaminice. În contextul noilor teorii referitoare la etiopatogenia depresiei, extractele de Ginseng acționează neuroprotector și, în același timp, cresc rezistența celulelor la diferiți agenți agresori. Ginseng-ul conține peste 15% polizaharide, neutre și acide, solubile în apă, considerate a fi răspunzătoare pentru multe dintre efectele benefice ale extractelor. Frațiunea polizaharidică neutră conține, în principal, glucani și cantități mici de arabinogalactani. Frațiunea polizaharidică acidă este un amestec complex de pectine bogate în unități de tip arabinogalactan, ramnogalacturonan și homogalacturonan. Această fracțiune a fost administrată animalelor de experiență (șoareci masculi ICR) pe cale orală, în doze de 100 mg/kg și 200 mg/kg. Administrarea s-a făcut zilnic, timp de o săptămână înainte de efectuarea experimentelor și în timpul desfășurării experimentelor. Au fost evaluate spontaneitatea și abilitățile de socializare ale animalelor de experiență, precum și comportamentul acestora în testul labirintului și testul înotului forțat. Frațiunea polizaharidică acidă nu a influențat spontaneitatea animalelor și comportamentul acestora în testul labirintului. În doză de 100 mg/kg, fracțiunea polizaharidică acidă a redus semnificativ imobilitatea animalelor în testul înotului forțat ; în doze de 100 mg/kg și 200 mg/kg, această fracțiune a diminuat agresivitatea și a îmbunătățit abilitățile de socializare ale animalelor (Wang J, Flaisher-Grinberg S, Li S et al. Antidepressant-like effects of the active acidic polysaccharide portion of ginseng in mice. *J Ethnopharmacol* 2010 ; 132 : 65-69).

Anca Miron