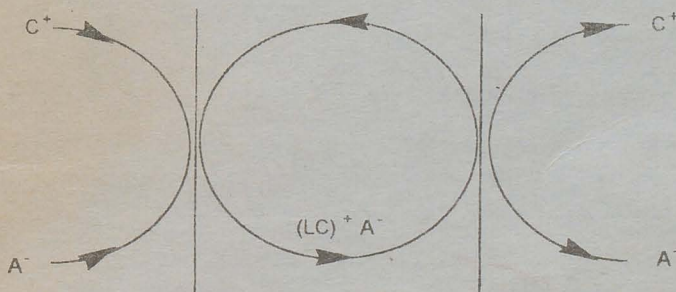


516347  
LUCIA MUTIAC

CAMELIA BALA

# SEPARAREA COMPUȘILOR CHIMICI ȘI BIOLOGICI PRIN MEMBRANE ȘI PROCESE MEMBRANARE



EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI

1999



BIBLIOTECA CENTRALA  
UNIVERSITARA  
Bucuresti

Cota IV 516 347  
Inventar C199902671

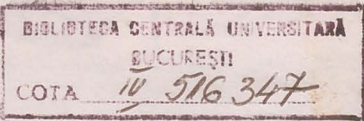
LUCIA MUTIHAC

CAMELIA BALA

**SEPARAREA COMPUȘILOR  
CHIMICI ȘI BIOLOGICI  
PRIN MEMBRANE  
ȘI PROCESE MEMBRANARE**

**EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI  
1999**

Referenți științifici: Prof. dr. VALERICĂ DUMITRESCU  
Conf. dr. VICTOR DAVID  
Conf. dr. ANTON CIUCU



311 / 99

B.C.U. București



C199902671

Contribuția autorilor la realizarea cărții: LUCIA MUTIHAC - capitolele I - IV  
CAMELIA BALA - capitolele V - VII

© Editura Universității din București  
Șos. Panduri, 90-92, București - 76235; Telefon/Fax 410.23.84

**Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale  
MUTIHAC, LUCIA**

**Separarea compușilor chimici și biologici prin membrane și  
procese membranare / Lucia Mutihac, Camelia Bala**

București: Editura Universității din București, 1999

140 p.: fig. ; 20 cm.

Bibliogr.

ISBN 973-575-301-4

I. Bala, Camelia

577.352

## INTRODUCERE

Progresele științifice și tehnologice în procesele membranare au cunoscut o creștere însemnată în ultimii ani. Datorită potențialului aplicațiilor industriale, operațiile membranare pot fi utilizate comparativ cu alte tehnici de separare. Procesele membranare sub acțiunea gradientului de presiune sunt cu succes aplicate în cea mai mare parte a sectoarelor industriale și anume de la industria textilă la cea farmaceutică, de la industria pielăriei la cea alimentară. Aplicațiile biomedicale și biotehnologice, cum ar fi senzorii membranari, organele artificiale, componentele avansate ale instrumentației analitice sunt numai câteva exemple ale utilizării sistemelor membranare. Tehnologiile membranare pot înlocui cu succes numeroase procedee convenționale de separare pentru diferiți compuși. În ceea ce privește domeniul biomedical, membranele lichide au fost utilizate pentru extracția toxinelor din sânge și pentru tratarea uremiilor cronice.

Procedeele membranare conduc către tehnologiile curate și reduc efectele de deteriorare datorate industriei asupra mediului înconjurător. Transportul moleculelor prin biomembrane constituie un proces fundamental în procesele biologice. Studiile fenomenelor de transport, clarifică la nivel molecular, mecanismele care controlează selectivitatea și permeabilitatea utilizării membranelor polimerice. Un mare număr de operații membranare sau procese membranare hibride sunt astăzi utilizate în lumea întreagă. În general procesele biologice au loc la nivelul membranei celulare, implicând o serie de fenomene fizice și chimice dirijate de specii chimice care în final conduc la un flux informațional realizându-se în acest fel un efect biologic, respectiv fizico-chimic.

Lucrarea de față tratează o parte din numeroasele posibilități de aplicare ale proceselor membranare în separarea unor compuși de interes chimic și biologic. După definirea membranei și a prezentării unor aspecte generale privind procesele membranare în capitolul întâi se trece la prezentarea unor probleme fundamentale ale fenomenelor de transport prin membrane lichide în capitolul al doilea. Astfel sunt prezentate și discutate detaliat noțiuni ca recunoaștere moleculară, tipuri de membrane lichide utilizate în separarea compușilor chimici și biologici, factori care influențează transportul prin membrane, mecanisme de transport prin membrane lichide precum și aspecte ale modelării matematice a transportului prin membrane lichide. Capitolul al treilea cuprinde într-un mod sintetic câteva dintre cele mai importante aplicații ale membranelor lichide în separarea unor compuși chimici și biologici de tip anorganic, organic sau gazos precum și posibilitățile de utilizare ale acestora în separarea enantiomerilor.



# CUPRINS

Introducere	
<b>I. Definirea membranelor și a proceselor membranare</b>	<b>1</b>
1.1. Aspecte generale	1
1.2. Definirea membranei	2
1.3. Procese membranare	3
1.4. Membrane biologice	5
1.4.1. Structura membranelor	6
1.4.2. Transportul prin membrane biologice	7
1.4.3. Modele membranare	8
Bibliografie	9
<b>II. Aspecte fundamentale ale fenomenelor de transport prin membrane lichide</b>	<b>12</b>
2.1. Transportul prin membrane lichide, parte a chimiei supramoleculare	12
2.1.1. Definirea chimiei supramoleculare	12
2.1.2. Recunoașterea moleculară	16
2.1.2.1. Principiul recunoașterii moleculare	16
2.1.2.2. Recunoașterea moleculară în solvenți organici nepolari	17
2.1.2.3. Recunoașterea moleculară în medii neapoase	22
2.1.2.4. Recunoașterea moleculară în medii apoase	22
2.1.3. Aspecte termodinamice și cinetice ale complexilor liganzilor macrociclici cu diferite specii moleculare	24
2.2. Tipuri de membrane lichide	30
2.2.1. Membrane lichide în strat gros	30
2.2.2. Membrane lichide immobilizate	32
2.2.3. Membrane lichide emulsionate	33
2.3. Influența parametrilor fizico-chimici asupra transportului prin membrane lichide	34
2.3.1. Influența constantei de stabilitate a complexului substrat-receptor asupra transportului	35
2.3.2. Influența anionului de cuplaj	36
2.3.3. Influența structurii receptorului și a substratului	36
2.3.4. Influența solventului membranal	37

2.4. Transportori utilizați în membranele lichide	38
2.5. Mecanisme de transport prin membrane lichide	43
2.5.1. Transport pasiv prin membrane lichide	44
2.5.2. Transport activ prin membrane lichide	44
2.6. Modelarea matematică a transportului prin membrane lichide	47
<b>Bibliografie</b>	48
<b>III. Aplicații ale membranelor lichide în separarea unor compuși</b>	53
3.1. Separarea unor compuși anorganici	53
3.1.1. Transportul metalelor alcaline și alcalino-pământoase prin membrane lichide	53
3.1.2. Transportul ionilor $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ și $\text{Ni}^{2+}$	55
3.1.3. Transportul metalelor Au și Ag	56
3.1.4. Transportul unor metale grele	57
3.2. Separarea gazelor	57
3.3. Transportul unor compuși organici	58
3.3.1. Transportul cationilor de guanidiniu și imidazol	58
3.3.2. Transportul ureii prin membrane lichide suportate	59
3.3.3. Transportul unor nucleobaze prin membrane lichide	60
3.3.4. Transportul aminoacizilor prin membrane lichide	61
3.3.4.1. Transportul aminoacizilor sub formă de complecși cationici	62
3.3.4.2. Transportul aminoacizilor sub formă de complecși anionici	64
3.3.4.3. Transportul enantioselectiv	65
<b>Bibliografie</b>	66
<b>IV. Procese membranare utilizate în separarea compușilor</b>	70
4.1. Aspecte privind fenomenele de încărcare ale membranelor	70
4.2. Osmoza Inversă (OI)	71
4.3. Nanofiltrarea (NF)	72
4.4. Ultrafiltrarea (UF)	73
4.5. Microfiltrarea (MF)	73
<b>Bibliografie</b>	74



<b>V. Procese membranare implicate în separarea compușilor biologici</b>	<b>76</b>
<b>5.1. Ultrafiltrarea proteinelor</b>	<b>76</b>
5.1.1. Descrierea celulei de ultrafiltrare cu agitare	77
5.1.2. Ultrafiltrarea proteinelor; etapa inițială	80
5.1.3. Influența adsorbției proteinelor pe membrană și a pH-ului soluției	82
5.1.4. Influența agitării	87
5.1.5. Curățarea membranei	88
<b>5.2. Purificarea compușilor biologici prin ultrafiltrarea de afinitate</b>	<b>90</b>
5.2.1. Etapa de administrare a probei și formarea complexului de afinitate	93
5.2.2. Etapa de spălare	94
5.2.3. Etapa de disociere a complexului de afinitate	96
5.2.4. Etapa de recondiționare	97
5.2.5. Purificarea Concanavalinei A din <i>Canavalia ensiformis</i>	98
5.2.6. Purificarea alcool dehidrogenazei din drojdia de bere	99
<b>5.3. Procesarea plasmei sanguine prin electrodiализă</b>	<b>100</b>
Bibliografie	105
<b>VI. Procese membranare utilizate în prelucrarea alimentelor</b>	<b>107</b>
<b>6.1. Ultrafiltrarea alimentelor</b>	<b>110</b>
6.1.1. Ultrafiltrarea alimentelor de origine vegetală	110
6.1.2. Ultrafiltrarea alimentelor de origine animală	113
<b>6.2. Osmoza inversă a alimentelor</b>	<b>115</b>
6.2.1. Osmoza inversă a alimentelor de origine vegetală	115
6.2.2. Osmoza inversă a alimentelor de origine animală	117
<b>6.3. Aspecte de reglementare sanitară</b>	<b>118</b>
Bibliografie	119
<b>VII. Utilizarea membranelor în realizarea organelor artificiale</b>	<b>121</b>
7.1. Membrane tip gel	122
7.2. Membrane microporoase	123
7.3. Transportul intramembranar	124
7.4. Tipuri de dispozitive membranare	126
7.5. Efecte nedorite	128
7.6. Monitorizare și control	129
Bibliografie	129

Capitolul al patrulea este dedicat câtorva dintre cele mai utilizate procese membranare (osmoza inversă, nanofiltrarea, ultrafiltrarea și microfiltrarea) în separarea diveselor amestecuri de compuși, procese membranare care sunt determinate de acțiunea unui gradient de presiune. Lucrarea de față prezintă succint posibilitățile de utilizare ale proceselor membranare în scopul separării și acordă mai multă atenție unor aspecte legate direct de înțelegerea acestor procese. În capitolele cinci, șase și șapte sunt prezentate detaliat câteva dintre procesele membranare implicate în separarea compușilor biologici cum ar fi ultrafiltrarea proteinelor, procesarea plasmei sanguine prin electrodiализă sau membrane utilizate în realizarea unor organe artificiale. De asemenea au fost tratate succint și posibilitățile aplicațiilor proceselor membranare în procesarea produșilor alimentari.

În această lucrare autorii încearcă să prezinte pe scurt câteva dintre multitudinea de posibilități oferite de procesele membranare în separarea compușilor chimici și biologici.

Lucrarea se adresează studenților și chimiștilor analiști preocupați de posibilitățile de utilizare ale proceselor membranare în știința separării.

Autorii

# I. Definirea membranelor și a proceselor membranare

## 1.1. Aspecte generale

Membranele și procesele membranare pot înlocui cu succes numeroase procedee convenționale de separare pentru diferiți compuși. Astăzi există posibilități de a realiza membrane cu proprietățile pe care le dorim și care satisfac servicii vitale. Procesele membranare pot fi incluse în grupul proceselor fizice care au ca obiectiv separarea diferitelor sisteme de componenți. Fraționarea, purificarea sau concentrarea unor amestecuri de compuși pot fi realizate cu ajutorul proceselor membranare [1-8].

De-a lungul istoriei, dorința de a purifica apa de băut a condus la crearea unor filtre în cazul romanilor a unor vase de ceramică pentru a filtra apa. Iată, deci că filtrele ceramice au o lungă istorie izvorâtă din dorința oamenilor de a avea lichide curate și purificate. Modernizarea tehnologiei polimerilor, aspect care permite producerea unor membrane polimerice cu pori uniformi și cu o mare densitate în rețeaua polimerică conduce la obținerea unor separări foarte fine. În ultimii 20 de ani membranele au fost sintetizate pentru utilizarea lor în laboratoarele bacterologice. Este cazul membranelor simetrice pentru microfiltrare.

Studiile fundamentale în fenomenele de transport prin membrane lichide deschid drumul către dezvoltarea chimiei și biologiei oferind modele pentru mecanismele de transport biologice. În chimia analitică și în separare în mod special (analiza și separarea componenților din amestecuri, separarea amestecurilor racemice, recuperarea minereurilor, reciclare, etc.), transportul joacă un rol important.

Un domeniu important pentru viitorul operațiilor membranare îl constituie realizarea combinată a transferului selectiv de masă prin membrană cu reacții tipice în diverse procese chimice și biologice [9,10]. Această combinație se realizează prin utilizarea însăși a membranei ca reactor sau prin integrarea unui reactor tradițional cu un proces membranar. Membranele sintetice sau ceramice constituie excelenți suporti pentru imobilizarea catalizatorilor și a biocatalizatorilor datorită unei largi suprafețe pe unitatea de volum și pentru posibilitatea de a oferi noi procedee de imobilizare. Posibilitatea imobilizării ligandului pe o membrană polimerică prin afinitate utilizând procese membranare specifice reprezintă de asemenea un domeniu atractiv al aplicațiilor membranare [11,12].

Membranele catalitice și reactorii membranari au fost utilizați în special în următoarele aplicații : creșterea timpului de viață al biocatalizatorului prin imobilizare, îndepărtarea continuă a inhibitorilor enzimatici precum și controlul secvențelor reacțiilor [13,14].

Procesele membranare de separare prezintă o serie de avantaje, ca de exemplu:

- separarea compușilor se face în mod continuu;
- cantitatea de energie consumată este minimă;
- se pot cupla ușor cu alte procese de separare;
- separările se pot realiza în condiții blânde;
- proprietățile membranelor sunt variabile și pot fi ajustate;
- nu se cer aditivi.

Ca dezavantaje ale proceselor membranare se pot prezenta următoarele:

- fenomenul de încărcare al membranelor, aspect care reduce fluxul de permeație;
- timp scurt de funcționare;
- în general selectivitate mică.

Recent utilizarea membranelor și a proceselor membranare în separarea și purificarea gazelor a însemnat un succes în extinderea aplicațiilor acestora.

În această lucrare vom prezenta câteva aspecte ale unor procese membranare care pot fi considerate și nu numai, chiar sunt procedee de separare mai des utilizate în separarea unor compuși de natură chimică sau biologică. Astfel, menționăm: osmoza inversă (OI), nanofiltrarea (NF), ultrafiltrarea (UF), microfiltrarea (MF), electrodializa, ultrafiltrarea de afinitate, membrane lichide, procese membranare utilizate în separarea unor produși alimentari și nu în ultimul rând posibilitatea utilizării membranelor în realizarea organelor artificiale.

## 1.2. Definirea membranei

Dificultatea de a defini membrana constă în varietatea posibilităților de utilizare a acestora. Howell [15] definește membrana ca fiind o barieră între două lichide care selectează trecerea unuia sau a mai multor componenți dintr-un lichid în altul prin barieră. Conform nomenclatorului publicat în 1995 de către Societatea Europeană a Științei și Tehnologiei Membranelor [16] membrana este o structură care intervine în separarea a două faze și/sau acționează ca o barieră activă sau pasivă la transportul materiei între fazele adiacente acesteia.

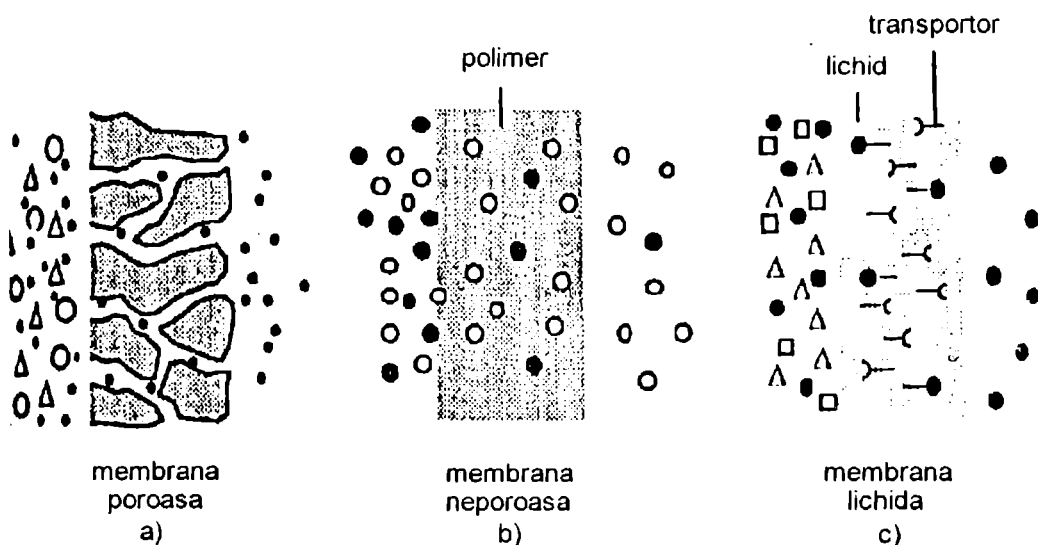
Membranele pot fi realizate dintr-o gamă largă de materiale, organice sau anorganice în formă asimetrică sau izotropică, plane sau tubulare cu grosimea cuprinsă între 100 nm și 1 mm alcătuite dintr-un singur component sau sub formă compozită.

Membranele artificiale au apărut în jurul anilor '60. Inițial s-au dezvoltat membranele polimerice în timp ce membranele anorganice au apărut la sfârșitul anului 1970. În funcție de natura și structura lor membranele sintetice se pot clasifica în cinci grupe de bază:

- medii poroase;
- bariere solide omogene;
- structuri asimetrice;
- bariere încărcate electric;
- bariere lichide cu transportori selectivi.

La rândul lor aceste grupe de bază sunt incluse în cele trei mari tipuri de membrane sintetice, clasificate în funcție de structura lor și principiul de separare aplicat (Figura 1.1):

- membrane poroase (utilizate în microfiltrare, ultrafiltrare, nanofiltrare);
- membrane neporoase (separarea gazelor, pervaporație);
- membrane lichide (transport mediat de transportori).



**Figura 1.1.**

*Tipuri de membrane sintetice*

### 1.3. Procese membranare

După cum am mai menționat, procesele membranare pot înlocui procedeele convenționale de separare a diferiților compuși reducând efectele de deteriorare datorate industriei asupra mediului înconjurător. Obiectivele principale ale procedeelelor de separare constau în *concentrarea* anumitor compuși, *purificarea* componentilor și *fracționarea* compușilor de interes. Într-o lucrare de review intitulată *The growth of membrane technology*, Lonsdale [17] pune bazele fundamentale ale dezvoltării fiecărui proces membranar.

Filtrarea este definită ca separarea a două sau mai multe componente dintr-un flux fluid. Concret, această tehnică se referă la separarea solidelor, componentelor nemiscibili sau a particulelor din fluxuri lichide sau gazoase. Filtrarea prin membrane extind aceste aplicații la includerea separării soluțiilor dizolvate în flux lichid și de asemenea la separarea gazelor [18].

O clasificare a proceselor membranare utilizate în procesele de separare al diverșilor compuși poate fi realizată în funcție de forța motrice sub care aceste procese au loc. **Principalele forțe motrice** utilizate în procesele membranare sunt: gradientul de presiune ( $\nabla P$ ), **gradientul de activitate** ( $\nabla \ln(a)$ ), și potențialul electric ( $\nabla E$ ). Gradientul termic ( $\nabla \mu/T$ ) în procesele membranare este ocazional utilizat cum de asemenea sunt posibile combinații între acești gradienti. Aceste forțe sunt componentele potențialului chimic care poate fi scris astfel, conform ecuației Gibbs pentru sisteme heterogene:

$$\nabla \mu = RT \nabla(\ln a) + V_{uq} \nabla P - S_i \nabla T - zF \nabla E \quad (1.1)$$

Rezultatul gradientilor de potențial este fluxul ( $J$ ) unor anumite specii supuse transportului prin membrană.

- a) *Diferența de presiune hidrostatică* ( $\nabla P$ ), între două faze separate printr-o membrană conduc la separarea speciilor chimice când permeabilitatea hidrostatică a membranei este **diferită pentru diferiți componenți**. Este cazul proceselor membranare: microfiltrarea (MF), ultrafiltrarea (UF), nanofiltrarea (NF), osmoza inversă (OI) și gaz separarea (GS).
- b) *Diferența activităților* ( $\nabla(\ln a)$ ) între două faze conduce la un gradient de concentrație între acestea inducând în acest fel separarea diverselor specii chimice când difuzivitatea și concentrația sunt diferite pentru diverși componenți (membrane lichide, dializa).
- c) *Diferența potențialului electric* ( $\nabla E$ ) între două faze separate printr-o membrană conduce la separarea diferitelor specii chimice când particule încărcate diferit manifestă diferite mobilități și diferite concentrații în membrană (electrodializa).

Osmoza inversă, nanofiltrarea, ultrafiltrarea și microfiltrarea pot fi considerate procedee de separare în fază lichidă prin permeația de a lungul membranelor sub acțiunea unui gradient de presiune. La o primă aproximare se pot considera aceste procedee, ca procedee de filtrare în mediu lichid care utilizează membrane al căror diametru al porilor se micșorează progresiv când se trece de la microfiltrare la ultrafiltrare, apoi la nanofiltrare și în final osmoza inversă. Trebuie menționat faptul că în cazul osmozei inverse, membranele utilizate nu sunt membrane microporoase și deci selectivitatea rezultă dintr-un mecanism de solubilizare-difuzie.

În general prin *membrană lichidă* se înțelege sistemul trifazic următor (i) faza sursă (faza apoasă în care se găsesc componenții de separat), (ii) membrana propriu-zisă (faza organică în

care se găsește transportorul și în care se realizează separarea) și (iii) faza acceptoare (faza apoasă în care ajung componentii după separare.

În cazul unui mecanism de transport simplu, solubilitate-difuzie, faza organică este un solvent pur în care specia transportată este solubilă. Acest sistem membranar nu prezintă o eficacitate comparabilă sub aspectul randamentului și al selectivității cu sistemele membranare în care sunt prezenți transportorii. În cazul sistemelor membranare cu transportori se utilizează mecanisme de transport facilitat și activ, aspect care conduce la creșterea performanțelor separărilor membranare [19].

În prezent se utilizează trei tipuri de membrane lichide : *membrane lichide în strat gros*, *membrane lichide imobilizate pe un suport*, *membrane lichide emulsionate*. Membranele lichide în strat gros sunt utilizate adesea în studii de laborator în timp ce membranele imobilizate pe un suport și în special membranele emulsionate sunt aplicate deja în procese industriale.

## 1.4. Membrane biologice

Membranele biologice s-au dezvoltat ca urmare a unor cerințe de delimitare a: (i) organismelor față de mediu, (ii) celulelor constitutive între ele, și (iii) organitelor și a compartimentelor subcelulare între ele. Se pot deosebi trei clase mari de membrane: (i) *membrane pluricelulare* (epiteliile), (ii) *membrane plasmatică* (celulare), și (iii) *membrane intraplasmatică* (citomembranele) și ale organitelor celulare. Funcțiunile principale ale membranelor biologice pot fi studiate în mod unitar pe mai multe direcții generale: (i) bariere selective pentru solviți și apă, (ii) suportul structural al foarte multor enzime și al receptorilor cu care interacționează moleculele care au rol de mesageri chimici, (iii) sediul proceselor de transport și cuplaje energetice greu de conceput într-un mediu omogen [20,21].

Membranele biologice sau celulele membranare au structuri foarte complexe impuse de specificitatea lor funcțională fiind definatorii pentru materia vie [22]. Ele definesc spațiul în care au loc procesele metabolice și asigură compartimentarea și anizotropia materiei vii. Toate formele de viață au alcătuire celulară. Membranele constituie sediul inițial al recepției stimulilor din mediu și cadrul specific pentru realizarea principalelor transformări energetice (fotochimice, chemochimice, chemo-electrice,...). Ele reglează schimburile de substanțe ale celulei cu mediul înconjurător, permițând intrarea moleculelor necesare sintezelor biochimice în citoplasmă și ieșirea cataboliților. Reglează totodată proprietățile mediului citoplasmatic, cum ar fi: tonicitatea; tăria ionică, *pH*-ul, etc. Membranele sunt direct implicate în propagarea

semnalelor (influxurilor nervoase) de la senzori la sistemul nervos central și în interiorul acestuia.

### 1.4.1 Structura membranelor

Membranele biologice sunt formațiuni flexibile având grosimi cuprinse între 50 și 100 Å, fiind alcătuite în principal două componente: bistratul lipidic care constituie scheletul membranei și din proteine care asigură funcțiile specifice de transport. (proteine variază de la 25% la 75%). Lipidele sunt molecule cu o parte *hidrofobică* (sau apolară) și o parte *hidrofilică* (sau polară). O structură schematică a bistratului lipidic este prezentată în figura 1.2. Această structură există în diferite tipuri de membrane celulare, partea polară fiind situată la interfața apă/membrană iar partea hidrofobică fiind localizată între regiunile hidrofilice.

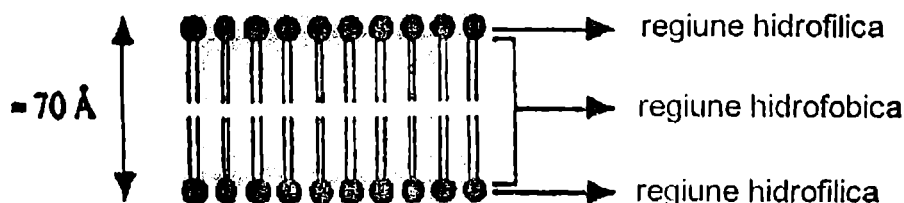


Figura 1.2

Reprezentarea schematică a bistratului lipidic

Proteinele membranare pot fi: (i) *periferice* (extrinseci) când sunt adsorbite pe stratul de lipide membranare; ele pot fi dissociate prin tratamente nedistructive (spălare cu soluții saline), și (ii) *integrale* (intrinseci) când pătrund adânc sau traversează chiar stratul lipidic. Proteinele membranare sunt agregate mari cu masa de ordinul  $10^5$  Da și având structură cuaternară. Pe fața citoplasmatică a membranei celulare se află o rețea de proteine fibrilare ce formează citoscheletul de care sunt ancorate unele proteine integrale. Pe fața externă a membranei se află atât proteine cât și unele lipide. Fața externă prezintă porțiuni oligozaharidice (glicoproteine și glicolipide) care formează învelișul celular (glicocalix).

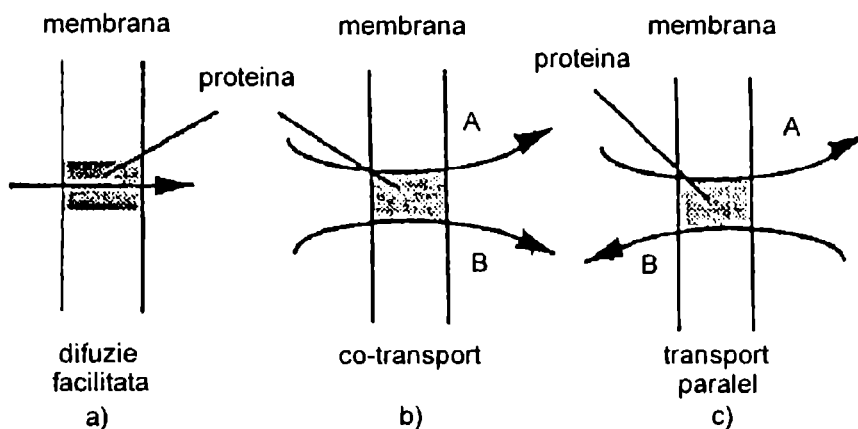
Lipidele membranare pot fi *nepolare* (colesterolul) sau *polare* (glicerofosfolipidele). Cele mai întâlnite lipide sunt fosfolipide. De capătul polar al lipidelor sunt legate câte două catene hidrocarbonate apolare ale acizilor grași ce esterifică glicerolul. Cu cât aceste catene



sunt mai nesaturate (prezintă mai multe legături duble), stratul lipidic este mai fluid, permițând modificări de conformație spațială și mișcări moleculare mai ample.

## 1.4.2 Transportul prin membrane biologice

Transportul speciilor chimice prin membrane poate fi *pasiv* și *activ*. Se pot evidenția trei tipuri de mecanisme de transport pasiv mediat de purtători (transportori) prin membranele biologice: (i) difuzie facilitată, (ii) co-transport, și (ii) transport paralel (Figura 1.3 a,b,c).



*Figura 1.3 a,b,c.*

*Tipuri de transport pasiv mediate de purtători*

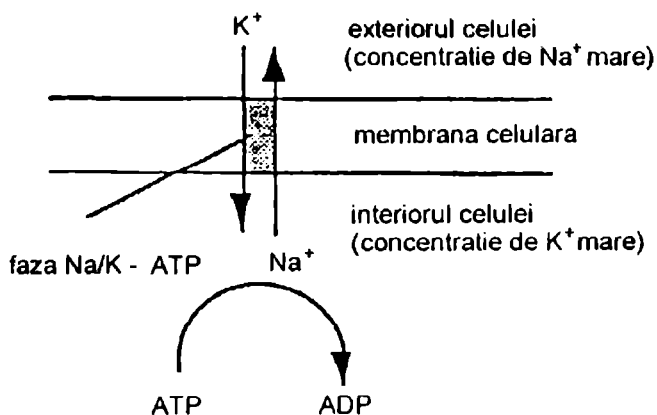
Cel mai simplu tip de transport pasiv mediat este difuzia sau difuzia facilitată deoarece proteina permite solutului să difuzeze prin membrană (Figura 1.3a). Transportul este determinat de gradientul de activitate sau concentrație al speciei de transportat și se produce din regiunea cu concentrație ridicată către regiunea cu concentrația scăzută.

În cazul co-transportului, solutul A este transportat în același sens prin membrană cu solutul B. Cei doi soluți se găsesc de aceeași parte a membranei iar forța motrice este gradientul de concentrație al unuia dintre soluți, de exemplu specia A. Aceasta înseamnă că specia B poate fi transportată chiar împotriva gradientului său de concentrație (Figura 1.3b).

La transportul paralel, cei doi soluți sunt transportați în sensuri opuse. În acest proces forța motrice este gradientul de concentrație al unuia dintre soluți. Astfel al doilea solut poate fi transportat împotriva propriului gradient de concentrație (Figura 1.3c).

Transportul activ implică existența unei surse de energie în sistem care să permită transportul speciilor chimice împotriva gradientilor lor de concentrație. În cazul membranelor

celulare, transportul facilitat activ se realizează pe baza energiei celulare. Energia se obține preponderent din hidroliza adenzotriofosfatului (ATP) la adenzodifosfat (ADP). Un exemplu consacrat de transport activ îl constituie pompele de sodiu și potasiu prin membrana celulară. În interiorul celulei concentrația de potasiu este ridicată iar cea de sodiu este scăzută, în timp ce în afara celulei (în țesuturi) situația este inversă, adică concentrația de sodiu este ridicată iar cea de potasiu este scăzută. O moleculă de ATP permite intrarea a doi ioni de potasiu în interiorul celulei, în timp ce trei ioni de sodiu sunt pompați afară din celulă. Schema acestui mecanism este prezentată în figura 1.4.



**Figura 1.4**

*Reprezentarea schematică a transportului activ de  $\text{Na}^+$  și  $\text{K}^+$*

### 1.4.3 Modele membranare

Au fost propuse mai multe modele pentru membranele biologice în tentativa de a modela și prezice interacțiunile complexe ale celulelor cu mediul înconjurător. Studiul modern al membranelor biologice a început în 1925 de către Fricke [23] care măsoară capacitatea electrică a eritrocitelor în suspensie și independent Gorter și Grendel [24].

Gorter și Grendel [24] pornesc de la observația că substanțele organice traversează membranele celulare cu o viteză proporțională cu gradientul lor de liposolubilitate. Ei propun o structură membranară alcătuită dintr-o zonă lipidică cuasi-continuu formată din două straturi lipidice monomoleculare juxtapuse, cu capetele polare spre exterior și cu catenele hidrocarbonate în contact.

Danielli și Davson [25] avansează ideea unei membrane plasmactice formată din două pături proteice având grosimea în jur de 20 Å și care sunt opace pentru electroni. Păturile proteice învelesc partea hidrofilă a unui dublu strat lipidic orientat perpendicular în raport cu păturile proteice, zonele hidrofobe fiind situate liniar și dispuse față în față cu cele două straturi lipidice hidrofobe.

Robertson [26] sugerează existența unei membrane unitate formată din trei straturi și anume două zone dense separate de o zonă clară. Această structură se regăsește la toate tipurile de membrane, diferențele de grosime realizându-se pe seama variațiilor zonei clare. Obiecția de principiu ridicată de acest model constă în faptul că nu permite trecerea apei și a substanțelor hidrosolubile deoarece în arhitectura propusă fosfolipidele formează o pătură continuă. Această dificultate este depășită teoretic de Danielli [27] prin postularea existenței unor "pori polari" având diametre între 7 și 10 Å mărginiți de grupări încărcate pozitiv. Din nefericire, acești pori nu au fost puși în evidență experimental.

Utilizând rezultate obținute cu microscopie electronică se poate introduce ipoteza organizării micelare a fosfolipidelor membranare care ar face posibil transportul apei și a substanțelor hidrosolubile prin membrane. Trecerea fosfolipidelor de la o organizare micelară la una lamelară este un fenomen reversibil și a fost demonstrată cu ajutorul modelelor de membrane artificiale.

În anii 1970 devine unanim acceptat modelul membranei biologice ca mozaic fluid de proteine globulare hidrofobe într-un dublu strat lipidic hidrofob. Membranele iau naștere prin autoasamblarea pe baza efectului hidrofob la limita de separație dintre două medii apoase lipidele formând structuri biomoleculare. Pe aceste structuri sunt adsorbite spontan proteinele, care tind să-și ascundă propriile porțiuni hidrofobe ale moleculelor în stratul hidrocarbonat al lipidelor.

## Bibliografie

1. M.Mulder, *Basic Principles of Membrane Technology*, Kluwer Academic Publishers, London, 1991.
2. N.N.Li și J.M.Calo, *Separation and Purification Technology*, Marcel Dekker Inc., New York, 1992.
3. C.Liteanu și G.Rădulescu, *Membranologie*, Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1984.
4. L.Mutihac, D.O.Popescu și R.Mutihac, *Roum.Chem.Quart.Rev.*, 1996, 4, 91-105.

5. L.Mutihac în *Mecanisme de transport prin membrane lichide*, Editura Academiei Române, București, 1997, p.36-45.
6. H.-J.Buschmann și L.Mutihac, *Rev.Roum.Chim.*, 1997, 42, 121-126.
7. H.-J.Buschmann și L.Mutihac, *DECHEMA e.V. Preprints "7<sup>th</sup> Int.Symp.Synthetic Membr.Sci.Ind."*, Tubingen, Germany, Aug.29-Sept.1, 1994, pp.194-197.
8. L.Mutihac, R.Mutihac, T.Constantinescu și C.Luca, *J.Incl.Phenom*, 1994, 17, 45-51.
8. M.Cheryan și M.A.Mehaia în *Membrane Separation in Biotechnology* (W.C.Mc Gregor, ed.), New York, Basel, Marcel Dekker, 1986, 258-301.
9. E.Drioli și G.Catapano în *Handbook of industrial membrane technology* (Ed. M.C.Porter), Park Ridge, NJ:Noyes, 1989, 401-481.
10. S.L.Matson și J.A.Quinn în *Membrane Handbook* (W.S.W. Ho and K.K.Sirkar, eds.), New York: Van Nostrand Reinold, 1992, 809-832.
11. E.Drioli și L.Giorno, *Chemistry and Industry*, 1996, January, 19-22.
12. M.Mc Donald în *Methods in Enzymology*, ( S.P.Colowich and N.O.Kaplan, eds.), Ac Press, New York, 1976, p.2.
13. E.Drioli, L.Giorno, L.Donato, R.Molinari și A.Basile, *Properties and Chemistry of Biomolecular Systems*, Kluwer Academic Publishers, 1994, 193-204.
14. J.A.Howell în *Regional Courses in Membrane Processes, Tempus, JEP 4720*, Module 2, July 18-29, 1994.
15. G.-H.Koops *Nomenclature and Symbols in Membrane Science and Technology* (European Society of Membrane Science and Technology), Sept.13, p.13.
16. H.K.Lonsdale, *J.Membrane Sci.*, 1982, 10:81.
17. M.Cheryan, *Ultrafiltration Handbook*, Techno.Publ., Co., Inc., Lancaster, Basel, 1986.
18. R.M.Izatt, J.D.Lamb și R.M.Brueening, *Sep.Sci.Technol.*, 1988, 1645.
19. H.R.Petty, *Molecular Biology of Membrane*, Plenum Press, New York and London, 1993, pp.1-5.
20. A.Gliozzi și R.Rolandi în *Membranes and Sensory Traduction* (G.Colombetti and F.Lenci, eds.), Plenum Press, New York and London, 1984, pp. 1-62.
21. L.Stryer, *Biochemistry*, W.H.Freeman and Company, New York, 1988.
22. H.Fricke, *Physical Rev.*, 1925, 26, 682-687.
23. E.Gorter și F.Grendel, *J.Exp.Med.*, 1925, 41, 439-443.
24. J.F.Danielli și H.Davson, *J.Cell.Comp.Physiol.*, 1935, 5, 495-508.
25. J.D.Robertson, *Biochem.Soc.Symp.*, 1959, 16, 3-43.

26. J.F.Danielli în *Cell Membranes* (G.Weissmann and R.Claiborne, eds.), HP Publishing, New York, 1975, pp.3-11.

27. S.J.Singer și G.L.Nicolson, *Science*, 1972, 175, 720-731.

## II. Aspecte fundamentale ale fenomenelor de transport prin membrane lichide

### 2.1. Transportul prin membrane lichide, parte a chimiei supramoleculare

Studiul transportului prin membrane lichide deschide perspective noi în dezvoltarea chimiei și biologiei oferind modele pentru mecanismele de transport biologic. Transportul moleculelor prin biomembrane constituie un proces fundamental în sistemele biologice. Transportul cationilor alcalini și alcalino-pământoși prin membrane lichide sintetice utilizând diverși transportori constituie subiectul a numeroase studii de specialitate. Acest lucru se datorează faptului că în lumea vie membrana este sediul unor procese importante controlate de concentrațiile intra- și extracelulare ale cationilor  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ .

În chimia analitică și în separare în mod special (analiza și separarea componenților din amestecuri, separarea enantiomerilor, recuperarea minereurilor, reciclare, etc.), transportul joacă un rol important.

#### 2.1.1. Definirea chimiei supramoleculare

După cum se știe chimia este știința care se ocupă cu studiul materiei și al transformărilor ei, viața fiind cea mai înaltă formă a materiei. Chimia este de asemenea știința transferelor, centrelor de comunicație de la simplu la complex între legile fizice și legile vieții, între fundament și aplicație.[1] Prin metodele ei, chimia este știința interacțiilor, transformărilor și a modelelor. Prin obiectele sale, molecule și materiale, chimia capătă expresia creativității. Cu ajutorul sintezei chimice se obțin noi molecule și noi compuși cu noi proprietăți. De la sinteza ureii în 1828 de către Friedrich Wöhler [2] chimia moleculară s-a dezvoltat pe o vastă arie beneficiind de metode sofisticate și puternice de a construi sau desface legături covalente între atomi în scopul obținerii unor structuri moleculare complexe. Sinteza organică a cunoscut și cunoaște o strălucitoare dezvoltare combinând cu eleganță, eficiența și selectivitatea noilor compuși. De la prima sinteză a lui Wöhler [2] până la sinteza vitaminei  $\text{B}_{12}$  de către Robert B. Woodward [3] și Albert Eschenmoser [4] este numai un exemplu al importantelor sinteze realizate de-a lungul istoriei chimice.

Chimia moleculară este chimia legăturilor covalente. Deasupra chimiei moleculare se află chimia supramoleculară denumită astfel de către întemeietorul ei *Prof. J.-M. Lehn* [1] de la Universitatea Louis Pasteur din Strasbourg, Franța, *chemistry beyond the molecule*, care se

bazează pe legături intermoleculare necovalente. Chimia supramoleculară constă din specii de o înaltă complexitate numite specii *supramoleculare* și *ansambluri supramoleculare*, care interacționează între ele prin forțe intermoleculare.

Chimia supramoleculară este un domeniu interdisciplinar important al științei și tehnologiei care leagă chimiștii cu biologii și fizicienii. Chimia supramoleculară înglobează puterea creativă a chimistului. Prin esența sa, prin abilitatea sa de a crea și prin frumusețea obiectelor sale chimia este o știință și în același timp o artă. Aceste aprecieri deosebite datorite chimiei aparțin *Prof. Lehn* [1], care împreună cu *C. J. Pedersen* și *D. J. Cram* în 1987 au primit *Premiul Nobel* pentru deosebitele contribuții aduse în domeniul chimiei supramoleculare. Această arie bine definită, conceptualizată și structurată este relativ tânără. Rădăcinile sale se întind în chimia organică și procedeele de sinteză moleculară, în chimia coordinativă și complecșii ion metal-ligand, în chimia fizică și în studiile experimentale și teoretice ale interacțiilor, în biochimie și procesele biologice prin legarea substratului și recunoaștere, în știința materialelor și proprietățile mecanice ale solidelor.

Chimia supramoleculară a extins rapid frontierele științei chimiei îmbogățind-o cu fenomene fizice și biologice. Chimia supramoleculară cuprinde pe de o parte supermoleculele iar pe de altă parte ansamblurile supramoleculare.

Organizarea moleculară și autoorganizarea (autoasamblarea) în straturi, membrane, miceli, microemulsii, geluri, specii în stare solidă, definesc agregate morfologice făcând posibil construcția agregatelor specifice supramoleculare.

Ca orice domeniu al științei, bineînțeles că și chimia supramoleculară are un trecut. Rădăcinile ei au fost trasate în sec.al 19-lea când Paul Ehrlich [5] introduce noțiunea de receptor deoarece consideră că nici o moleculă nu poate acționa dacă nu este legată *Corpora non agunt nisi fixata*. Dar legarea trebuie să fie selectivă, noțiune enunțată de Emil Fischer [6] în 1894 și devenită celebră ca noțiunea *lacăt-cheie*, noțiune care implică complementaritate geometrică și care constituie baza recunoașterii moleculare. Apoi, A. Werner [7] introduce noțiunea de coordinare și astfel chimia supramoleculară devine o generalizare a chimiei de coordinare. Odată cu aceste trei concepte fixare, recunoaștere și coordinare fundamentele chimiei supramoleculare au fost puse. Asociațiile moleculare au fost recunoscute și studiate de a lungul timpului și termenul de *Übermoleküle* a intrat în istoria chimiei la mijlocul anilor '30 pentru a descrie entitățile unei organizări (cum ar fi dimerii acidului acetic) rezultând din asociația speciilor coordinativ saturate.[8-10] De asemenea organizarea supramoleculară are un rol important în biologie [11]. În încercarea sa de a defini cât mai elocvent noțiunea de chimie supramoleculară Lehn [1] citându-l pe Roland Barthes [12] *Le langage est une*

*législation, la langue en est le cod*, specifică faptul că chimia este o legislație iar cuvintele care nominalizează forma obiectelor sale reprezintă codul, acestea dând accesul la domeniul specific de studiu.

După cum este binecunoscut, acest domeniu a început o dată cu legarea selectivă a cationilor metalelor alcaline cu liganzi macrociclici și macropolioiciclici naturali [13-15] și sintetici cum ar fi eterii coroană [16, 17] și criptanzii [18-21]. Chimia recunoașterii moleculare este cea mai importantă parte a chimiei *host-guest* (gază-oaspete).[22] Conceptul și termenul de chimie supramoleculară a fost introdus în 1978 [23] fiind definit ca *chimia ansamblurilor moleculare și a legăturilor intermoleculare*. Componentii unei *supermolecule* sunt *receptorul molecular și substratul*. Această terminologie este similară cu interacția receptor-substrat din sistemul biologic. Funcțiile de bază ale speciilor supramoleculare sunt: recunoașterea moleculară, transformarea și translocarea. Chimia supramoleculară poate fi divizată în două părți (i) studiul supermoleculelor definite ca specii oligomoleculare rezultate din asocierea intermoleculară a unui receptor și unul sau mai multe substraturi bazate pe principiul recunoașterii moleculare și (ii) studiul ansamblurilor supramoleculare rezultate din asocierea spontană a unui număr mare de componenți într-o fază microscopică cu caracteristici macroscopice dependente de natura sa (strat, membrană, veziculă, micelă, fază solidă, etc.)

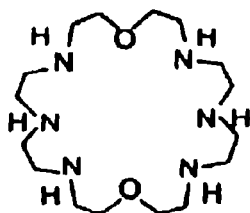
Speciile supramoleculare sunt caracterizate atât de aranjamentul spațial al componenților lor, mai bine spus arhitectura lor sau superstructura precum și de natura legăturilor intermoleculare care țin împreună componenții supermoleculei. Proprietățile structurale, conformaționale, termodinamice, cinetice și dinamice sunt bine definite. Forțele intermoleculare ce caracterizează speciile supramoleculare sunt mai slabe decât legăturile covalente deci, aceste specii sunt din punct de vedere termodinamic mai puțin stabile, cinetic mult mai labile, iar din punct de vedere dinamic mult mai flexibile decât moleculele. Astfel, după cum spune Prof. Lehn [1] chimia supramoleculară operează cu legături blânde și reprezintă o *chimie blândă* (soft chemistry). Se disting diverse tipuri de legături slabe, necovalente utilizate în chimia supramoleculară: interacții electrostatice, legături de hidrogen, forțe van der Waals, interacții donor-acceptor, etc.

Procesele de înaltă selectivitate ale recunoașterii moleculare se bazează pe natura stereochemică a compușilor. Astfel, stereochemia supramoleculară se extinde de la supermolecule la ansambluri polimoleculare. Aranjamentul spațial diferit al componentelor unei supermolecule conduce către stereoizomerii supramoleculari. Intereconversia lor va depinde de natura interacțiunilor dintre componenți, de variația energiei interacției



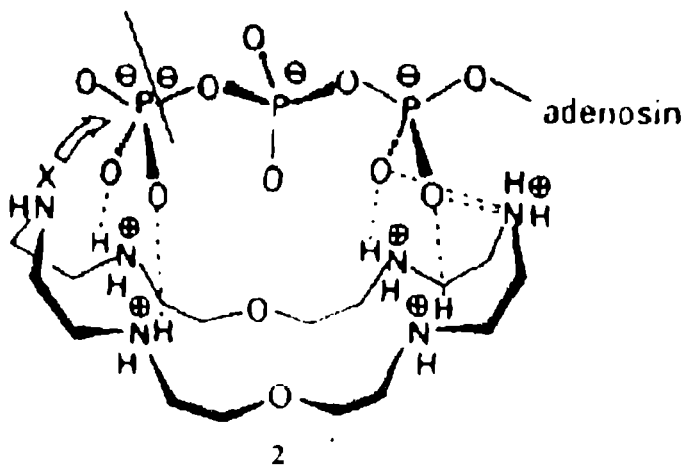
intermoleculare cu distanța și unghiurile corespunzătoare. Astfel, similar studiului interacțiilor intermoleculare există o analiză conformațională intermoleculară. Aspectele specifice chiralității supramoleculare privesc discriminarea chirală în legătura receptor-substrat precum și enantiomerii supramoleculari și ansamblurile supramoleculare.

Deși speciile anionice joacă un rol important în chimie și biologie datorită compușilor săi pe care îi pot forma, ele nu au fost mult studiate în literatura de specialitate comparativ cu posibilitățile de complexare ale cationilor metalici sau a unor compuși în formă cationică. Substraturile anionice prezintă diferite forme sau geometrii și anume: sferici, liniari, planari, tetraedrici și octaedrici. Dezvoltarea chimiei coordinative a anionilor și a moleculelor receptoare de tip anion a deschis posibilitatea realizării catalizei moleculare a substratelor anionice de interes chimic și biochimic, cum ar fi adenzin trifosfatul (ATP). Hidroliza ATP poate fi catalizată de anumite poliamine macrociclice protonate. În particular, [24]-N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1, leagă puternic ATP și accelerează hidroliza sa către ADP și a fosfatului anorganic pe un domeniu larg de pH.

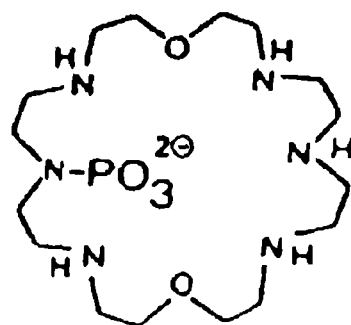


1

Reacția prezintă o cinetică de ordinul întâi (2, 3). Schema 2 reprezintă un posibil mod de legătură între ATP-complex.



2



3

## 2.1.2. Recunoașterea moleculară

### 2.1.2.1. Principiul recunoașterii moleculare

În principal, recunoașterea moleculară constă în selectarea de către *gazdă* a anumitor molecule *oaspete*. Principiul înțelegerii domeniului chimiei *gazdă-oaspete* formează fundamentul recunoașterii moleculare, aspect important în transportul biologic selectiv, activitatea medicamentelor și funcționarea enzimelor. Recunoașterea moleculară reprezintă baza chimiei supramoleculare, domeniu inițiat, așa cum am mai spus mai sus, în sec. al 19-lea, odată cu introducerea conceptelor de receptor, recunoaștere și coordinare de către Ehrlich [5], Fischer [6] și Werner [7]. Când substratul este o specie chimică organică sau anorganică, recunoașterea este expresia stabilității și selectivității complexului speciei respective cu liganzii organici și depinde de geometria ligandului și de legăturile existente.

În ultimile trei decade s-au sintetizat o serie de receptori moleculari de geometrii diferite capabili de a forma complecși selectivi cu compuși corespunzători (specii organice, anorganice) prin legături de hidrogen, interacții ionice sau/și interacții hidrofobe (efecte de solvatare). Aceste forțe, care contribuie la stabilizarea complecșilor formați între gazdă și oaspete sunt de natură necovalentă. Ingeniosul concept definit de Fischer [6] *schloss-schlüssel-prinzip* referindu-se la enzimă și substrat își găsește rapid aplicarea în biochimie (membrane biologice), chimie, dar ceea ce este mai important este faptul că stabilește posibilitatea realizării unei punți între chimie, știința vieții și știința materialelor precum și transformarea conceptelor biologice în modele statistice [24-26].

Deoarece chimia coordinativă s-a ocupat exhaustiv de formarea complecșilor liganzilor organici sau anorganici cu ionii metalici tranziționali și numai exemple împrăștiate de complecși ai cationilor alcalini au fost studiați, situația s-a schimbat în totalitate în jurul anilor '60 odată cu descoperirea într-un timp foarte scurt a trei clase de liganzi organici capabili să formeze complecși stabili și selectivi cu cationii alcalini și alcalino-pământoși.

Cea mai cunoscută clasă de compuși utilizată în studii lacăt-cheie au fost ciclodextrinele [27]. Acestea au cavități hidrofobe. De exemplu,  $\alpha$ -ciclodextrinele formează complecși de incluziune cu clorbenzenul dar nu cu brombenzenul. Numeroase modele enzimatică stau la baza acestui principiu.

Recunoașterea moleculară a unor specii biologice relevante la nivel molecular constituie o nouă și dinamică branșă a chimiei organice. Astfel au fost sintetizați noi receptori pentru aminoacizi, nucleotide [28] și carbohidrați [29]. Recunoașterea moleculară bazată pe legături de hidrogen a fost cel mai adesea studiată în medii neapoase, în timp ce apa sau

amestecul apă-metanol sunt folosite pentru studiul unor nucleotide polare sau aminoacizi ca substrat pentru care interacțiile electrostatice joacă un rol important [30, 31]

### 2.1.2.2. Recunoașterea moleculară în solvenți organici nepolari

Procesele în organismele vii se bazează în principal pe interacțiile necovalente care sunt în acest fel responsabile de diferitele structuri ale moleculelor biologice și de asemenea de transformările chimice care conduc organismele spre replicare.

Deși au fost studiate o varietate de interacțiuni privind recunoașterea moleculară a unor compuși în mediu de solvenți organici, de departe cea mai des întâlnită legătură este legătura de hidrogen. Această legătură este dominantă în marea majoritate a sistemelor de recunoaștere solubile în solvenți organici. Cel mai cunoscut exemplu de recunoaștere moleculară prin formarea a trei legături de hidrogen (figura 2.1a) este cel al receptorilor sintetici de tip eter coroană sau aza eter coroană cu ionii primari de amoniu [32-35]. În figura 2.1b este prezentat complexul dintre L-triptofan și un receptor enantioselectiv pentru  $\alpha$ -aminoacizii aromatici. [36]

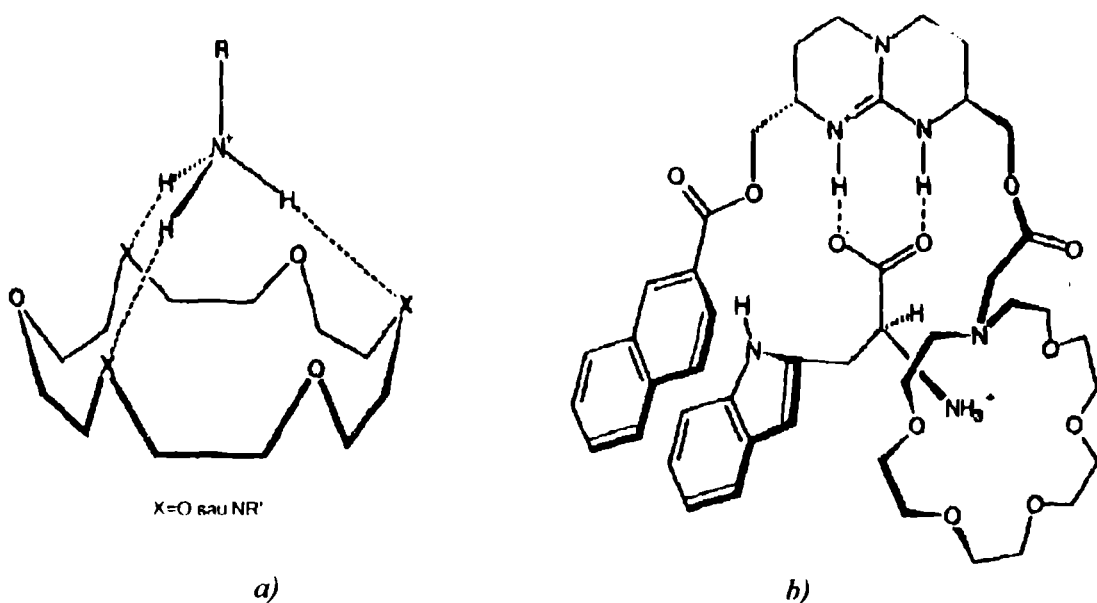
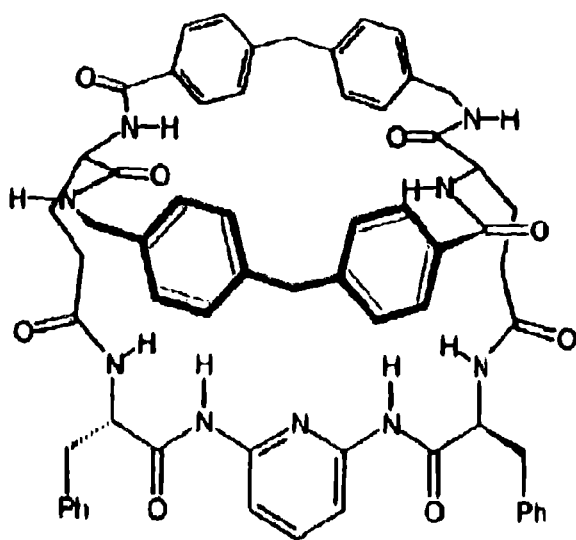


Figura 2.1. a) Formarea a trei legături de hidrogen, b) Reprezentarea schematică a complexului ligand macrociclic-ion primar de amoniu.

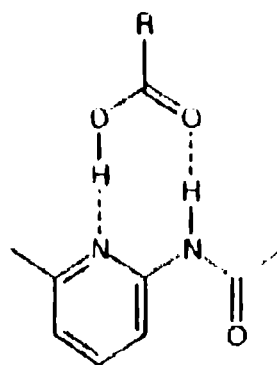
Recunoașterea ortogonală a celor trei grupuri de legături (amoniu-eter coroană, carboxilat-guanidinium și interacții de natură  $\pi$ - $\pi$  dau posibilitatea recunoașterii selective a L-

aminoacidului care în acest fel este extras în totalitate în  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  din soluția apoasă de amestec racemic. În timp ce moleculele mici de eteri coronă sau aza eteri coroană recunosc grupuri funcționale individuale, polimacrociclici pot recunoaște molecule. Still și colaboratorii [37] studiază recunoașterea peptidelor cu receptori macropolociclici în care interacțiunile dintre acestea se realizează prin legături de hidrogen.

Deci, pentru a înțelege și ulterior pentru a simula procesele biologice trebuie cunoscută modalitatea de a controla aceste forțe și apoi de a sintetiza nu numai molecule (definite de legături covalente) ci supermolecule în care forțele intermoleculare sunt de natură necovalentă. Astfel receptorul biciclic din schema 4 [38, 39] complexează selectiv aminoacizi derivatizați.



4



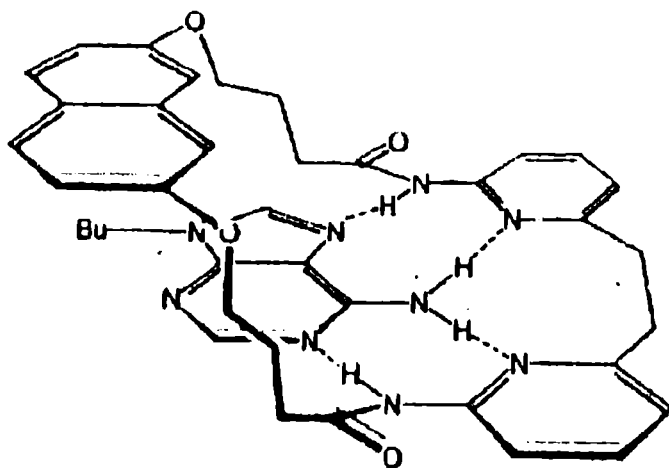
5

În cazul în care receptorul conține unități bis(acilamino)piridinice, acesta leagă grupări carboxilice libere prezentate în schema 5. Compusul 4 complexează acizi carboxilici simpli dar formează complecși și cu  $\alpha$ -aminoacizi cu N-derivatizat și de asemenea cu C terminal al peptidelor.

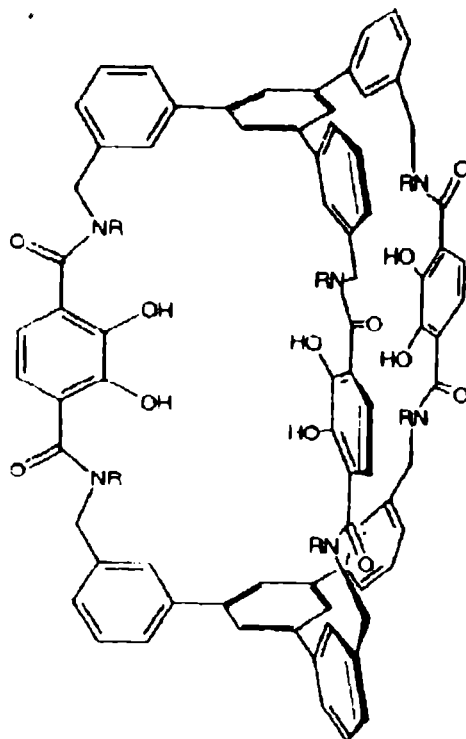
Datorită importanței deosebite a recunoașterii acidului nucleic pentru biologia moleculară, nu este surprinzător faptul că nucleobazele au atras interesul chimiei supramoleculare. Receptorul bis(acilamino)piridină a cărui țintă este 9-butiladenină realizează complexul 6 cu acesta prin legături de hidrogen și interacții  $\pi$ - $\pi$ .

Complexul format are o constantă de asociere  $K_a = 3200 \text{ M}^{-1}$  în  $\text{CDCl}_3$ . Receptorul tris(catecol) 7 având 6 grupări de legături de hidrogen donoare poate interacționa cu legăturile

centrale ale unui substrat corespunzător. În general, acesta este folosit pentru recunoașterea unor molecule polare mici în faze lipofilice. Astfel acest receptor este capabil de a solubiliza trei nucleobaze (citosina, guanina și adenina) în  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ca și pterina, melanina și 2,6-diaminopurina [40].



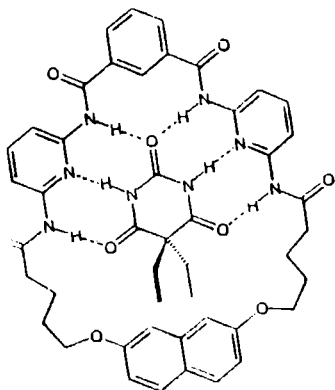
6



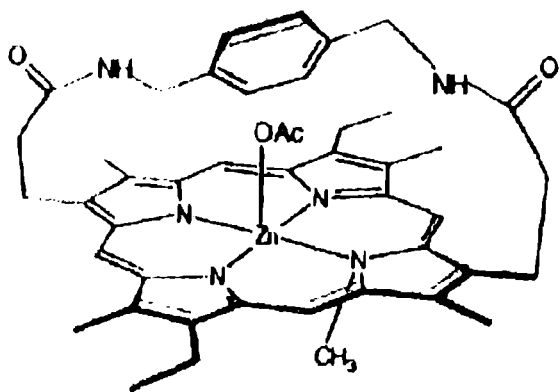
R = Cl, Ph

7

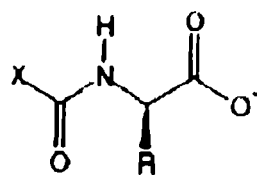
Receptorul molecular **8**, care conține în structura sa la fel ca și receptorul 7, unitați de acilaminopiridină recunoaște selectiv compuși de tip barbituric. Complexul format între receptorul **8** și barbital ( $K_a = 250\ 000\ M^{-1}$  în  $CH_2Cl_2$ ) a fost studiat în stare cristalină prin difracție de raze X [41]



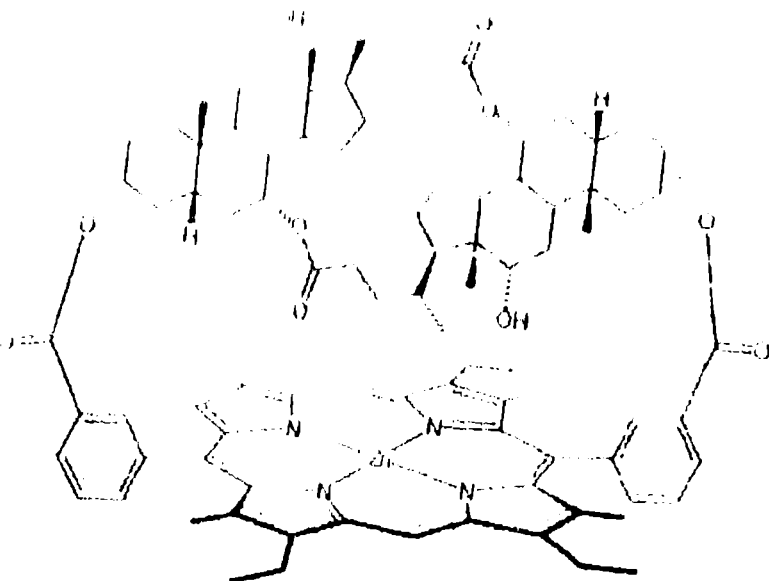
Interacțiile metal-ligand reprezintă un tip deosebit de legături în chimia supramoleculară cu un potențial mare de aplicații în sinteza receptorilor moleculari. Cel mai comun tip de legătură metalică aflată în receptorii moleculari utilizați în recunoașterea moleculară este cea de Zn-porfirină. Acești receptori au în structura lor grupări cu proprietăți spectroscopice, ca de exemplu grupări cromofore făcând posibilă investigația în UV sau investigații în RMN. În schemele 9, 10, 11 sunt prezentați câțiva receptori moleculari de tip Zn-porfirină care manifestă selectivitate pentru compușii de interes biologic. Astfel porfirina **8** a fost studiată ca receptor pentru esterii  $\alpha$ -aminoacizilor. [42].



11



10



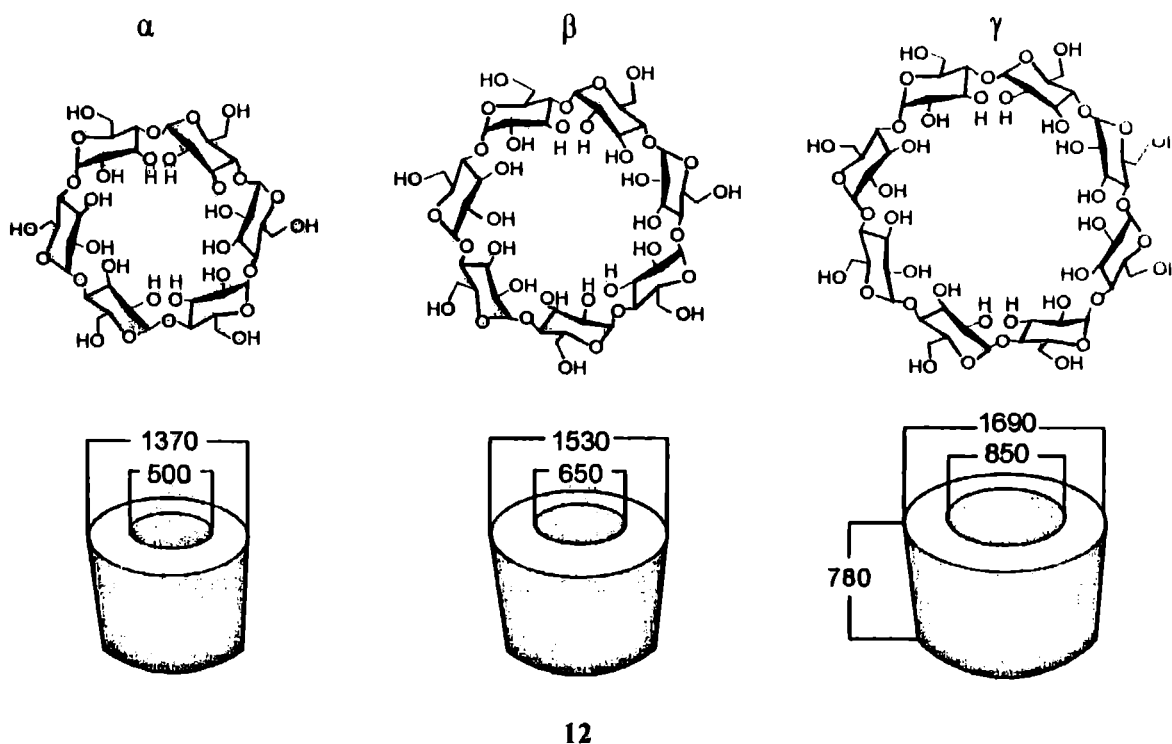
11

### 2.1.2.3 Recunoașterea moleculară în medii neapoase

Compusul **9** are capacitatea de a extrage o însemnată varietate de carboxilați de tip **10** din soluții apoase în cloroform cu semnificație enantioselectivă [43]. Un bun receptor pentru carbohidrați și polioli este compusul Zn-porfirină, prezentat în schema **11**. În cazul acestui compus adăugarea moleculelor de metanol sau apă îmbunătățesc calitatea de receptor pentru compuși piranozinici [44].

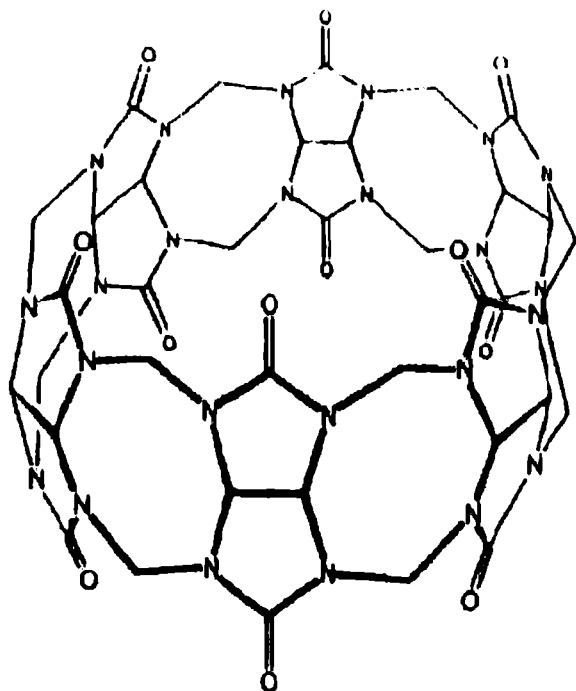
### 2.1.2.4 Recunoașterea moleculară în medii apoase

Spre deosebire de mediile nepolare, recunoașterea în medii apoase este în general caracterizată de interacții hidrofobice. Ca receptori specifici acestui tip de interacții sunt ciclodextrinele și calixarenele solubile în apă. Ciclodextrinele, **12**, au contribuit și contribuie la dezvoltarea chimiei gazdă-oaspete în soluții apoase [45-47].

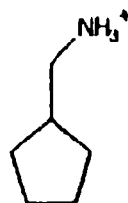


Cucurbiturilul, **13**, este considerat un receptor interesant [48] care se obține printr-un procedeu simplu din 6 molecule de glioxal și 12 molecule de uree și formaldehidă.





13



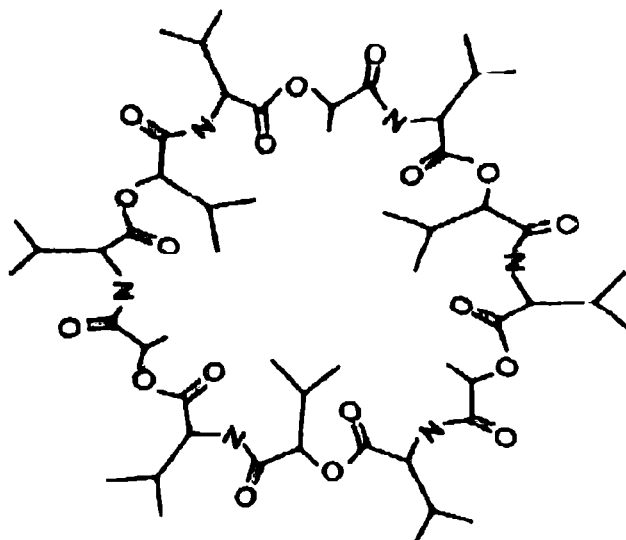
14



15



16



17

În soluții apoase acide acesta manifestă o puternică afinitate față de anumiți ioni pozitivi de alchilamoniu, care își plasează grupurile lor alchil în interiorul cavității hidrofobice prin interacții hidrofobice.[49-53] Ca oaspeți ai acestui receptor se pot enumera

compușii următori : ciclopentilmetilamoniu, **14**, bis(amoniu), **15** și spermina protonată, **16**, ale cărei patru grupări amoniu pot deveni participante la legăturile de hidrogen cu receptorul.

În cele de mai sus au fost prezentați câțiva dintre receptori macrociclici care prezintă interes pentru recunoașterea moleculară biologică. Acești receptori sunt în particular apropiați de natură având în structura lor unități de natură biologică sau similară sistemelor biologice sau capacitatea de a recunoaște compuși de natură biologică. Un alt grup interesant de receptori este grupul vancomicin de antibiotice cunoscut ca un grup de produse naturale macrociclice a căror activitate se datorează proprietăților lor de receptori moleculari. În schema 17 este prezentată structura valinomicinei.

### 2.1.3 Aspecte termodinamice și cinetice ale complexelor liganzilor macrociclici cu diferite specii moleculare

Descoperirea de către Pedersen [16, 17] a polieterilor macrociclici și sinteza de către Lehn [18, 19] a aminopolieterilor corespunzători a condus către numeroase investigații în chimia acestor compuși. În primul rând s-a studiat înțelegerea comportamentului acestor compuși cu speciile ionice în particular cationii alcalini și alcalino-pământoși ca și ionii de amoniu.

În principal, stabilitatea eterilor coroană cu ionii metalici este guvernată de o serie de factori cum ar fi : (i) mărimea relativă a ionilor metalici și cavitatea eterilor coroană; (ii) sarcina electrică a ionilor metalici, (iii) tipul, numărul și amplasarea heteroatomilor în inelul eterului coroană, (iv) flexibilitatea conformațională a inelului eterului coroană, (v) interacția ion-solvent [54].

Efectul chelat al liganzilor aciclici a fost extins la efectul macrociclic și criptat definit de proprietăți speciale (incluziunea substratului, stabilitate mare, selectivitate mare, viteză scăzută de schimb, protecție față de mediu) prezentate de liganzii macrociclici și complexii lor cu ionii metalici. Acest efect este de natură entalpică și entropică.

Studiul stabilității și selectivității complexelor liganzilor macrociclici cu diverși cationi sau anioni formați prin interacții necovalente între receptor ( $R$ ) și substrat ( $S$ ) este abordat ținând seama de constanta de stabilitate ( $K$ ) a acestora precum și de datele termodinamice corespunzătoare, entalpia ( $\Delta H$ ) și entropia ( $\Delta S$ ).

Astfel conform ecuațiilor 2.1 și 2.2 se definește constanta de stabilitate :



$$K = \frac{k_f}{k_d} \quad (2.2)$$

unde  $k_f$  este constanta vitezei de complexare sau de formare a complexului iar  $k_d$  este constanta vitezei de disociere a complexului.

Paradoxul transportului prin membrană este acela că un transportor ar putea avea în mod optim, proprietăți diferite în fiecare din cele trei regiuni chimic diferite (faza sursă, interiorul membranei și faza receptoare). La interfața membrană / fază sursă legarea trebuie să fie rapidă și puternică deci o valoare a lui  $k_f$  mare. În interiorul membranei hidrofobice cationul trebuie să fie puternic legat astfel încât constanta de stabilitate să fie mare. În final la interfața membrană / faza receptoare,  $k_d$  trebuie să aibă valoare mare pentru a avea loc decomplexarea. În mod evident aceste condiții nu sunt ușor de realizat astfel încât apar câteva compromisuri în ceea ce privește puterea de legare și dinamica fiecărui transportor [55].

Constantele de stabilitate ( $\log K$ ) precum și parametrii termodinamici  $\Delta H$  și  $T\Delta S$  pentru complexii aminelor protonate și neprotonate cu 15-coroană-5, 18-coroană-6 și benzo-18-coroană-6 în diverși solvenți organici ca metanol, acetonitril și propilencarbonat au fost studiați de către Buschmann și colaboratorii [56-59]. Constantele de stabilitate și datele termodinamice prezentate în tabelul 2.1 pentru aminele protonate și neprotonate cu 18-coroană-6 în metanol au fost determinate utilizând tehnica titrării calorimetrice. Au fost studiate amine primare, secundare și terțiare [56, 58, 59] atât din seria alifatică cât și din seria aromatică. În acest caz se constată că legăturile de hidrogen formate între ionii de amoniu pentru aminele primare și 18-coroană-6 nu influențează formarea complexului în soluție și acest lucru este evidențiat de faptul că valorile entalpiei sunt aproape identice. Situația este complet schimbată privind aminele primare comparativ cu cele secundare și respectiv terțiare. Deși valorile  $\log K$  nu se schimbă foarte mult valorile entalpiei și entropiei se schimbă dramatic astfel încât valorile  $\Delta H$  se apropie de zero și formarea complexului este favorizat de efectele entropice.

Comparând rezultatele pentru *n*-, *sec*-, și *terț-butilamină*, valorile variației entalpiei scad și ale entropiei cresc. Acest efect nu poate fi explicat prin numărul de legături de hidrogen formate între amine și ligand deoarece el trebuie să fie constant. Explicația se datorează faptului că diferenții substituienți influențează densitatea electronică a atomului de azot. Această interpretare a fost confirmată din datele obținute în reacția aniliniei cu 18-

coroană-6. În cazul aminelor secundare și terțiare, structura substituienților nu au o influență prea mare asupra variației entalpiei. În acest caz efectele sterice sunt cel mai important factor care influențează puterea interacțiilor între ligand și amină.

**Tabel 2.1.** Constantele de stabilitate ( $\log K$ ,  $K$  în  $M^{-1}$ ) și parametrii termodinamici  $\Delta H$  și  $T\Delta S$  (în  $kJmol^{-1}$ ) ai complexilor diferitelor amine cu 18-coroană-6 în metanol la 25 °C.

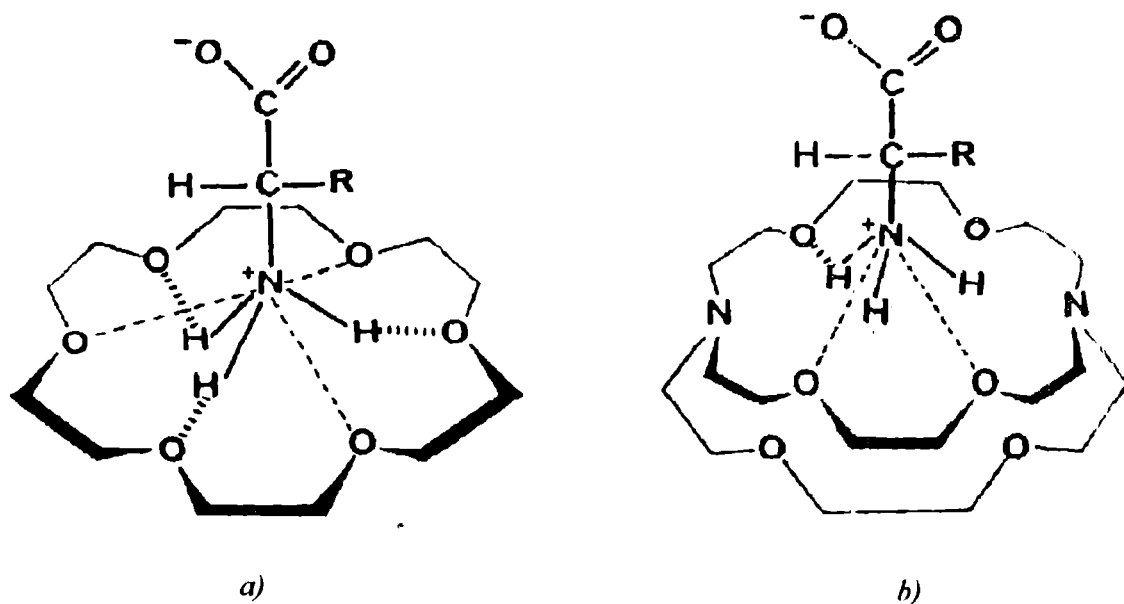
Amine	Log K	- $\Delta H$	$T\Delta S$
<i>n</i> - C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NH <sub>2</sub>	2.60 ± 0.05	31.5 ± 0.3	- 16.7 ± 0.6
<i>n</i> - C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	3.95 ± 0.06	44.3 ± 0.1	- 21.9 ± 0.5
<i>sec</i> - C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NH <sub>2</sub>	2.40 ± 0.01	19.2 ± 0.2	- 5.6 ± 0.3
<i>sec</i> - C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	3.38 ± 0.08	41.5 ± 0.2	- 22.3 ± 0.7
<i>tert</i> - C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NH <sub>2</sub>	2.46 ± 0.05	12.7 ± 1.3	1.3 ± 1.0
<i>tert</i> - C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	2.55 ± 0.03	44.4 ± 3.1	- 29.9 ± 2.8
( <i>n</i> - C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> NH	2.51 ± 0.06	2.0 ± 0.3	12.3 ± 0.6
( <i>n</i> - C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	2.37 ± 0.2	2.7 ± 0.2	10.8 ± 0.3
( <i>n</i> - C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>3</sub> N	2.58 ± 0.04	2.3 ± 0.4	12.4 ± 0.7
( <i>n</i> - C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>3</sub> NH <sup>+</sup>	2.28 ± 0.03	5.5 ± 0.4	7.5 ± 0.6
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>	2.52 ± 0.02	1.6 ± 0.7	12.7 ± 0.6
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	3.85 ± 0.21	41.6 ± 0.3	- 19.7 ± 0.8
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	2.46 ± 0.02	22.5 ± 0.3	- 8.6 ± 0.3
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	4.37 ± 0.17	47.7 ± 0.9	- 22.9 ± 1.8
4 - Cl <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	2.54 ± 0.01	23.8 ± 0.4	- 9.4 ± 0.4
4 - CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	3.86 ± 0.01	49.4 ± 0.2	- 27.5 ± 0.3
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> NHCH <sub>3</sub>	2.47 ± 0.04	1.2 ± 0.3	12.8 ± 0.9
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> (Cl <sub>3</sub> ) <sup>+</sup>	2.43 ± 0.08	3.6 ± 0.7	11.0 ± 0.5
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2.51 ± 0.01	2.1 ± 0.9	12.2 ± 0.9
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> NH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	2.52 ± 0.01	3.3 ± 0.9	11.2 ± 1.0

Constantele de stabilitate, entalpiile și entropiile procesului de complexare (Tabel 2.2) ale unor liganzi macrociclici cu o serie de aminoacizi au fost de asemenea determinate utilizând titrarea calorimetrică având ca solvent metanolul [35, 59]

*Tabelul 2.2. Constantele de stabilitate ( $\log K$ ,  $K$  în  $M^{-1}$ ) și parametrii termodinamici  $\Delta H$  și  $T\Delta S$  (în  $\text{kJmol}^{-1}$ ) ai complexelor unor aminoacizi cu 18-coroană-6 și criptandul [2.2.2] în metanol la 25 °C [35]*

Amninoacizi	Parametri	18C6	[2.2.2]
<i>L-<math>\alpha</math>-Ala</i>	<i>log K</i>	3,24 ± 0,01	3,11 ± 0,09
	$-\Delta H$	46,2 ± 2,6	16,9 ± 0,8
	$T\Delta S$	-27,8 ± 2,7	1,6 ± 1,2
<i>L-Cys</i>	<i>log K</i>	3,28 ± 0,02	3,09 ± 0,12
	$-\Delta H$	44,1 ± 4,6	25,2 ± 3,1
	$T\Delta S$	-25,5 ± 4,7	-7,7 ± 3,7
<i>Gly</i>	<i>log K</i>	3,68 ± 0,09	3,20 ± 0,08
	$-\Delta H$	49,8 ± 2,1	51,0 ± 2,9
	$T\Delta S$	-28,6 ± 2,7	-32,8 ± 3,4
<i>L-Ile</i>	<i>log K</i>	2,98 ± 0,05	3,22 ± 0,05
	$-\Delta H$	53,6 ± 0,5	16,6 ± 0,7
	$T\Delta S$	-36,7 ± 0,8	1,7 ± 1,0
<i>L-Leu</i>	<i>log K</i>	3,14 ± 0,02	3,28 ± 0,03
	$-\Delta H$	49,0 ± 0,3	14,6 ± 0,9
	$T\Delta S$	-31,1 ± 0,5	4,0 ± 1,0
<i>L-Met</i>	<i>log K</i>	3,23 ± 0,01	3,21 ± 0,04
	$-\Delta H$	45,4 ± 1,9	16,8 ± 1,1
	$T\Delta S$	-27,0 ± 2,0	1,5 ± 1,4
<i>L-Phe</i>	<i>log K</i>	3,18 ± 0,01	3,26 ± 0,02
	$-\Delta H$	31,3 ± 0,8	12,0 ± 0,9
	$T\Delta S$	-13,2 ± 0,9	-6,5 ± 1,0
<i>L-Trp</i>	<i>log K</i>	3,19 ± 0,09	3,22 ± 0,04
	$-\Delta H$	41,1 ± 3,7	11,8 ± 1,1
	$T\Delta S$	-22,9 ± 4,3	6,5 ± 1,3
<i>L-Val</i>	<i>log K</i>	2,99 ± 0,09	3,26 ± 0,02
	$-\Delta H$	32,2 ± 0,9	11,3 ± 1,3
	$T\Delta S$	-15,2 ± 1,4	7,2 ± 1,4

De remarcat este faptul că nu sunt variații mari ale energiei de complexare pentru diverși aminoacizi cu 18-coroană-6 și criptandul Kryptofix [2.2.2], [35,59], acest fapt conducând la remarcabile efecte ale compensării entalpie-entropie. Astfel procesul de complexare al aminoacizilor cu 18-coroană-6 este din punct de vedere entalpic stabil (valori mari și negative ale  $\Delta H$  și nefavorabil entropic (valori negative ale  $\Delta S$ ). Astfel acest proces este controlat entalpic. Complexarea aminoacizilor cu criptandul [2,2,2] (exceptând câțiva aminoacizi, inclusiv glicina) este favorizat de efectele entalpice și entropice (Tabelul 2.2). Diferența între valorile entalpiilor complexării aminoacizilor cu eterii coroană față de cele ale aminoacizilor cu criptandul [2.2.2] poate fi atribuită caracteristicilor structurale diferite ale celor doi liganzi. Această diferență este în principal dată de variația tăriei interacției între moleculele oaspete și liganzi. Interacțiile complecșilor aminoacidului cu 18-coroană-6 sunt reprezentate prin trei legături de hidrogen și trei legături electrostatice  $N^+ \dots O$  (Figura 2.2, a,b). În cazul complecșilor cu Kryptofix [2.2.2], doi din cei trei hidrogeni ai grupării  $-NH_3^+$  sunt prea departe de atomii de oxigen ai criptandului pentru a forma trei legături de hidrogen



**Figura 2.2**

- a) *Reprezentarea schematică a complexului unui aminoacid cu 18-coroană-6;*  
b) *Reprezentarea schematică a complexului unui aminoacid cu criptandul [2.2.2]*

Modelul computerizat arată formarea unei legături de hidrogen și două legături electrostatice pentru complexul aminoacidului cu Kryptofix [2.2.2]. Aceasta poate fi atribuită efectelor sterice care reduc abilitatea criptandului de a interacționa în întregime cu aminoacidul. De menționat faptul că și variația entalpică corespunzătoare complexării aminoacidului cu criptandul [2.2.2] este mai mică decât în cazul complexării aminoacidului cu 18-coroană-6 în același solvent. În cazul acestor complecși nu trebuie neglijat efectul datorat restului aminoacidului, de exemplu aminoacizii cu grupări *-OH*, *-SH* pot forma legături de hidrogen adiționale care influențează stabilitatea complexului.

## 2.2. Tipuri de membrane lichide

### 2.2.1. Membrane lichide în strat gros

Ideea realizării unor separări în sistem trifazic utilizând membranele lichide nu este nouă. Totuși, studiul unor noi metode de punere în contact a celor trei faze în scopul obținerii unor separări performante a cunoscut o reală creștere în ultimii 20 de ani. Posibilitatea utilizării unui spectru larg al interacțiilor specifice în membrană pentru obținerea unor separări selective și a unor fluxuri de masă mari constituie unul dintre argumentele pentru care membranele lichide au atras atenția cercetătorilor.

Termenul general utilizat pentru transportul cantității de masă prin membranele neporoase sub acțiunea unui gradient de concentrație este de *permeație*. Dacă permeanții din faza sursă sunt deosebiți în cealaltă parte a membranei într-o fază de vapori operația este numită *pervaporizare*. Dacă permeanții din faza sursă sunt transportați printr-o membrană (polimerică sau lichidă) și desorbiți într-o fază acceptoare lichidă, această operație se numește *pertracție*. Acest termen derivă din cuvântul latin *per-trahere* prin analogie cu termenul de extracție care derivă de asemenea din cuvântul latinesc *ex-trahere*.

În timp ce extracția cu solvenți este un proces de echilibru pertracția este guvernată de cinetica transportului prin membrană. În general grosimea membranelor lichide are ordinul de mărime cuprins între  $10^{-5}$  -  $10^{-2}$  m.

Dispozitivele în care se realizează sistemele membranare lichide sunt de diverse geometrii. Primul sistem membranar a fost realizat în 1961 de către Schulman [56] și este cunoscut sub denumirea de puntea Schulman (figura 2.3).

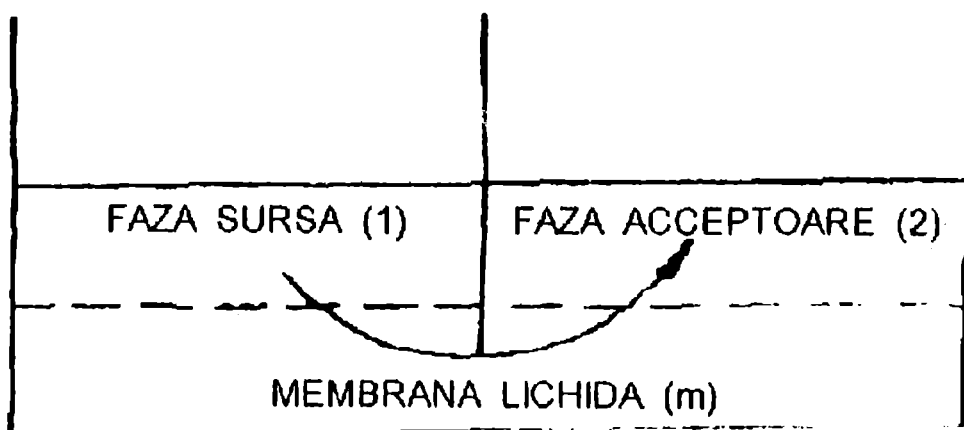
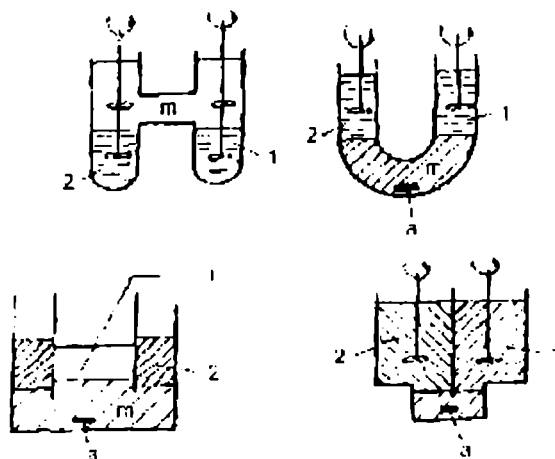


Figura 2.3 Dispozitiv cu membrană lichidă tip Schulman



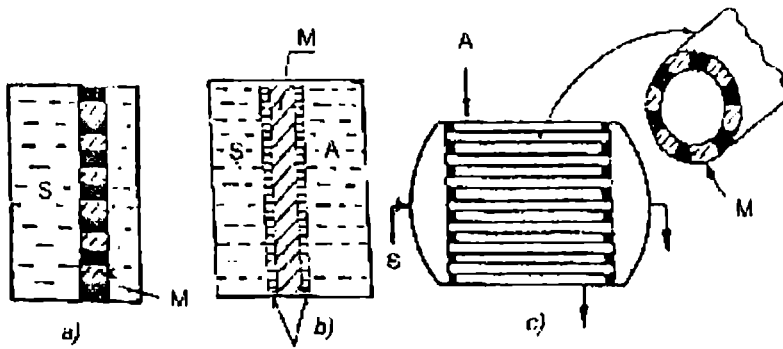
Membrana este constituită dintr-un solvent organic nemiscibil cu apa care separă faza apoasă sursă de faza apoasă acceptoare. În solventul organic se găsește dizolvat transportorul care asigură transportul componentilor prezenți în faza sursă către faza acceptoare în scopul izolării sau concentrării acestora. În majoritatea cazurilor dispozitivele sunt prevăzute cu sisteme de agitare care măresc viteza procesului de transport. Celulele în care se realizează sistemele membranare lichide pot avea geometrii diverse în formă de U, H,W, incinte semicilindrice, incinte cilindrice concentrice, bariere care separă fazele, etc. (figura 2.4).



**Figura 2.4** Celule utilizate pentru realizarea membranelor lichide. 1-faza sursă; 2-faza acceptoare; m- membrana; a- agitator.

În realizarea sistemelor membranare lichide un factor important îl constituie forma geometrică a celulelor care trebuie corelată atât cu asigurarea unei suprafețe optime de contact între faze cât și cu asigurarea unui regim convențional eficient. Natura solventului membranar afectează procesul de separare al speciilor chimice. Sunt folosiți în general acei solvenți care asigură un domeniu larg de concentrație pentru transportor și favorizează un anumit grad de disociere a perechii ionice formate. În literatura de specialitate sunt prezentate studii ale influenței solventului membranar asupra procesului de separare a speciilor chimice [57-60]. Eficiența solventului în sistemul de transport se poate aprecia valoric cu ajutorul constantei de repartiție a transportorului între apă și solvent și al constantei dielectrice. Dintre cei mai adesea solvenți utilizați în sistemele membranare se pot menționa: cloroformul, 1,2-diclorețanul, triclorețanul, tetraclorețanul, clorura de metilen, benzenul, etc.

La scară pilot sau industrială se folosesc dispozitive mai complexe cum ar fi pertractoare în film sau pertractoare disc-rotativ [61,62] (figura 2.5).

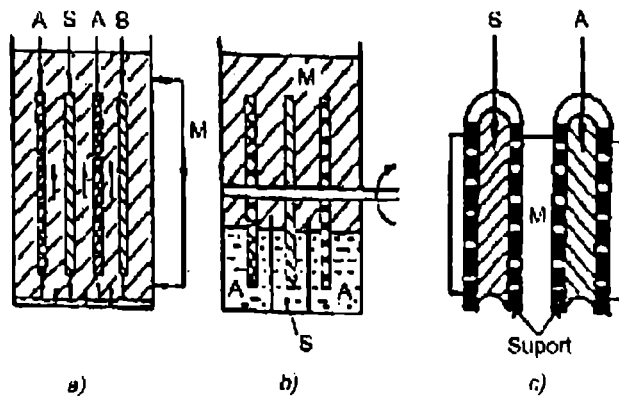


**Figura 2.5.** Dispozitive industriale în strat gros; a) pertractor film; b) pertractor disc rotativ; c) pertractor fibre capilare. S- fază sursă; A-fază acceptoare, M-membrana lichidă.

### 2.2.2. Membrane lichide imobilizate

Fluxul transportului prin membrane lichide și selectivitatea separărilor sunt influențate de o serie de factori fizici (viteza de agitare a fazelor, temperatura) și chimici (structura transportorilor și a substratului, reacții chimice de complexare și decomplexare la interfețele fazelor, natura solventului, gradienti chimici (pH, pX, potențial redox, etc.).

O mărire a fluxurilor de transport a fost obținută prin reducerea grosimii membranei (a stratului de solvent organic) prin imobilizarea acesteia pe suporturi poroase inerte sau între două suporturi neporoase (tip sandwich) care sunt permeabile (figura 2.6). Principala problemă în aplicarea membranelor lichide imobilizate este dată de timpul de funcționare al lor. În unele cazuri acesta poate fi crescut prin umplerea porilor suportului cu un gel [63].



**Figura 2.6.** Membrane lichide imobilizate; a - pe suport polimeric poros; b - tip sandwich; c - fibre capilare.

Primele suporturi utilizate pentru realizarea membranelor lichide immobilizate au fost obținute din policlorură de vinil apoi din propilenă și derivați fluorurați ai acesteia [64] care prezintă o bună stabilitate față de solvenții organici. Diametrul porilor suportului este, în general, cuprins între 0,02 și 1 μm iar grosimea de ordinul zecilor de μm. Suportii membranari sunt caracterizați fizic prin porozitate și tortuozitate. Porozitatea reprezintă raportul dintre volumul total al porilor și volumul suportului. Tortuozitatea este raportul dintre lungimea medie a porilor și grosimea suportului. Eficacitatea unui suport membranar este cu atât mai mare cu cât porozitatea este < 1 și cu cât tortuozitatea este > 1.

S-au realizat două tipuri de membrane lichide immobilizate și anume: membrane lichide suportate sub formă de strat subțire și membrane lichide suportate sub formă de fibre capilare (figura 2.6,c).

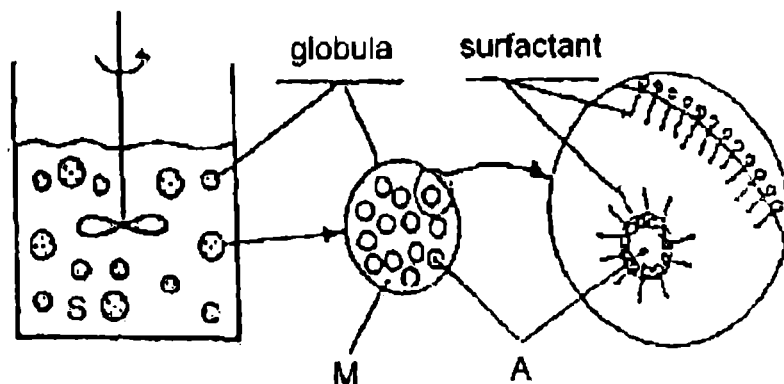
În cazul membranei lichide suportate sub formă de fibre capilare, faza acceptoare este situată în exteriorul fibrei iar faza sursă circulă prin interiorul acesteia. Membranele lichide immobilizate sub formă de strat subțire se utilizează și pentru separarea amestecurilor gazoase. Pentru realizarea sistemelor membranare de tip sandwich se utilizează cauciucul siliconic și polimerii fluorocarbonici. Între suportul și solventul membranei trebuie să existe o compatibilitate în ceea ce privește caracterul hidrofob și solubilitatea. Ca solvenți mai des utilizați în realizarea membranelor de acest tip se pot enumera: cloroformul, diclorbenzenul, toluenul, fenilhexanul, etc. [65].

### 2.2.3. Membrane lichide emulsionate

Li [66,67] realizează primele membrane lichide emulsionate în 1968. Contribuții importante la dezvoltarea acestora sunt aduse în continuare de Cussler și colaboratorii săi [68,69]. Aceste membrane prezintă un real interes industrial datorită suprafeței mare de contact care se poate realiza între faze, acest aspect conducând la obținerea de fluxuri mari și deci separări eficiente. Inițial aceste membrane au fost utilizate pentru extracția metalelor grele dar în continuare ele și-au găsit numeroase aplicații analitice cât și industriale.

Pentru realizarea acestor tipuri de membrane se formează pentru început o emulsie între solventul membranar și una din fazele apoase de obicei faza sursă care conține specia chimică supusă transportului. În solventul membranar se găsește evident transportorul, deci specia chimică care controlează permeabilitatea și selectivitatea membranei. Diametrul picăturilor în emulsie este cuprins între 0,1 și 10 μm. Emulsia obținută este stabilizată cu ajutorul unui agent

tensioactiv adecvat și apoi dispersată în faza apoasă acceptoare. Într-un astfel de sistem, faza sursă este separată de faza acceptoare la nivelul a numeroase globule de lichid membranar care includ în interiorul lor picăturile de fază sursă. Se poate realiza de asemenea și sistemul invers în care faza acceptoare este inclusă în picăturile de emulsie care sunt dispersate în faza sursă din care se separă specia de interes. Faza apoasă acceptoare și emulsia formată între faza sursă și lichidul membranar se separă prin spargerea acesteia (figura 2.6).



*Figura 2.7 Membrană lichidă de tip emulsie*

Membranele lichide emulsionate prezintă numeroase aplicații atât în scopuri analitice pentru separarea și purificarea diferiților compuși chimici sau biologici cât și la nivel industrial [70,71].

### **2.3. Influența parametrilor fizico-chimici asupra transportului prin membrane lichide**

Echilibrele de repartiție între faze în cazul sistemelor membranare sunt influențate de o serie de factori fizici și chimici care acționează la ambele interfețe. În general principalii factori care influențează echilibrele de repartiție între faze atât în cazul extracției cu solvent precum și în cazul transportului prin membrane lichide sunt: structura receptorului utilizat ca extractant sau transportor, natura speciei extrase sau transportate, natura anionului utilizat pentru formarea perechii de ioni și natura solventului. Proprietățile termodinamice ale complexului receptor-substrat (stabilitate, entalpie și entropie) prezintă de asemenea o importanță deosebită asupra proceselor de transfer și transport [72]. Proprietățile cinetice cum ar fi viteza de complexare și decomplexare a complexilor la interfețe joacă un rol important nu numai în determinarea stabilității complexilor formați cât și în viteza de transport a acestora prin

membranele lichide. Concentrația speciilor în faza sursă influențează de asemenea extractibilitatea acestora în membrană și evident viteza transportului. Geometria celulei în care se realizează transportul influențează la rândul ei viteza de transport a speciilor. Transportul speciilor chimice prin membrane lichide la interfața fază sursă/membrană se poate defini conform echilibrului următor:



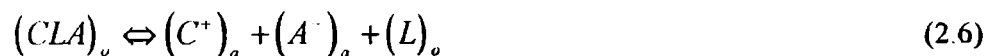
unde  $C^+$  - specia transportată;  $L$  - transportorul;  $A^-$  - anionul de cuplaj, iar indicii  $s$  și  $o$  reprezintă faza sursă și respectiv faza membranară. Acest echilibru este caracterizat de constanta de extracție :

$$K_{ex} = \frac{[CLA]_o}{[C^+]_s [L]_o [A^-]_s} \quad (2.4)$$

În sistem se pot stabili și alte echilibre caracterizate de constantele de echilibru corespunzătoare. Apoi:



în care indicii  $os$  și  $oa$  reprezintă interfața membrană/fază sursă și respectiv membrană/fază acceptoare, sugerează transportul prin membrana organică. În final la interfața cu faza acceptoare are loc un proces de decomplexare ilustrat prin ecuația de mai jos :



în care  $a$  reprezintă faza apoasă acceptoare.

### 2.3.1. Influența constantei de stabilitate a complexului substrat-receptor asupra transportului

Constanta de stabilitate a complexului format între specia de transportat (substrat) și ligandul (receptor) care realizează transportul prezintă o importanță deosebită în obținerea unui transport eficient și selectiv. Cunoașterea atât a constantei de extracție a complexului studiat,  $K_{ex}$ , cât și a constantei de stabilitate  $K$ , este esențială în modelarea procesului de transport prin membrane lichide. De exemplu în cazul transportului aminoacizilor prin membrane lichide utilizând liganzi macrociclici ca transportori există un proces controlat de difuzie [73,74]. Din studiile prezentate în literatura de specialitate se constată că transportul complexilor prin membrane lichide depinde de valoarea constantei lor de stabilitate  $\beta$ . În general pentru viteze

de transport optime prin membrane sunt necesare constante de stabilitate optime. Astfel o valoare mare a constantei de stabilitate a complexului substrat-receptor poate împiedica desfacerea acestuia la interfața membrană/fază acceptoare. De asemenea, dacă în faza sursă se găsesc două sau mai multe specii în prezență, specia care are o constantă de stabilitate mai mare cu receptorul blochează transportul astfel încât celelalte specii vor fi transportate cu o viteză de transport mai mică [75-78].

### 2.3.2. Influența anionului de cuplaj

Transportul speciilor chimice sau biologice prin membrane lichide utilizând liganzi macrociclici ca transportori este influențat de natura anionului care însoțește complexul receptor-substrat sub forma unei perechi de ioni [79,80]. Astfel, s-a studiat transportul unor complecși cationici ai aminoacizilor și aminelor cu liganzi macrociclici prin membrane lichide sub formă de pereche de ioni în prezența acidului picric, tropeolinei 00, derivaților sulfoftaleinici, etc. Lamb și colab. [79] studiind efectele unor anioni asupra transportului cationic prin membrane lichide a constatat că anionii cu energie de hidratare mică dar cu o lipofilicitate ridicată conduc către un transport cationic rapid. Stabilește de asemenea o corelație între extractibilitatea complecșilor în prezența anionilor și energia de hidratare a acestora.

În concluzie, prin natura anionului prezent în faza sursă se poate controla viteza procesului de transport a cationilor prin membrana lichidă mergând până la inhibarea acestuia. Viteza de transport este funcție de energia liberă de hidratare a anionului, de caracterul lipofil al anionului și de interacțiile anionului cu grupările grefate pe coroana macrociclului.

### 2.3.3. Influența structurii receptorului și a substratului

Este binecunoscut faptul că atât stabilitatea cât și selectivitatea complecșilor receptor-substrat depind de forma și mărimea cavității receptorului în sensul că cel mai potrivit substrat este acela care are diametrul potrivit cavității receptorului. De exemplu, raza cavității ligandului macrociclic, 18-coroană-6, este  $r = 1.4 \text{ \AA}$ , iar a grupării  $-NH_3^+$  este  $r = 1.42 \text{ \AA}$  [81,82]. Așa cum este menționat în cap. 2.1.3, potrivirea dimensională a cavităților receptorului, respectiv substratului, tipul, numărul și amplasarea heteroatomilor în inelul ligandului, flexibilitatea conformațională a inelului ligandului precum și interacția substrat-solvent reprezintă o serie de parametri care influențează formarea complexului receptor-substrat

Din datele experimentale (tabel 2.3) obținute în cazul transportului unor aminoacizi în formă cationică prin membrane lichide de 1,2- dicloretan utilizând ca transportori eteri coroană de tipul 18-coroană-6 (18C6), benzo-18-coroană-6 (B18C6) și dibenzo-18-coroană-6 (DB18C6) se constată următoarea secvență a randamentului de transport : 18C6 > B18C6 > DB18C6 [83].

**Tabel 2.3.** Datele experimentale ale transportului unor aminoacizi prin membrane lichide de 1,2-dicloretan, utilizând diverși eteri coroană ca transportori [83].

Aminoacid	<u>18C6</u>		<u>B18C6</u>		<u>DB18C6</u>	
	(%)	$\log K_{ex}$	(%)	$\log K_{ex}$	(%)	$\log K_{ex}$
L-metionină	83	4,70 ± 0,04	41	4,25 ± 0,03	37	3,95 ± 0,02
L-izoleucină	81	4,90 ± 0,04	47	4,52 ± 0,05	38	4,10 ± 0,04
L-fenilalanină	81	5,16 ± 0,02	55	4,45 ± 0,09	45	4,25 ± 0,05
L-leucină	81	5,76 ± 0,01	43	4,30 ± 0,05	42	4,15 ± 0,05
L-valină	79	4,36 ± 0,03	67	4,38 ± 0,20	35	3,50 ± 0,03
L- $\alpha$ -alanină	74	4,32 ± 0,02	38	4,15 ± 0,12	30	3,15 ± 0,02
L-cisteină	50	4,11 ± 0,03	30	3,85 ± 0,05	25	2,50 ± 0,07

Adiționarea grupărilor benzo și dibenzo la coroana eterului 18C6 deci mărirea hidrofobicității acestuia conduce la descreșterea randamentelor de transport în condițiile mai sus menționate. Proprietățile substratului, raza ionică, polarizabilitatea, lipofilitate, etc., influențează selecția receptorului implicat în complexare. Este foarte important ca receptorul și substratul să prezinte complementaritate structurală.

### 2.3.4. Influența solventului membranelor

Natura solventului utilizat în fazele membranare influențează echilibrele de distribuție ale complexilor transportați prin membranele lichide stabilite la interfețele membrană/fază sursă și membrană/fază acceptoare. Astfel, polaritatea solventului este importantă atât în

extracția cu solvent cât și în transportul prin membrană [59,60,84,85]. Natura solventului prezintă o influență ridicată asupra transportului dar o influență mică asupra selectivității membranei [85]. Stabilitatea membranei este dată de posibilitatea menținerii solventului organic între faza sursă și faza membrană. Pentru creșterea integrității membranei (punct de fierbere ridicat, solubilitate mică în apă) este recomandată utilizarea solvenților clorurați cu un număr mare de catene de carbon [86]. Constanta dielectrică a solventului utilizat în extracția cu solvent cât și în transportul membranal este un parametru de neglijat. Este binecunoscut faptul că solvenții cu constantă dielectrică mică favorizează formarea asocierilor ionice. Distribuția receptorului între faza apoasă și cea organică este unul dintre factorii care stă la baza selecționării solventului utilizat în procesele membranare. În cazul membranelor lichide suportate de tip strat subțire utilizarea solvenților hidrofobici este absolut obligatorie pentru menținerea stabilității membranei.

## 2.4. Transportori utilizați în membranele lichide

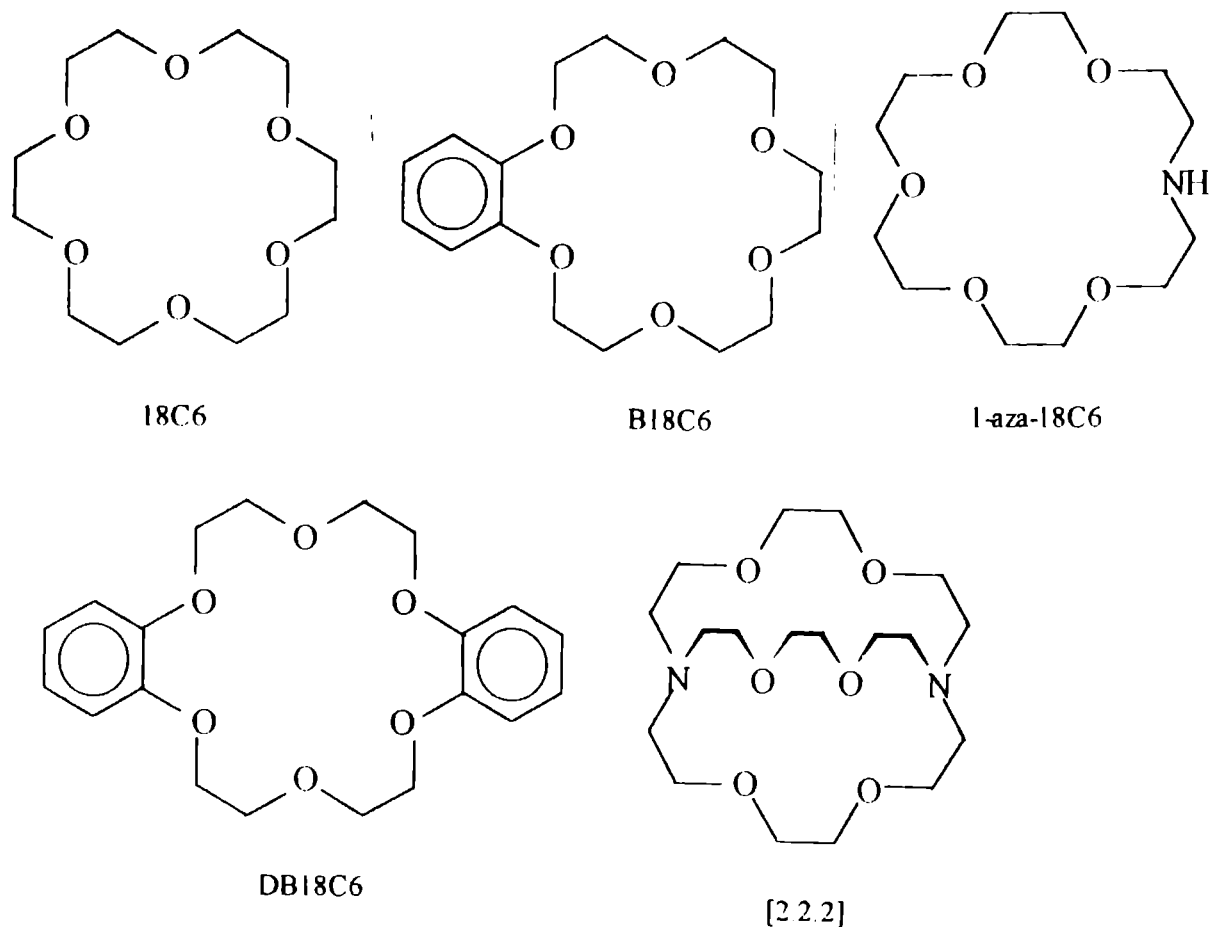
Ionoforii sunt molecule sau macromolecule capabile de a conduce ionii prin membrane sau transmembrane. Creșterea permeabilității membranei este mediată de purtător sau de mecanismul de formare al porilor. Unii ionofori sunt sintetici în timp ce alții sunt naturali. Cei naturali (ionoforii) au origine antibiotică sau microbială. Privind transportul aminoacizilor și peptidelor acest proces a fost studiat în cazul sistemelor naturale [87] și abiotice [30]. Lehn [88] este primul care prezintă utilizarea sărurilor de amoniu ca transportori pentru transportul aminoacizilor și dipeptidelor prin membrane lichide de toluen separate de două faze apoase. Recent alți transportori au fost studiați și anume eterii coroață, criptanzii, sferanzii, calixarenele, ciclodextrinele și complecșii hidrofobi ai metalelor [1,50,81-83,89].

*Liganzii macrociclici* (figura 2.8) pot fi utilizați ca transportori prin membranele lichide datorită faptului că, în structura lor există grupări care le accentuează caracterul lipofil, permițându-le astfel solubilizarea în medii organice.

Selectivitatea cavității endopolarofile și caracterul exopolarofil al liganzilor macrociclici le conferă calități de agenți selectivi de extracție și de transportori selectivi prin membrane. Abilitatea liganzilor macrociclici (eteri coroață, diaza eteri coroață și criptanzi) de a interacționa cu ionii amoniu de interes biologic a condus la importante aplicații ale acestora atât în biochimie cât și în biotehnologie. Alături de liganzii naturali ai acestui tip de transportori, cum ar fi ciclodextrinele, valinomicina, monensinul, lasalocidul, etc., liganzii macrociclici



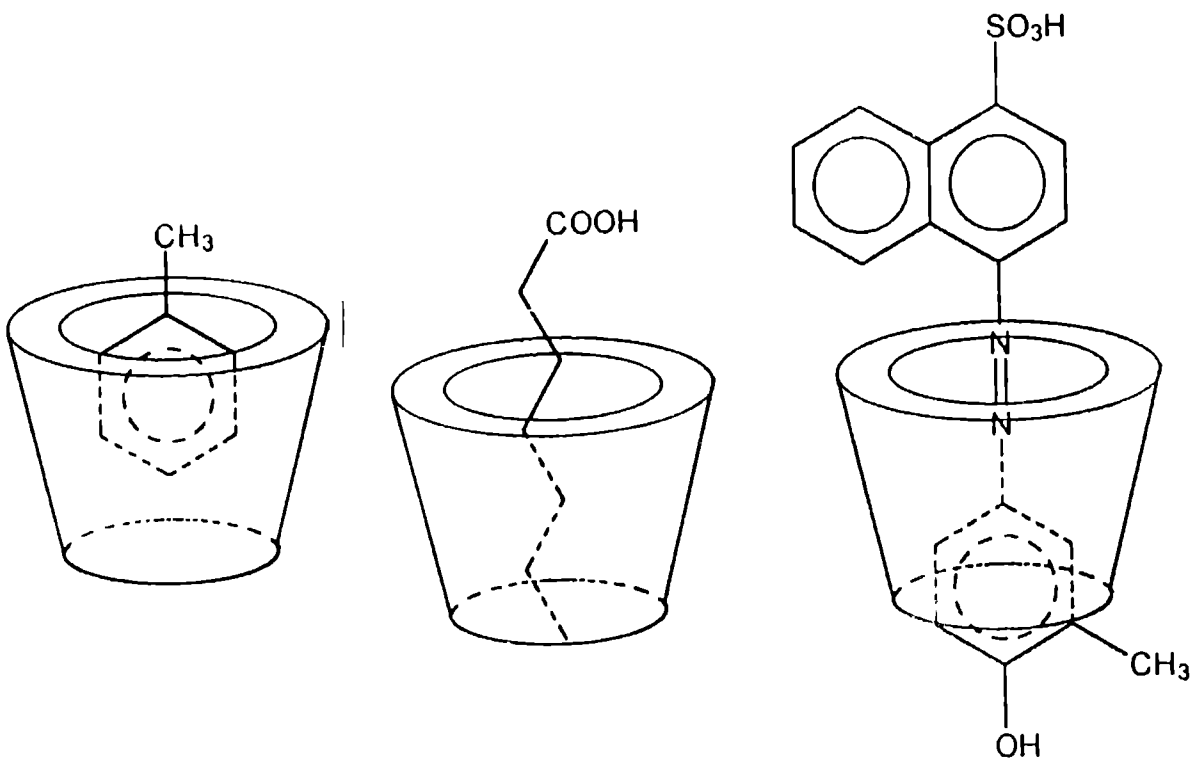
sintetici de tip polieteric constituie una dintre cele mai importante clase de transportori atât pentru compușii chimici cât și pentru cei biologici.



**Figura 2.8.** Liganzi macrociclici

Liganzii macrociclici conținând heteroatomi în structura lor, macrociclii aza-coroană și criptanzi sunt o clasă importantă de agenți complexanți și în același timp de buni transportori prin membrane lichide pentru cationi, anioni, molecule neutre precum și pentru compuși de importanță biologică [90-92]. De asemenea compușii macrociclici chirali sunt utilizați ca selectori chirali în separări de enantiomeri începând cu anii 1970.

Descoperite acum mai mult de un secol, *ciclodextrinele* sunt molecule fascinante, atât pentru cercetători cât și pentru tehnologi, datorită formei lor inedite cât și a abilității de a forma complecși de incluziune cu o largă varietate de molecule (figura 2.9). Complecșii de incluziune formați prezintă proprietăți fizico-chimice deosebite, proprietăți valorificate în diferite domenii industriale



**Figura 2.9.** Exemple de complecși de incluziune ai ciclodextrinelor

Ciclodextrinele, **14**, au fost descoperite de către Villiers [93] și caracterizate de către Schardinger [94]. Ciclodextrinele (Cds) sunt oligozaharide ciclice compuse din unități glucopiranozice unite prin punți de oxigen în pozițiile 1 și 4. Ele sunt constituite din 6, 7 și 8 unități glucopiranozice și se numesc  $\alpha$ -,  $\beta$ -, și respectiv  $\gamma$ - ciclodextrină. Nu există ciclodextrină cu mai puțin de 6 unități de glucoză, datorită tensiunii interne mari care apare la nivelul inelului. În funcție de diametrul lor intern și solubilitatea în apă poate fi apreciată capacitatea ciclodextrinelor de a forma complecși de incluziune cu diferiți compuși concomitent cu schimbarea proprietăților acestora. Ciclodextrinele sunt compuși ieftini, netoxici, capabili să complexeze și să stabilizeze o largă categorie de substanțe cum ar fi medicamentele, parfumurile sau aromele alimentare. Ciclodextrinele reprezintă modele clasice pentru studiul interacției gazdă-oaspete. Astfel ele constituie modele enzimatică și catalizatori în transferul interfazic. Există o mare varietate a compușilor oaspete și anume ciclodextrinele pot lega de la ioni mici și gazele nobile până la molecule mari ca benzopiren și compuși grași. Complexarea se desfășoară în două etape și anume:

a) eliminarea apei de hidratare de către moleculele oaspete,

b) pătrunderea moleculei oaspete în cavitatea ciclodextrinei și formarea complexului de incluziune prin interacții electronice. Formarea incluziunii complexe și mărirea constantei de

stabilitate sunt controlate de o serie de factori. Un astfel de factor este *efectul hidrofobic* datorat interiorului ciclodextrinei care este relativ hidrofob comparativ cu punțile exterioare ciclodextrinei pe care sunt localizate grupări hidroxil. Formarea uneia sau mai multor legături de hidrogen între moleculele oaspete și grupele hidroxil externe ale ciclodextrinei reprezintă un factor major în stabilizarea unor incluziuni complexe. La nivel molecular, energetica formării complexului este în funcție de mărimea, flexibilitatea și grupările funcționale, atât ale ciclodextrinei gazde cât și ale moleculei oaspete. Majoritatea studiilor termodinamice asupra complexării ciclodextrinelor cu diverși compuși se referă la apă ca mediu de reacție dar există și studii care implică mediile neapoase [95].

Ciclodextrinele au fost utilizate ca faze staționare ale coloanelor capilare în separările cromatografice ale unor izomeri geometrici și chirali. Rezultatele obținute pentru câțiva derivați ciclodextrinici au arătat că ele constituie faze excelente pentru separarea unei largi varietăți de izomeri chirali [96]. În cei câțiva ani de la introducerea comercializării coloanelor ciclodextrinice fază chimic legată s-a înregistrat separarea a aproximativ 300 izomeri optici, 150 izomeri structurali și a numeroși compuși obișnuiți. Separarea chirală a aminoacizilor prin cromatografie de lichide folosind faze staționare legate ciclodextrinice au fost studiate sistematic. Comportamentul cromatografic al aminoacizilor și derivaților lor dipeptidici a fost studiat prin HPLC cu fază inversă folosind ciclodextrina ca fază mobilă aditivă.

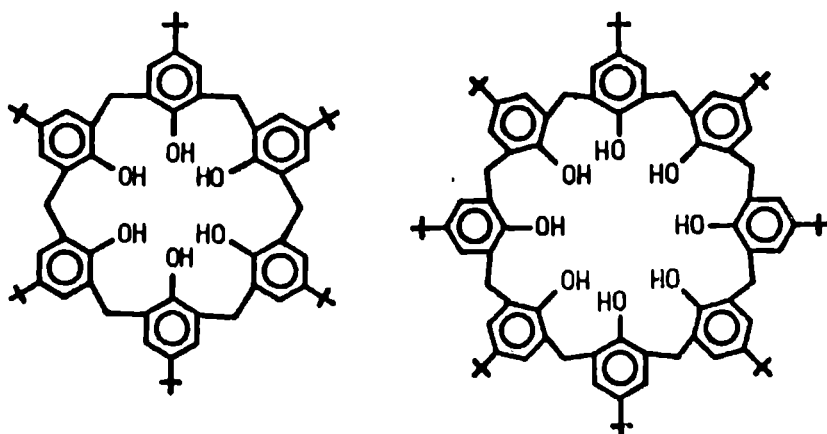
Numerosele lucrări și patente dedicate aplicațiilor industriale ale ciclodextrinelor sunt direcționate în proporție de cel puțin 50% aplicațiilor farmaceutice. Pe lângă conversia medicamentelor lichide în pudre microcristaline și stabilizarea medicamentelor instabile, creșterea biodisponibilității este cel mai semnificativ efect al complexării cu ciclodextrine. Biodisponibilitatea unui medicament administrat oral depinde de câțiva factori printre care: viteza de dizolvare, solubilitatea și viteza absorbției intestinale. Viteza de dizolvare și limita de solubilitate a medicamentului, dincolo de proprietățile sale chimice fundamentale, depind de structura cristalină și de mărimea cristalului. Din acest motiv, doze identice de medicamente administrate oral pot da curbe diferite ale nivelului în sânge, depinzând de formula medicamentului. Absorbția substanțelor necomplexate este în multe cazuri incompletă, complexarea cu ciclodextrinele putând scădea doza necesară de ingrediente activi prin îmbunătățirea solubilității și absorbției.

În general nu toate medicamentele pot fi complexate cu ciclodextrine. Există trei factori fundamentali care limitează aplicarea ciclodextrinelor în preparatele administrate oral: i) complexibilitatea (exprimată prin constanta de stabilitate și care depinde de hidrofobicitatea

moleculii oaspete, mărimea relativă și geometria ei în corelație cu cavitatea ciclodextrinei), ii) stoichiometria complexului, iii) doza cerută a medicamentului.

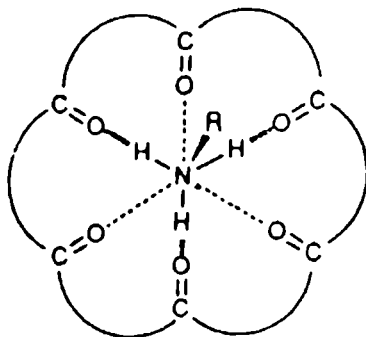
Ciclodextrinele pot fi utilizate ca transportori prin membrane pentru diferite tipuri de compuși. Dată fiind modalitatea specială în care are loc complexarea, cât și larga varietate de ciclodextrine deja disponibilă, se pot învedere largi aplicații ale acestora în diferite metode, numărul moleculelor oaspete care pot fi încapsulate fiind foarte mare. Complexarea permite aducerea în soluții apoase a unor substanțe mai mult sau mai puțin hidrofobe, transportul acestora către diferite zone pe baza unor echilibre de partiție, fapt ce poate fi considerat ca o perspectivă promițătoare pentru realizarea unor membrane ciclodextrinice similare membranelor biologice, cu posibilitatea de a realiza tratamente folosind  $\beta$ -ciclodextrine prin încercarea de a interveni în echilibrele metabolice [97]. Primele date referitoare la utilizarea ciclodextrinelor ca transportori au fost prezentate în 1990 de A. Danil de Namor și colab. [98].

**Calixarenele** [99] (figura 2.9) sunt utilizate ca transportori prin membrane lichide datorită proprietăților structurale atractive care fac posibilă simularea sistemelor biomimetice.

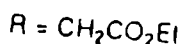
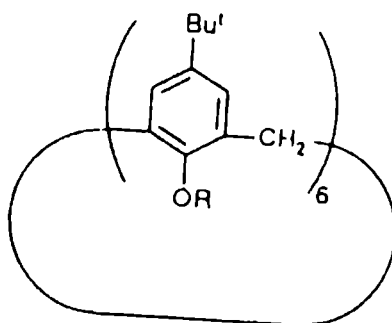


**Figura 2.10. Calixarene**

Ele au capacitatea de a forma complecși de incluziune cu diferiți cationi, cu metalele alcaline și alcalino-pământoase și de asemenea manifestă proprietăți de recunoaștere selectivă și de separare a unor compuși biologici ca de exemplu aminoacizii (figura 2.11). Derivatul esterului etilic al *p*-terț-butilcalixarenei prezentat în figura 2.12 prezintă un pronunțat caracter selectiv față de esterii etilici ai fenilalaninei și triptofanului comparativ cu cei ai glicinei, alaninei și ai acidului 4-aminobutiric [100].



**Figura 2.11.** Complexul cationului de amoniu cu esterul calixarenei



**Figura 2.12.**  $R = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$

## 2.5. Mecanisme de transport prin membrane lichide

Mecanismele de transport ale speciilor chimice prin membrane lichide utilizând ca transportori liganzii macrociclici au constituit subiectul a numeroase cercetări [1,30,101]. Acest interes se datorează faptului că transportul prin membrane reprezintă un proces esențial în cadrul sistemelor biologice. Se desprind două tipuri de transport prin membrane și anume: transport *pasiv* adică în sensul dictat de gradientul de concentrație al speciilor chimice transportate și transport *activ* al speciilor chimice realizat împotriva gradientului lor de concentrație

### 2.5.1. Transport pasiv prin membrane lichide

Sistemele membrană cu transport pasiv deși sunt selective în majoritatea cazurilor nu au aceeași eficiență ca sistemele membrană cu transport activ în ceea ce privește randamentul de transport. În literatura de specialitate s-a studiat transportul pasiv al aminoacizilor derivați în formă anionică (carboxilați) prin membrană lichidă de clorură de metilen având complecși metalici lipofilici ca transportori [102]. În figura 2.13 este prezentat schematic mecanismul de transport pasiv prin membrane lichide cu transportori macrociclici. Într-un astfel de sistem, transportul continuă până la egalarea concentrației speciei transportate în fazele apoase, deci o eficiență relativ mică.

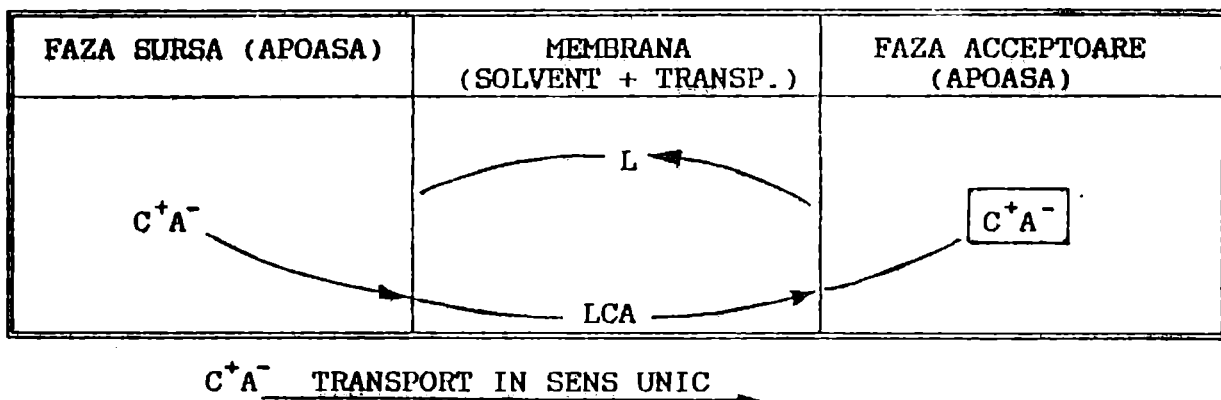
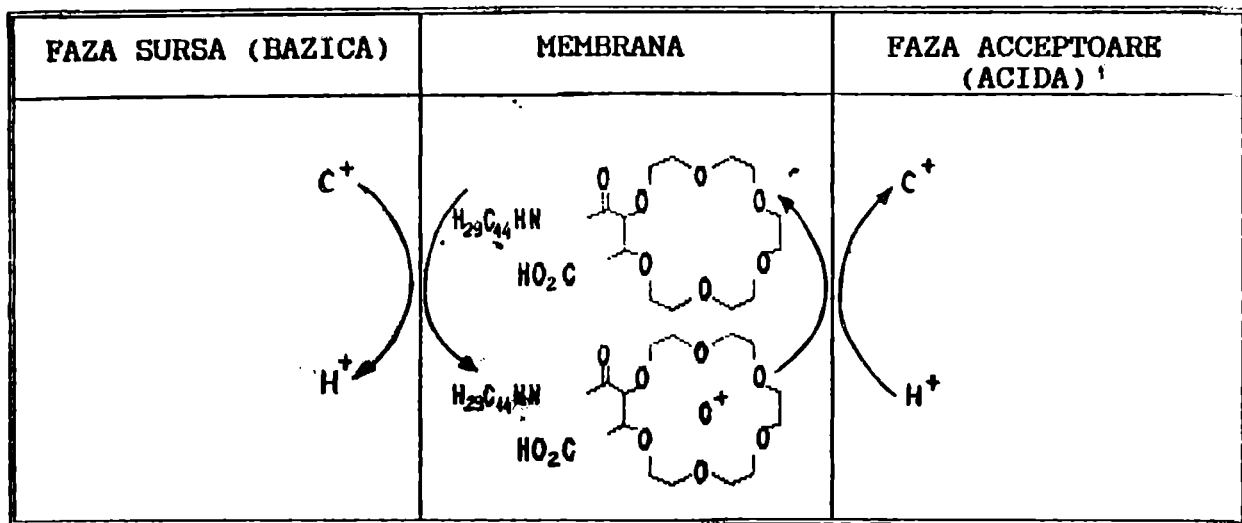


Figura 2.13. Transport pasiv prin membrane lichide;  $C^+$  - specia transportată în formă cationică;  $A^-$  - anionul;  $L$  - ligandul macrociclic.

### 2.5.2. Transport activ prin membrane lichide

Sistemele membrană cu transport activ sunt realizate pe baza unui gradient de potențial chimic, gradient de pH, gradient al potențialului redox sau de transformări obținute prin iradiere. Membranele lichide obținute cu gradient de potențial chimic sunt denumite *membrane cu transport cuplat*. În figura 2.14 este prezentat schematic mecanismul de transport cuplat proton-cation.

Transportul activ se realizează prin diverse reacții chimice la interfețele fazelor sistemului la care participă specia transportată. În acest context sunt posibile două tipuri de mecanisme de transport activ și anume transport prin extracție și transport prin complexare



*Figura 2.14. Mecanismul transportului cuplat proton-cation.*

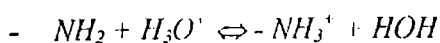
Transportul activ prin extracție se realizează [103] dacă specia transportată este solubilă preferențial în solventul membranei și deci se extrage din faza apoasă sursă în faza organică. În funcție de caracterul acid sau bazic al speciei transportate, *pH*-ul fazei apoase receptoare poate fi reglat astfel încât această specie să fie transformată într-o specie anionică sau cationică, care devine mai solubilă în faza receptoare și deci să faciliteze trecerea ei din faza organică în faza receptoare. Se pot atinge randamente de transport care tind către 100%.

Transportul activ prin complexare se poate realiza dacă specia transportată nu este direct solubilă în solventul membranei. Un transportor chimic prezent în faza organică reacționează cu specia transportată, transformând-o într-un complex lipofil. Reacția are loc la interfața fază sursă/fază organică. Complexul format traversează prin difuzie membrana și ajunge la interfața fază organică/fază receptoare unde sunt create condițiile necesare decomplexării și eliberării speciei transportate în faza receptoare. De menționat faptul că în ambele tipuri de transport activ, transportul speciei chimice se produce în sens invers gradientului său de concentrație și este facilitat de transportul simultan (cuplat) al altor specii chimice, fie în același sens, fie în sens invers speciei care se separă.

În condițiile transportului cu gradient de *pH*, transportorul macrociclic la interfața cu

faza acceptoare (*pH* acid) fixează protonul ducându-l prin difuzie la interfața cu faza apoasă bazică unde îl pierde prin neutralizare. După cedarea protonului, transportorul macrociclic cuplează cationul  $C^+$  din faza sursă și-l transportă prin difuzie la interfața cu faza acceptoare acidă, unde îl eliberează. Ciclul se repetă până la realizarea transportului total al cationului  $C^+$  din faza sursă în faza acceptoare. Are loc deci transportul cationului  $C^+$  împotriva gradientului de concentrație menținându-se gradientul de *pH* între cele două faze apoase ale sistemului membrană (figura 2.14).

Ca transportori macrociclici utilizați în membranele lichide al căror mecanism se bazează pe un transport cuplat proton-cation se pot menționa: acizi carboxilici ai eterilor coroană, dicarboxamid-dicarboxil-18-coroană-6 sau 18-coroană-6 pe care unii autori [95,102] au grefat gruparea aminică -  $O(CH_2)_nNH_2$  (cu  $n = 2$  și  $n = 5$ ), obținând un transportor care în mediu acid formează *in situ* un complex intramolecular prin complexare în cavitatea macrociclică, a ionului -  $NH_3^+$ . Membranele realizate astfel prezintă un transport activ cu gradient de *pH* prin intermediul cuplului:

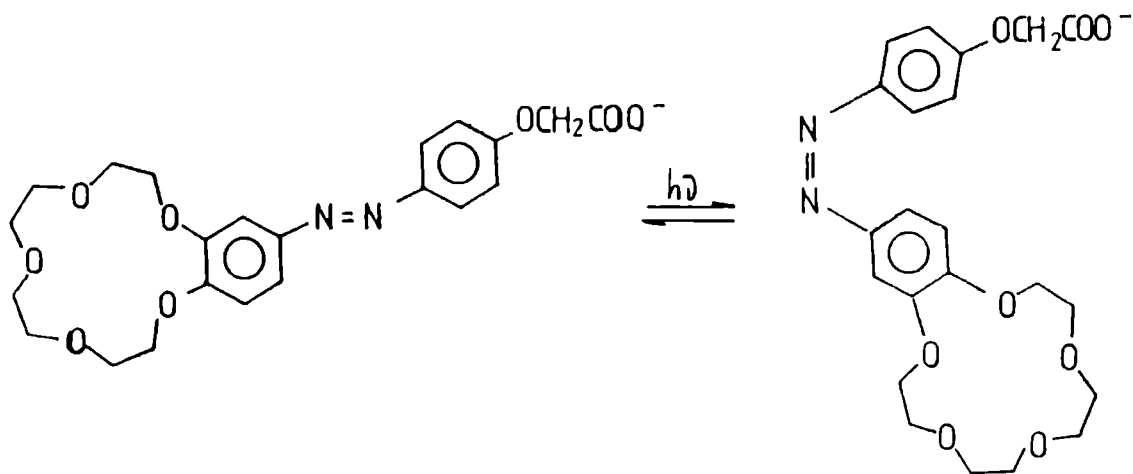


Ca și în cazul sistemelor biologice de transport, anumiți ioni cum ar fi  $Na^+$  și  $K^+$  pot determina transportul activ al aminoacizilor. În acest fel Tsukube [102] studiază transportul invers al anionilor aminoacizilor și peptidelor prin membrane de cloroform cu transportori macrociclici de tipul benzo eterilor coroană și diaza eterilor coroană determinat de un gradient de concentrație al cationului  $K^+$ . În acest fel se realizează un *transport cuplat anion-cation*.

Transportorii macrociclici fotofuncionali au capacitatea de a schimba posibilitatea de complexare a unor specii chimice conducând la realizarea unor mecanisme de transport activ *fotoindus*. Din această grupă de transportori se pot menționa compușii azobis-benzo-eteri coroană denumiți în literatura de specialitate și *butterfly crown ethers* [1].

Un alt grup de transportori din clasa mai sus menționată sunt cei în care gruparea azo este încorporată direct în inelul macrociclic astfel încât izomerizarea fotoindusă conduce la schimbarea dimensiunilor cavității intramoleculare cu consecințe asupra posibilității de a complexa diferiți cationi [1]. Alte tipuri de transportori din această clasă sunt cei cu punte 2,2'-azopiridină [1] sau cei care au la bază un lanț cu o grupare anionică la capăt legată de o parte a grupării azo, de cealaltă parte găsindu-se receptorul polieter coroană. Gruparea anionică concurează la formarea complexului cu un cation prin compensarea sarcinii acestuia, fapt care conduce la o mărire a stabilității complexului (figura 2.15).





**Figura 2.15.** *Transportor fotofuncțional cu lanț anionic.*

Este de remarcat faptul că în această clasă de liganzi se exclude necesitatea prezenței în sistemul de extracție sau de transport prin membrane a anionului de cuplaj care să formeze perechea de ioni extractibili.

Gradientul redox poate influența procesul de transport prin membrane fie acționând asupra speciei transportate fie asupra transportorului. O mare aplicabilitate o au transportorii macrociclici cu grupări redox funcționale de tip tiol sau de tip hidrochinonă, aceștia făcând parte din grupul de transportori asupra cărora acționează gradientul redox. Schimbările structurale ale transportorului sub influența potențialului redox, face transportorul mai apt să complexeze o specie chimică și astfel să o transporte prin membrană.

## 2.6. Modelarea matematică a transportului prin membrane lichide

Modelele fenomenologice propuse pentru transportul speciilor chimice prin membrane lichide pornesc de la procesul care limitează transportul și care pot fi următoarele: difuzia speciilor complexate prin membrană, reacțiile de complexare/decomplexare și/sau adsorbția/desorbția transportorului cu proprietăți surfactante la interfețe. Funcție de hidrofobicitate, transportorul și complexii formați se repartizează preferențial în membrană sau între aceasta și fazele apoase, corespunzător coeficienților de repartție.

Modelarea matematică a fenomenelor de transport activ mediat (facilitat) de transportori ai ionilor prin membrane lichide presupune analiza detaliată a unei serii de etape în desfășurarea procesului chimic [103,104]

C.F.Reusch și E.L.Cussler [105] realizează pentru prima dată modelarea unui transport facilitat al unor cationi printr-o membrană lichidă suportată ca perechi de ioni. Izatt și colab. [106] dezvoltă un model similar în care includ formarea unei perechi de ioni în fazele apoase. In literatura de specialitate Behr și colab.[107]. studiază un model simplu dar sugestiv pentru difuzia pasivă a unei singure specii mediată de un transportor hidrofob (ligand macrociclic de tipul eterilor coroană sau criptanzilor) printr-o membrană lichidă nesuportată. Folosind o simulare numerică ei studiază transportul competitiv funcție de timp.

Rezultatele experimentale demonstrează că transportul activ al zaharurilor și aminoacizilor necesită prezența ionilor de sodiu [108]. Ipoteza cuplării gradientilor oferă soluția pentru mecanismul transportului activ în astfel de sisteme ternare. C.G.Cranne [108] sugerează că transportul zaharurilor trebuie să lege și ioni de sodiu pentru a se comporta ca un transportor efectiv în sistemul considerat. Substratul real transportat este perechea sodiu + zahăr, având ca efect transportul cuplat al zaharurilor cu cel al ionilor de sodiu. Acest cuplaj al fluxurilor realizează un cuplaj între gradientul ionilor de sodiu și gradientul zaharurilor, astfel încât un gradient puternic al ionilor de sodiu (determinat de acțiunea unui alt sistem :pompa de sodiu) atrage formarea unui gradient da zaharuri.

## Bibliografie

1. J.-M.Lehn, *Supramolecular Chemistry, Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, 1995
2. F.Wöhler, *Poggendorfs Ann.Physik*, **1828**, 12, 253.
3. R.B.Woodward, *Pure Appl.Chem.*, **1968**, 17,519.
4. A.Eschenmoser, *Quart.Rev.*, **1970**, 24, 366: *Chem.Soc.Rev.*,**1976**,5, 377: *Nova Acta Leopoldina*, **1982**, 55, 5.
5. P.Ehrlich, *Studies on Immunity*, Wiley, New York, **1906**.
6. E.Fischer, *Ber.Deutsch.Chem.Ges.*, **1894**, 27, 2985.
7. A.Werner, *Zeitschr.Anorg.Chem.*, **1893**, 3,267.
8. K.L.Wolf, H.Frahm și H.Harms, *Z.Phys.Chem.*, **1937**, Abt.1336, 237.
9. K.L.Wolf, H.Dunken și K.Merkel, *Z.Phys.Chem.*,**1940**, Abt.B 46, 287.
10. K.L.Wolf și R.Wolf, *Angew.Chem.*,**1949**, 61, 191.
11. A.L.Lehninger, *Naturwiss.*, **1966**, 53, 57.
12. R.Barthes, *Lecon Inaugurale, Collège de France*, **1977**, 9.
13. H.Brockmann și H.Geeren, *Justus Liebigs Ann.Chem.*, **1957**, 603, 217.

14. B.C.Pressman, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **1965**, 53, 1077.
15. J.Beck, H.Gerlack, V.Prelog și W.Voser, *Helv.Chim.Acta*, **1962**, 45, 620.
16. C.J.Pedersen, *J.Am.Chem.Soc.*, **1967**, 89, 7017.
17. C.J.Pedersen, *Angew.Chem.*, **1988**, 100, 1053; *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, **1988**, 27, 1053.
18. B.Dietrich, J.-M.Lehn și J.P.Sauvage, *Tetrahedron Lett.*, **1969**, 34, 2885.
19. B.Dietrich, J.-M.Lehn, J.-P.Sauvage și J.Blauzat, *Tetrahedron*, **1973**, 29, 1629.
20. B.Dietrich, J.-M.Lehn și J.-P.Sauvage, *Tetrahedron*, **1973**, 29, 1647.
21. J.-M.Lehn, *Struct.Bonding*, **1973**, 16, 1.
22. D.J.Cram și J.M.Cram, *Science*, **1974**, 183, 803.
23. J.-M.Lehn, *Pure Appl.Chem.*, **1978**, 50, 871.
24. J.Rebek, Jr. în *Molecular Recognition: Chemical and Biochemical, Problems II.* (S.M.Roberts ed.), Royal Society of Chemistry, **1992**, 65-73.
25. T.Kunitake, *Thin Solid Films*, **1996**, 9-12, 284-285.
26. J.de Mendoza și F.Gago în *Computational Approaches in Supramolecular Chemistry* (G.Wipff, ed.), Kluwer Academic Publishers, **1994**, 79-99.
27. F.Cramer în *The Lock and Key Principle* (J.-P.Behr, ed.), J.Wiley and Sons Ltd., **1994**, 1-23.
28. A.D.Hamilton și D.van Engen, *J.Am.Chem.Soc.*, **1987**, 109, 5035.
29. R.P.Bonar-Law, A.P.Davis și B.A.Murray, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, **1990**, 29, 1408.
30. F.Vögtle, *Supramolecular Chemistry*, Wiley, Chichester, **1991**.
31. C.Seel și F.Vögtle, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, **1992**, 31, 528.
32. L.Mutihac, *Rev.Roum.Chim.*, **1995**, 40, 577-579.
33. H.-J.Buschmann, E.Schollmeyer și L.Mutihac, *Supramolecular Sci.*, **1998**, 5, 139-142.
34. L.Mutihac, D.O.Popescu și R.Stefan, *Anal.Lett.*, **1995**, 28, 835-843.
35. H.-J.Buschmann, E.Schollmeyer și L.Mutihac, *J.Incl.Phenom.*, **1998**, 30, 21-28.
36. A.Galan, D.Andreu, A.Echavarren, P.Prados și J.de Mendoza, *J.Am.Chem.Soc.*, **1992**, 114, 1511.
37. J.-J.Hong, S.K.Namgoong, A.Bernardi și W.C.Still, *J.Am.Chem.Soc.*, **1991**, 113, 5111.
38. C.P.Waymark, J.D.Kilburn și J.Gillies, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 3051.
39. A.Davis în *Large Ring Molecules* (J.A.Semlyen, ed.), J.Wiley and Sons Ltd., **1996**, 473-506.
40. C.Seel și F.Vögtle, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, **1991**, 30,442.
41. S.-K.Chang, D.van Engen, E.Fan și A.D.Hamilton, *J.Am.Chem.Soc.*, **1991**, 113, 7640.

42. Y.Kuroda, Y.Kato, T.Higashioji și H.Ogoshi, *Angew.Chem.,Int.Ed.Engl.*, **1993**, 32, 723.
43. K.Konishi, K.Yahara, H.Toshishige, T.Aida și S.Inoue, *J.Am.Chem.Soc.*, **1994**, 116, 1337.
44. R.P.Bonar-Law și J.K.M.Sanders, *J.Am.Chem.Soc.*, **1995**, 117, 259.
45. H.-J.Buschmann în *Proceedings of the Eighth Int.Symp.on Cyclodextrins*, (J.Szejtli, L.Szente, eds.), Kluwer Acad.Publ., **1996**, 547-552.
46. U.Denter, H.-J.Buschmann, D.Knittel și E.Schollmeyer, *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, **1997**, 248, 153-163.
47. U.Denter, H.-J.Buschmann, D.Knittel și E.Schollmeyer, *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, **1997**, 248, 165-188.
48. W.A.Freeman, W.L.Mock și N.Y.Shih, *J.Am.Chem.Soc.*, **1981**, 103, 7367; W.L.Mock și N.-Y.Shih, *J.Org.Chem.*, **1986**, 51, 4440.
49. H.-J.Buschmann și E.Schollmeyer, *J.Incl.Phenom.*, **1992**, 14, 91-99.
50. C.Meschke, H.-J.Buschmann și E.Schollmeyer, *Thermochim.Acta*, **1997**, 297, 43-48.
51. H.-J.Buschmann și E.Schollmeyer, *J.Incl.Phenom.*, **1997**, 29, 167-174.
52. H.-J.Buschmann, E.Cleve și E.Schollmeyer, *Inorg.Chim.Acta.*, **1992**, 193, 93-97.
53. R.Hoffmann, W.Knoche și C.Fenn, *J.Chem.Soc.Faraday Trans.*, **1994**, 90(1), 1507-1511.
54. H.-J.Buschmann în *Thermodynamic and Stereochemical Aspects of Macrocyclic and Cryptate Effects* (I.Bernal, ed.), Elsevier, NY, **1987**, 103-185.
55. G.W.Gokel, *Chem.Soc.Rev.*, **1992**, 39-47
56. H.L.Rosano, J.H.Schulman și J.B.Weisbuch, *Ann. N.Y.Acad.Sci.*, **1961**, 92, 467.
57. J.D.Lamb, P.R.Brown, J.J.Christensen, J.S.Bradshaw, D.G.Garrich și R.M.Izatt, *J.Membrane Sci.*, **1983**, 13, 89.
58. L.Mutihac, H.-J.Buschmann, C.Bala și R.Mutihac, *Anales de Quimica, Int.Ed.*, **1997**, 93, 332-336.
59. O.D.Popescu, T.Constantinescu și L.Mutihac, *Anales de Quimica, Int.Ed.*, **1997**, 93, 182-185.
60. O.D.Popescu, L.Mutihac și T.Constantinescu, *Rev.Roum.Chim.*, **1997**, 42, 907-912.
61. L.Boyadzhiev, E.Bezenshek și Z.Lazarova, *J.Membrane Sci.*, **1984**, 21, 137.
62. S.Schlösser și E.Kossaczky, *J.Radioanal.Nuclear Chem.*, **1986**, 101, 115.
63. T.Neplenbrock, *Stability of supported liquid membranes*, Ph. D. thesis, p.115, Univ.Twente, Enschede, **1989**.
64. W.J.Wars și W.L.Robb, *Science*, **1967**, 156, 1481.
65. R.M.Izatt, J.D.Lamb și R.L.Bruening, *Sep.Sci.Technol.*, **1988**, 23, 1645.

66. N.N.Li, U.S.Pat., **1968**, 3, 415 794.
67. R.P.Cahn și N.N.Li, *Sep.Sci.Technol.*, **1974**, 2, 505.
68. K.H.Lee, D.F.Evans și E.L.Cussler, *AIChE.J.*, **1978**, 24, 860.
69. A.Hochhauser și E.L.Cussler, *AIChE.J., Symp.Ser.*, **1975**, 71, 136.
70. D.K.Schiffer, *AIChE.J., Symp.Ser.*, **1974**, 70, 150.
71. R.W.Baker, M.E.Kelly și H.K.Lonsdale, *J.Membrane Sci.*, **1977**, 2, 213.
72. H.-J.Buschmann, L.Mutihac și R.Mutihac, *Sep.Sci.Technol.*, **1998**, sub tipar
73. R.M.Izatt, D.K.Roper, R.L.Brüening și J.D.Lamb, *J.Membrane Sci.*, **1989**, 45, 73.
74. L.Mutihac și R.Mutihac, *Acta Chim.Hung.-Models in Chemistry*, **1992**, 129, 573.
75. J.D.Lamb, J.J.Christensen, J.L.Oscarson, B.L.Nielsen, B.W.Asay și R.M.Izatt, *J.Am.Chem.Soc.*, **1980**, 102, 6820.
76. M.Kirch și J.-M.Lehn, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, **1980**, 14, 555.
77. H.-J.Buschmann și L.Mutihac, *Thermochim.Acta*, **1994**, 237, 203-206.
78. H.-J.Buschmann și L.Mutihac, *Rev.Roum.Chim.*, **1994**, 39, 565-568.
79. J.D.Lamb, J.J.Christensen, S.R.Izatt, K.Bedke, M.S.Astin și R.M.Izatt, *J.Am.Chem.Soc.*, **1980**, 102, 3399.
80. H.-J.Buschmann, E.Cleve, L.Mutihac, și E.Schollmeyer, *J.Solution Chem.*, **1993**, 27, 753-757.
81. F.Vögtle și E.Weber în *The Chemistry of Ethers, Crown Ethers, Hydroxy Groups, and Their Sulphur Analogues*, E.Patai (Ed), J.Wiley & Sons, N.Y., **1980**, Cap.2.
82. F.De Jong și D.N.Reinholdt, *Stability and Reactivity of Crown Ether Complexes*, Academic Press, N.Y., **1981**.
83. L.Mutihac, R.Mutihac și H.-J.Buschmann, *J.Incl.Phenom.*, **1995**, 23, 167.
84. H.-J.Buschmann, G.Wenz, E.Schollmeyer și L.Mutihac, *Thermochim.Acta*, **1995**, 261, 1.
85. R.M.Izatt, D.W.McBride Jr., P.R.Brown, J.D.Lamb și J.J.Christensen, *J.Membrane Sci.*, **1986**, 28, 69.
86. R.M.Izatt, R.L.Brüening și J.D.Lamb, *Israel J.of Chem.*, **1990**, 30, 239.
87. K.Ring, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, **1970**, 9, 345.
88. J.P.Behr, J.-M.Lehn, *J.Am.Chem.Soc.*, **1973**, 95, 6108.
89. M.T.Reetz, J.Huff, J.Rudolph, K.Töllner, A.Deege și R.Goddard, *J.Am.Chem.Soc.*, **1994**, 116, 11588.
90. J.Bradshaw, K.E.Krakowiak și R.M.Izatt, *Aza-Crown Macrocycles*, Ed.J.Wiley & Sons, Inc., N.Y., **1993**, 51, 1-28.

91. H.-J. Buschmann, *J. Incl. Phenom.*, **1989**, 7, 581.
92. H.-J. Buschmann, D. Rader și E. Schollmeyer, *Textilveredlung*, **1991**, 26, 157.
93. A. Villiers. *Compt. Rend.*, **1891**, 112, 536.
94. F. Schardinger, *Z. Untersuch. Nahr. n. Genussum*, **1903**, 6, 865.
95. N. Kobayashi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 1126.
96. H. Isaak, *J. Liquid Chromatography*, **1988**, 11, 2131.
97. B. L. Poh și Y. M. Chow, *J. Incl. Phenom.*, **1992**, 14, 85.
98. A. F. Danil de Namor, M. C. Ritt, M. J. Schwing-Weil, F. A. Neu, și D. F. Lewis, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1991**, 87, 3231.
99. C. D. Gutsche, *Calixarenes*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1989**.
100. S. K. Chang, H. S. Hwang, H. Son, J. Youk și Y. S. Kang, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 217-219.
101. C. Luca, L. Mutihac, R. Mutihac și A. M. Joșceanu, *Mecanisme de transport prin membrane lichide*, Ed. Academiei Române, București, **1998**.
102. K. Maruyama, H. Tsukube și T. Araki, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 5197.
103. R. Mutihac în *Mecanisme de transport prin membrane lichide*, Ed. Academiei Române, București, **1998**, 157-222.
104. L. Mutihac și R. Mutihac, *Acta Chim. Hungarica-Models in Chemistry*, **1992**, 129, 576-577.
105. C. F. Reusch și E. L. Cussler, *AIChE J.*, **1973**, 19, 736
106. R. M. Izatt, R. L. Bruening, M. L. Bruening, G. Linh și J. J. Christensen, *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 1140.
107. J.-P. Behr, M. Kirsch și J.-M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 241.
108. P. D. Beer și C. G. Cranne, *Polyhedron*, **1988**, 7, 2469.

### 3. Aplicații ale membranelor lichide în separarea unor compuși

#### 3.1. Separarea unor compuși anorganici

Comarate cu tehnicile de separare convenționale cum ar fi : extracția cu solvenți, distilarea, cristalizarea, schimbul ionic, etc.), tehnicile membranare sunt caracterizate de fluxuri mari, selectivitate, viteză și economicitate. In tehnologiile de tratare al apelor uzate, separarea și recuperarea metalelor de importanță strategică, decontaminarea deșeurilor care prezintă radioactivitate, purificarea și concentrarea în industria alimentară , procesele membranare sunt din ce în ce mai utilizate.

##### 3.1.1. Transportul metalelor alcaline și alcalino-pământoase prin membrane lichide

Este binecunoscut faptul că în lumea vie membrana este sediul unor procese importante iar multe dintre aceste procese sunt controlate de concentrațiile intra și extracelulare ale cationilor de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . Concentrațiile intracelulare variază în ordinea următoare :  $\text{K}^+ \gg \text{Na}^+ \approx \text{Mg}^{2+} \gg \text{Ca}^{2+}$  iar cele extracelulare conform următoarei serii :  $\text{Na}^+ \gg \text{K}^+ > \text{Mg}^{2+} \gg \text{Ca}^{2+}$

Fyles și colab.[1] studiază transportul cationilor alcalini și alcalino-pământoși prin membrane lichide de cloroform utilizând eteri coroaă cu grupări funcționale monocarboxilice și dicarboxilice ca transportori (figura 3.1).

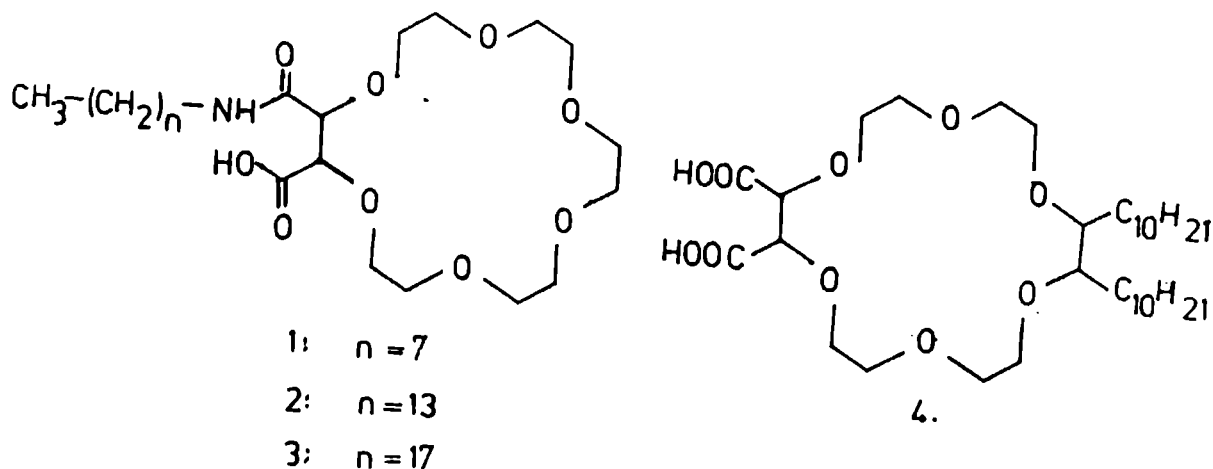
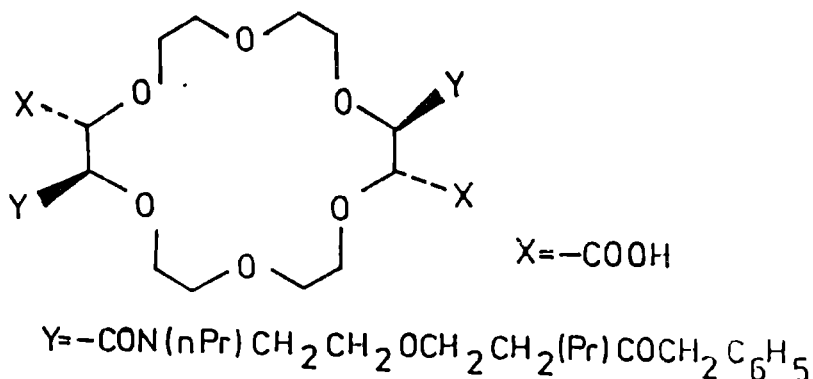


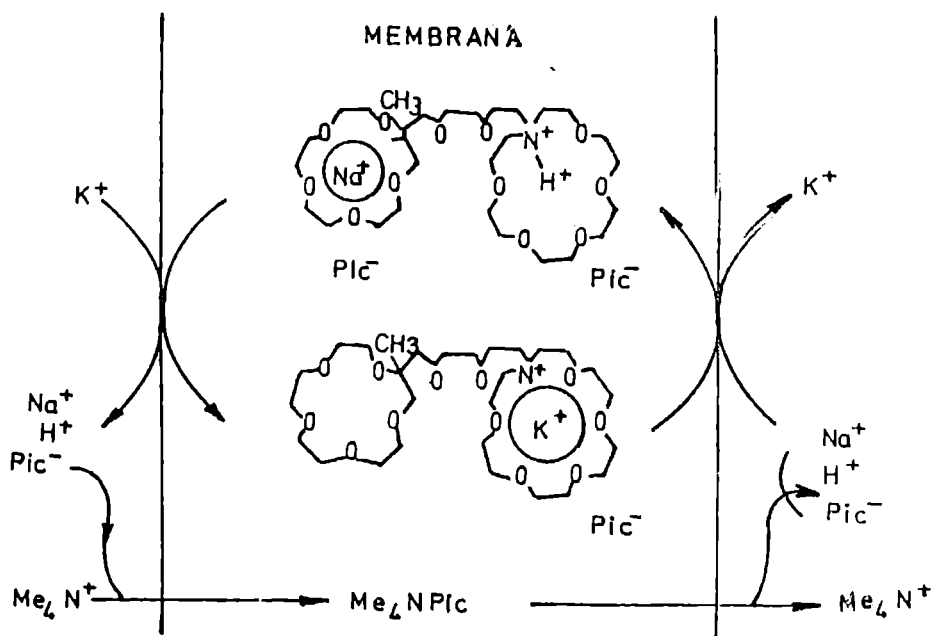
Figura 3.1. Structurile unor eteri coroaă cu grupări mono- și dicarboxilice.

Bazat pe selectivitatea ligandului din figura 3.2, pentru cationii  $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ , J.-M. Lehn [2] realizează transportul simultan al celor doi cationi în direcții opuse, folosind ca forță motrice gradientul de  $pH$ . Acest sistem este o replică artificială a ATP-azei  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  care transportă cationii menționați prin membrane biologice împotriva gradientului lor de concentrație.



**Figura 3.2.** Ligand macrociclic

La o valoare neutră sau slab acidă a  $pH$ -ului din faza apoasă sursă se ionizează o singură grupare carboxil, aspect care conduce către afinitatea transportorului pentru ionul de potasiu. Crescând valoarea  $pH$ -ului în jur de 9, are loc ionizarea ambelor grupe carboxil și în acest caz este favorizată complexarea și transportul ionului de calciu.



**Figura 3.3.** Transportul ionilor de  $\text{Na}^+$  și  $\text{K}^+$  [3].



Un exemplu schematic al transportului ionilor de sodiu și potasiu în direcții opuse printr-o membrană lichidă este prezentat în figura 3.3. La interfața apoasă bazică transportorul complexează ionul de potasiu. În prezența ionului picrat aflat de asemenea în faza apoasă se formează perechea de ioni cation-ligand-anion care difuzează prin membrană până la interfața cu faza apoasă acidă. Aici are loc protonarea azotului, astfel ionul  $K^+$  trebuie să părăsească cavitatea transportorului. În continuare, ionul de  $Na^+$  este extras din faza acidă sub formă de picrat, și se deplasează spre faza apoasă bazică. În final se constată o concentrare a ionului de  $K^+$  în faza apoasă acidă iar a ionului de  $Na^+$  în cea bazică.

Transportul cationilor alcalini și alcalino-pământoși poate fi realizat și cu transportori cu funcțiuni bazice, sub controlul gradientului redox, sub controlul alosteric specific chimiei biomimetice și sub controlul fotochimic [4-6].

### 3.1.2. Transportul ionilor $Cu^{2+}$ , $Co^{2+}$ și $Ni^{2+}$

Cercetările în domeniul membranelor lichide au fost direcționate în cea mai mare parte către studiul mecanismelor de transport. Recent s-a constatat o pondere mare a aplicațiilor membranelor lichide la nivel de pilot și chiar la nivel industrial. Boyadzhiev [7] a fost printre primii care a elaborat un procedeu de tratare al efluenților industriali care conțin cationii metalelor cupru, cadmiu, plumb și zinc cu ajutorul membranelor lichide emulsionate utilizând acizii grași ca transportori.

Cea mai utilizată metodă pentru separarea cuprului este extracția cu solvenți. Mai nou membranele lichide au început să-și ocupe un loc din ce în ce mai important printre metodele de separare ale cuprului. Acest lucru este posibil la concentrații reduse ale cuprului. Cuprul [8] poate fi transportat eficient printr-o membrană de clorbenzen și 1,2 diclorometan în care se găsește cuproină. Un alt transportor specific cuprului este 6-amino-6-dodecilamino-2,2'-dipiridilul care facilitează transportul și concentrarea cuprului printr-o membrană lichidă cu gradient de  $pH$  [9]. Un exemplu interesant în ceea ce privește transportul ionilor de cupru este oferit de către derivatul dioxociclamic [10] care permite realizarea unei pompe de  $Cu^{2+}$  asemănător cu fenomenele de translocare biologică a cuprului de către peptidele Gly-His-Lys [11] sau Asp-Ala-His [12]. În figura 3.4 este prezentat schematic mecanismul de transport al ionilor de cupru utilizând ca transportor derivatul ciclamic.

Transportul ionilor  $\text{Ni}^{2+}$  și  $\text{Co}^{2+}$  prin membrane lichide se desfășoară sub acțiunea unui gradient de  $\text{pH}$ . În general se utilizează membrane lichide suportate cu un suport de poli(vinilidendifluorură) și transportori de tipul compușilor organofosforici.

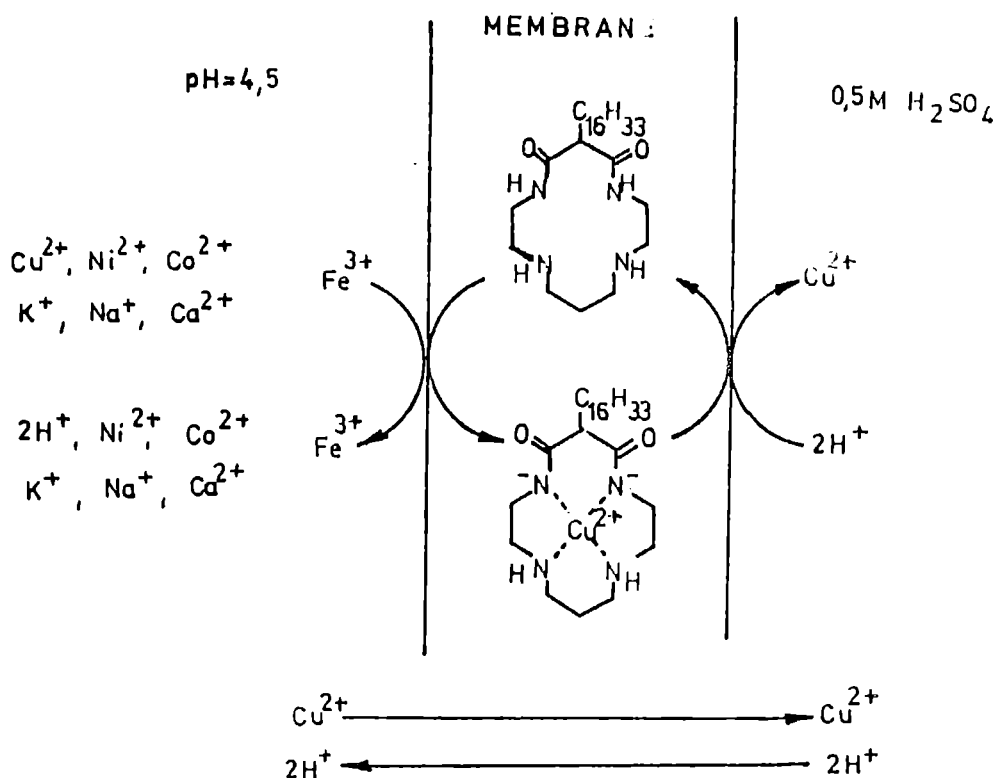


Figura 3.4. Transportul ionilor de  $\text{Cu}^{2+}$  prin membrană lichidă

### 3.1.3. Transportul metalelor Au și Ag

Recuperarea metalelor prețioase din apele reziduale precum și din prelucrarea hidrometalurgică a minereurilor sunt două dintre problemele importante ale tehnologiei industriale. În general aurul și argintul în leșiile industriale se găsesc sub formă de cianuri complexe  $\text{M}(\text{CN})_2^-$ . Pentru separarea acestora se utilizează săruri cuaternare de amoniu, amine protonate și diverși solvenți organici [13]. În cazul sărurilor cuaternare de amoniu interacțiunea acestora cu metalele prețioase este independentă de  $\text{pH}$ , aspect care conduce la o recuperare mai greoaie a metalelor. Tehnica membranelor lichide suportate utilizând ca transportori

liganzii macrociclici sau compușii organofosforici sunt folosite cu succes la separarea acestor metale prețioase [14,15]. Problemele care se pun în utilizarea membranelor suportate sunt legate de alegerea solventului membranei și a dimensiunilor porilor suportului inert.

### 3.1.4. Transportul unor metale grele

Metalele grele,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  și  $Hg^{2+}$  datorită posibilității lor de a interacționa cu proteinele precum metalele esențiale, acestea acționează ca inhibitori pentru o serie de procese enzimactice vitale pentru sistemele vii. Este binecunoscut faptul că atât plumbul, cadmiul cât și mercurul sunt considerați poluanți majori constituind un pericol pentru mediul înconjurător.

Tehnicile membranelor lichide se utilizează din ce în ce mai mult și în cazul eliminării metalelor grele. Mecanismele de transport utilizate la eliminarea acestora sunt similare cu mecanismele de transport ale metalelor alcaline și alcalino-pământoase. Ca transportori prin aceste membrane sunt adesea utilizați liganzii macrociclici de tipul eterilor coroană sau aza eterilor coroană [16]. În apele industriale uzate de aciditate ridicată, metalele grele se găsesc sub formă de clorocomplecși. De aceea este necesară prelucrarea acestora înainte de a utiliza membrana lichidă cu transportor macrociclic. În acest caz se utilizează sărurile de amoniu ca transportor.

## 3.2. Separarea gazelor

Pentru separarea amestecurilor gazoase utilizarea membranelor lichide a deschis noi posibilități în domeniul industrial. În general separarea industrială a amestecurilor gazoase se realizează prin utilizarea unor filme polimerice a căror selectivitate nu este deosebit de ridicată datorită unor fenomene de solubilizare-difuzie. Ward și colab.[17] raportează rezultate bune în ceea ce privește separarea gazelor printr-un mecanism de transport facilitat. În cazul utilizării membranelor lichide suportate pentru producerea industrială a aerului îmbogățit în oxigen o problemă o constituie durata de viață a membranei. Scurtarea duratei funcționării membranei se datorează în primul rând impurificării transportorului de către alți compuși ai aerului, apoi datorită evaporării solventului în fazele gazoase și de asemenea datorită oxidării ireversibile a transportorului în prezența oxigenului. Membranele lichide suportate se utilizează la recuperarea  $NH_3$  din amestecurile gazoase de temperatură ridicată. Instabilitatea chimică a

membranelor lichide poate fi diminuată cu ajutorul sărurilor topite imobilizate prin capilaritate pe un sistem poros metalic sau ceramic. Indepărtarea SO<sub>2</sub> din gazele de ardere reprezintă o reală problemă ținându-se seama de reglementările privind protecția mediului. Si în acest caz utilizarea membranelor lichide suportate conduce la obținerea unor randamente de separare optime și avantaje în cea ce privește costul de operare, consumul de energie, simplitate, etc.

### **3.3. Transportul unor compuși organici**

Transportul speciilor organice prin membrane lichide a fost îndreptat asupra unor procese care se petrec în natură sau a unor modele de sisteme care simulează transportul biologic. In literatura de specialitate există numeroase preocupări în această direcție, acest aspect reflectându-se prin numărul mare de lucrări publicate [2,5, 18-20].

După cum s-a menționat și în capitolul 1, membranele lichide au fost și sunt utilizate în domeniul biomedical, biotehnologic cât și în studiul mediului înconjurător. Studiul aminelor, aminoacizilor, peptidelor, proteinelor prezintă o semnificație deosebită datorită faptului că ele sunt componenți fundamentali ai moleculelor biologice. Receptori moleculari macrociclici de tipul eterilor coroană, criptanzilor, aza eterilor coroană, calixarene capabili de a forma complecși selectivi cu speciile de interes biologic prin legături de hidrogen, interacții ionice sau hidrofobice au fost utilizați ca transportori prin membrane.

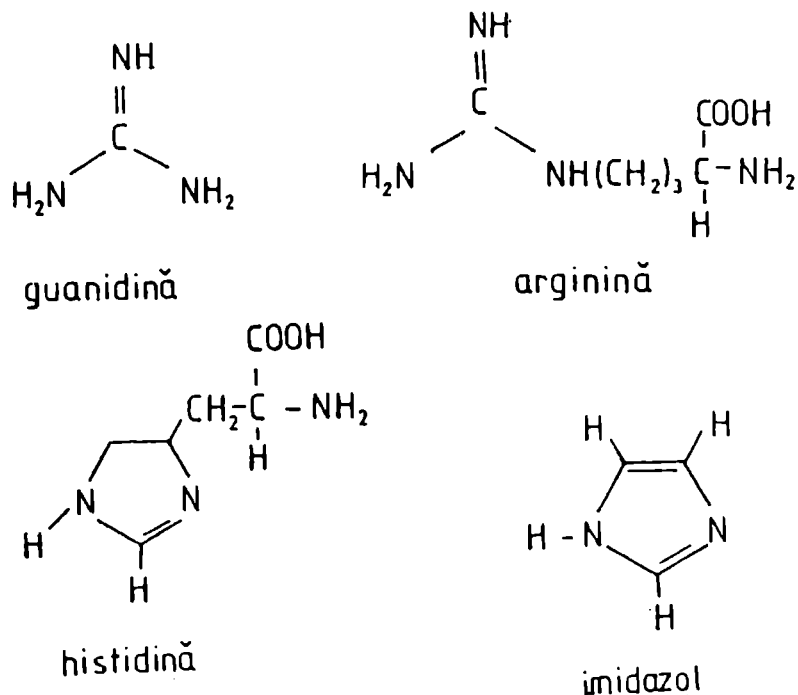
#### **3.3.1. Transportul cationilor de guanidiniu și imidazol**

Imidazolul și guanidina sunt baze organice importante din punct de vedere biologic, componente ale histidinei și respectiv argininei (figura 3.5).

Având în vedere importanța acestora, cercetătorii și-au îndreptat atenția asupra studierii comportamentului acestor compuși. S-a studiat transportul compușilor mai sus menționați prin membrane lichide utilizând ca transportori liganzii macrociclici de tip benzo- și dibenzoeteri coroană [21].

Prin studii de difracție cu raze X asupra complecșilor formați între ligandul macrociclic de tip benzo și dibenzo eter coroană și ionul imidazoliu se sugerează prezența a două legături de hidrogen NH...O și a trei legături slabe CH...O. In cazul complecșilor ionului de guanidiniu

și liganzi macrociclici de tip benzo- și dibenzoeteri coroață cu cicluri de 27 și 30 de atomi se sugerează formarea a 6 legături de hidrogen NH...O și trei legături electrostatice N...O.



*Figura 3.5. Structura guanidinei, argininei, histidinei și imidazolului.*

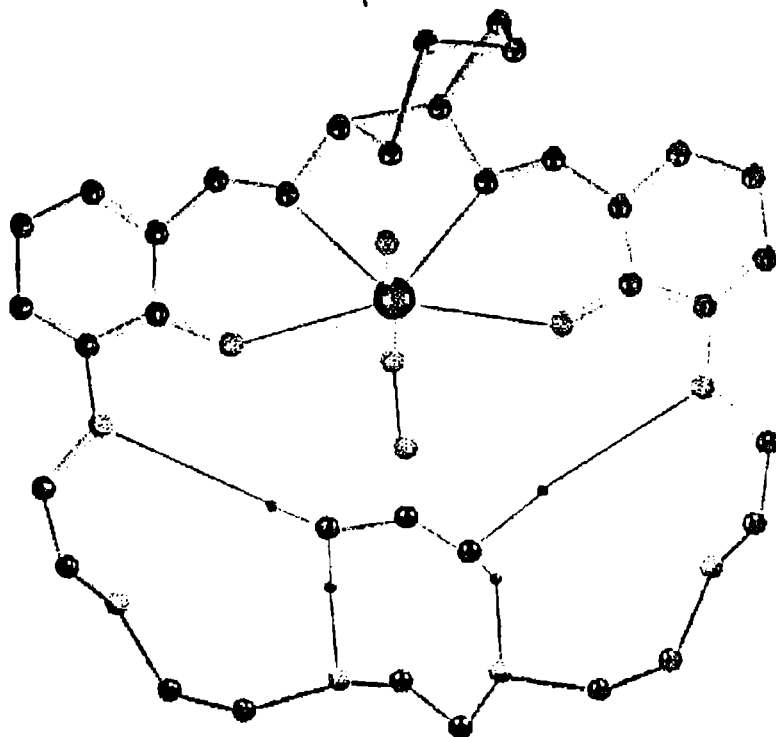
S-a studiat transportul acestor compuși prin membrane lichide utilizând ca transportori liganzii macrociclici de tip benzo- și dibenzoeteri coroață [21].

Prin studii de difracție cu raze X asupra complexilor formați între ligandul macrociclic de tip benzo- și dibenzo eter coroață și ionul imidazoliu se sugerează prezența a două legături de hidrogen NH...O și a trei legături slabe CH...O. In cazul complexilor ionului de guanidiniu și liganzi macrociclici de tip benzo- și dibenzoeteri coroață cu cicluri de 27 și 30 de atomi se sugerează formarea a 6 legături de hidrogen NH...O și trei legături electrostatice N...O.

### 3.3.2. Transportul ureii prin membrane lichide suportate

Reinhoudt și colab [22] au sintetizat eteri coroață cu grupări acide intraanulare pentru complexarea și transportul selectiv al ureii prin membrane lichide suportate. In figura 3.6 este prezentată structura complexului ureii cu ligandul metalomacrociclic cu grupări 1,2-ciclohexil.

În acest caz se formează o legătură coordinativă între gruparea carbonil a ureii și gruparea uranil a compusului metalomacrociclic și prin legături de hidrogen între funcțiunile  $\text{NH}_2$  ale ureii și atomii de oxigen din ciclul compusului metalomacrociclic.

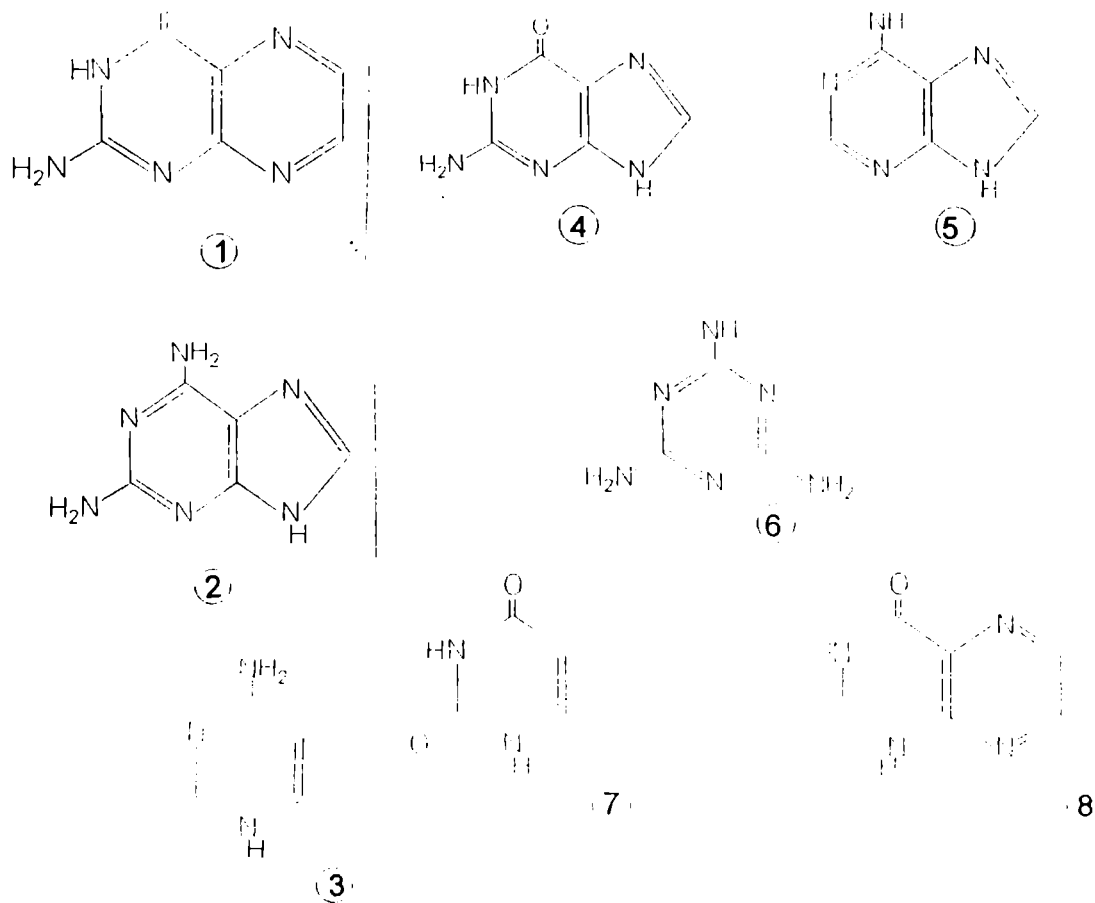


*Figura 3.6. Structura complexului ligand-uree.*

### 3.3.3. Transportul unor nucleobaze prin membrane lichide

Bazele purinice și pirimidinice sunt cel mai important grup de molecule biologice. Incorporarea oricăror purine sau pirimidine în cavitatea eterului coroană ar trebui să conducă la sisteme interesante din punct de vedere al interacțiilor supermoleculii formate. Studiul interacțiilor bazelor nucleice în astfel de compuși au o importanță fundamentală în biochimie.

F.Vögtle și colab.[23] sintetizează un grup de compuși chimici de tip tris(bipiridine) cu cavități diferite cu scopul de a complexa selectiv compuși din clasa trihidroxibenzenilor în soluții organice. În același scop sintetizează compuși macrociclici de tip tris(catecol). Prin introducerea a 6 grupe N-benzil în structura acestora s-a realizat complexarea selectivă a unor compuși de interes biologic precum și transportul acestora printr-o membrană lichidă de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  /n-hexan (figura 3.7).



**Figura 3.7.** Structura unor nucleobaze (1- pterina, 2-6-diamino-purina, 3-citosina, 4-guanina, 5-adenina, 6-melamina, 6-uracilul, 8-2,4-dihidroxipteridina).

Acest studiu face parte din cercetările fundamentale privind similitudinea mecanismelor de transport prin membrane lichide cu mecanismele de transport prin membranele biologice.

### 3.3.4. Transportul aminoacizilor prin membrane lichide

Aminoacizii sunt constituenții de bază ai proteinelor. În general se obțin prin hidroliza proteinelor. Izolarea aminoacizilor din proteine, pentru început s-a făcut în scopul stabilirii sau confirmării structurii lor. Apoi a fost necesară obținerea lor în scop preparativ pentru studii biologice și pentru sinteza polipeptidelor. Din moment ce aminoacizii sunt unitățile chimice componente ale proteinelor, echilibrul de schimb ionic al aminoacizilor ne ajută să aflăm despre proprietățile intrinseci de schimb ionic al proteinelor. Această clasă de compuși este amplu

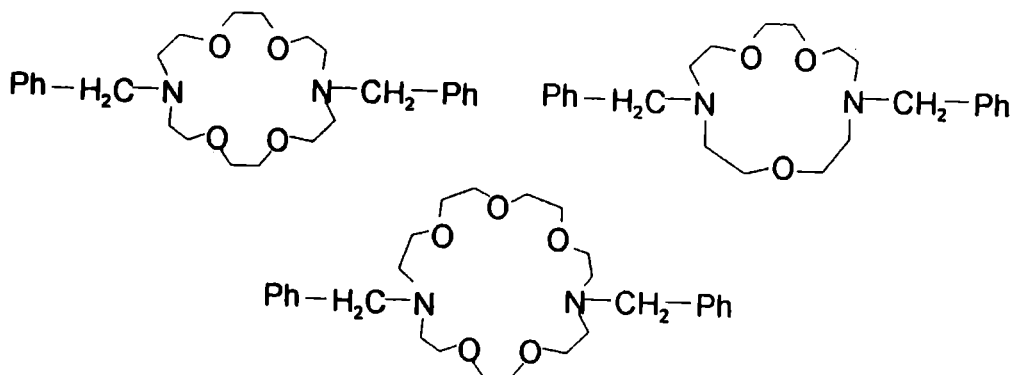
implicată în procesele biochimice, în industria medicamentelor, alimentară etc. Aminoacizii au structura unor amfioni având o grupare bazică ( $\text{NH}_2$ ) și o grupare acidă ( $\text{COOH}$ ) la care se adaugă uneori și alte grupări ionizabile. În proteine se găsesc  $\alpha$ -aminoacizii și au formula generală  $\text{R-CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ . După cum am menționat, aminoacizii se găsesc sub formă de amfioni, dar în realitate gruparea  $-\text{COOH}$  este mai ionizată decât gruparea  $-\text{NH}_2$ , deci soluțiile aminoacidului sunt slab acide. Aminoacizii conțin sarcini electrice de semn contrar în centre diferite ale moleculei, deci au momente electrice mari. O consecință a acestui fapt este mărirea constantei dielectrice a apei în care sunt dizolvați.

Este binecunoscut faptul că liganzii macrociclici au abilitatea de a complexa mai mult sau mai puțin selectiv cationii de amoniu. Aminoacizii pot fi transportați prin membrane lichide sub formă cationică sau anionică cu un receptor macrociclic adecvat. Astfel în ultimii ani mai mulți derivați ai eterilor coroană, criptanzi, aza eteri coroană au fost utilizați ca transportori specifici prin membrane lichide a unor aminoacizi [2,5,24,25].

### 3.3.4.1. Transportul aminoacizilor sub formă de complecși cationici

O afinitate deosebită pentru cationii amoniu ai unor aminoacizi derivatizați o prezintă eterii coroană diaza lipofilici (figura 3.8) ceea ce îi recomandă ca transportori specifici prin membrane lichide de cloroform [26,27].

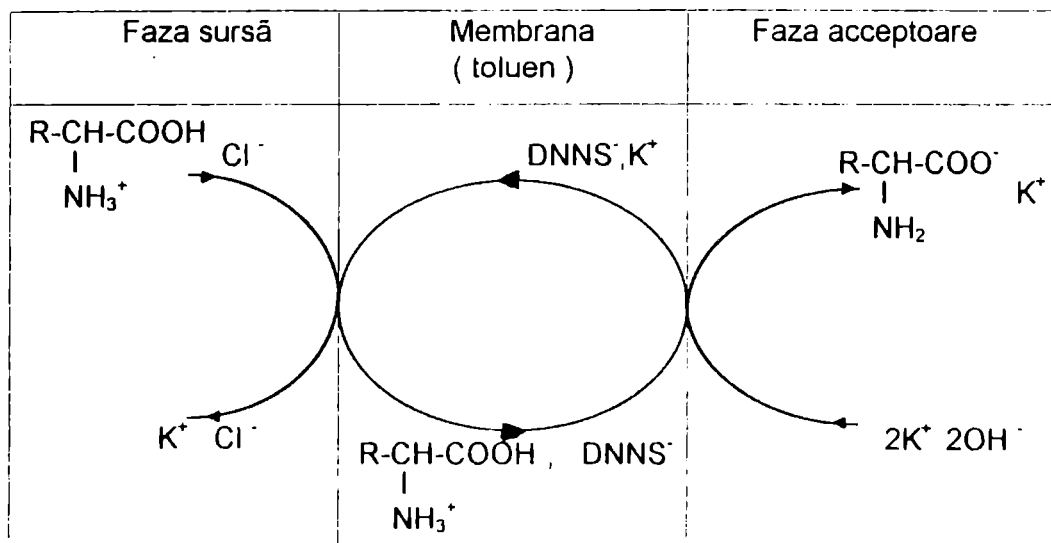
Pentru studiul transportului unor aminoacizi sub formă de complecși cationici Lehn și colab. [28] utilizează ca transportor dinonilnaftalensulfonatul ( $\text{DNNS}^+$ ).



. **Figura 3.8.** Transportori diaza eteri coroană



În acest studiu se constată că aminoacizii sunt transportați din faza apoasă acidă în faza apoasă bazică împotriva gradientului lor de concentrație simultan cu transportul invers al cationului  $K^+$ . În figura 3.9 este prezentat schematic transportul unor aminoacizi sub formă cationică printr-o membrană de toluen.



*Figura 3.9. Transportul unor aminoacizi cu dinonilnaftalensulfonat [28].*

Viteza de transport a aminoacizilor prin membrana lichidă este următoarea : fenilalanina > triptofanul > leucina > tirozina > valina > alanina > glicina > serina.

S-au studiat de asemenea posibilitățile de separare ale aminoacizilor dintr-un amestec abordând tehnica de transport prin membrane utilizând liganzi macrociclici și macrobioniciclici . În acest fel se realizează un transport activ deci un transport cuplat al aminoacizilor și al ionilor de hidrogen din faza sursă în faza acceptoare asistat de un gradient de  $pH$  [29,30].

În figura 3.10 este prezentat schematic mecanismul de transport activ prin membrana lichidă.

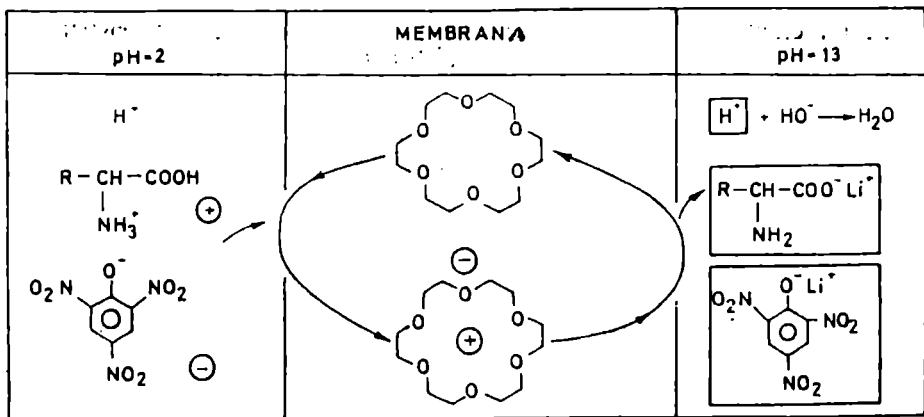


Figura 3.10. Mecanismul de transport al aminoacizilor prin membrana lichidă [29].

La interfața dintre faza sursă (acidă) și membrană, transportorul 18-coroană-6, benzo-18-coroană-6, sau dibenzo-18-coroană-6, complexează aminoacidul prin intermediul grupării aminice protonate. Complexul cationic își asociază un anion (picrat, anionul provenit de la tropeolină 00 sau alt derivat sulfoftaleinic) cu care formează o pereche de ioni care se extrage în membrana de 1,2 dicloretan, cloroform sau clorură de metilen [31], ajungând prin difuzie la interfața cu faza acceptoare. Aici are loc eliberarea aminoacidului din complex și trecerea lui în faza acceptoare datorită caracterului bazic al acesteia care provoacă transformarea grupării aminice protonate  $-\text{NH}_3^+$  în  $-\text{NH}_2$ . Transportorul eliberat difuzează spre interfața cu faza sursă. Rezultatele obținute au fost aplicate pe amestecuri de aminoacizi obținuți prin hidroliza acidă a proteinelor provenite din serul de bovină (*Albumina Bovis*) și caseina din lapte [32]. În raport cu alte tehnici convenționale s-au obținut rezultate competitive. Pentru separarea aminoacizilor s-au utilizat și membrane lichide suportate utilizând ca transportor Kryptofix 5 și anionul  $\text{Cl}^-$ . În acest caz se realizează un transport pasiv [33]. Pentru separarea unor amestecuri de aminoacizi au fost de asemenea utilizate și membranele lichide emulsionate. Astfel a fost separată și concentrată L-fenilalanina din amestecuri cu NaCl, glucoză, acid lactic și L-triptofan, utilizând ca transportor acidul di-2-etilhexilfosforic [34].

### 3.3.4.2. Transportul aminoacizilor sub formă de complecși anionici

O nouă clasă de transportori ionici implicând creșterea vitezei fluxului prin membrane datorită eliberării de ioni precum și transportului aminoacizilor prin intermediul complecșilor ligand-metal a fost studiată de numerosi cercetători în diverse moduri. Shinkai și colab [35] studiază transportul aminoacizilor în formă anionică prin membrane lichide de cloroform

utilizând ca transportor 1-dodecanoyl-10-carboximetil-1,10-diaza, 4,7,13,16, - tetraoxa-18-coroană-6.

Utilizând ca transportori prin membrane lichide, sărurile cuaternare de amoniu (Aliquat 336), Lehn și colab. [28] realizează transportul unor aminoacizi și dipeptide printr-un mecanism de transport activ printr-o membrană de toluen. În acest sistem procesul este de protonare/deprotonare cuplat cu transportul invers al unui ion anorganic ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) (figura 3.11).

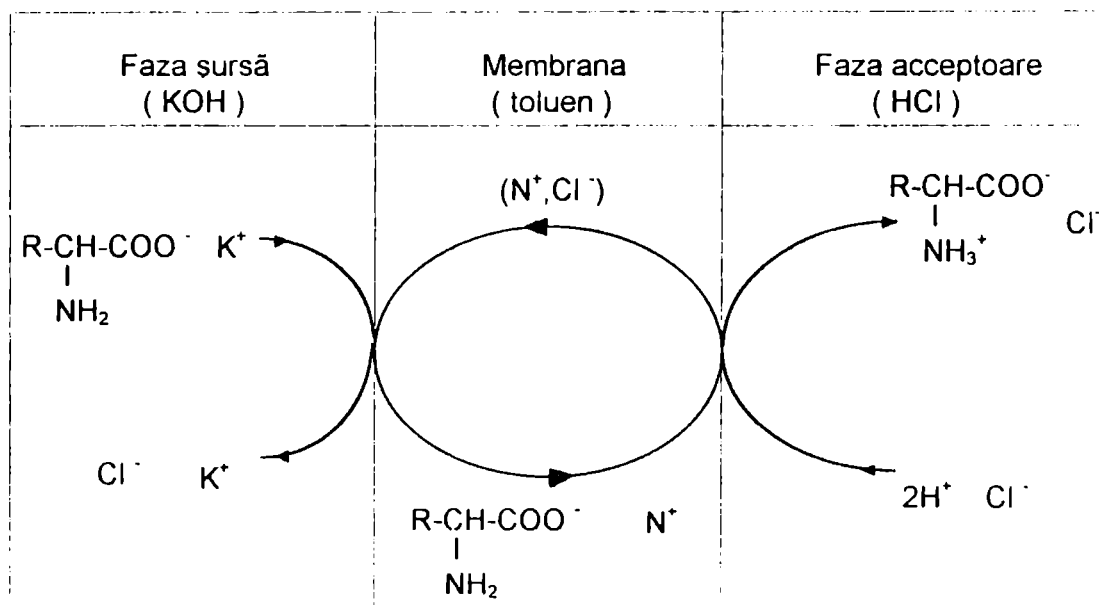


Figura 3.11. Transportul aminoacizilor sub formă de complecși anionici.

### 3.3.4.3. Transportul enantioselectiv

Recunoașterea enantiomerică este una dintre cele mai importante proprietăți ale moleculelor biologice. Au fost observate diferențe mari în acțiunea biologică a enantiomerilor, aspect deosebit de important pentru industria farmaceutică, alimentară, etc. Este binecunoscut faptul că în ultimul timp, tehnici cum ar fi: cromatografia de gaze, cromatografia cu fluide supercritice sau electroforeza capilară au fost utilizate intens pentru rezolvarea compușilor



4. L.Mutihac, C.Bala, S.Fleschin, L.Rotariu și V.Magearu, *Roum.Chem.Quart.Rev.*, **1997**, 2, 99-110.
5. C.Luca, L.Mutihac, R.Mutihac și A.-M. Joșceanu, *Mecanisme de transport prin membrane lichide*, Ed. Academiei Române, București, **1998**.
6. L.Mutihac și E.Blidar, *Rev.Roum.Chim.*, **1994**, 39, 1197-1201.
7. L.Boyadzhiev și G. Kyuchoukov, *J. Membrane Sci.*, **1980**, 6, 107.
8. M.Szpakowska și O.B.Nagy, *Bull.Soc.Chem.Belg.*, **1990**, 99, 889.
9. N.Kishii, K.Araki și S.Shiraishi, *Chem.Commun.*, **1984**, 103.
10. E. Kimura, C.A. Dalimunte, A.Yamashita și R. Machida, *Chem.Commun.*, **1985**, 1041.
11. L. Pickart, J.H. Freedman, W.J.Loker, J. Peisach, C.M. Perkins, R.E. Stenkamp și B.Weinstein, *Nature*, **1980**, 288, 715.
12. J.P.Laussac și B.Sarkar, *Biochemistry*, **1984**, 23, 2832.
13. J.D. Miller și M.B. Moisman, *Sep.Sci.Technol.*, **1985**, 38, 295.
14. M.Tromp, M. Burgard și A. El Bachiri, *Analysis*, **1991**, 19, 97.
15. M.Munoz, C. Palet și M. Valiente, *Anal. Lett.*, **1990**, 23, 1591.
16. C.D.Garner și P.M. Harrisson, *Chem.Ber.*, **1982**, 173
17. W.J. Ward și W.L. Robb, *Science*, **1967**, 156, 1481.
18. J.D. Lamb, J.J. Christensen, S.R. Izatt, K. Bedke, M.S. Astin și R.M. Featt, *J.Am.Chem.Soc.*, **1980**, 102, 6820.
19. J.D. Lamb, R.M. Izatt și J.J. Christensen, *Prog. Macrocyclic Chem.*, **1981**, 2, 41.
20. C.Seel și F.Vögtle, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, **1991**, 4, 30.
21. T.B.Stolwijk, E.J.R.Sudholter, D.N. Reinhoudt, J. van Eerden și S.Harkema, *J.Org.Chem.*, **1983**, 54, 1000.
22. W.F. Nijenhuis, A.R. van Doorn, A.M. Reichwein, F. de Jong și D.N. Reinhoudt, *J.Chem.Soc., Chem.Commun.*, **1991**, 113, 3607.
23. F.Vögtle, A.Wallon, W.M. Müller, U. Werner și M. Nieger, *J.Chem.Soc., Chem.Commun.*, **1990**, 158.
24. L.Mutihac, R. Mutihac și H.-J. Buschmann, *J.Incl.Phenom.*, **1995**, 23, 167.
25. D.J. Cram, *Science*, **1988**, 240, 760.
26. H. Tsukube, *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, **1984**, 57, 2685.
27. H. Tsukube, *J.Chem.Soc., Chem.Commun.*, **1983**, 970.
28. J.P.Behr și J.-M.Lehn, *J.Am.Chem.Soc.*, **1973**, 95, 6108.
29. L. Mutihac, R. Mutihac, T. Constantinescu și C. Luca, *J.Incl.Phenom.*, **1994**, 17, 45

30. H.-J. Buschmann, L. Mutihac și R. Mutihac, *Sep.Sci.Technol.*, 1998, in press.
31. D.O. Popescu, L. Mutihac și T. Constantinescu, *Anales de Química, Int.Ed.*, 1997, 93, 182-185.
32. L. Mutihac și I.V. Pătroescu, *Recentes Progres en Genie de Procedes*, 1992, 22, 431-435.
33. M. Bryjak, P. Wiczorek, P. Kafarski și B. Lejczak, *J.Membrane Sci.*, 1988, 37, 287.
34. H. Itoh, M.P. Thien, T.A. Hatton și D.I.C. Wang, *Biotechnol. Bioeng.*, 1990, 35, 83
35. S. Shinkai, H. Kinda, Y. Araragi și O. Manabe, *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, 1983, 56, 559.
36. T. Shinbo, T. Yamaguchi, K. Sakaki, H. Yanagishita, D. Kitamoto și M. Sugiura, *Chem.Express*, 1992, 7, 781.
37. L.R. Sousa, G.D.Y. Sogah, D.H. Hoffman și D.J. Cram, *J.Am.Chem.Soc.*, 1978, 100, 4569.

## IV. Procese membranare utilizate în separarea compușilor

### 4. 1. Aspecte privind fenomenele de încărcare ale membranelor

Recente studii de specialitate au ajuns la concluzia că domeniul de aplicații bazate pe procese de separare membranare pot fi extinse deoarece performanțele pot fi crescute. Transportul facilitat a fost recunoscut ca fiind eficient pentru creșterea performanțelor separărilor membranare. Procesele membranare sunt procese care conduc către tehnologiile curate și în acest fel reduc efectele de deteriorare ale industriei asupra mediului înconjurător [1]. Integrarea proceselor membranare cu alte procese fizico-chimice sau biologice în vederea realizării separărilor, purificărilor sau concentrărilor este unul dintre cele mai importante obiective în cercetarea și dezvoltarea proceselor membranare [2].

În subcapitolul 1.3 s-a prezentat o clasificare a proceselor membranare în funcție de forța motrice sub care aceste procese au loc. În acest capitol ne vom referi la procesele membranare *osmoza inversă*, *nanofiltrarea*, *ultrafiltrarea* și *microfiltrarea*, procese care au loc sub acțiunea unui gradient de presiune. Menționăm faptul că acestea sunt numai o parte dintre procesele membranare existente care sunt cu succes utilizate la separarea, purificarea și concentrarea compușilor chimici și biologici.

În timpul utilizării membranelor pot apărea fenomene care reduc fluxul de permeație datorită încărcării acestora. Interacțiile de natură electrostatică s-a constatat că pot avea consecințe nefavorabile pentru permeabilitatea membranelor. Astfel, forțele atractive, membrană-particule pot provoca depuneri pe suprafață, particulele sau moleculele reducând sau blocând accesul porilor la solvent provocând un depozit intraporos reducând deci porozitatea membranei [3-5]. În general acest fenomen se produce în primele secunde ale filtrării. Legătura formată la suprafață (încărcătură și afinitate) a membranei în raport cu particulele în suspensie sau moleculele este destul de tare.

Forțele atractive între particule pot favoriza de asemenea agregarea particulelor între ele până la formarea unui agregat (*gâteau*) la suprafața membranei mai mult sau mai puțin permeabil solventului. Aceste fenomene depind de natura soluției de separat, pH-ul, forța ionică și concentrația soluției sau suspensiei. În cazul suspensiilor, forma particulelor este de o importanță majoră și anume dacă particulele sunt mici aceste fenomene apar mai repede iar în cazul particulelor mari, forțele mecanice de presiune vor fi determinante.

În general creșterea concentrației unei soluții sau dispersii se traduce prin creșterea vâscozității. Relația exactă între fluxul de permeație și vâscozitate necesită studii privind varietatea comportamentelor reologice ale soluțiilor. Astfel se disting modele tradiționale și

modele moderne pentru explicația acestor fenomene. Unul dintre modelele tradiționale se bazează pe teoria polarizării concentrației care începe cu modelul de gel. Alt model este cel de rezistență care are la bază legea lui Darcy, care exprimă fluxul de permeație în funcție de presiunea transmembranară aplicată. O variantă a acestui model ține seama de rezistența datorită presiunii osmotice dacă aceasta nu este neglijată.

Ca metodă modernă a acestor fenomene este un model bazat tot pe teoria concentrării polarizării dar acest ultim model diferă de cel vechi prin descrierea comportamentului fluxului de permeație pe un larg spectru de diferite condiții operatorii : presiune transmembranară, viteză axială, temperatură.

În procesul membranar, ultrafiltrare, ajustarea raportului hidrofilicitate/hidrofobicitate al suprafeței membranei este de o mare importanță pentru separarea proteinelor și reducerea încărcării membranelor.

## 4.2. Osmoza Inversă (OI)

Osmoza inversă sau hiperfiltrarea este o operație membranară care are loc sub acțiunea gradientului de presiune în care solventul sau componentul predominant al soluției este transportat împotriva diferenței presiunii osmotice a lui prin membrană.

Osmoza inversă utilizează membrane dense care lasă să treacă solventul (apa în cea mai mare parte a cazurilor) și oprește toate sărurile. Membranele utilizate sunt caracterizate prin pori de un diametru mai mic decât 2 nm. În general această tehnică este utilizată pentru :

- demineralizarea apelor (desalinizarea apelor de sare, produce ape ultrapure);
- concentrarea soluțiilor (concentrarea sucului de fructe deoarece funcționând la temperatură ambiantă păstrează calitățile organoleptice ale produsului). În acest caz, concentrația este limitată de presiunea osmotică care poate atinge valori ridicate. Principalii constituenți care contribuie la presiunea osmotică a sucului de fructe sunt hexozele, dizaharidele și de asemenea acizii organici; concentrarea laptelui;
- purificarea apelor potabile prin îndepărtarea nitraților, fluorurilor și a metalelor grele; în industria medicamentelor, etc.;
- preconcentrarea unor compuși în vederea concentrării acestora într-un proces mai dificil de realizat.



Presiunea osmotică joacă un rol important în osmoza inversă și nanofiltrare, mai puțin în ultrafiltrare și nu intervine în nici un fel în microfiltrare. O presiune mai mare decât presiunea osmotică este capabilă de a dirija fluxul soluției din partea cu concentrații mari a soluției către partea cu concentrații mai mici a soluției și de aici denumirea de osmoză inversă.

Matsuura și Sourirajan [6] au studiat intens separarea unor soluții organice și au corelat separarea acestora cu parametrii polari sterici și nepolari în vederea optimizării separărilor cu ajutorul osmozei inverse.

În osmoza inversă sunt utilizate în general membrane din diacetat de celuloză și triacetat de celuloză. Membranele pot fi împachetate în formă spiralată, plată sau tubulară [7].

### 4.3. Nanofiltrarea (NF)

Nanofiltrarea este termenul utilizat pentru această nouă tehnică separativă prin membrane situată între osmoza inversă și ultrafiltrare. Eriksson este cel care dă o definiție completă privind nanofiltrarea [8]. Aceasta tehnică permite separarea componentelor care au o mărime în soluție vecină cu cea a nanometrilor (10 Å) de unde numele său. Sărurile ionilor monovalenți și compușii organici neionizați cu masă moleculară inferioară nu sunt reținuți prin acest tip de membrane. Sărurile ionilor multivalenți (calciu, magneziu, aluminiu, sulfați, etc.) și compușii organici neionizați cu masă molară superioară în jur de 300 g/mol sunt din contră puternic reținuți.

Mecanismele de transport caracteristice acestei tehnici sunt intermediare între cele caracteristice osmozei inverse și cele de ultrafiltrare. În cazul acestei tehnici, porii membranelor pot fi caracterizați în funcție de structura lor prin microscopie electronică. În special tehnica microscopiei electronice scanning dă o viziune clară a proprietăților structurale ale membranei și cere o minimă preparare a probei. În general, membranele destinate nanofiltrării constau din membrane composite cu o structură asimetrică.

Aplicațiile posibile sunt numeroase printre care :

- demineralizarea selectivă;
- concentrarea compușilor organici cu masă moleculară mică (antibiotice), etc.;
- în tratarea și purificarea apei potabile;
- îndepărtarea compușilor organici cu masă moleculară mică;
- în tratarea apelor uzate;
- separarea sau concentrarea unor amestecuri.

#### 4.4. Ultrafiltrarea (UF)

Această tehnică utilizează membrane microporoase al căror diametru al porilor este cuprins între 1 - 100 nm. Astfel de membrane permit moleculelor mici (apă, săruri) să treacă și opresc moleculele de masă moleculară ridicată (proteine, polimeri, etc.). Selectivitatea membranelor utilizate în procesul membranar ultrafiltrare este determinată în primul rând de raportul dintre diametrul solutului și diametrul porilor membranei. De asemenea rezultatele ultrafiltrării sunt influențate de polarizarea concentrației. Dacă sistemul membranar permite o corecție pentru concentrație, atunci polarizarea poate fi modelată matematic și astfel optimizată [9].

Aplicațiile acestei tehnici membranare sunt multiple :

- producerea apei de o înaltă puritate (îndepărtarea microorganismelor și a altor particule);
- separarea emulsiilor apă/ulei;
- în industria alimentară în mod special pentru limpezirea unor sucuri din fructe, pentru limpezirea vinului;
- concentrarea soluțiilor macromoleculare (proteine, polizaharide, diferiți polimeri, etc.);
- eliminarea macrosoluțiilor prezente în efluenți sau în apa de uz domestic, industrial (electronic) sau medical.

Aplicațiile cu o eficiență ridicată ale ultrafiltrării în special în separările biologice necesită utilizarea unor membrane care să prezinte mărimea porilor uniformă și cu o înaltă permeabilitate. În mod special încărcarea membranelor în cazul ultrafiltrării este o problemă importantă deoarece în acest caz scade foarte mult fluxul separărilor. Când se filtrează soluțiile de proteină utilizând membrane hidrofobice în cele mai multe dintre cazuri adsorbția proteinelor pe suprafața membranei sau în porii membranei devine ireversibilă. Concentrarea proteinelor prin ultrafiltrare este una dintre cele mai comune tehnici utilizate în procesele biofizice cu aplicații industriale [10,11].

#### 4.5. Microfiltrarea (MF)

Microfiltrarea este procesul membranar utilizat în cazul separării particulelor sau a suspensiilor coloidale din diferite lichide. În general membranele pentru microfiltrare sunt din

nitrat de celuloză, policarbonat, polipropilenă, poliester sau alumină [12]. În cazul microfiltrării ca și al ultrafiltrării sunt preferate membranele microporoase. Mărimea porilor microfiltrelor este cuprinsă în general între 0,05  $\mu\text{m}$  și 1,5  $\mu\text{m}$ . Parametrii cheie în realizarea unei bune funcționări a procesului membranar, microfiltrare sunt considerați a fi o bună hidrodinamică și o presiune transmembranară scăzută.

Cele mai utilizate membrane microporoase sunt realizate din polimeri polipropilenici sau fluoropolimeri deoarece prezintă o rezistență bună la diverși solvenți.

Aplicațiile operației membranare, microfiltrare se regăsesc în :

- separarea soluțiilor macromoleculare cum ar fi emulsia apă/ulei;
- îndepărtarea suspensiilor coloidale din soluțiile apoase;
- îndepărtarea particulelor de praf din aer;
- în industria alimentară pentru sterilizarea berii, în industria de prelucrare a vinului și a oțetului, pentru epurarea bacteriană a laptelui.

Recent în studiul aplicațiilor membranelor pentru diverse operații de separare, concentrare sau purificare, rezultate bune se obțin în cazul combinării acestor procese. De exemplu dacă osmoza inversă este combinată cu microfiltrarea, ultrafiltrarea sau nanofiltrarea pentru separarea sau concentrarea unor soluții (sucurile din fructe, microorganismele din celule, apele uzate etc.) de departe se obțin rezultate interesante. De altfel acesta constituie unul dintre obiectivele de viitor ale industriei membranelor.

## Bibliografie

1. L. Mutihac, *EMS XVth Annual Summer School, Membrane Processes in Water and WasteWater Treatment*, Toulouse, 6-10 July, **1998**.
2. E. Drioli, G. Iorio și G. Catapano, *Handbook of Industrial Membrane Technology*, (Ed. Mark C. Porter), Noyes Publish., New Jersey, USA, **1989**, 404-410.
3. J.A. Howell, *EMS XVth Annual Summer School, Membrane Processes in Water and WasteWater Treatment*, Toulouse, 6-10 July, **1998**.
4. Wu, Dengxi, J.A. Howell și R.W. Field, *J.Membrane Sci.*, **1998**, in press.
5. P. Aimar, M. Meireles și V. Sanchez, *J.Membrane Sci.*, **1990**, 54, 321-339.
6. T. Matsuura, M.E. Bednas și S. Sourirajan, *J.Appl.Polym.Sci.*, **1974**, 18, 567-588.
7. L. Mutihac, D.O. Popescu și R. Mutihac, *Roum.Chem.Quart.Rev.*, **1996**, 4, 91-105.
8. A.P. Eriksson, *Environmental Progress*, **1988**, 7, 58.
9. A.S. Jonsson și G. Tragardh, *Desalination*, **1990**, 77, 135-179

10. P. Aimar și R.W. Field, *Chem.Eng.Sci.*, **1992**, 47, 570-586.
11. R.W. Field și P. Aimar, *J.Membrane Sci.*, **1993**, 80, 107-115.
12. A. Taddei, P. Aimar, J.A. Howell și P. Scott, *J.Chem.Tech.Biotechnol.*, **1990**, 47, 365-376

## V. Procese membranare implicate în separarea compușilor biologici

### 5.1. Ultrafiltrarea proteinelor

În ultimele două decenii o serie de considerente au influențat cercetările din domeniul ultrafiltrării prin membrane a soluțiilor de proteine. Dintre acestea, cele mai importante s-au referit la rolul concentrării și/sau gel polarizării fluxului de solvent precum și la retenția solutului pe diverse membrane. Toate aceste considerente au stimulat dezvoltarea tehnicilor de condiționare a fluidului prin reducerea polarizării și creșterea fluxului de solvent [1,2]. Totodată termenul de polarizare în ultrafiltrarea proteinelor a fost explicat atât în cazul formării unui strat de gel cât și în cazul limitării osmotice [3-5].

De asemenea, în cazul ultrafiltrării proteinelor nu trebuie neglijată o serie de factori cum ar fi: adsorbția proteinelor pe membrană, efectul pH-ului și al agregării proteinelor, comportamentul inițial al membranelor cu o permeabilitate limitată pentru solut, tăria ionică precum și curba hysteresis a membranei. Un alt aspect care afectează determinările, îl reprezintă reproductibilitatea acestora, întrucât aceasta depinde în primul rând de procesul de curățare al membranei.

Ultrafiltrarea proteinelor poate fi realizată fie continuu fie într-o celulă de lucru cu spațiu bine determinat, utilizând diverse configurații ale membranei și ale celulei. În cazul măsurătorilor în laborator pentru volume foarte mici de probă se utilizează o celulă prevăzută cu agitare sau tuburi de ultrafiltrare foarte înguste, în timp ce pentru separări la scară mare se utilizează fibre cu porozitate mare sau membrane cu diverse geometrii. În oricare din aceste cazuri, soluția de proteină vine în contact, în celula de separare, cu o membrană nouă sau cu una curățată anterior iar experimentul se desfășoară în condițiile stabilite. După experiment membrana este curățată pe cât posibil și este inițiat un nou experiment în condiții diferite sau similare. Adeseori membrana uzată este înlocuită cu una nouă.

În timpul unui astfel de program experimental, în mod firesc pot apărea o serie de întrebări cu privire la condițiile de operare. Când este atinsă starea staționară a ultrafiltrării? Reflectă întotdeauna ultrafiltratul obținut concentrația de solut așa cum ne-am aștepta din specificațiile firmei producătoare de membrane? Contactul soluției de alimentare cu membrana înaintea de începerea filtrării, influențează procesul de separare? Cum influențează procesul de ultrafiltrare, agregarea proteinelor și adsorbția acestora pe suprafața și în porii membranei? Care este pH-ul ideal pentru experiment? O valoare mare a vitezei de agitare a

soluției va conduce la creșterea fluxului de solvent? În ce măsură procedeele de curățare a membranei vor permite reproductibilitatea determinărilor?

Punctele de vedere cu privire la ultrafiltrarea proteinelor în sistem real sunt foarte diverse. Să considerăm, de exemplu, rezistența la transportul solventului. Michaels A. S. caracterizează rezistența totală pentru fluxul de solvent din ultrafiltrare, ca fiind suma rezistenței membranei ( $R_m$ ), a rezistenței stratului adsorbit ( $R_a$ ), a rezistenței stratului de gel ( $R_g$ ) și a rezistenței stratului de concentrare a polarizării ( $R_c$ ) [6]. Caracterizarea fiecărei rezistențe pentru un sistem solut-membrană dat este un proces foarte dificil, iar în cazul în care permeabilitate membranei nu ar mai fi aceeași pe toată suprafața, apar complicații suplimentare [7].

De aceea în acest subcapitol ne vom axa pe acele exemple care evidențiază complexitatea procesului de ultrafiltrare a proteinelor, accentul fiind pus pe primele 10-15 minute de ultrafiltrare. Cunoașterea factorilor care influențează separarea prin ultrafiltrare a proteinelor va permite alegerea corectă a membranei, la utilizarea repetată a aceluiași membrane și la operarea în condiții mecanice și chimice corespunzătoare pentru sistemul de ultrafiltrare, din punctul de vedere al separării unei proteine cu o anumită masă moleculară.

### 5.1.1. Descrierea celulei de ultrafiltrare cu agitare

În figura 5.1. este prezentată schematizat instalația de laborator (prevăzută cu agitare) pentru ultrafiltrarea unei soluții diluate de proteină [8,9]. Celula prevăzută cu agitator magnetic este Amicon Model 401-S prevăzută cu o membrană cu suprafața efectivă de 39,2 cm<sup>2</sup>. Dispozitivul conține de asemenea o butelie cu azot, un regulator pentru presiune azotului, un rezervor pentru solvent, indicatori de presiune, valve precum și o unitate prevăzută cu sistemul de filtre și sistemul de măsurare. Toate conexiunile au fost realizate cu tuburi de polietilenă rezistente la presiune și cu racorduri din oțel inoxidabil.

Există mai multe diferențe între acest sistem și cele utilizate în mod obișnuit. Astfel, rezervorul pentru solvent conține soluția de tampon fără proteină care este menținută la aceeași presiune ca cea din celula de ultrafiltrare. Pe parcursul procesului de ultrafiltrare valvele  $V_2$  și  $V_4$  se mențin deschise iar valva  $V_3$  închisă, astfel încât orice pierdere de solvent din celulă, datorată ultrafiltrării să fie înlocuită automat din rezervorul cu solvent. Prin acest procedeu se elimină modificarea de volum în celulă, iar condițiile de agitare nu vor fi afectate. Mai mult decât atât, pentru soluții total eliminați, concentrația de solut din celulă va fi **neschimbată datorită adaosului de soluție tampon din rezervor.**

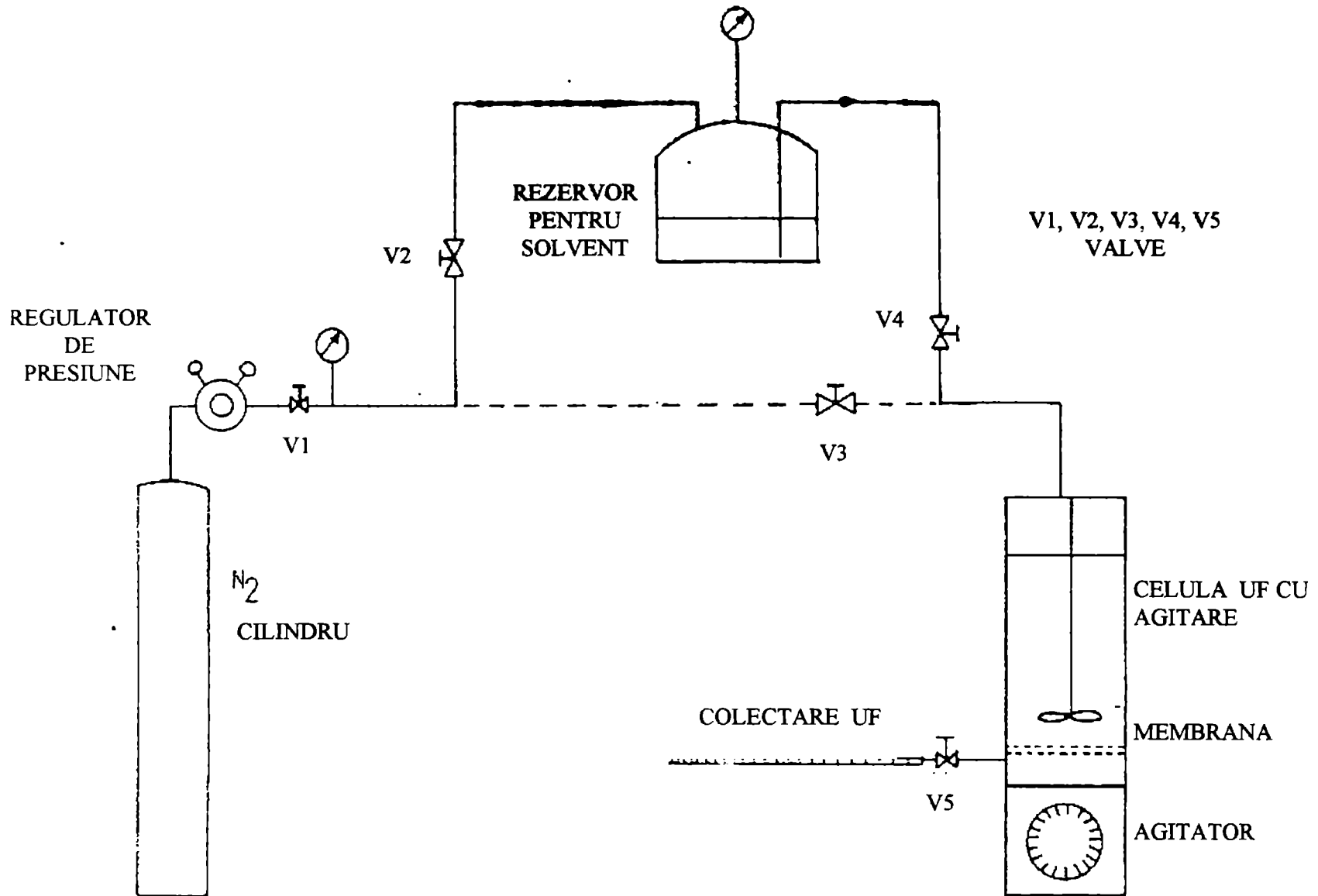


Figura 5.1. Instalajia pentru ultrafiltrarea cu agitare.

Sistemul utilizat prezintă o serie de avantaje în comparație cu ultrafiltrarea în sistem închis, în care volumul de soluție scade pe măsură ce procesul de ultrafiltrare înaintează [10] astfel încât concentrația de solut în probă cât și condițiile de agitare variază în timp.

Un alt aspect căruia trebuie să i se acorde atenție, în cazul celulele cu agitare, îl reprezintă posibilitatea apariției mișcării turbionare.

Procedura de lucru adoptată pentru realizarea ultrafiltrării este următoarea: se utilizează o celulă de ultrafiltrare (UF) și un rezervor umplut pe jumătate cu o soluție tampon acid citric 0,1 M - fosfat disodic 0,2 M (tabelul 5.1.)

**Tabelul 5.1.** Tampon McIlvain's: acid citric – fosfat disodic<sup>a</sup>

pH	8,0	6,8	6,0	4,8	4,6	3,0
x	2,75	22,75	36,85	50,70	53,25	79,45

<sup>a</sup>  $x \text{ cm}^3$  acid citric 0.1 M +  $(100 - x) \text{ cm}^3$  0,2 M fosfat disodic.

Se închid valvele  $V_3$  și  $V_4$  iar valvele  $V_1$  și  $V_2$  se deschid astfel încât rezervorul cu tampon să fie presurizat la valoarea de presiune aleasă pentru experiment. Spațiul limitat din partea inferioară a membranei din celulă se umple cu soluție tampon iar valva  $V_5$  se închide. Se introduc în celulă  $250 \text{ cm}^3$  soluție proteină și se inițiază agitarea. În același timp se deschide valva  $V_3$  pentru a presuriza celula la nivelul existent în rezervor. Dacă experimentul necesită ca membrana să intre în contact cu soluția de probă o perioadă de timp înaintea începerii filtrării, atunci după această perioadă valvele  $V_4$  și  $V_5$  se deschid brusc iar simultan se închide valva  $V_3$ , pentru a începe ultrafiltrarea. În timpul contactului dintre membrană și soluție înainte de ultrafiltrare nu se utilizează agitarea.

După ce valva  $V_5$  este închisă, pe măsură ce ultrafiltrarea avansează, se colectează ultrafiltratul într-o biuretă gradată. Indicațiile biuretei gradate, citite la intervale de 30 secunde, se utilizează pentru trasarea diagramei volum filtrat-timp, pe baza cărora se pot realiza diagrame ale fluxului de solvent în raport cu timpul. De asemenea se extrag cu ajutorul unei seringi, eșantioane din ultrafiltrat, la diferite intervale de timp, pentru determinarea concentrației de solut în ultrafiltrat. Acest volum de eșantion, precum și volumul lichidului introdus în partea inferioară a membranei, înaintea filtrării, s-au luat în calcul pentru măsurarea volumului de ultrafiltrat la un moment dat.

În finalul experimentului se oprește agitarea, valvele  $V_2$  și  $V_4$  se închid, se evacuează soluția din interiorul celulei iar presiunea se scade lent. Celula și ansamblul de ultrafiltrare se



scot și se spală cu apă de la robinet. Pentru reutilizarea unei membrane Swaminathan [8,9] a utilizat următorul procedeu de curățare: membrana este spălată cu apă de la robinet și se păstrează timp de 15 minute într-o soluție de NaOH 0,1 N, după care se spală din nou de această dată cu apă dublu distilată. Se fixează în celulă și se trece, timp de 15 minute, un jet de apă dublu distilată la aceeași presiune la care membrana a fost expusă în timpul experimentului. Se scoate din nou membrana. se curăță cu NaOH 0,1 N și apă dublu distilată la o presiune de 10 atm măsurându-se viteza de filtrare. Acest procedeu se continuă până când se restabilește performanța inițială a membranei, față de apă distilată la 10 atm.

În cazul separării albuminei serice (BSA) adsorbția pe suprafața membranei XM 100A (Amicon) este foarte mare. De aceea după utilizare se scufundă membrana, timp de 30 min., într-o soluție de NaOH 0,1 N ce conține 0,5 % pepsină. Dacă după clătire cu apă dublu distilată și filtrarea acesteia la 20 atm se atinge un flux de solvent de cel puțin 95% din valoarea fluxului inițial al unei membrane noi, aceasta poate fi utilizată pentru un nou set de determinări. În caz contrar se scufundă membrana pentru încă 15 min. în soluția de curățare și se repetă procedeu.

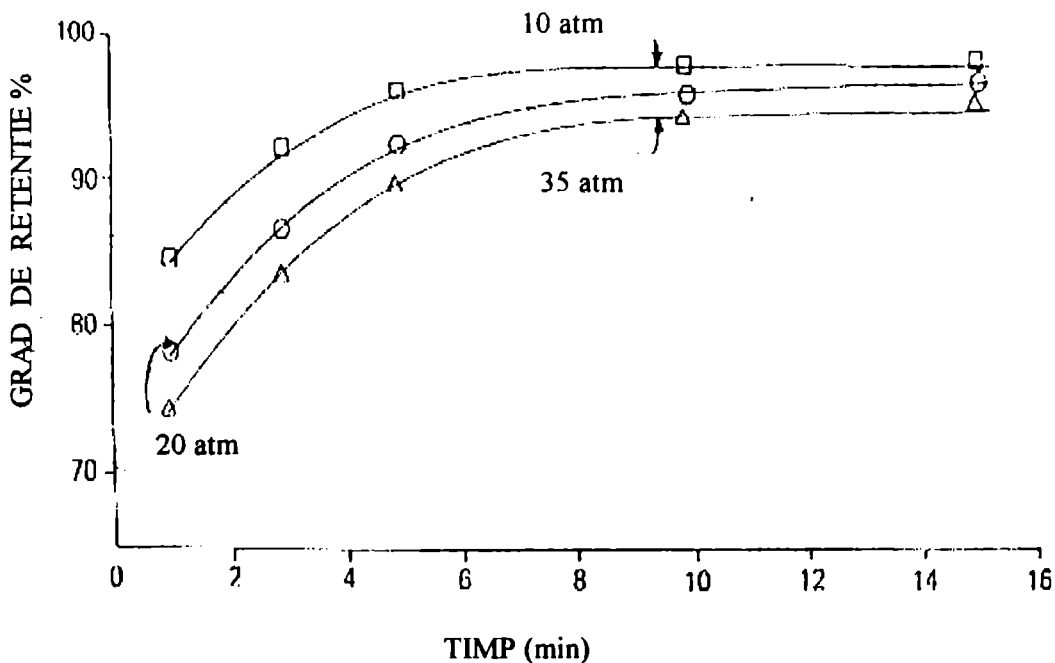
Concentrația în proteine ale probelor se determină spectrometric utilizând metoda Lowry [11] pentru soluții de proteină diluate și metoda Biuret modificată [12] pentru soluții relativ concentrate.

### **5.1.2. Ultrafiltrarea proteinelor; etapa inițială**

Swaminathan [8,9] a observat că fluxul de solvent scade repede în timp la începutul ultrafiltrării, simultan cu creșterea retenției solutului. După o anumită perioadă de timp viteza de modificare a fluxului de solvent, respectiv retenția solutului scade substanțial și în circa 10-15 min. ambele procese decurg practic cu viteză constantă. Acest comportament a fost observat în cazul ultrafiltrării albuminei serice cu membrane PM 30, XM 100A și XM 300 (Amicon) la presiuni de 10-35 atm și o variație a concentrației de soluție între 0,05-0,5%.

Figura 5.2 prezintă comportarea unei membrane PM 30 din punctul de vedere al evoluției timpului de reținere inițial al unei soluții de albumină 0,1 %, la diferite presiuni, utilizând o celulă cu agitare (800 rpm).

Același comportament a fost observat și pentru alte valori ale pH-ului. De exemplu Waters și Fane [10] au studiat ultrafiltrarea albuminei 0,05% pe o membrană XM 100A într-o celulă cu agitare, și au observat că retenția albuminei variază în mod semnificativ funcție de timp pentru toate cele trei valori ale pH-ului, respectiv 7,4; 3,0 și 4,8.



**Figura 5.2.** Evoluția timpului de reținere inițial al albuminei serice pe o membrană PM 30; soluția de albumină de alimentare 0,1%, pH-ul soluției 4,8 corespunzătoare pH-ului izoelectric al albuminei.

De asemenea Waters și Fane [10] au observat modificarea procentului de retenție al albuminei de la 20-30% la începutul procesului de ultrafiltrare până la circa 90% și chiar mai mult în final. Deoarece membrana XM 100A utilizată are un indice de separare de 100 000 iar albumina are masa moleculară de 67 000 Da, procentul de reținere va fi mult mai mic decât 100%.

Atunci când se folosește o membrană PM 30, cu un coeficient de retenție mult mai mare, (figura 5.2.) se observă că gradul de retenție al albuminei, în primele minute, este în jur de 70-85%, în timp gradul de retenție corespunzător stării staționare (după 10-15 min.) variază între 90-98%, în funcție de presiunea aplicată și de concentrația soluției inițiale [8].

În general, gradul de retenție al proteinelor, în faza de echilibru, crește ușor odată cu creșterea concentrației soluției de proteină, și scade atunci când crește presiunea aplicată [8,9]. Un alt aspect ce trebuie menționat, îl reprezintă timpul necesar atingerii stării de echilibru pentru fluxul de solvent, care este întotdeauna mult mai mic decât cel necesar atingerii stării de echilibru pentru retenția solutului [8,14]. Pentru un interval de timp determinat, chiar dacă debitul de solvent este constant, gradul de retenție al solutului crește. Acest fenomen poate fi

atribuit obturării porilor membranei de către proteinele globulare care afectează semnificativ gradul de retenție al solutului.

Instabilitatea unui astfel de sistem de ultrafiltrare se datorează: (i) aglomerării în timp a stratului polarizat (și a stratului de gel); (ii) interacțiilor dintre membrană și solut care conduc la adsorbția proteinelor pe suprafața membranei și la posibila obturare a porilor acesteia. Timpul caracteristic pentru primul tip de proces [15] este proporțional cu raportul dintre coeficientul de difuzie efectivă a solutului în soluția de alimentare și pătratul vitezei de difuzie a solventului prin membrană. Astfel, pentru soluții cu concentrații mari de proteine (deci coeficienți de difuzie mai mici) și pentru presiunii aplicate mari (deci flux inițial de solvent mai mare) timpul caracteristic aglomerării stratului polarizat (și a stratului de gel) este mai mic. Într-o serie de cercetări s-a constatat că pentru concentrații de proteină între 0,05-0,5% și o presiune aplicată nu foarte mare timpul inițial până la atingerea echilibrului este de 10-15 min. [8-10,13]. În cazul în care atât concentrația soluției inițiale de proteină cât și presiunea aplicată este mare timpul până la atingerea echilibrului poate să scadă până la 60 s. și din această cauză efectul acestuia să fie ignorat [1].

Formarea rapidă a stratului polarizat (și a stratului de gel) va conduce la scăderea fluxului de solvent în timp. Dacă acest strat va prezenta proprietăți corespunzătoare unei a doua membrane capabile să rețină parțial solutul, se va modifica gradul de retenție a solutului în timp. De asemenea dacă are loc și adsorbția proteinei pe suprafața membranei, stratul adsorbit va influența cu siguranță gradul de retenție al solutului.

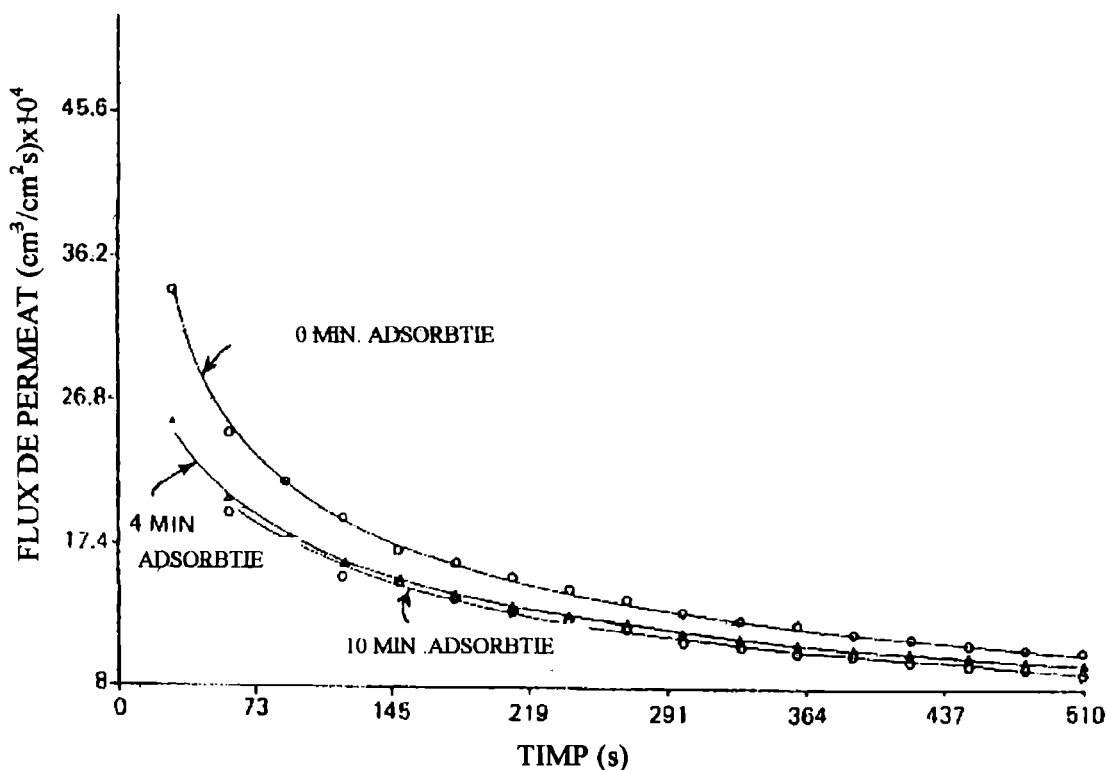
### **5.1.3. Influența adsorbției proteinelor pe membrană și a pH-ului soluției**

O deosebită atenție a fost acordată în ultimii ani cercetările cu privire la rolul adsorbției proteinelor în cazul ultrafiltrării prin procese membranare [16]. Membranele de tip YM, introduse recent de firma Amicon [17] prezintă o adsorbție foarte mică a proteinelor iar caracteristicile acestora reflectă preocupările recente din domeniul obținerii de membrane pentru ultrafiltrare. Caracterizarea unei membrane de ultrafiltrare din punctul de vedere al adsorbției proteinelor pe suprafața sa este foarte importantă în vederea recuperării totale a solutului din soluții inițiale de proteină foarte diluate. În cazul unor soluții de proteină supuse ultrafiltrării, foarte concentrate, fenomenul de adsorbție nu afectează considerabil bilanțul material proteic [18].

Structura soluției și gradul de aglomerare a moleculelor proteice, care sunt dipolare în stare naturală, sunt influențate de pH-ul soluției. De exemplu, pe măsură ce pH-ul soluției are

o valoare apropiată de pH-ul punctului izoelectric, gradul de aglomerare atinge valoarea maximă iar solubilitate atinge valoarea minimă. Este cunoscut, de asemenea, faptul că adsorbția proteinelor pe suprafețe sintetice [19,20] și pe membrane din polimeri neutrii sau schimbători de cationi [21] crește atunci când pH-ul soluției are valori apropiate de pH-ul punctului izoelectric. Influența pH-ului asupra separării prin ultrafiltrare a unor soluții ce conțin un singur solut (albumină serică BSA, hemoglobină și albumină din ou) a fost studiată pentru membrane de tipul PM 30, XM 100A și XM 300 [22]. S-a constatat că debitul de echilibru pentru ultrafiltrarea cu agitare a unei soluții de proteină va avea o valoare minimă pentru o soluție cu pH egal cu pH-ul izoelectric și va crește pentru valori de pH diferite.

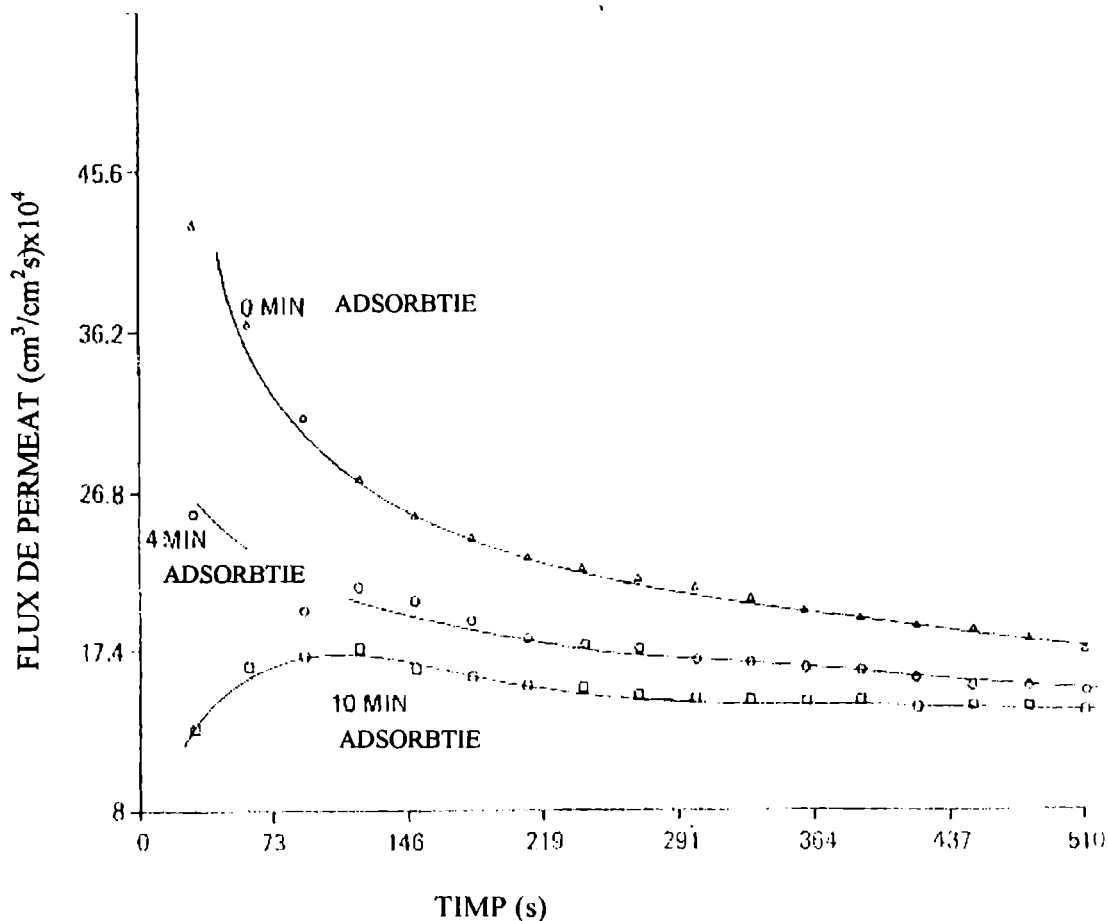
În figura 5.3. este prezentată variația debitului de curgere a solventului prin membrană, într-o soluție fără agitare, în funcție de timp pentru ultrafiltrarea albuminei serice BSA la pH 3,2 cu o membrană XM 100A, pentru timpi de adsorbție diferiți.



**Figura 5.3.** Variația debitului de curgere a solventului prin membrană în timp (ultrafiltrare fără agitare) pentru trei valori ale timpului de adsorbție; membrană tip XM 100A; soluție de albumină serică BSA 0,05%; pH 3,2; presiune 20atm.

Se observă din grafic o scădere a valorii debitului de curgere a solventului prin membrană pentru un timp de adsorbție de 4 respectiv 10 min. comparativ cu valoarea înregistrată pentru un timp de adsorbție de 0 min. Mai mult decât atât, valoarea debitului de curgere a solventului prin membrană scade odată cu creșterea timpului cu tendința de atingere a stării de echilibru după o perioadă mai lungă de timp.

În cazul utilizării unui sistem de ultrafiltrare cu agitare efectul fenomenului de adsorbție pe suprafața membranei este mai pronunțat (figura 5.4.).

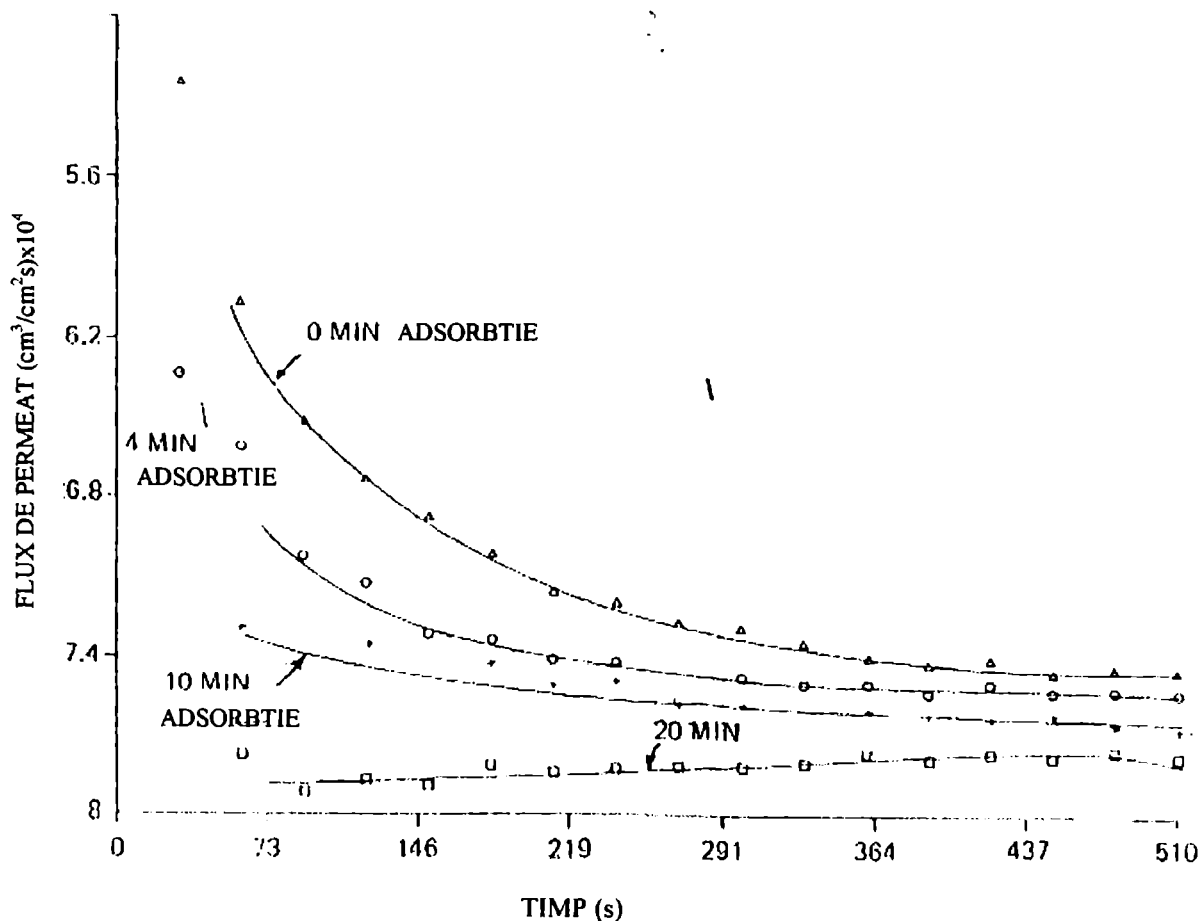


**Figura 5.4.** Variația debitului de curgere a solventului prin membrană în timp (ultrafiltrare cu agitare) pentru trei valori ale timpului de adsorbție; membrană tip XM 100A; soluție de albumină serică BSA 0,05%; pH 3,2; presiune 20atm; viteza de rotație 650 rpm

Un efect și mai important al adsorbției proteinelor, pe suprafața membranei, asupra procesului de ultrafiltrare se constată în cazul separării prin ultrafiltrare într-un sistem cu agitare a albuminei BSA, pe o membrană XM 100A la pH 4,8 corespunzător pH-ului

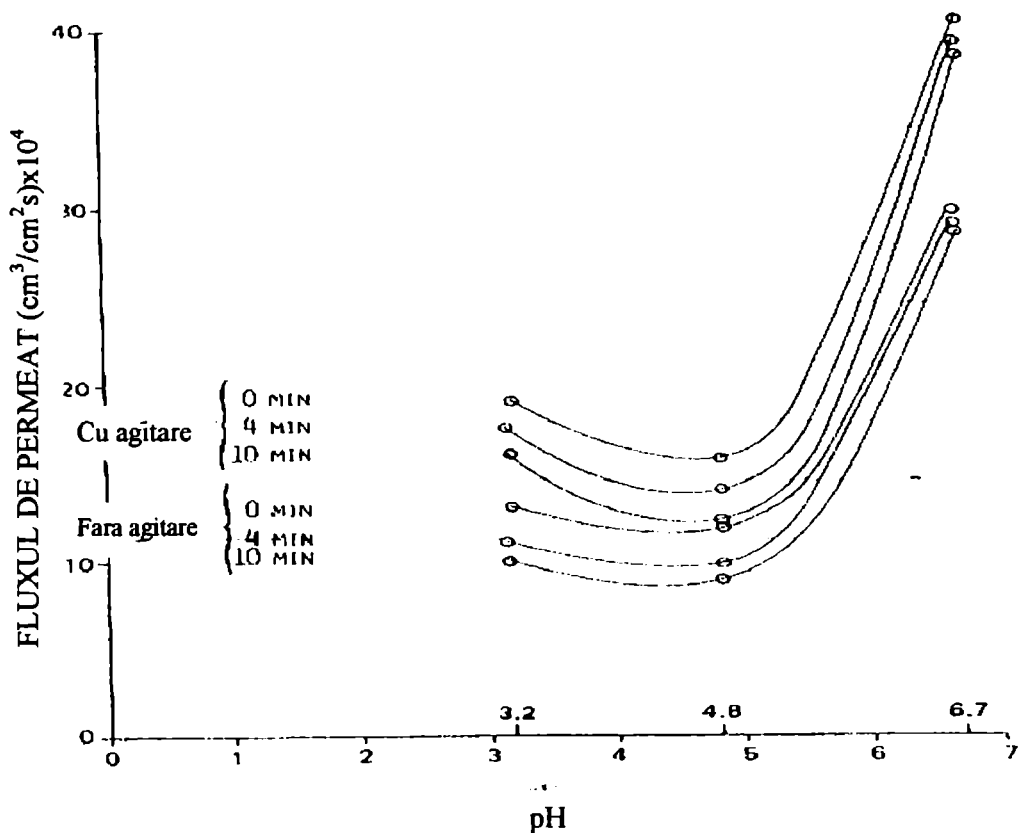
izoelectric al acestei proteine. Așa cum se observă din figura 5.5., debitul inițial de curgere prin membrană scade semnificativ ( de peste patru ori) pe măsură ce timpul de adsorbție crește de la 0 la 20 min. Valoarea debitului de curgere prin membrană corespunzător stării de echilibru, pentru un proces de ultrafiltrare precedată de adsorbție timp de 20 min. este de aproximativ jumătate din valoarea corespunzătoare unui timp de adsorbție de 0 min.

Se poate concluziona că amânarea accidentală a începerii procesului de ultrafiltrare prin membrane ce prezintă adsorbție pentru proteine, poate afecta considerabil performanțele membranei.



**Figura 5.5.** Variația debitului de curgere a solventului prin membrană în timp (ultrafiltrare cu agitare) pentru patru valori ale timpului de adsorbție; membrană tip XM 100A; soluție de albumină serică BSA 0,05%; pH 4,8; presiune 20atm; viteza de rotație 650 rpm.

Dependența debitului de curgere al solventului prin membrană în funcție de pH este prezentată în figura 5.6. pentru cazul ultrafiltrării unei soluții de albumină serică BSA, într-un sistem cu sau fără agitare.



**Figura 5.6.** Variația debitului de curgere a solventului prin membrană în funcție de pH pentru trei valori ale timpului de adsorbție; membrană tip XM 100A; soluție de albumină serică BSA 0,05%; presiune 20atm.

Rezultatele demonstrează faptul că un timp de contact îndelungat, între membrană și soluție, înaintea începerii procesului de ultrafiltrare determină un grad mare de adsorbție și conduce la scăderea debitului de curgere al solventului indiferent de valoarea pH-ului și de condițiile de agitare.

Datele prezentate confirmă efectul pe care îl are pH-ul soluției de proteină asupra ultrafiltrării, și anume că debitul de curgere a solventului prin membrană, în starea de echilibru, atinge o valoare minimă pentru o soluție cu pH egal cu pH-ul izoelectric. Acest lucru este valabil indiferent dacă soluția este sau nu agitată și nu depinde de timpul de

adsorbție ce precede ultrafiltrarea; este de preferat să se lucreze la un pH diferit de pH-ul izoelectric.

#### 5.1.4. Influența agitării

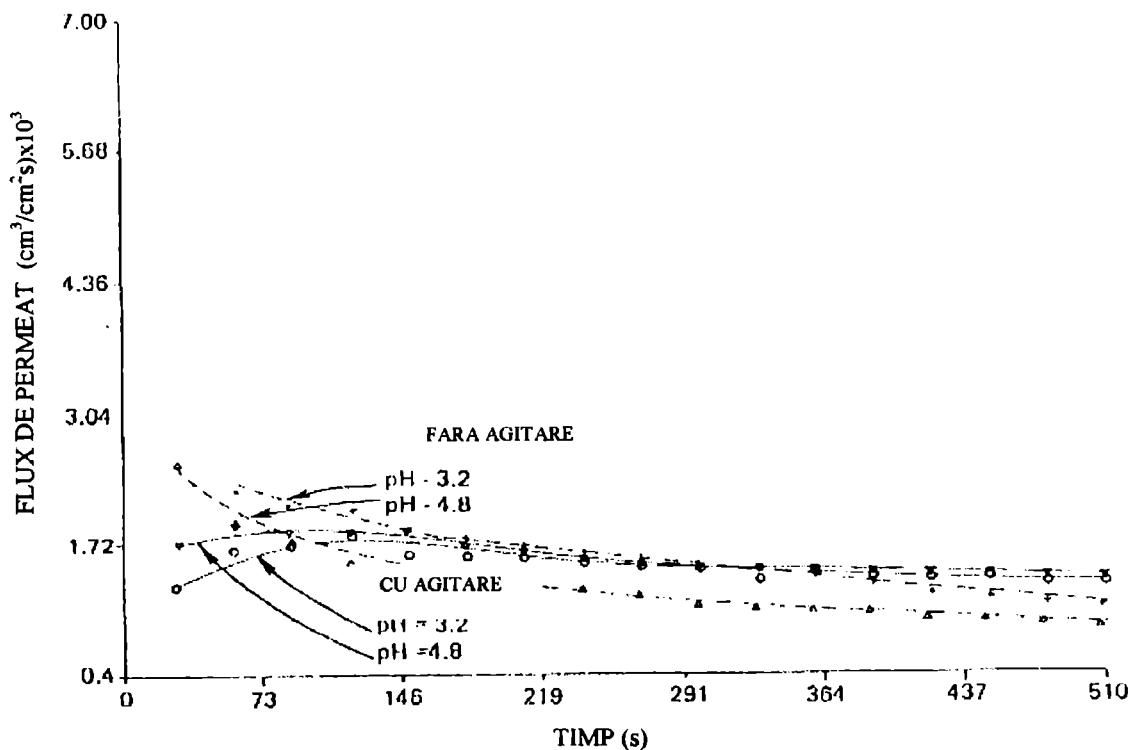
În cazul ultrafiltrării prin procese membranare, este bine cunoscut faptul că, agitarea soluției reduce polarizarea și crește debitul de curgere a solventului prin membrană deoarece prin agitare, crește coeficientul de transfer de masă prin difuzie al solutului de la suprafața membranei către interiorul soluției.

În cazul membranelor XM 100A și XM 300 s-a observat [13] că viteza de atingere a stării de echilibru pentru o soluție de albumină serică BSA la pH izoelectric, este mai mică când ultrafiltrarea se realizează cu agitare decât în absența agitării. De asemenea în cazul membranelor de mai sus, caracterizate printr-o permeabilitate parțială pentru ultrafiltrare, s-a constatat că debitul de curgere al solventului prin membrană sau gradul de retenție a solutului nu se modifică atunci când viteza de agitare crește de la 500 la 1000 rotații/min.

Un astfel de comportament neobișnuit poate fi explicat după cum urmează. La pH izoelectric moleculele de proteină se găsesc în agregate moleculare puternic comasate. Stratul polarizat, în absența agitării, va fi "poros" datorită conglomeratelor de mari dimensiuni. În prezența agitării se formează conglomerate mai mici, ceea ce duce la apariția unui strat polarizat mai compact. Dar acest lucru nu este suficient deoarece pentru o membrană impermeabilă, agitarea determină întotdeauna o creștere a debitului [13]. Probabil că aceste conglomerate mai mici apărute în urma agitării, blochează o parte din pori, ducând la o scădere a suprafeței active. Efectul este mult mai pronunțat în cazul ultrafiltrării cu agitare, deoarece se formează conglomerate mai mici în comparație cu cele rezultate în ultrafiltrarea în absența agitării. Modul de blocare a porilor membranei cu conglomerate proteice de diferite mărimi nu este încă pe deplin clarificat [10,13].

În figura 5.7. sunt prezentate datele obținute la ultrafiltrarea albuminei BSA, în sistem cu agitare și fără agitare, printr-o membrană de tipul XM 100A la pH 3,2 și 4,8 cu un timp de adsorbție de 10 min., înaintea ultrafiltrării. Se poate constata că în primele aproximativ 90 s. valorile debitului de curgere prin membrană în sistemul cu agitare sunt mai mici decât valorile obținute în absența agitării. În starea de echilibru debitul de curgere prin membrană este puțin mai mare ca valoare în cazul sistemul cu agitare, decât în cazul sistemului fără agitare, pentru aceeași valoare a pH-ului.





**Figura 5.7.** Influența agitării asupra debitului de curgere a solventului printr-o membrană de tipul XM 100A pentru un timp de adsorbție de 10 min.; soluție de albumină serică BSA 0,05%; pH 3,2 și 4,8; presiune 20 atm

Interpretarea acestor rezultate se poate face dacă se consideră existența a două straturi de proteine adsorbite pe suprafața membranei: unul puternic adsorbit și un al doilea strat, chiar deasupra primului, mai puțin adsorbit. Acest al doilea strat, mai puțin compact, va putea fi ușor îndepărtat și deci va permite un debit de curgere mai mare.

### 5.1.5. Curățarea membranei

În pofida unui control riguros al proceselor de fabricare a membranelor, există variații de la o membrană la alta în cadrul aceluiași lot. Pentru a asigura aceleași condiții inițiale este deci necesar să refolosim o membrană în cazul în care poate fi curățată suficient de bine pentru a se restabili, pe cât posibil, performanța inițială. În plus, reutilizarea membranei este deseori impusă de costul ridicat al unei noi membrane, mai ales în cazul ultrafiltrărilor ce utilizează cartușe de filtre se impune curățarea membranelor.

În ceea ce privește curățarea membranelor, trei probleme principale solicită atenție:

1. Cum ne putem asigura că membrana este curată?
2. Ar putea procedura de curățare a membranei să provoace modificări reversibile sau ireversibile ale acesteia?
3. Care este combinația optimă de procedee fizice și chimice pentru curățarea membranei?

În ceea ce privește prima întrebare, nu există un consens; răspunsurile variind în funcție de scopurile experimentului. Astfel Mc Gregor [18] consideră completă curățarea membranei, atunci când soluția rezultată în urma spălării nu mai conține, în mod repetat, proba supusă separării. Waters și Fane [10] se referă la o refacere a proprietăților inițiale ale membranei XM 100A în proporție de 95%, din punctul de vedere al restabilirii gradului inițial de retenție a solutului simultan cu refacerea permeabilității față de apă pură.

Deoarece în cazul membranelor de ultrafiltrare, caracterizate printr-o anumită distribuție a mărimii porilor, variația dimensiunii acestora afectează în mod diferit debitul de curgere a solventului și gradul de retenție a solutului, pare rezonabil să afirmăm că o membrană poate fi considerată curată doar atunci când permeabilitatea față de apă pură și caracteristicile de retenție a solutului sunt complet restabilite.

Procedeele de curățare includ tratamente chimice și fizice variate. Procedeele chimice implică, de obicei, utilizarea unei substanțe alcaline diluate, a unei soluții slab acide, tratamente cu enzime, utilizarea unei soluții de surfactant sau o combinație a acestora. Procedeele fizice se referă la spălarea cu apă de robinet sau apă distilată într-un sens și în sens contrar. Tratamentul chimic se desfășoară de obicei prin spălare într-un singur sens sau prin simpla scufundare, urmată de o spălare în sens contrar.

De asemenea trebuie supravegheată presiunea soluției de spălare astfel încât suprafața membranei să nu sufere deteriorări ireversibile.

Swaninathan [25] a observat că debitul filtrării apei pure prin membrane PM 30; XM 100A și XM 300 după scufundarea într-o soluție de agent tensioactiv neionic, a fost considerabil mai mare decât în cazul unor membrane netratate. În acest caz se consideră că umflarea membranei reprezintă unul dintre factorii care contribuie la creșterea debitului de curgere a solventului prin membrană [25]. Deși există aspecte comune între diversele procedee de curățare a membranelor, ar fi de preferat alegerea unui procedeu pe baza experiențelor de laborator directe și a indicațiilor furnizate de firma producătoare a membranei.

Un fenomen secundar îl reprezintă scăderea în timp a debitului de curgere prin membrană datorită modificărilor ireversibile din stratul polarizat (și de gel), a adsorbției moleculelor de proteină pe și în membrană și colmatării ireversibile a membranei.

Acest subcapitol s-a referit numai la ultrafiltrarea unei soluții ce conține o singură proteină. În cazul în care se are în vedere ultrafiltrarea unui amestec de proteine trebuie să se țină cont de: fenomenul de asociere a proteinelor, adsorbția competitivă pe suprafața membranei, etc.

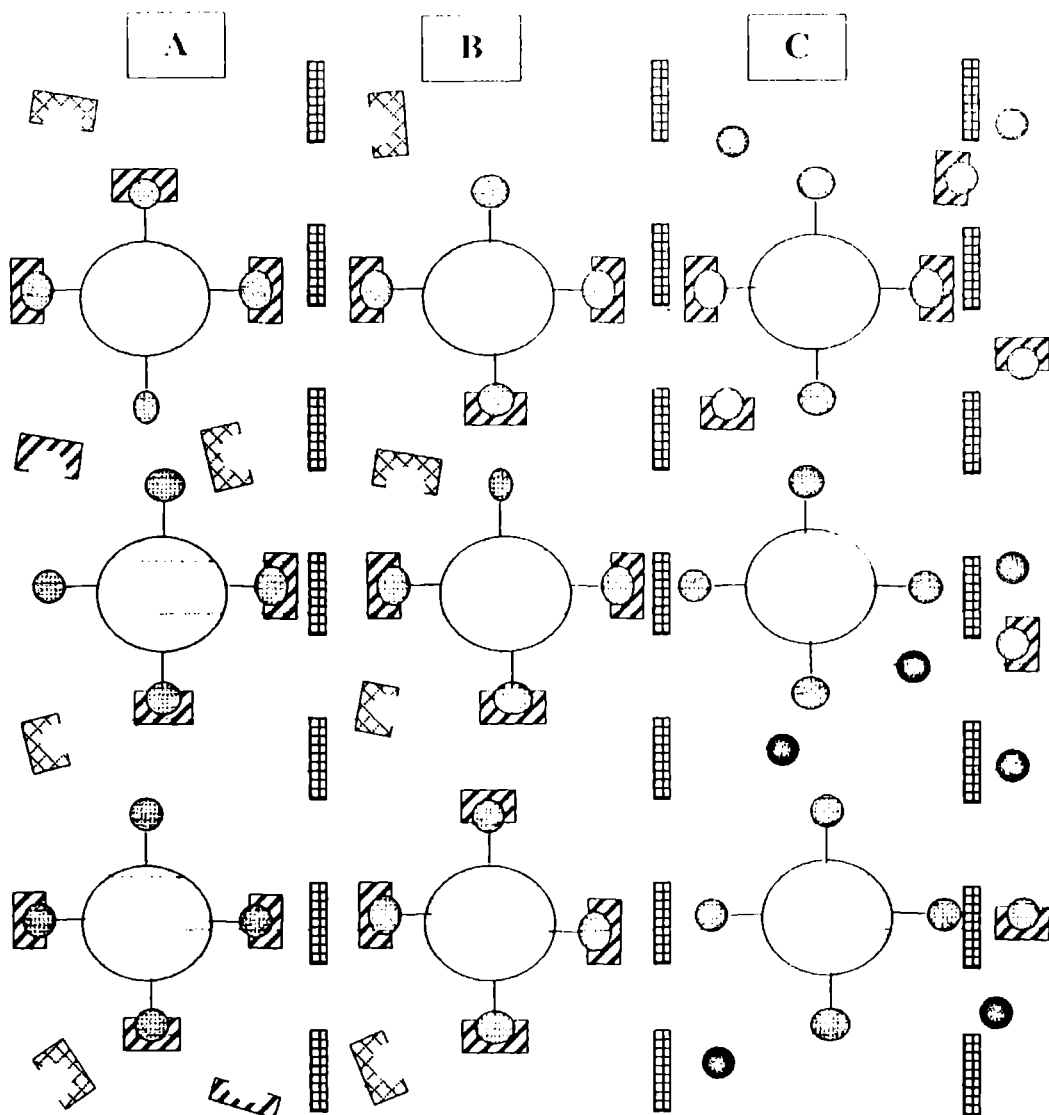
## **5.2. Purificarea compușilor biologici prin ultrafiltrarea de afinitate**

În prezent, în cadrul proceselor biotehnologice o importanță deosebită este acordată etapei de purificare a produselor rezultate. Tehnologiile de purificare la scară largă au în vedere utilizarea unor tehnici de purificare de înaltă rezoluție, astfel încât produsele obținute să se poată încadra în criteriile de calitate care sunt din ce în ce mai riguroase în prezent.

Purificarea compușilor biologici prin ultrafiltrarea de afinitate combină metodele de purificare bazate pe interacții de afinitate cu metodele de separare prin membrane. Separarea prin procese membranare are numeroase aplicații în biotehnologii. Un exemplu, din domeniul interacțiilor de afinitate, se referă la imobilizarea unui ligand pe suprafața membranei după care un pachet de astfel de membrane sunt introduse într-o coloană [26]. Astfel, este înlocuit materialul suport de afinitate cu straturi de membrane. Suprafața disponibilă în acest ultim caz este mult mai mică, determinând o capacitate de schimb scăzută. Pentru a crește capacitatea de schimb se pot imobiliza enzime pe suprafața unei membrane de ultrafiltrare [27]. În acest caz, fiecare moleculă de enzimă transformă mai multe molecule de substrat, în produs îmbunătățindu-se capacitatea catalitică. Un astfel de proces este în prezent aplicat în instalațiile pilot [28].

În ultrafiltrarea de afinitate membrana nu constituie un suport pentru ligandul macromolecular ci mai degrabă o barieră care menține ligandul numai pe o parte a membranei. Într-un astfel de aranjament sunt evitate problemele privind capacitatea scăzută și se poate pune la punct un proces de purificare pe scară largă.

O limitare tehnologică a unui astfel de proces o constituie lipsa unor membrane care să aibă capacitatea de discriminare adecvată, în funcție de masa moleculară. Principiul general al purificării de afinitate prin ultrafiltrare este prezentat în figura 5.8.

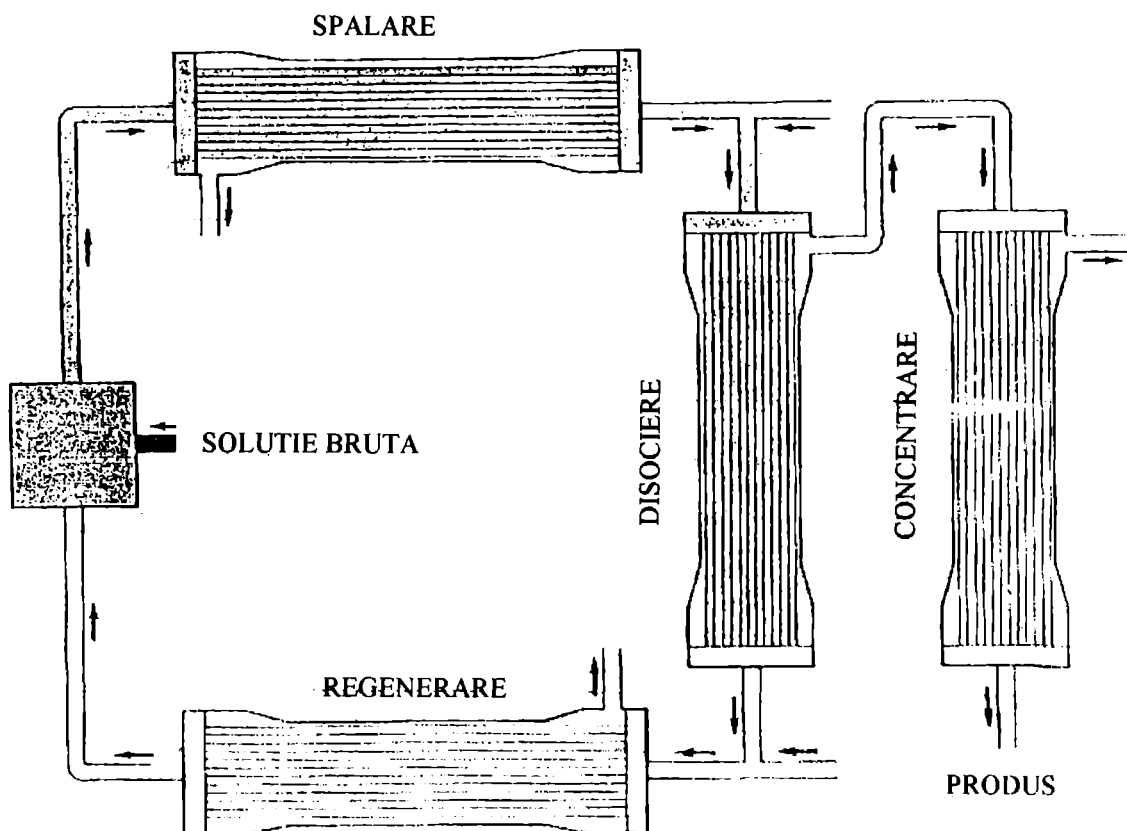


**Figura 5.8.** Principiul purificării prin ultrafiltrare de afinitate: (A) etapa de spălare, când impuritățile trec prin membrană, (B) spălare completă, și (C) disocierea materialului legat de ligandul macromolecular, mediată în acest caz de către un ligand competitor cu masă moleculară mică

Membranele utilizate au pori cu un diametru destul de mare pentru a putea permite tuturor moleculelor de proteine, prezente în probă, să treacă prin pori. Dacă se adaugă în sistem un ligand macromolecular de afinitate, acesta va reține selectiv o parte din soluții

prezenți în probă, în timp ce toate celelalte molecule vor trece prin membrană. Când etapa de spălare s-a încheiat, adică atunci când toate moleculele proteice nelegate de ligandul macromolecular sunt înlăturate, complexele de afinitate poate fi disociat iar materialul eliberat va trece prin membrană și va putea fi colectat. In faza finală, ligandul macromolecular poate fi recondiționat pentru utilizare în ciclul următor.

Procedura generală este ilustrată schematic în figura 5.9. Procesul de purificarea poate fi împărțit în patru etape experimentale distincte: administrarea probei și formarea complexului, spălare, disociere și recondiționare.



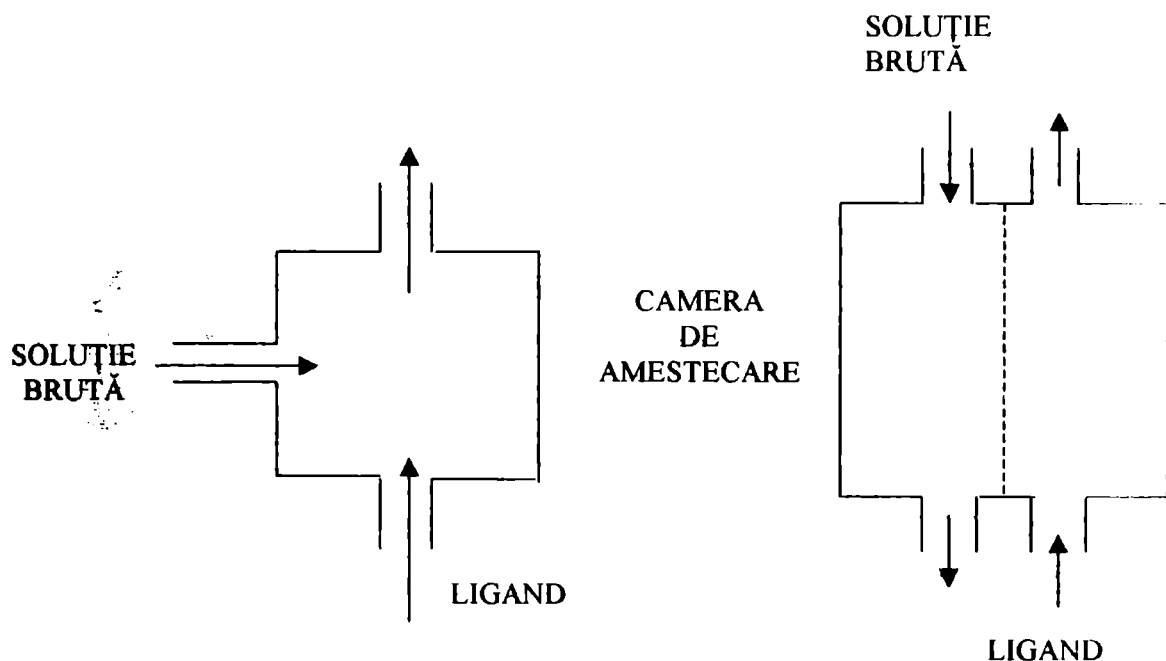
**Figura 5.9.** Reprezentarea schematică a unui proces de purificarea continuă prin ultrafiltrare de afinitate. Se aleg membrane în care porii au diametre ce permit reciclarea continuă a ligandului creându-se posibilitatea operării în sistem continuu

## 5.2.1. Etapa de administrare a probei și formarea complexului de afinitate

Administrarea probei de purificat și legarea ligandului pot fi realizate astfel:

1. Prin amestecarea soluției brute cu ligandul, realizându-se astfel legăturii de afinitate. Amestecul de reacție trebuie prelucrat în etapa următoare, de spălare;
2. Prin pomparea celor două soluții, soluția brută și respectiv ligandul macromolecular, fiecare pe câte o parte a membranei, permițându-se astfel formarea complexului între ligand și moleculele care trec prin membrană. Metoda se numește diafiltrare.

Cele două metode sunt prezentate schematic în figura 5.10.



**Figura 5.10.** Modalități de administrare a probei de purificat și a ligandului:

(A) amestecare și (B) diafiltrare

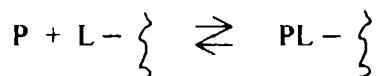
Alegerea unei metode este depinde de procesul studiat. Dacă o substanță trebuie purificată dintr-un amestec omogen, fără nici o particularitate, se va alege prima variantă. Această metodă necesită ca particulele solide existente să fie înlăturate, înaintea începerii purificării.

Cea de-a doua metodă presupune o abordare mult mai generală. În acest caz membrană poate fi considerată ca o barieră protectoare care îndepărtează alți agenți de legare

posibili. Această metodă poate fi folosită pentru separarea continuă a unei substanțe din amestecuri complexe de compuși biologici.

### 5.2.2. Etapa de spălare

Etapa de spălare nu ar trebui să dureze prea mult pentru a evita disocierea și pierderea substanțelor proteice legate. Interacția dintre ligand (L) și molecula care trebuie purificată (P) poate fi prezentată în mod schematic, astfel:



Molecula P este prea mică pentru a fi reținută de membrană și va fi deci îndepărtată prin spălare, echilibrul fiind deplasat spre stânga. Este deci de dorit să se folosească membrane cu flux mare și liganzi macromoleculari de afinitate care au mase moleculare mult mai mari decât substanțele care trebuie îndepărtate. O altă alternativă pentru optimizarea procesului de interacție ar fi utilizarea liganzilor care formează legături puternice cu moleculele de interes. Astfel pierderea moleculelor P este redusă la minim.

În figura 5.11. este prezentată schematic o instalație experimentală de purificare prin ultrafiltrarea de afinitate, utilizată pentru monitorizarea procesului de spălare. Sistemul ales drept model este următorul:



în care albumina (BSA) este considerată a fi ligandul cu masă moleculară mare (L) care se leagă de substanța (P), verdele de bromcrezol.

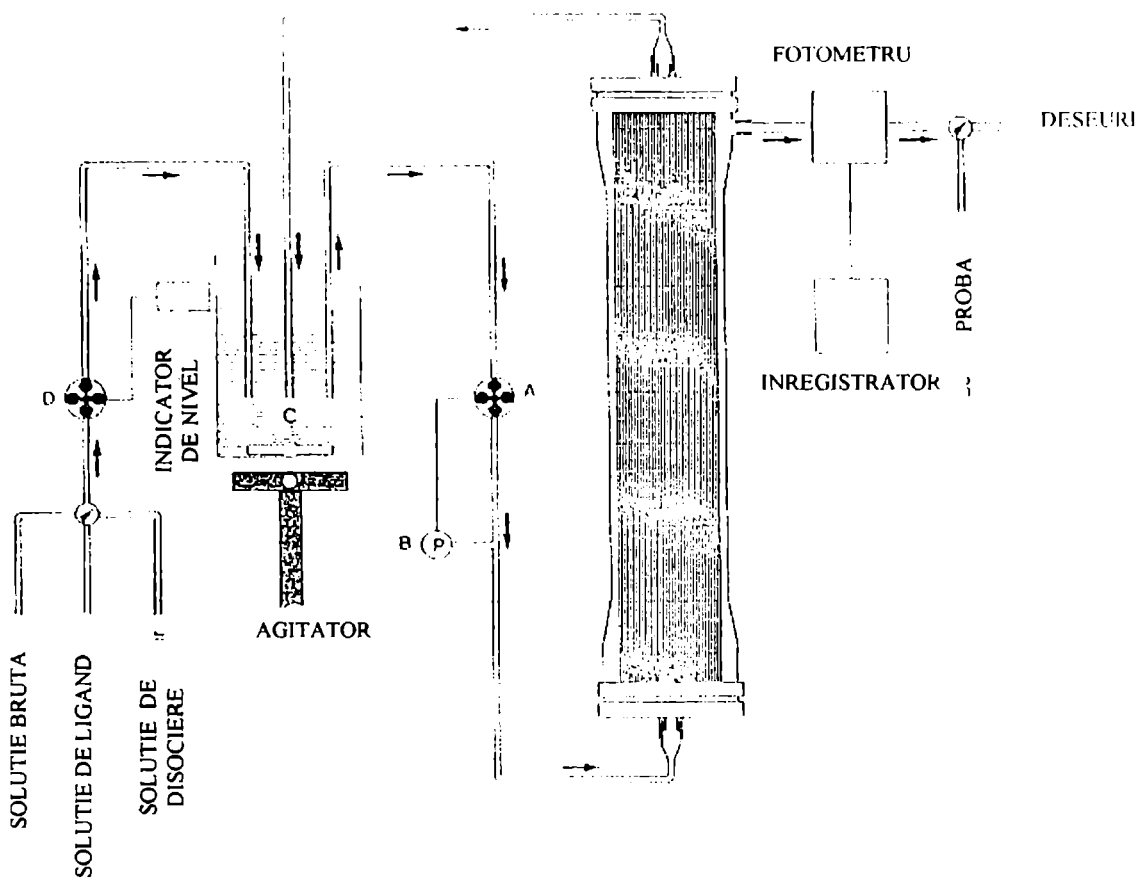
Concentrația C de verde de bromcrezol transportat prin membrană, la momentul t poate fi exprimată astfel:

$$C = C_0 e^{-kt}$$

unde k este o constantă.

Pentru a facilita reprezentarea grafică ecuația de mai sus se poate scrie sub formă logaritmică:

$$\ln C = \ln C_0 - kt$$



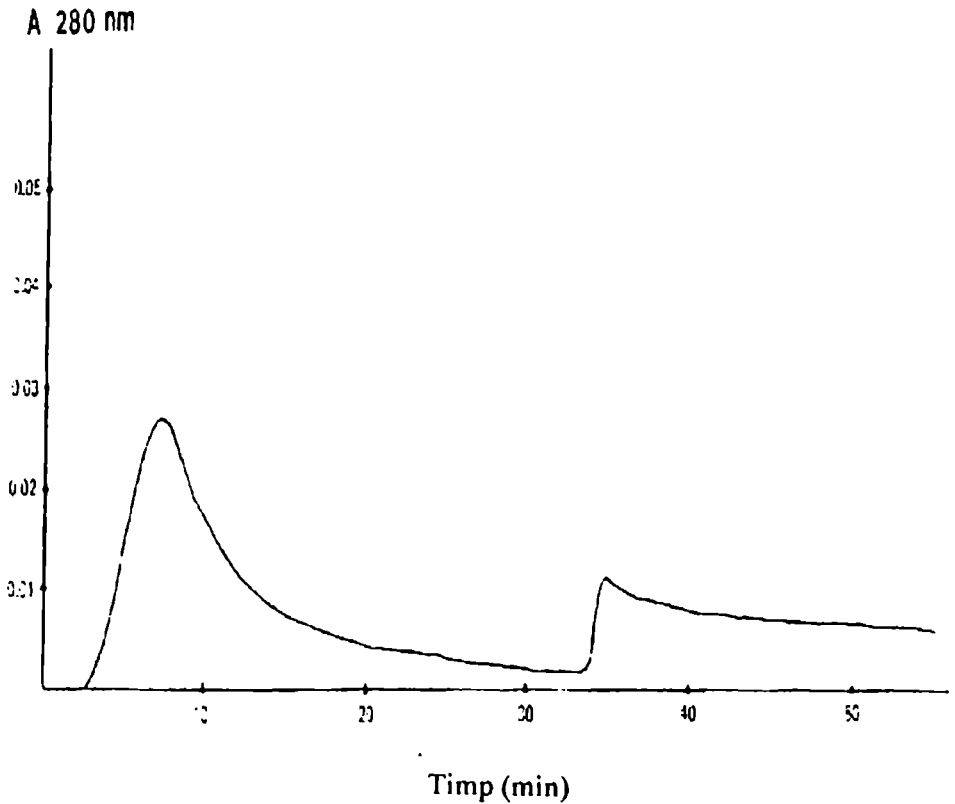
**Figura 5.11.** Instalație de purificare prin ultrafiltrare de afinitate. Curgerea este controlată de o pompă (A), care poate fi închisă dacă presiunea atinge o valoare prestabilită (B). Soluția este recirculată către rezervorul (C). Prin intermediul pompei cu valve (D) se pot introduce în sistemul de filtrare proba și reactivii.

Curba de eluție pentru sistemul albumină-verde de bromcrezol este prezentată în figura 5.12.

Membrana utilizată are un indice de separare de 35.000. Deoarece masa moleculară a albuminei este aproape dublă, se poate presupune că nu există pierderi prin membrană. Totuși ar trebui să luăm în calcul că dublarea masei moleculare pentru o proteină globulară conduce



la o creștere a diametrului molecular doar cu un factor de  $\sqrt{2}$ . Din acest motiv producătorii membranelor prevăd posibilitatea unei pierderi prin membrană de cel mult 10%. Pierderea ligandului prin membrană, în etapa de spălare, poate fi compensată prin reducerea timpului de lucru și deci reducerea pierderilor datorate disocierii. O îmbunătățire și mai mare ar putea fi realizată prin utilizarea unui ligand cu masă moleculară mult mai mare.



**Figura 5.12.** Curba de eluție pentru sistemul albumină-verde de bromcrezol. Inițial colorantul nelegat este îndepărtat prin spălare, obținându-se primul pic. Când spălarea s-a terminat, soluția tampon este înlocuită pentru a se asigura condițiile de disociere, observându-se cel de al doilea pic.

### 5.2.3. Etapa de disociere a complexului de afinitate

Disocierea complexului de afinitate PI și eluția lui P reprezintă una dintre etapele critice din întregul proces de purificare, deoarece trebuie alese condițiile de lucru favorabile

pentru conservarea atât a activității biologice a biomoleculelor cât și a caracteristicilor operaționale ale membranei.

Eluția poate fi realizată:

- (i) prin folosirea unui ligand competitiv pentru a disocia P și L, sau
- (ii) prin eluția nespecifică a compusului P din L prin modificarea pH-ului, a tăriei ionice a soluției, etc.

Prima alternativă este atractivă deoarece nu produce modificări semnificative în procesul de formare a complexului (a legăturii dintre L și P) și deci conservă activitatea biologică a moleculelor P. Această metodă, presupune condiții chimice neagresive și deci nu va influența negativ parametrii operaționali ai membranei. Printre dezavantaje putem enumera două: (a) prețul de cost ridicat datorat folosirii unui ligand de afinitate competitiv și (b) faptul că compusul P este contaminat cu ligandul liber.

Eluția nespecifică este un procedeu mult mai ieftin, dar poate afecta considerabil atât activitatea biologică a compușilor supuși purificării cât și proprietățile membranei. În cazul acestei metode un dezavantaj îl reprezintă faptul că compușii utilizați pentru disocierea complexului pot contamina proba. De aceea este foarte important să se aleagă cu grijă condițiile de lucru; de exemplu revenirea la condițiile inițiale prin modificarea pH-ului sau utilizarea unor membrane mult mai rezistente la diverșii agenți chimici utilizați.

Un alt dezavantaj al acestei metode îl reprezintă interacțiile de asociere dintre P și L care sunt caracterizate prin constante de asociere cu valori foarte mari. De exemplu, pentru complexul avidină - biotină, constanta de asociere are valoarea  $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ .

În cazul sistemului albumină - verde de bromcrezol, în care albumina are rolul ligandului de afinitate cu masă moleculară mare iar verdele de bromcrezol este substanța de purificat, pentru disocierea complexului se realizează eluția cu un ligand cu proprietăți mixte: parțial capabil de competiție directă, parțial acționând ca un disociant nespecific al albuminei.

#### **5.2.4. Etapa de recondiționare**

După etapa de disociere, ligandul macromolecular de afinitate eluat poate fi refolosit în următorul ciclu de purificare, după ce a fost recondiționat. Recondiționarea se poate realiza tot printr-un proces membranar în care soluția tampon ce conține ligandul competitiv este înlocuită cu una proaspătă ce conține ligandul macromolecular de afinitate. De asemenea pentru concentrarea soluției, ce conține ligandul macromolecular de afinitate, se pot utiliza o

serie de alte membrane care pot elimina, pe principiul excluziunii sterice, atât ligandul competitiv liber cât și apa.

### 5.2.5. Purificarea Concanavalinei A din *Canavalia ensiformis*

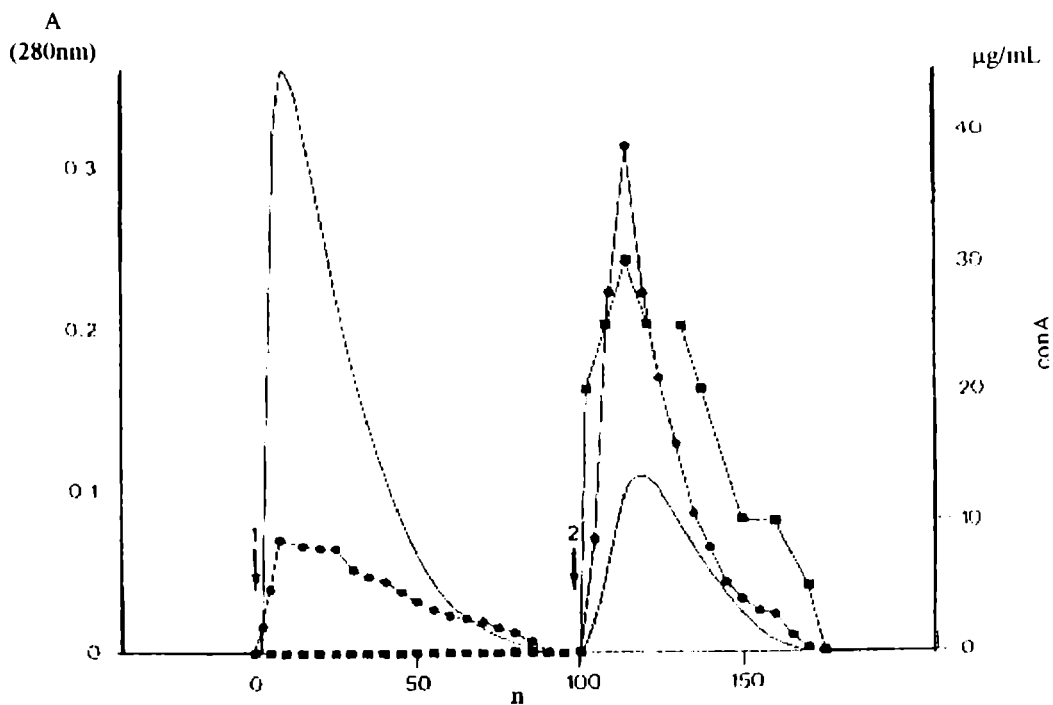
În vederea obținerii unui amestec omogen de probă se macină și înmoaie în apă boabele de fasole (*Canavalia ensiformis*). Pentru purificare se utilizează o soluție limpede. Ligandul de afinitate pentru concanavalina A (conA) poate fi dextran solubil T-2000 ( $M=2 \times 10^6$ ) sau celule de drojdie, *Saccharomyces cerevisiae* (cu un diametru mediu de 5  $\mu\text{m}$ ), dezactivate la temperatură. Ambii liganzi conțin reziduuri de zaharoză la care se poate lega lectina.

Membranele utilizate în acest proces de purificare pot separa compuși cu mase moleculare cuprinse între 300.000–1.000.000. Concanavalina A are masa moleculară 102.000 și nu este reținută de membrană atunci când este în forma liberă. În urma legării de ligand se formează un complex macromolecular care nu trece prin membrană.

Diferența dintre dimensiunile moleculelor de conA și cele ale dextranului nu este suficient de mare pentru a putea permite o separare adecvată. De aceea se utilizează drept ligand macromolecular drojdia iar curba de eluție este cea prezentată în figura 5.13. Eluția conA se realizează cu glucoză drept ligand competitiv. Pentru a împiedica metabolizarea glucozei de către drojdie, aceasta se dezactivează prin încălzire, reducându-se totodată riscul introducerii în mediu a proteazelor microbiene.

Concanavalina A purificată prin această metodă este analizată atât din punctul de vedere al purității ( metoda imunologică) cât și al activității biologice (abilitatea de a aglutina globulele roșii). Din figura 5.13. se poate observa că prima fracție conține conA care reacționează cu anticorpii anti-conA dar nu prezintă capacitate de aglutinare. Cea de-a doua fracție obținută în urma eluării cu glucoză prezintă ambele proprietăți și reprezintă un amestec omogen din punct de vedere electroforetic cu o puritate mai mare decât preparatele comerciale.

Randamentul purificării prin ultrafiltrare de afinitate a concanavalinei A este de 70% iar capacitatea sistemului de 1g/oră proteină pură.



**Figura 5.13.** Curba de eluție obținută în cazul purificării concanavalinei A prin ultrafiltrarea de afinitate. Primul pic corespunde eliminării prin spălare a materialului nelegat de reziduurile de zaharoză; cel de al doilea pic corespunde eluării cu glucoză 0,5 M. Frațiile au fost colectate, dializate și analizate din punctul de vedere al conținutului în conA (●) și al activității biologice (■).

### 5.2.6. Purificarea alcool dehidrogenazei din drojdia de bere

Alcool dehidrogenaza (ADH) prezentă în extractul brut de drojdie de bere (*S. cerevisiae*) poate fi purificată având la bază interacția dintre albastru de Cibacrom și enzime. Ligandul de afinitate folosit este mai întâi immobilizat pe granulele de amidon care se cuplează ușor cu ligandul. Particulele de amidon modificate cu albastru de Cibacrom se adaugă amestecului omogen de drojdie de bere. Pentru filtrare se utilizează sistemul prezentat în figura 5.11. Membranele utilizate permit separarea unor compuși cu masa moleculară 500.000. Conținutul de alcool dehidrogenază din efluentul de spălare este monitorizat cu un detector UV. Disocierea ADH-ului din complex se face prin creșterea tăriei ionice a soluției

Purificarea ADH din drojdia de bere prin ultrafiltrarea de afinitate se poate realiza și într-un proces continuu. Principiul unui astfel de proces a fost prezentat în figura 5.9. Cel mai important avantaj al unui astfel de proces îl reprezintă faptul că sistemul este ușor de controlat cu ajutorul unui calculator eliminându-se astfel diferențele de eficiență dintre etapele filtrării.

### 5.3. Procesarea plasmei sanguine prin electrodiализă

O concepție de bază a chimiei proteinelor se referă la înțelegerea comportamentului proteinelor izolate care trebuie studiate în stare nativă. De exemplu, în cazul proteinelor din plasma sanguină implicate în procesele de hemostază, procese inflamatorii sau în mecanismele de apărare ale organismului. Aceste proteine sunt prezente în sânge în concentrații mai mici de 1mg/mL în formă de zimogen sau preactivată și care trec într-o formă biologic activă *in vivo* sub acțiunea unor stimulenți adecvați [29].

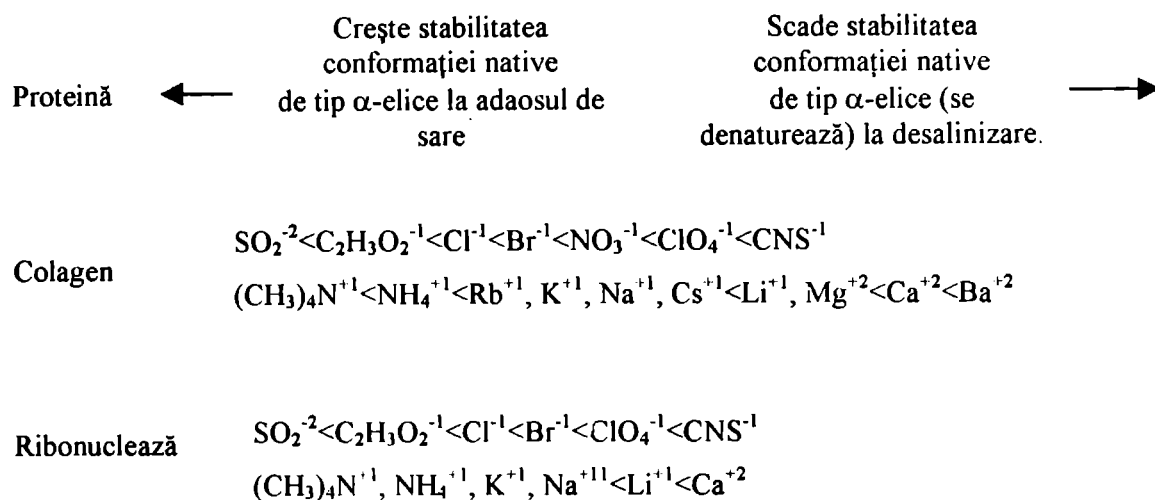
Acest capitol se referă la separarea componentelor proteice eterogene și/sau instabile din plasma umană prin precipitare izoelectrică. Precipitarea izoelectrică se realizează prin electrodiализă de-a lungul unor membrane ion-selective semipermeabile.

În soluție apoasă proteinele sunt amfioni și formează legături atât cu moleculele de apă cât și cu ceilalți ioni prezenți în soluție. În determinarea experimentală a densităților proteinelor se presupune de obicei că moleculele de apă legate sunt similare cu moleculele de apă obișnuită, dar analizele cristalografice cu raze X ale proteinelor au demonstrat că acest lucru nu este adevărat [30,31]. Richards și Richmond au sugerat că moleculele de apă legate de proteine și prezente în situsurile active pot fi înlocuite mult mai ușor decât moleculele de apă obișnuită și deci acestea contribuie în mod semnificativ la energia de legătură a ligandului [32].

Ionii ce provin de la o sare neutră, prezenți în soluție, protejează grupările încărcate electric ale proteinelor influențând astfel interacțiile electrostatice dintre aceste grupări. Acest efect apare pentru concentrații mici de săruri, cum ar fi concentrațiile corespunzătoare sărurilor fiziologice și pentru tării ionice caracteristice pentru determinării *in vitro* (0,05-0,2 și chiar mai mici de 0,02  $\mu$ ).

Sărurile neutre pot determina stabilitatea unei anumite conformații a proteinelor, cum ar fi conformația nativă de tip  $\alpha$ -elice [33]. Efectul de stabilizare urmează seria clasică Hofmeister care ordonează eficacitatea diverșilor ioni pentru stabilizarea conformației de  $\alpha$ -elice a proteinelor [34].

Pe de altă parte, creșterea solubilității determină scăderea stabilității. Solubilitatea în apă a proteinelor se datorează solvatării grupelor cu sarcină ionică,  $\text{COO}^-$  și  $\text{NH}_4^+$  [35]. Solvatarea (hidratarea) grupelor polare explică cantitățile mari de apă (30-60% din greutatea lor) conținute în proteinele pure, chiar cristalizate. Efectele diferitelor tipuri de ioni asupra proteinelor sunt rezumate în figura 5.14.



**Figura 5.14.** Seriile Hofmeister: ordonarea diferitelor tipuri de ioni în funcție de efectul structurii proteinelor, în sensul menținerii respectiv modificării conformației native de tip  $\alpha$ -elice.

Precipitarea fracționată a proteinelor din plasma sanguină prin controlul tăriei ionice și a pH-ului se bazează pe proprietățile de solubilitate a proteinelor, prezentate anterior și reflectă echilibrul dintre grupările hidrofile și hidrofobe din moleculă. Relația dintre solubilitatea unei proteine și tăria ionică este exprimată prin formula de mai jos:

$$\log S = -K_s \cdot I$$

unde **S** reprezintă solubilitatea, **I** tăria ionică și **K<sub>s</sub>** este coeficientul de desalinizare care depinde de pH și de temperatură. Dependența desalinizării de valoarea pH-ului reflectă faptul că o proteină prezintă insolubilitate maximă într-un mediu fără electrolit la pH-ul său izoionic *pH-ul*

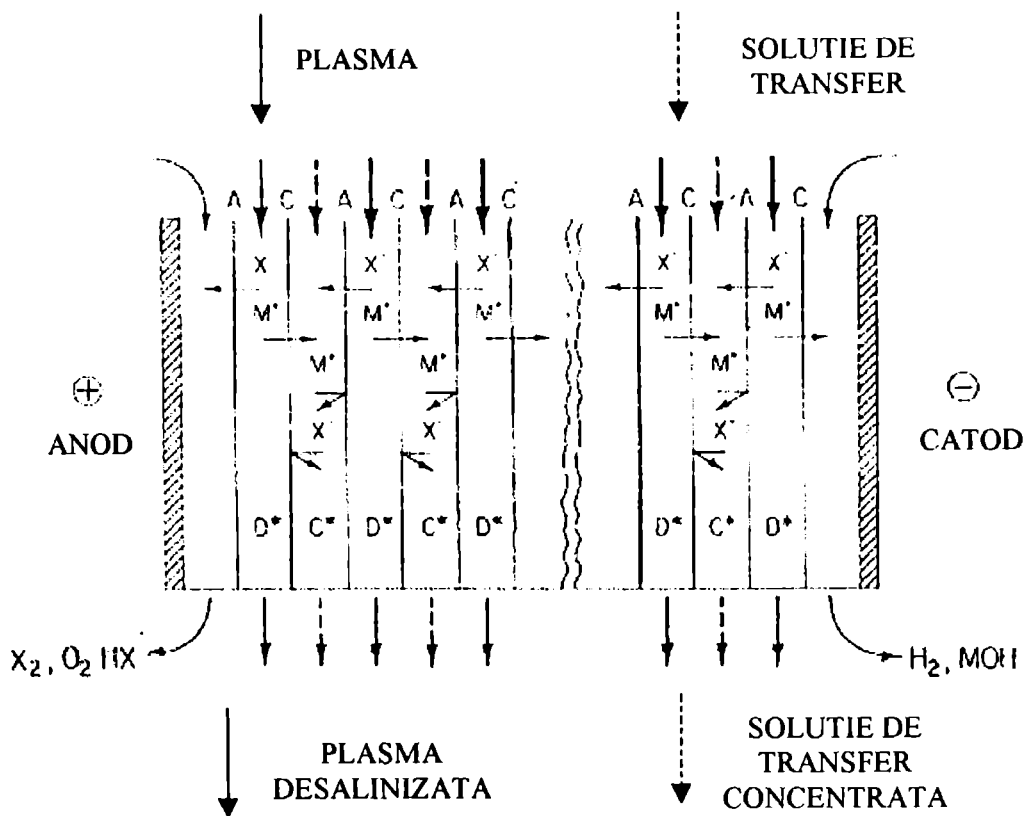
*izoionic* se definește ca fiind pH-ul unei proteine într-un mediu fără electrolit. El se deosebește de pH-ul izoelectric, definit ca pH-ul la care sarcina electrică a unei proteine este zero. Cele două pH-uri nu sunt în mod necesar identice pentru o proteină dată [30].

Acest fenomen este cunoscut sub denumirea de precipitare izoelectrică. S-a observat că o proteină poate fi solubilă într-un mediu caracterizat prin tărie ionică scăzută, cu condiția ca pH-ul să nu aibă o valoare apropiată de valoarea pH-ului izoionic [29].

Precipitarea reversibilă a proteinelor din soluție, cu soluții concentrate de electroliți *salinizarea*, se datorează tendinței puternice a ionilor electrolitului de a se hidrata, apa necesară pentru aceasta fiind cedată de proteină, care ne mai dispunând de suficient dizolvant precipită: proteina precipitată se redizolvă însă dacă de îndepărtează electrolitul (de exemplu, prin dializă). Electrodializa este superioară dializei deoarece asigură o eliminare mai rapidă și mai completă a electroliților.

Electrodializa reprezintă procesul în care ionii sunt transportați dintr-o soluție prin membrane cu permeabilitate selectivă într-o altă soluție, prin aplicarea unui potențial electric. Membranele conțin grupări schimbătoare de ioni ca au sarcină electrică fixă, pozitivă sau negativă. Membranele anionice încărcate pozitiv permit trecerea anionilor și resping cationii. Membranele cationice încărcate negativ permit trecerea cationilor și resping anionii. Atunci când se aplică un curent electric de-a lungul unei membrane cu proprietăți schimbătoare de ioni introdusă în soluția unui electrolit, curentul electric rezultat va trece doar prin intermediul ionilor care au o sarcină opusă sarcinii membranei. Din acest motiv cartușele de membrane permeabile pentru cationi și anioni pot concentra sau dilua alternativ electroliții din soluțiile cu care intră în contact (figura 5.15.) [36]. O celulă conține două membrane cationice și o membrană anionică.

În electrodializă, spre deosebire de dializa directă, se poate vorbi mai degrabă de o deplasare a ionilor decât de una a electroliților. În dializă diferențele dintre concentrațiile substanțelor de-a lungul membranelor semipermeabile determină concentrația finală a ionilor. În electrodializă gradul de deionizare a unei soluții este proporțional cu curentului electric, care la rândul său este limitat de rezistența electrică a membranelor. Mai mult, electrodializa reprezintă o curgere printr-un sistem fără filtre care ar putea genera modificarea presiunii sau a vitezelor de curgere. Indicele de excludere a membranelor folosite în electrodializa plasmei sanguine variază în jurul valorii de 10 000, astfel încât să nu existe o pierdere însemnată de proteine.



**Figura 5.15.** Reprezentarea schematică a unui aparat pentru electro-dializă folosit la deionizarea plasmei sanguine: A, membrană pentru transfer de anioni; C, membrană pentru transfer de cationi; X<sup>-</sup>, anion; M<sup>+</sup>, cation; D\*, celulă pentru desalinizarea plasmei; C\*, celulă pentru concentrare.

Electrodializa prin membrane schimbătoare de ioni (EDIM-electrodialysis across ion exchange membrane) realizată cu viteze mari de agitare determină scăderea potențialului membranei (5-10 V), nu produce modificări ale pH-ului ca urmare a acumulării ionilor și permite un control riguros al procesului de deionizare. De asemenea în EDIM ca și în dializa directă, pH-ul final este determinat de pH-ul izoionic ale proteinelor care rămân în soluție.

În ultimii ani s-a dezvoltat foarte mult plasmaforeza ca terapie pentru înlăturarea factorilor toxici umorali [37]. Se manifestă două preocupări principale: una vizează consecințele



nedeterminate ale eliminării continue ale componentelor proteice din plasma normală împreună cu substanța nedorită iar cea de a doua vizează natura fluidului de înlocuire. Dacă drept lichid înlocuitor se folosește plasma normală există riscul producerii unor reacții de hipersensibilitate sau a hepatitei. Soluția de albumină serică constituie un fluid înlocuitor mult mai sigur dar foarte costisitor. De aceea s-au făcut eforturi pentru punerea la punct a unor metode care să permită reținerea proteinelor din plasma normală în plasma ce trebuie înlocuită. Astfel s-ar putea utiliza ca lichid de înlocuire chiar plasma pacientului. În acest sens cercetările au fost orientate spre obținerea unor adsorbanți selectivi în vederea eliminării, în timpul plasmaforezei, a proteinelor nedorite [38,39].

Utilizarea electrodializei prin membrane ion selective (EDIM) în procesarea plasmei permite reținerea albuminei precum și altor proteine în timp ce sunt înlăturate parțial imunoglobulina G (IgG) și în totalitate complexii imunoprecipitați și IgM. Ultimele două sunt relativ insolubile în soluții caracterizate prin tării ionice scăzute.

Efectele electrodializei plasmei colectată de la pacienții ce sufereau transfuzii terapeutice de plasmă a fost examinat pe probe de 200-300 mL plasmă [40]. S-au procesat prin EDIM următoarele tipuri de plasmă provenind de la pacienți, dintre care: 12 cu myasthenia gravis, 4 cu sindrom Guillain-Barré, 2 cu artrită reumatică, 3 cu lupus erythematosus, 3 cu hipergamaglobulinopatii și 1 cu mielită acută. Un eșantion de plasmă de 100 mL adus la temperatura de 15<sup>0</sup>C a fost electrodializat în condiții în care pH-ul plasmei a scăzut treptat până la 5. Pentru toate eșantioanele s-au făcut următoarele analize: cantitatea totală de proteine, albumină, IgG, IgM, IgA, și complecși imuni [40]. Rezultatele sunt similare atât pentru plasma patologică cât și pentru cea normală. Prin electrodializă se elimină complecșii imuni (acolo unde au existat), o parte din IgG și o mare cantitate din IgM, păstrându-se o mare parte din albumină și cantități variabile din alte proteine plasmatică. Rezultatele obținute indică faptul că tipurile de plasmă specifice diferitelor boli se comportă diferit. De asemenea sugerează că electrodializa prin membrane schimbătoare de ioni poate fi adaptată la terapia curentă de transfuzie a plasmei sanguine. Aparatul de electrodializă funcționează la fel de bine la temperaturii cuprinse între 0 și 37<sup>0</sup>C.

Considerentele prezentate arată că electrodializa prin membrane schimbătoare de ioni reprezintă o modalitate practică de a aplica precipitarea izoelectrică în izolarea componentelor prezente în urme în plasma sanguină [41].

## Bibliografie

1. W. F. Blatt, A. Dravid, A. S. Michaels și L. Nelsen, în *Membrane Science and Technology*, (J. E. Flinn, ed.), Plenum, New York, 1970, 47.
2. W. F. Blatt, în *Membrane Separation Processes* (P. Mears, ed.), Elsevier, New York, 1976, 81.
3. V. L. Wilker, C. K. Colton și K. A. Smith, *AIChE J.*, 1981, 27, 632.
4. V. L. Wilker, C. K. Colton și K. A. Smith, *AIChE J.*, 1981, 27, 637.
5. A. S. Michaels, *Chem. Eng. Prog.*, 1968, 64, 31.
6. J. A. G. Weldring, B. Gaakeer și K. Vant't Riet, *Summer AIChE National Meeting*, Denver, Colorado, august 30, 1983, 61g.
7. A. G. Fane, C. J. D. Fell și A. G. Waters, *J. Membrane Sci.*, 1981, 9, 245.
8. T. Swaminathan, M. Chaudhuri și K. K. Sirkar, *86th AIChE National Meeting of the AIChE*, - houston, Texas, april 2, 1979, 8b.
9. T. Swaminathan, M. Chaudhuri și K. K. Sirkar, în *Ultrafiltration Membranes and Applications* (A. R. Cooper, ed.), Plenum, New York, 1980, 247.
10. A. G. Waters și A. G. Fane, *J. Appl., Polym. Sci.*, 1981, 26, 3007.
11. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr și R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
12. J. L. Bailey, *Techniques in Protein Chemistry*, Elsevier, London, 1967, 340.
13. T. Swaminathan, M. Chaudhuri și K. K. Sirkar, *J. Appl., Polym. Sci.*, 1979, 24, 1581.
14. *Amicon Selection Guide and Catalog*, publicația nr. 426B, Amicon Corporation, Lexington, Mass., 1972.
15. K. C. Ingham, T. E. Busby, Y. Sahlestrom și F. Castino, în *Ultrafiltration Membranes and Applications* (A. R. Cooper, ed.), Plenum, New York, 1980, 141.
16. T. F. Busby și K. C. Ingham, *Biophys. J.*, 1979, 25, 241.
17. *Amicon Technical Data*, publicația nr. 457D, Amicon Corporation, Danvers, Mass., 1980.
18. K. S. Kamalesch și R. Prasad, în *Membrane Separation in Biotechnology*, (W. Courtney și Mc. Gregor, eds.), Marcel Dekker, New York, 1986, 27.
19. A. D. McLaren, *J. Phys. Chem.*, 1954, 58, 129.
20. E. I. F. Pearce și B. G. Bibby, *Arch. Oral Biol.*, 1966, 11, 329.
21. W. J. Dillman și J. F. Miller, *J. Colloid Interface Sci.*, 1983, 44, 221.
22. T. Swaminathan, M. Chaudhuri și K. K. Sirkar, *Biotechnol. Bioeng.*, 1981, 23, 1973.
23. A. J. Dileo, K. A. Smith și C. K. Colton, *J. Colloid Interface Sci.*, 1989, 50, 245.

24. R. W. Watkins și C. R. Robertson, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1977**, 11, 915.
25. T. Swaminathan, M. Chaudhuri și K. K. Sirkar, *J. Colloid Interface Sci.*, **1980**, 76, 573.
26. B. Mattiasson and M. Ramstorp, *J. Chromatogr.*, **1984**, 283, 322.
27. B. Mattiasson, T. G. I. Ling and J. L. Nilsson, în *Symposium on Affinity Chromatography and Biological Recognition* (I. M. Chaiken, M. Wilchnek și I. Parikh, eds.), Academic Press, New York, **1984**, 233.
28. B. Mattiasson and M. Ramstorp, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1983**, 413, 307.
29. F. W. Putman, *Progress in Clinical and Biological Research*, Liss, New York, **1975**, 5, 11.
30. H. E. Skultze și J. F. Heremans, în *Molecular Biology of Human Proteins*, Elsevier, Nae York, **1966**, 236.
31. C. R. Cantor și P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry*, (Freeman, ed.), San Francisco, **1980**, 280.
32. F. M. Richards și T. Richmond, *Molecular Interaction and Activity in Ptoteins Structure*, Excerpta Medica, New York, **1978**, 23.
33. R. H. Haschmeyer și A. E. V. Haschmeyer, *Proteins: A Guide to Studz bz Phzysical and Chemical Methods*, Wiley, New York, **1973**, 368.
34. P. H. von Hippel și T. Schleich, în *Biological Macromolecules*, (G. Fasman și C. Timashell, eds.), Marcel Dekker, New York, **1969**, 417.
35. P. H. von Hippel, în *Protein Interactions* (H. Sund și G. Blaner, eds.), de Grutyer, New York, **1975**, 452.
36. S. M. Jain, *Am. Lab.*, **1976**, 70, 112.
37. G. J. Nemo și H. Taswell, *Proceeding of the Workshop on Therapeutic Plasmapheresis and Cytophoresis*, NIH Publication nr. 82-1665, **1981**, 1.
38. S. C. Bansal, B. R. Bansal, J. E. Rhoads, D. R. Cooper, J. P. Boland și R. Mark, *Int. J. Intern. Organs.*, **1978**, 1, 94.
39. B. E. Boutke, I. K. Moss, P. Mumfors, A. Horsfall și R. N. Maini, *Clin. Exp. Immunol.*, **1982**, 48, 726.
40. D. H. Bing, A. C. DiDonnon și M. Regan, în *Membrane Separation in Biotechnology*, (W. Courtney și Mc. Gregor, eds.), Marcel Dekker, New York, **1986**, 135.

## VI. Procese membranare utilizate în prelucrarea alimentelor

Procesele membranare utilizate în prelucrarea alimente, precum ultrafiltrarea, osomoza inversă și electrodializa sunt nedestructive păstrând calitățile de bază ale acestora.

Lonsdale [1] menționează, pentru prima dată, utilizarea proceselor de separare prin membrane pentru obținerea unei băuturi alcoolice: în 1784 un călugăr francez a realizat un experiment cu un sortiment de vin păstrat într-un butoi a cărui deschidere era acoperită cu o bășică de animal. De atunci cercetările teoretice și practice privind ultrafiltrarea și osmoza inversă a alimentelor lichide sau extins continuu [2-4].

Transferul proceselor de ultrafiltrare și de osmoză inversă din laborator, unde reprezentau instrumente de studiu pentru biochimisti, în stațiile pilot și la scară industrială ca suport în procesul de prelucrare a alimentelor este relativ recent. În 1965 au fost operaționale instalațiile de separare prin membrane a glucidelor, iar la scurt timp după aceea au fost publicate numeroase studii cu privire la prelucrarea zerului, sucurilor de fructe și a albușului de ou [5-8]. După de Boer și Hiddinik [9] prima instalație industrială pentru prelucrarea zerului bazată pe procesele de separare prin membrane a fost realizată în Noua Zeelandă în 1971. Începând cu anii '70 tehnologia separării prin membrane s-a răspândit treptat pe plan mondial. Publicațiile științifice din domeniu au fost orientate în două direcții: dezvoltarea unor noi tipuri de membrane și punerea la punct a unei strategii de cercetare (tabelul 1). Între anii 1979 și 1983 s-au publicat peste 200 de articole științifice. Această expansiune fiind reflectată în același timp și de producția industrială de membrane (tabelul 2).

Ultrafiltrarea alimentelor lichide la temperaturii și presiunii scăzute permite separarea componentele moleculare grele de cele ușoare și permite acestora din urmă să treacă prin membrane odată cu apa. În cazul în care presiunea osmotică din sistem nu este mare, aceasta nu va avea un rol important. Adeseori pentru a descrie mecanismul implicat în ultrafiltrare se utilizează sintagma de “cernere ca printr-o sită”. Alimentele lichide curg peste membrană, de-a lungul acesteia și nu direct prin membrană. Această curgere paralelă împiedică formarea unor zone de concentrații diferite care ar putea afecta permeabilitatea membranei ca urmare a formării, pe suprafața acesteia, a unui strat de lichid de concentrație diferită.

Membranele de ultrafiltrare sunt proiectate să rețină substanțele și componentele dizolvate în funcție de dimensiune și masa moleculară. În procesele de ultrafiltrare din industria alimentară se utilizează adeseori, membrane ce pot separa compuși cu mase moleculare cuprinse între 10.000 și 20.000.

**Tabelul 1.** Repartiția articolelor științifice privind utilizarea proceselor de separare membranară la prelucrarea alimentelor, în perioada 1979-1983.

Domenii de prelucrare a alimentelor	Număr de articole	
	Ultrafiltrare	Osmoză inversă
<i>Lapte și produse lactate</i>		
Brânză	53	3
Zer	40	13
Lapte	25	5
Alte produse	12	6
Total	130	27
<i>Alte alimente</i>		
Sucuri de fructe	17	9
Proteine	17	1
Vin	2	4
Ouă	2	0
Zahăr	4	0
Total	42	14

Retenția unor componenți și trecerea altora în timpul procesului de ultrafiltrare directă determină concentrarea selectivă. De exemplu, apa și o parte din componentele din lapte cum ar fi lactoza, sărurile solubile și azotul neaproteic trec prin membrană, la presiune joasă, obținându-se un filtrat limpede. Grăsimile, proteinele și sărurile insolubile sunt reținute într-un rezervor formând un lichid concentrat.

**Tabelul 2.** Numărul, suprafața și aplicațiile membranelor de ultrafiltrare, în perioada 1977-1983.

Aplicații	Europa			America de Nord		
	Nr. de fabrici	Nr. de cartușe de membrane de ultrafiltrare	Suprafața (m <sup>2</sup> )	Nr. de fabrici	Nr. de cartușe de membrane de ultrafiltrare	Suprafața (m <sup>2</sup> )
Lapte și zer	25	1222 <sup>a</sup>	2276 <sup>a</sup>	7	990 <sup>b</sup>	2370 <sup>b</sup>
Enzime	12	229	526	9	606	1894
Sucuri de fructe și legume	0	0	0	7	444	1056
Albumină	1	10	15	3	60	130

<sup>a</sup> din care aplicații referitoare la zer (estimate): nr. de cartușe de membrane de ultrafiltrare < 27%; suprafața < 13%.

<sup>b</sup> din care aplicații referitoare la zer (reale): nr. de cartușe de membrane de ultrafiltrare 85%; suprafața < 84%.

Diafiltrarea și fermentarea simultană sunt adaptării ale ultrafiltrării directe. Diafiltrarea se referă la adăosul controlat de apă peste substanțele reținute în timpul ultrafiltrării directe, fie simultan, fie într-un ciclu continuu. Astfel se elimină componentele cu masă moleculară mică. De exemplu, utilizarea diafiltrării în cazul laptelui va conduce la îndepărtarea urmelor de lactoză și săruri solubile. De obicei volumul de apă utilizat este egal cu volumul de filtrat rezultat în urma ultrafiltrării directe.

Fermentarea simultană este larg utilizată în ultrafiltrarea laptelui. În acest caz în timpul procesului de ultrafiltrare inițială se scade temperatura la 30°C pentru a favoriza creșterea optimă a bacteriilor pentru acidul lactic. Ultrafiltrarea continuă până când pH-ul inițial de 6,6 scade la o valoare predeterminată, dar care nu determină coagularea laptelui; de regulă pH-ul est 5,5. Când pH-ul atinge valoare dorită se crește temperatura la 52-54°C când majoritatea bacteriilor nu mai cresc după care continuă procesul de ultrafiltrare. Această metodă solubilizează calciul din lapte dar poate conduce la creșterea conținutului în bacterii în produsul final.

În procesul de osmoză inversă se separă compușii cu masă moleculară mare sau mică de apă concentrându-se astfel alimentele lichide. Procesul a fost folosit inițial pentru desalinizarea apei de mare. Presiunea osmotică foarte mare care apare în cazul utilizării membranelor semipermeabile și se datorează compușilor cu masă moleculară mică, constituie un factor critic în osmoza inversă. Această presiune osmotică este contracarată prin aplicarea în timpul procesului de separare prin membrană a unei contrapresiuni de 20,7-69 bari. Presiunea mare, de circa 10 ori mai mare decât în cazul ultrafiltrării, determină trecerea fluidului, de regulă apă, prin membrană. Membranele utilizate în astfel de cazuri au porii foarte fini și denși iar amestecul de separat curge, paralel cu suprafața acestora, cu o viteză foarte mare.

Producția de membrane utilizate în industria alimentară a evoluat foarte rapid. Inițial, singurul material utilizat la fabricarea membranelor a fost acetatul de celuloză. Începând cu anul 1975 acesta a fost înlocuit cu polimeri complecși, cum ar fi polisulfurile.

Membranele realizate din acetat de celuloză sunt sensibile la variații de temperatură, pH și la concentrații mari de clor. Din aceste motive este necesară curățarea îndelungată a membranelor utilizându-se enzime, și limitarea strictă a variațiilor de temperatură, pH și concentrații de clor. Membranele din polisulfură sunt practic insensibile la aceste influențe; de exemplu ele acționează efectiv la 80°C și la un pH între 1,5 și 13,0.

Membranele de ultrafiltrare din a treia generație sunt realizate din metal, oxid de zirconiu având calități aparent îmbunătățite față de cele confecționate din polisulfură. Ele pot

fi utilizate la valori mari de pH, la temperaturi de până la 400°C și presiuni de 40 bari. Acest tip de membrane se utilizează în industria alimentară deoarece pot fi curățate foarte ușor.

## 6.1. Ultrafiltrarea alimentelor

Ultrafiltrarea alimentelor lichide are trei funcții principale: separarea, purificarea și concentrarea selectivă. Acestea se realizează de regulă la temperaturii cuprinse între 10-15°C pentru a nu denatura proteinele. Mai mult, temperatura scăzută reduce consumul energetic reducând costurile.

Parametrii cum ar fi timpul, temperatura, presiunea și viteza de curgere depind de natura alimentelor, tipul de membrană, echipamentul folosit precum și de interacțiile dintre diverșii componenți existenți în alimente. În tabelul 3 sunt prezentate câteva din alimentele pentru a căror prelucrare se utilizează ultrafiltrarea.

*Tabelul 3.* Produse alimentare prelucrate prin ultrafiltrare.

Sucuri de fructe și legume	Gelatină
Sucuri cu conținut mic de zahăr	Plasmă sanguină
Suc de arțar	Carbohidrați
Oțet	Proteine din cereale și semințe
Cafea	Lapte proaspăt
Bere	Brânză
Vin	Zer
Ouă	Lapte fermentat
Pectine	Înghețată
Coloranți naturali	Preparate enzimatice

### 6.1.1. Ultrafiltrarea alimentelor de origine vegetală

#### *A. Sucuri de fructe*

Metodele clasice utilizate pentru purificarea sucurilor de fructe necesită extracția sub presiune, pretratarea sucului cu o enzimă, pectinaza, pentru a micșora sau elimina cantitatea de pectină, după care se aplică centrifugarea sau filtrarea clasică.

Purificarea sucurilor de mere, pere, portocale, grape fruit și alte sucuri de fructe se realizează prin ultrafiltrare. Este necesară o cantitate foarte mică de pectinază iar suc purificat este foarte limpede, deoarece pectina, amidonul și impuritățile se concentrează pe membrană. Microorganismele nu trec prin membrana de ultrafiltrare, astfel încât substanța filtrată rezultată, nu conține celule microbiene. Mirosul și culoarea sucului de fructe sunt excelente. Prin acest procedeu poate fi purificată chiar și tescovina de mere obținută după extracție [10].

Heatherbell [11] a realizat împreună cu colectivul său, prima purificare prin ultrafiltrare a sucului de mere utilizând membrane cu o suprafață de 2,4 m<sup>2</sup> ce pot separa compuși cu mase moleculare de 50.000.

Purificarea prin ultrafiltrare a sucului de mere, dar și a altor sucuri de fructe, este influențată de eliminarea pectinei dar și de temperatură. Nielsen [12] a purificat prin ultrafiltrare, la 50<sup>o</sup>C, suc de mere din care s-a eliminat anterior pectina, cu un debit de 41-49 L/h. Dacă suc se depectinizează anterior purificării, în proporție de 75 %, debitul se dublează. Volumul de suc de fructe purificat crește cu 1,1% pentru fiecare grad Celsius cu care se mărește temperatura.

În cazul purificării prin ultrafiltrare a sucului de fructe la scară industrială, se lucrează la o temperatură de 50<sup>o</sup>C, presiunea de 1,7-3,1 bari și se utilizează membrane ce pot separa mase moleculare de aproximativ 10 000. Randamentul instalației este de 97% obținându-se 20 000 L de suc pe oră.

Totodată, prin purificarea sucului de mere prin ultrafiltrare s-a constatat că se reduce considerabil conținutul microbial [13]. Înainte de purificare sunt prezente 2300 de bacterii aerobe, 300 de celule de drojdie și 650 de celule de mușci pe milimetru, iar după purificarea conținutul bacterian este de o bacterie pe milimetru.

Sucurile de fructe purificate prin ultrafiltrare pot fi concentrate prin osmoză inversă, evaporare la vid sau prin combinarea celor două procedee.

### ***B. Vin și alte băuturi alcoolice***

Vinul se obține prin fermentația alcoolică a mustului obținut din struguri. Băuturile alcoolice din fructe se obțin prin macerarea fructelor sau din sucurilor acestora, în care se adaugă drojdie, urmată de fermentația anaerobă. În producerea vinurilor apar probleme cum ar fi oxidarea vinului alb sau formarea cristalelor de tartrat în cazul vinurilor albe și roșii. Prevenirea oxidării vinurilor albe se realizează, în mod tradițional, prin adăugarea în must a SO<sub>2</sub> liber sub forma metabisulfidului de sodiu (până la 100 ppm) sau a bioxidului de sulf



gazos. Dar s-a constatat ca persoanele care au consumat, de exemplu salată verde tratată cu metabisulfid de sodiu pentru menținerea culorii și proapețimii, au prezentat anumite reacții fiziologice. Acest fapt a alertat autoritățile abilitate cu privire la posibilitatea ca băuturile tratate cu sulfiți să provoace efecte similare.

De asemenea prin ultrafiltrarea vinului (membrane caracterizate printr-un indice de separare de 20 000) se îndepărtează polifenolii și compușii cu azot și , ceea ce este mai important se reduce fenomenul de oxidare [14].

Cristalele de tartrat de potasiu se formează în cazul vinului netratat atunci când temperatura variază. Procedul tradițional se referă la păstrarea vinului la rece, temperaturii cuprinse între  $-8^{\circ}\text{C}$  și  $-6^{\circ}\text{C}$ , timp de 2-3 săptămâni, când tartratul de potasiu precipită și se elimină prin filtrare. O metodă alternativă, dar care necesită un spațiu de răcire mult mai mic, se referă la ultrafiltrarea vinului când apa, alcoolul și sărurile solubile sunt filtrate și se rețin compușii care dau aroma. Filtratul se păstrează la temperaturii scăzute pentru cristalizare tartratului de potasiu, se filtrează după care se recombina cu compușii care dau aroma și se îmbuteliază. Purificarea prin ultrafiltrare conferă vinurile un buchet plăcut.

### *C. Sucuri din trestie de zahăr, sfeclă și coajă de fructe*

Din sucurile dulci, folosite pentru obținerea siropurilor sau a diverselor dulciuri, se elimină înainte de concentrare respectiv cristalizare, rășinile, amidonul și impuritățile proteice deoarece acestea contribuie la modificarea culorii și a turbidității sucului. Pentru precipitarea acestor compuși, tradițional, se adaugă în sucuri oxid de calciu, la un pH între 7 – 7,5 la  $100^{\circ}\text{C}$ .

Purificarea industrială a sucului de trestie de zahăr poate fi realizată prin membrane de ultrafiltrare cu o capacitate de separare a compușilor cu mase moleculare cuprinse între 10 000 și 30 000, la pH 7,5 și o temperatură de  $60^{\circ}\text{C}$  [15].

Citricile, cum ar fi grape fruit, conțin în coajă componente amare și între 5-8% zaharuri care pot fi separate prin ultrafiltrare și schimb ionic [16]. Pulpa din cojile de fructe este supusă ultrafiltrării obținându-se un lichid amar ușor gălbui. Componentele amare sunt îndepărtate prin trecerea lichidului, mai întâi printr-o coloană cu rășini schimbătoare de cationi urmată de o coloană cu schimbători de anioni. Se obține astfel, un suc din coajă de fructe limpede și dulce din care prin evaporare la vid rezultă sirop, în proporție de 63%.

#### ***D. Proteine vegetale***

Cercetările din domeniul industriei alimentare s-au orientat în ultimii ani spre izolarea proteinelor vegetale în vederea obținerii unor noi substituenți alimentari. Cel mai intens studiate au fost proteinele din soia datorită prețului de cost relativ scăzut.

Industria proteinelor vegetale pune accent pe obținerea diverselor concentrate proteice din soia, sămânță de rapiță, arahide, bumbac și cartof [17-21].

Laptele de soia se obține din concentrat de soia purificat prin ultrafiltrare într-o instalație de tip Abcor 22S prevăzută cu membrane ce au capacitatea de a separa compuși cu mase moleculare de 20 000 Da. Soluția de soia are un conținut proteic de 73-84%.

Tehnologia separării prin membrane este simplă și mai puțin costisitoare decât procedeele tradiționale care implică extragerea și precipitarea.

### **6.1.2. Ultrafiltrarea alimentelor de origine animală**

#### ***A. Proteine animale***

Albușul de ou sau albumina, gelatina și plasma din sânge bovin obținute în condiții igienice sunt alimente naturale excelente sau pot constitui componente ale altor alimente. Procedeele tradiționale de separare, purificare și concentrare a proteinelor de origine animală sunt laborioase iar reziduurile de carbohidrați precum și alte impurități determină apariția unor culori nedorite.

Concentratele de albuș de ou obținute prin ultrafiltrare se caracterizează printr-o stabilitate mult mai mare la temperaturii ridicate [22]. Pudra de albuș de ou obținută prin ultrafiltrare își păstrează calitățile în timpul depozitării.

Gelatina se obține din oase și țesuturi de animale sacrificate. Extractele conțin, în cantitate foarte mare, compuși macromoleculari care sunt eliminați total prin ultrafiltrare. Se obține astfel o gelatină îmbunătățită calitativ prin creșterea masei de solid la 10-12%.

Plasma sanguină utilizată ca supliment alimentar sau pentru hrana animalelor este de regulă obținută prin centrifugarea sângelui și separarea în celule și plasmă în stare lichidă.

Ultrafiltrarea reprezintă un procedeu simplu și eficient pentru concentrarea și purificarea proteinelor din plasma sanguină fiind utilizat în numeroase stații de concentrare pilot [23-26].

De exemplu, Quaglia și Tasselli [24] prelucrează cu rezultate foarte bune plasma sanguină de vițel la 18-42<sup>o</sup>C, o presiune de 5-9 bari și la un debit de curgere de 3000-7000 L/h.

În practica industrială pentru concentrare și purificare componentelor celulare sanguine se realizează inițial ultrafiltrarea și diafiltrarea urmată de osmoza inversă [27].

Calitățile nutriționale, fluiditatea și solubilitatea produselor separate prin procese membranare sunt excelente.

### ***B. Lapte și produse lactate***

Aplicațiile ultrafiltrării industriale ale laptelui și produselor lactate au debutat timpuriu în prezent fiind operaționale în întreaga lume. Produsele lactate concentrate prin ultrafiltrare includ laptele integral, laptele degresat, zerul și frișca.

În lapte, prezența a aproximativ 3,5% proteine și 4% grăsimi îngreunează procesul de concentrare prin pasivarea membranei. Prelucrarea laptelui se supune unor reglementări sanitare foarte stricte iar proiectarea echipamentului utilizat trebuie să țină seama de normele sanitare. Prin ultrafiltrarea laptelui degresat și a laptelui integral se obține un produs principal a cărui compoziție este prezentată în tabelul 4. Produsul secundar rezultat este limpede, de culoare verde-gălbui și lipsit de proteine.

**Tabelul 4.** Compoziția laptelui degresat și a produsului principal rezultat în urma ultrafiltrării.

Component	Lapte degresat (%)	Lapte degresat după concentrarea prin ultrafiltrare(%)	Raportul dintre concentrații
Grăsimi	urme	urme	-
Proteine totale	3,3	16,7	5,1 : 1
Solide totale	9,3	24,8	2,7 : 1
Lactoză	4,5	4,3	-
Aciditate titrabilă	0,16	0,44	2,5 : 1
pH	6,6	6,6	-

Ultrafiltrarea laptelui se realizează de obicei la 52-54°C la o presiune inițială de 1,7-3,1 bari prin membrane de polisulfură cu indice de separare de 20 000.

Concentrarea laptelui în ferme conduce la scăderea cheltuielilor de transport, deoarece cantitatea de lapte filtrat (concentrat) este mult mai mică. Produsul principal obținut prin

ultrafiltrarea laptelui conține lactoză, azot neproteic și vitamine și poate fi utilizat ca hrană pentru animale, în amestec cu alte nutrețuri [28].

## **6.2. Osmoza inversă a alimentelor**

Prin aplicarea procedeele de osmoza inversă se concentrează componentele alimentelor lichide prin eliminarea apei la temperaturii scăzute. Eliminarea apei nu necesită o schimbare a stării de agregare procesul decurgând cu conservarea energiei.

Osmoza inversă prin membrane speciale se aplică cu succes în desalinizarea apei de mare sau pentru micșorarea concentrației de alcool din bere.

Ultrafiltrarea și osmoza inversă sunt utilizate adesea ca procedee complementare în procesul de prelucrare a alimentelor. Ultrafiltrarea se aplică în vederea purificării iar osmoza inversă împreună cu evaporarea la vid pentru concentrare. Gradul de concentrare, fie a filtratelor fie a produsului reținut pe membrană, prin osmoză inversă sau evaporarea la vid depinde de conținutul inițial în substanțe solide, concentrația finală dorită cât și de prețul de cost al procedurii. Nordbaek [27] a observat că prezența de vapori în exces în fabricile de zahăr poate anula avantajele economice care apar în cazul concentrării prin ultrafiltrare în comparație cu evaporarea la vid. În alte cazuri este mai economic să se utilizeze concentrarea prin osmoză inversă până la un conținut de substanță solidă de 18% după care prin evaporare la vid se ajunge la 45%.

Concentrarea până la un conținut de substanțe solide de 45% nu este posibilă numai prin osmoză inversă; de exemplu, Patterson Candy International a concentrat unele alimente lichide prin osmoză inversă până la un conținut în substanțe solide de 28% [28].

Osmoza inversă necesită un spațiu mai mic și funcționează la temperaturii foarte scăzute. (0-7°C în cazul prelucrării băuturilor alcoolice).

### **6.2.1. Osmoza inversă a alimentelor de origine vegetală**

#### ***A. Sucuri de fructe și legume***

Majoritatea sucurilor de fructe, inclusiv cele de mere, portocale și pere care au o presiune osmotică mare pot fi concentrate prin osmoză inversă. Limitările procedeeului au în vedere pasivarea membranei și formarea unor zone de concentrații diferite [29]. Componentul din sucul de fructe care pasivează cel mai des membrana este pectina. [30].

Sucurile de fructe concentrate prin osmoză inversă necesită condiții operaționale și membrane diferite. Sucul de portocale este concentrat industrial prin osmoză inversă cu un debit de 35 L/h și un conținut de substanțe solide de 35% la o presiune de 30 bari în timp ce sucul de mere este concentrat la o presiune de 60 bari și 50<sup>0</sup>C [27]. Dintre sucurile de legume, sucul de roșii a fost concentrat prin osmoză inversă folosindu-se membrane din acetat de celuloză [31].

### ***B. Băuturi alcoolice***

Mustul cu un conținut de zahăr scăzut, în jur de 17%, produce un vin de masă cu un conținut de alcool ce nu corespunde cerințelor legale. Teoretic 51% din zahărul prezent în fermentația anaerobă este transformat în alcool etilic iar restul în bioxid de carbon și energie. Conținutul în alcool poate fi mărit prin adăugarea de zahăr, procedeu numit șampanizare, sau prin utilizarea osmozei inverse atunci când nu mai este necesar nici un adaos [32].

Un alt domeniu în care este utilizată osmoza inversă îl reprezintă industria de prelucrare a berii. Alcoolul etilic împreună cu apa trec prin membranele de acetat de celuloză, iar substanța reținută pe membrană este apoi rediluată cu apă. Prin acest procedeu se obține berea cu conținut mic de alcool. Unele țări din Asia solicită bere cu conținut mic de alcool, de 0,1%, care se poate produce prin osmoza inversă din berea obișnuită. Alte regiuni solicită bere cu un procent de alcool între 3,5-10%. Folosind procedeul de osmoză inversă, o fabrică de bere poate produce o varietate de sortimente de bere cu diferite procente de alcool, devenind astfel mai eficientă.

De asemenea, tipurile de bere cu procent mare de alcool pot fi concentrate prin acest procedeu în vederea realizării unui transport mai econom, iar după ce ajung la consumator pot fi reconstituite prin adaosul de apă.

### ***C. Suc din trestie de zahăr.***

Concentrarea sucului de trestie de zahăr prin osmoză inversă se realizează mult mai ușor prin membrane de polisulfură decât prin membrane de acetat de celuloză [33]. Procedeul se realizează la 80<sup>0</sup>C cu un randament destul de bun, dar excesul de vapori care există de regulă în fabricile de trestie de zahăr scad interesul pentru înlocuirea instalațiilor existente de concentrare prin evaporare cu cele prin osmoză inversă.

#### *D. Cafea*

Cafeaua instant este un alt lichid de origine vegetală concentrat industrial prin osmoză inversă. Extractul de cafea din produsul instant are un conținut în substanțe solide de 13%. Extractul este concentrat prin osmoză inversă la 70°C până la un conținut de substanță solidă de 36%. Ulterior concentratul este evaporat la vid până la un conținut de 48%, uscat și împachetat.

Cele mai utilizate membrane sunt cele confecționate din amestecuri de polimeri care în comparație cu membranele de acetat de celuloză prezintă un grad mai mare de retenție a compușilor aromatici [27].

#### *E. Sirop de arțar*

Seva de arțar este colectată prin introducerea unor tuburi de plastic în trunchiul arborelui. Tradițional seva era evaporată la presiune atmosferică în cazane sau rezervoare metalice încălzite la foc de lemn. Siropul de culoare aurie este utilizat la prepararea prăjiturilor și bomboanelor. Seva de arțar poate fi concentrată și prin evaporare la vid până la un conținut în substanțe solide de 65% [34]. În prezent seva de arțar este concentrată numai prin osmoză inversă procedeul fiind mult mai economic în comparație cu evaporarea la vid.

### **6.2.2. Osmoza inversă a alimentelor de origine animală**

#### *A. Laptele*

Prelucrarea laptelui prin osmoza inversă reprezintă una dintre primele aplicații ale metodei în industria alimentară [35]. Problemele datorate pasivării membranelor de către caseină în cazul procesului de prelucrare a laptelui sau de fosfatul de calciu în prelucrarea zerului sunt diminuate prin creșterea vitezei de trecere a lichidului prin membrană [36]. Prin osmoză inversă se poate concentra laptele integral fără ca fluxul de curgere prin membrană să scadă. La aplicarea acestui procedeu în fabricarea laptelui praf se constată modificarea proprietăților organoleptice, deoarece presiunea mare (24,5 bari) și temperatura mică (20-30°C) activează lipaza și hidrolizează grăsimile din laptele nefiert sau nepasteurizat. Această problemă a fost rezolvată fie prin utilizarea unor tuburi capilare plasate la ieșirea din unitatea de osmoză inversă, fie prin micșorarea presiunii inițiale asupra laptelui. Astfel, laptele integral nefiert este concentrat prin osmoză inversă în raport de 2 : 1 și nu prezintă nici un fel de modificare a proprietăților organoleptice.

## **B. Brânză și produse lactate**

În cazul osmozei inverse, spre deosebire de ultrafiltrare, produsul reținut pe membrană reflectă compoziția inițială a laptelui integral. Astfel, laptele integral concentrat prin osmoză inversă într-un raport de 2 : 1 poate fi adus în forma inițială prin adăugarea unui volum de apă corespunzător. Acest lucru nu este posibil în cazul aplicării ultrafiltrării deoarece prin această metodă se realizează o concentrare selectivă. Laptele obținut prin concentrare prin osmoză inversă are o aromă și o stabilitate bună și proprietăți asemănătoare cu cele obținute prin evaporarea la vid [37].

Brânza tip Gouda s-a fabricat în Olanda prin osmoza inversă a laptelui concentrat încă din 1978 [38]. Brânza de vaci s-a obținut în Anglia prin osmoza inversă a concentratului de lapte degresat [28]. Limitarea utilizării osmozei reversibile sau a evaporării la vid în prelucrarea laptelui pentru obținerea brânzei sau a altor produse lactate se datorează excesului de lactoză. Concentrația în lactoză a laptelui concentrat prin ultrafiltrare este de 4,5% iar prin osmoză inversă sau evaporare la vid este între 5-10%.

### **6.3. Aspecte de reglementare sanitară**

În procesul de prelucrare a alimentelor trebuie să se păstreze aroma, textura și aspectul produsului dar în același timp să se realizeze controlul efectiv al procesului de alterare. Aceste aspecte necesită o atenție sporită mai ales în procesul de prelucrare a laptelui și a produselor lactate. Laptele reprezintă un mediu favorabil pentru creșterea bacteriilor iar aplicarea normelor sanitare devine dificilă deoarece componenții laptelui aderă puternic pe pereții vaselor de metal. De aceea este necesară o curățare temeinică a echipamentului de oțel utilizat la prelucrarea laptelui.

Curățarea primelor generații de membrane, din acetat de celuloză sensibile la acțiunea acizilor, bazelor, temperaturii și clorului, necesită o procedură de 3 ore care implică utilizarea unor enzime pentru îndepărtarea reziduurilor proteice.

În prezent utilizarea în instalațiile de ultrafiltrare a membranelor de polisulfură simplifică foarte mult procedura de curățare și dezinfectare. Inițial instalația se spală cu apă urmată de o soluție acidă și una alcalină, după care se spală din nou cu apă.

Nu toate membranele se curăță atât de ușor; se pare că membranele sub formă de tuburi capilare și cele cu formă plană sunt cel mai ușor de curățat. Membranele sub formă de tuburi capilare permit redirectionarea fluxului de apă sau substanță filtrată prin membrană pentru a disloca particulele fixate pe pereți.

Procesele de ultrafiltrare și osmoză inversă rețin bacteriile și virușii în proporție de aproape 100%. Teoretic substanțele filtrate sunt sterile dar spărturile ce apar în membrane sau contactul cu suprafața nesterilă a containerelor provoacă contaminarea. De obicei numărul de microorganisme din filtrat este foarte mic. O atenție deosebită trebuie acordată concentrării bacteriilor și virușilor în precipitatul de pe membrană. În cazul laptelui se constată o creștere a numărului de bacterii și enzime deoarece temperatura de ultrafiltrare este de 54<sup>0</sup>C.

## Bibliografie

1. H. K. Lonsdale, *J. Membrane Sci.*, **1982**, 10, 81.
2. R. F. Madsen, *Hyperfiltration and Ultrafiltration in Plate-and-Frame Systems*, Elsevier, New York, **1977**, 1-367.
3. D. M. Barbano și D. G. Bynum, *J. Dairy Sci. Suppl.*, **1983**, 66, 70.
4. Anonymus, *Ultrafiltration Handbook*, Romicon, Woburn, Mass., **1983**, 1-36.
5. P. G. Marshall, W. L. Dunkley și E. Lowe, *Food Technol.*, **1968**, 22, 969.
6. R. L. Merson și T. R. Morgan, *Food Technol.*, **1968**, 22, 97.
7. J.-L. Maubois, G. Mocquot și L. Vassal, *Patent francez nr. 2*, **1969**, 052, 121.
8. E. Lowe, E. L. Durkee, R. L. Merson, K. Ijichi și S. L. Cimino, *Food Technol.*, **1969**, 23, 45.
9. R. De Boer și J. Hiddink, *Desalination*, **1980**, 35, 169.
10. V. Hlavcka, P. Brokes și L. Sorman, *Kvasny Prum.*, **1981**, 27, 206.
11. D. A. Heatherbell, J. L. Short și P. Strumbi, *Confructa*, **1977**, 22, 157.
12. C. E. Nielsen, *J. Food. Sci.*, **1983a**, 32, 23.
13. J. L. Short, în *Proceeding of the 74th AIChE Annual Meeting*, New Orleans, **1981**, 8.
14. Y. Amano, K. Nakamura, T. Komuro, S. Kirbayashi și M. Kagami, *J. Inst. Enol. Viticult.*, **1980**, 15, 15.
15. S. Kishihara, S. Fuji și M. Komoto, *Int. Sugar J.*, **1981**, 83, 35.
16. B. R. Breslau, D. F. Pensenstadler și W. G. Mitchell, în *Proceeding of the American Society of Mechanical Engineers and Citrus Engineers Conference*, Lakeland, Fla., **1976**, 45.
17. M. C. Porter și A. S. Michaels, *Chem. Technol.*, **1971**, 1, 633.
18. J. T. Lawton S. H. C. Lin, C. M. Crater și K. F. Mattil, *J. Food. Sci.*, **1974**, 39, 183
19. D. J. Nichols și M. Cheryan, *J. Food. Sci.*, **1981**, 46, 367.



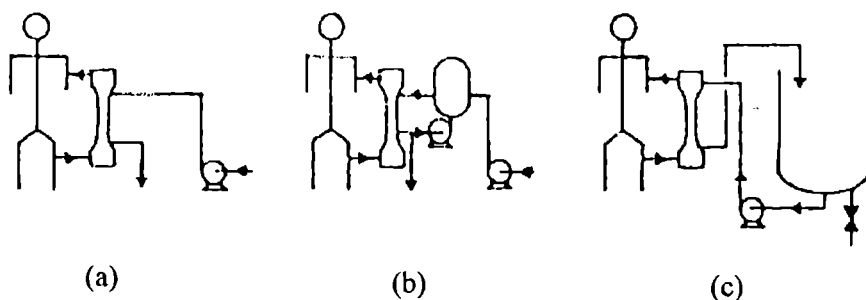
20. R. D. Siy și F. D. F. Talbot, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1981**, 58, 1021.
21. I. Wojnowska, S. Poznanski și W. Bednarski, *J. Food. Sci.*, **1982**, 47, 167.
22. Y. N. Lee, R. C. Wiley, M. J. Sheu și D. W. Schlimme, *J. Food. Sci.*, **1982**, 47, 465.
23. J. Delaunay, J. P. Tessier și V. Louveau, *Rev. Gen. Froid*, **1979**, 70, 622.
24. G. B. Quaglia și F. Tasselli, *Ind. Aliment.*, **1980**, 19, 671.
25. J.-P. Tessier, *J. Dairy Res.*, **1980**, 47, 327.
26. T. Fernando, *Biotechnol. Bioeng.*, **1981**, 23, 19.
27. D. J. Nichols și M. Cheryan, *J. Food. Sci.*, **1982**, 47, 486.
28. S. Benard, J.-L. Maubois și A. Tareck, *J. Food. Sci.*, **1989**, 54, 234.
29. D. J. Nichols și M. Cheryan, *J. Food. Sci.*, **1982**, 47, 123.
30. A. Watanabe, V. Ohta, S. Kimura și K. Umeda, *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, **1989**, 36, 260.
31. R. L. Merson, G. Paredes și D. B. Hoska, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 178, 99.
32. K. Wucherpfenning și F. Zuern, *J. Food. Sci.*, **1988**, 53, 134.
33. D. Pepper, A. C. J. Orchard și B. L. Taylor, *Raport*, Patterson Candy Int., Ltd., **1983** TPRO 68, 6.
34. W. K. Jordan, F. V. Kosikowski și R. P. March, *Food Eng.*, **1954**, 26, 70.
35. F. A. Glover, *J. Dairy Res.*, **1971**, 38, 273.
36. J. Hiddink, R. de Boer și P. F. C. Nooy, *J. Dairy Sci.*, **1980**, 63, 204.
37. R. K. Abrahamsen și T. B. Holman, *Milchwissenschaft*, **1980**, 35, 339.
38. J. Abbot, F. A. Glover, D. D. Muir și P. J. Skudder, *J. Dairy Res.*, **1979**, 46, 663.

## VII. Utilizarea membranelor în realizarea organelor artificiale

În ultimii 30 de ani industria organelor artificiale s-a dezvoltat foarte mult datorită aplicării tehnologiilor de separare prin membrane pentru început în tratamentul afecțiunilor renale dar și pentru realizarea schimbului de gaze din sânge în timpul operațiilor pe cord deschis, tratamentul insuficienței hepatice acute, separarea plasmei din sânge [1].

În toate aceste aplicații se are în vedere menținerea unui echilibru între viteza și selectivitatea transportului prin membrană, pe de o parte și evitarea transformărilor și contaminărilor nedorite pe de altă parte.

Transportul selectiv al unor moleculelor prin membrană este utilizat adeseori în tratamentul afecțiunilor renale în fază finală. Din artera pacientului se extrage sânge cu ajutorul unui ac, cu un debit de curgere constant, în jur de  $200 \text{ cm}^3/\text{min}$ . Sângele este trecut printr-un circuit extracorporeal cu un volum redus, practic câteva sute de  $\text{cm}^3$ . Astfel, timpul total de retenție extracorporeală a sângelui să fie de ordinul a 1-2 min. Elementul de bază al acestui circuit îl reprezintă "hemodializorul" care conține o membrană cu suprafața de  $1 \text{ m}^2$  iar lichidul pentru dializă curge cu un debit de curgere de  $500 \text{ cm}^3/\text{min}$ . Sângele este recirculat către pacient iar soluția rezultată în urma dializei (dializat) este de obicei aruncată sau recirculată (figura 7.1).



**Figura 7.1.** Sistem pentru hemodializă: soluția rezultată în urma dializei este (a) îndepărtată, (b) recirculată prin sistem, (c) păstrată într-un rezervor pentru utilizării ulterioare.

Tipul membranei cât și condițiile de operare permit ca pentru fiecare trecere prin sistemul de dializă să se separe în jur de 80% din substanțele cu moleculă mică (de exemplu, ureea) prezente în sânge. Întreg procesul de dializă durează 4 ore, perioadă în care se elimină circa 30 g uree [3-6].

O alternativă pentru dializă, aplicată practic, o reprezintă hemofiltrarea [7-10]. Hemofiltrarea folosește diferența de presiune pentru transportul prin membrană nu numai a solventului dar și a substanțelor dizolvate. Pentru separarea cantității necesare de uree trebuie să se transporte o cantitate mult mai mare de apă, glucoză și alte câteva specii anorganice. De aceea pentru înlocuirea acestor substanțe se utilizează o soluție de compensare; întreg sistemul simulează procesele de filtrare-reabsorbție din rinichiul natural.

În afară de dializă și hemofiltrare se utilizează și procedee mixte; de exemplu, se elimină solventul sub presiune iar substanțele dizolvate se separă prin concentrare și presiune [11-12].

De asemenea trebuie menționate aici alte trei utilizări importante ale membranelor în realizarea organelor artificiale. Primă se referă la utilizare membranelor în combinație cu substanțe absorbante și enzime imobilizate care sunt puse în contact direct cu sângele pentru tratarea insuficienței hepatice acute [13]. Spre deosebire de rinichiul artificial se pot separa astfel, molecule cu dimensiuni mai mari

O a doua utilizare se referă la membranele aplicate în procesele de procesare a plasmei sanguine [14], iar cea de a treia se referă la plămânul artificial. Acesta permite schimbul de gaze ( $O_2$ ,  $CO_2$ ) prin membrane, la nivelul sângelui [15,16]. În acest caz membranele au o suprafață mare de până la  $3\text{ m}^2$ , debitul de curgere este în jur de  $5\text{ L/min}$  iar viteza de transport prin membrană ajunge până la  $250\text{ mL } O_2/\text{min}$ .

Toate membranele folosite în prezent la realizarea organelor artificiale sunt realizate din gel hidrofил sau din materiale microporoase pe o matrice suport impermeabilă.

## 7.1. Membrane tip gel

Membranele tip gel ce intră în componența rinichiului artificial pot fi confecționate din celuloză regenerată [17], acetat de celuloză [18], poliacrilonitril [19], alcool polivinilic [20], alcool etilvinilic [21] și policarbonați [22]. Aceste membrane se livrează de obicei în stare uscată fiind plastifiate cu glicerol. De aceea pentru îndepărtarea plastifiantului, înainte de folosire se spală cu o soluție salină sterilă.

Toate aceste membrane sunt asemănătoare ca aspect, proprietăți mecanice, grosime și performanțe. Cele mai multe membrane sunt transparente ceea ce permite vizualizarea rapidă a reziduurilor din sânge. Grosimea lor variază între  $5\text{-}100\text{ }\mu\text{m}$ , cele mai subțiri fiind caracteristice membranelor sub formă de fibre capilare.

Separarea unui solut prin astfel de membrane depinde de doi parametrii mai importanți: permeabilitatea solutului și permeabilitatea hidraulică (a apei). Prin permeabilitatea solutului se înțelege raportul dintre fluxul de solut și diferența de concentrație de-a lungul membranei. Permeabilitatea hidraulică se referă la raportul dintre debitul de apă și diferența de presiune. Permeabilitatea solutului caracterizează fiecare substanță în parte pe când permeabilitatea hidraulică va avea o singură valoare care nu este influențată foarte mult de rezistența la transport prin straturile de lichid adiacente membranei [23].

## 7.2. Membrane microporoase

Materialele microporoase au o structură caracterizată prin pori cu dimensiuni de ordinul micrometrilor (0,01–5  $\mu\text{m}$ ). Astfel de materiale pot fi configurate în straturi sau fibre astfel încât porii sunt unii în continuarea celorlalți rezultând o cale de transport relativ scurtă (0,1 mm) iar suprafața de contact crește foarte mult. O serie de polimeri în soluție sau în topitură pot fi congelați obținându-se membrane microporoase [24].

Membranele microporoase hidrofobe s-au folosit ca suprafață de transport în cazul plămânului artificial. În acest caz presiunea sângelui trebuie să fie mai mare decât presiunea gazelor (pentru a împiedica producerea de bule de gaz în sânge), dar suficient de mică astfel încât să nu fie depășită presiunea de intrare în cel mai mare por din membrană (pentru a împiedica umplerea cu sânge a porilor din membrană). Funcționarea cu succes a plămânului artificial are loc atunci când transportul prin membrană este foarte rapid. Acest lucru se realizează atunci când în porii membranei sunt gaze, în acest caz viteza de transport depinzând numai de coeficienții de difuzie, foarte mari, pentru moleculelor în fază gazoasă. De asemenea, prezența gazelor în porii membranei împiedică scurgerea de lichid prin membrană. Membranele microporoase folosite la realizarea plămânului artificial sunt realizate din teflon sau polipropilenă.

Membranele microporoase ce funcționează cu porii umpluți cu lichid pot fi realizate din polimeri hidrofilii, polimeri hidrofobi formați în membrană și tratați ulterior pentru a deveni permeabili sau polimeri hidrofobi netratați care au fost "umeziți" prin folosirea unui jet de lichid miscibil cu apa caracterizat prin tensiune de suprafață mică (de exemplu alcoolii). Membranele cu porii umpluți de lichid s-au folosit în principal pentru filtrarea plasmei sanguine sau pentru separarea unor proteine [25]. În acest sens s-au utilizat membrane realizate din acetat de celuloză microporos, polipropilenă, polisulfură, clorură de polivinil și

policarbonați. Diametrul porilor din membranele utilizate pentru filtrarea plasmei sanguine variază între 0,2-0,8  $\mu\text{m}$ .

Membranele microporoase, hidrofobe sau hidrofile, prezintă diferențe morfologice. Cele mai multe membrane microporoase sunt imaginate uniforme cu pori ale căror diametre și direcții de circulație se schimbă frecvent. Raportul dintre volumul porilor și volumul total al membranelor depășește 60% [26]. Unele membrane microporoase sunt neuniforme, în sensul că media proprietăților tuturor porilor variază cu distanța față de o suprafață sau cealaltă a membranei.

În prezent, tendința este spre obținerea de membrane compozite în care structura suport constă dintr-un strat de material microporos cu pori de dimensiuni mari, iar cea de-a doua fază este constituită dintr-un gel care umple porii membranei. Aceste membrane sunt diferite atât din punct de vedere cantitativ cât și calitativ față de membranele microporoase sau membranele tip gel disponibile în mod curent. Proprietățile membranelor compozite permit utilizarea lor la realizarea organelor artificiale și în biotehnologii.

### 7.3. Transportul intramembranar

Transportul difuzional de-a lungul membranelor este descris în general prin *permeabilitate*, care reprezintă raportul dintre debit ( $\text{g}\cdot\text{mol}/\text{cm}^2\cdot\text{s}$ ) și diferența de concentrație ( $\text{g}\cdot\text{mol}/\text{cm}^3$ ). Atunci când unitățile de măsură folosite pentru debit și pentru concentrație sunt compatibile, cum ar fi cele prezentate anterior, permeabilitatea va avea ca unitate de măsură lungime/timp ( $\text{cm}/\text{s}$ ). Dacă transportul prin membrană se realizează, în principal, prin convecție se definește *permeabilitatea hidraulică* ca fiind raportul dintre debitul de volum și diferența de presiune. Dacă transportul prin convecție duce la o separare efectivă, prin membrană, a unui solut această caracteristică a membranei se numește *coeficient de reflexie* a membranei pentru acel solut. Coeficientul de reflexie al unei membrane este egal cu unitatea când nici un solut nu trece prin membrană și egal cu zero când un solut trece prin membrană cu o anumită viteză astfel încât concentrația să în filtrat este aceeași cu concentrația din soluția de pe fața superioară a membranei [27]. În anumite cazuri transportul solutului prin membrană se realizează atât prin convecție cât și prin difuzie [28]. În hemodializă transportul solutului se realizează cu precădere prin difuzie iar transportul solventului prin convecție, iar în hemofiltrare atât solutul cât și solventul sunt transportați prin convecție. De asemenea, în dializa peritoneală transportul solventului se realizează în principal prin difuzie osmotică.

Modelul de transport intramembranar, în cazul organelor artificiale, trebuie să țină cont atât de structura cât și de natura transportului prin membrană. Un prim model se referă la membranele tip gel dar și la membranele din silicon sau fluoropolimer care au fost utilizate pentru transportul gazelor înaintea dezvoltării membranelor microporoase [29]. În acest caz se poate considera că solutul de interes este dizolvat într-una din “fazele” membranei constituită din solvent (apa), soluții care au o solubilitate apreciabilă în membrană și moleculele de substanță din care este alcătuită membrana. Difuzia solutului este determinată de solubilitatea și mobilitatea acestuia. Solubilitatea este o proprietate termodinamică; variațiile de solubilitate sunt importante pentru transportul gazelor prin membranele omogene (non-microporoase). În cazul membranei din gel hidrofili ce separă două faze apoase, solubilitatea este proporțională cu fracțiunea din membrană ocupată cu apă (aproximativ fracțiunea de pori).

Teoria elaborată de Kedem și Katchalsky [30] pentru explicarea noțiunii de mobilitate a solutului atribuie o viteză de deplasare  $v$  pentru fiecare specie chimică ce trece prin membrană; se consideră că membrana are viteza de deplasare egală cu zero. Particulele speciilor prezente sunt supuse unei forțe egală cu produsul dintre coeficienții de frecțiune  $f$  și viteza de deplasare a unei specii chimice în raport cu celelalte specii. De exemplu, forța totală ce acționează asupra moleculelor de solut  $S$  dizolvate în apă  $W$ , în cazul transportului printr-o membrană  $M$  are următoarea expresie:

$$X_S = -F_{SW} - F_{SM} = f_{SM}(v_S - v_W) + f_{SM} \cdot v_S$$

Chiar în cazul sistemelor cu conțin mai mulți soluți, interacțiunile preponderente ce afectează fiecare specie chimică în parte sunt cele cu membrana și cu solventul atâta timp cât concentrațiile respectivelor substanțe nu sunt foarte mari. Membranele cu procent mare de pori prezintă o permeabilitate ridicată: solutul va interacționa în principal cu solventul astfel încât selectivitatea membranei pentru un anumit solut va fi similară cu cea găsită dacă soluții sunt separații prin difuzie liberă în solvent. Membranele mai compacte se caracterizează printr-o interacție mai puternică între soluții și membrană dar în detrimentul permeabilității.

Mecanismul de transport în cazul membranelor microporoase a fost propus de către Lane și Riggle [31]. Aceștia consideră că permeabilitatea se datorează difuziei prin porii a căror lungime medie este egală cu  $\tau t$ , unde  $t$  reprezintă grosimea membranei iar  $\tau$  este *tortuozitatea*. Aria totală a porilor pe unitatea de suprafață a membranei se notează cu  $\nu$ . Coeficientul de difuzie a unui solut prin membrană  $D$  se înmulțește cu un factor  $F$  pentru moleculele ale căror diametru este aproape egal cu diametrul porilor.

În aceste condiții se poate defini permeabilitatea pentru cazul membranelor microporoase, astfel:

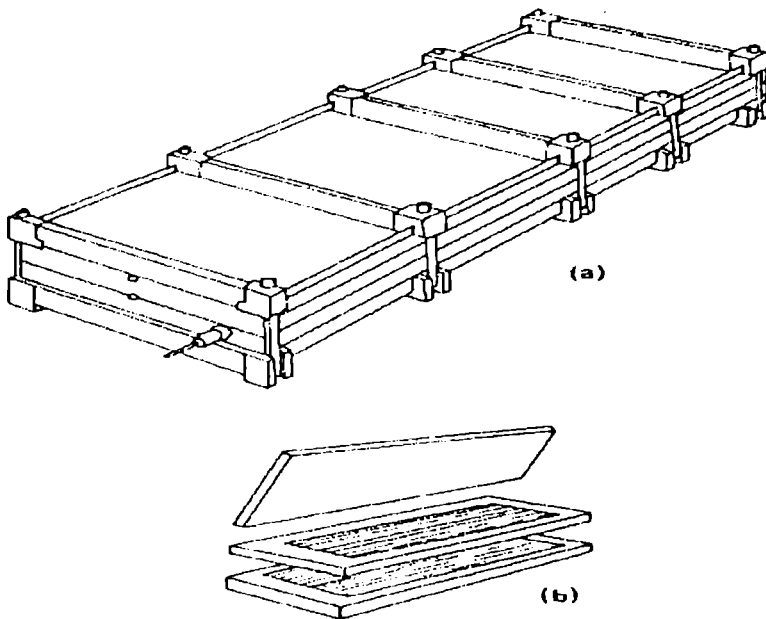
$$P = DF(a/d)v/t\tau$$

Astfel în cazul utilizării membranelor microporoase la realizarea organelor artificiale, transportul gazelor este eficient atunci coeficientul de difuzie **D** este mare.

#### 7.4. Tipuri de dispozitive membranare

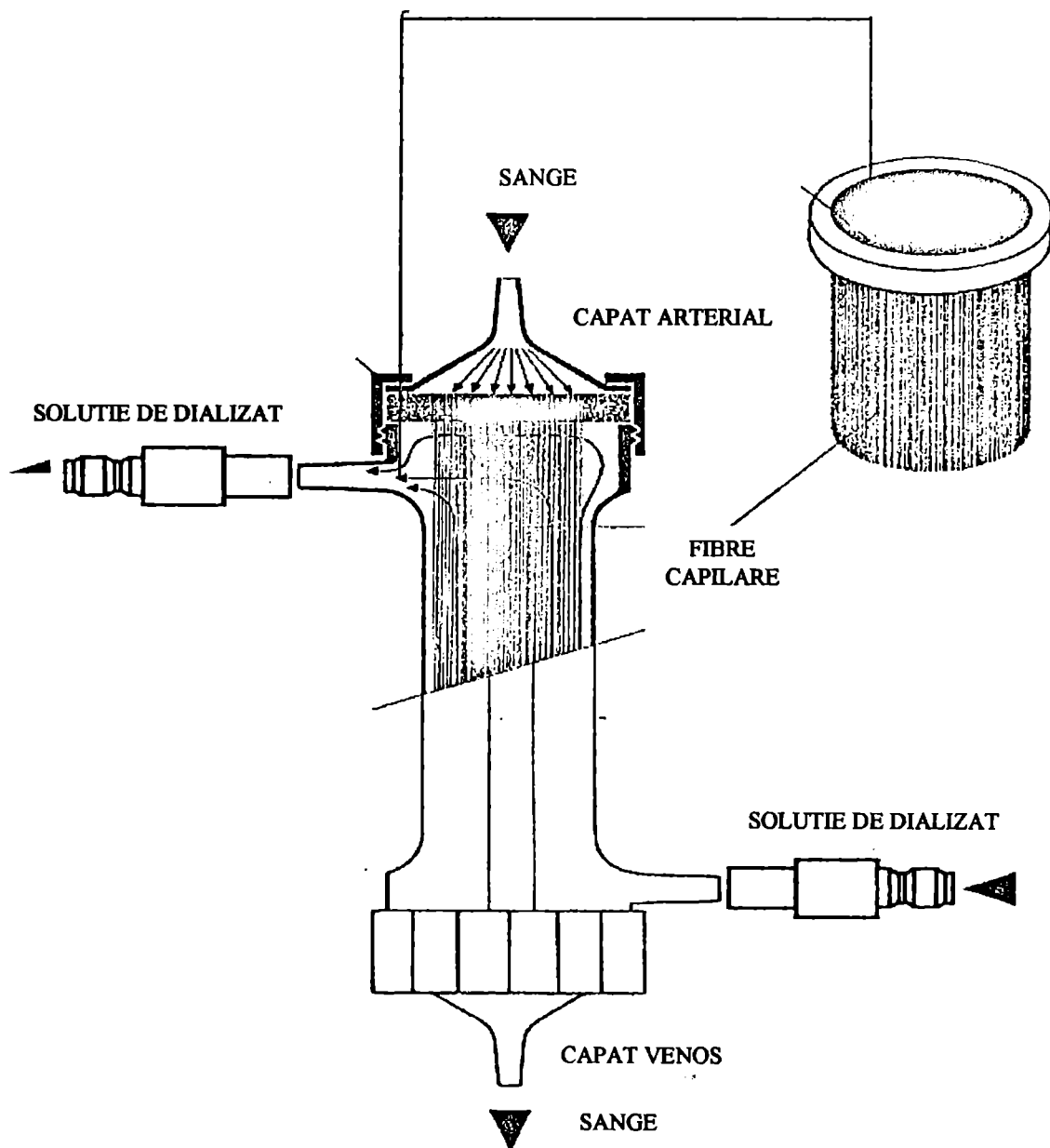
Dispozitivele membranare utilizate la realizarea organelor artificiale sunt în general realizate pentru unică folosință și trebuie să fie sterile. Aceste membrane pot fi în *formă de strat subțire* sau în *formă de fibre capilare*.

Membranele în formă de strat subțire (fig. 7.2) permit sângelui să curgă într-un strat subțire printre doi pereți plani ce fixează membrana. Membrana este menținută, de către o structură suport, într-o poziție care să permită formarea unor canale de curgere a lichidului și pe fața opusă feței impregnată cu sânge. Aceste dispozitive folosesc între 10-75 căi de curgere a lichidului dispuse în paralel. Lungimea canalelor variază între 5-50 cm iar lățimea între 5-15 cm (lățimea efectivă a  $n$  canale dispuse în paralel este de  $n$  ori lățimea unui singur canal).



**Figura 7.2.** Rinichi artificial ce utilizează o membrană în formă de strat subțire.

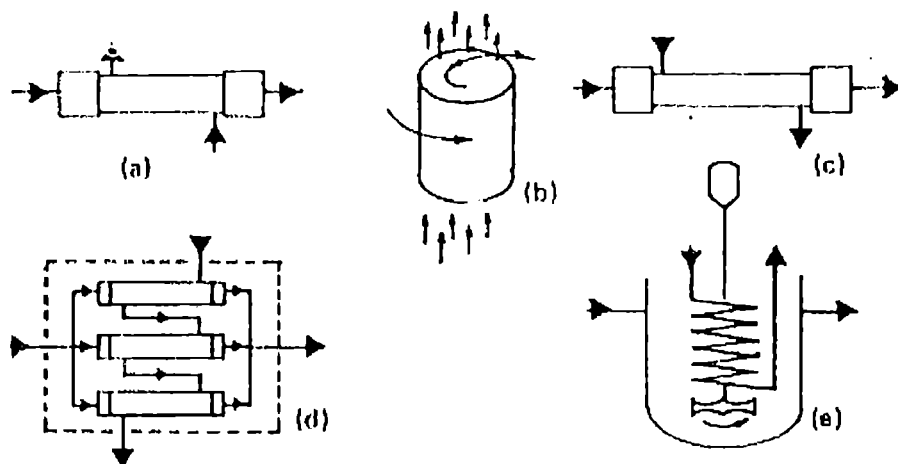
Membranele în formă de fibre capilare au diametrul interior cuprins între 180-350  $\mu\text{m}$ , iar lungimea fibrelor este de 20-35 cm; o unitate de membrane conține până la 10 000 de fibre individuale (fig. 7.3).



**Figura 7.3.** Rinichi artificial ce utilizează o membrană în formă de fibre capilare.



Geometria dispozitivelor membranare utilizate la realizarea rinichiului artificial este influențată de natura contactului dintre sânge (faza sursă) și lichidul de contact (faza acceptoare) (fig. 7.4.).



**Figura 7.4.** Tipuri de dispozitive membranare utilizate la realizarea rinichiului artificial în funcție de natura contactului dintre sânge și lichidul de contact; (a) în contracurent, (b) în contact încrucișat, (c) în contact co-curent, (d) în contact complex, și (e) contact când unul dintre lichide este sub agitare.

## 7.5. Efecte nedorite

Dintre problemele care pot să apară în utilizarea membranelor la realizarea organelor artificiale putem enumera: (i) distrugerea celulelor, (ii) activarea sistemelor de reacții biochimice, și introducerea unor contaminanți chimici sau biologici. Distrugerea celulelor poate avea loc direct, prin interacția dintre acestea și o suprafață incompatibilă sau indirect datorită fenomenului de agregare. Anumite suprafețe, datorită rugozității, pot provoca liza celulelor implicate într-un proces de dializă. S-a observat, de asemenea, că pe suprafața unor organe artificiale se pot acumula straturi de trombocite și leucocite modificându-se activitatea fiziologică [32]. Multe membrane artificiale, în special cele realizate din celuloză regenerată, activează, în absența anticoagulantelor, sistemul complementar formându-se fibrină. S-au

făcut studii pentru elucidarea mecanismului de activare cât și pentru identificarea unor materiale cu proprietăți “netrombogenice” [33].

Contaminanții pentru sistemele biologice implicate în organele artificiale provin din diverse surse, cum ar fi: dietil hexil ftalatul din tuburile de colorare de polivinil [34] oligomeri cu catenă scurtă ce provin de la membranele din celuloză regenerată [35], formaldehidă rămasă în urma sterilizării [36].

## 7.6. Monitorizare și control

Sistemele de organe artificiale sunt proiectate pentru utilizarea în mediul clinic și deci modul în care se operează cu aceste dispozitive este asociat cu îngrijirea bolnavilor și cu dezvoltarea unor proceduri speciale de utilizare. Din aceste motive, standardele de monitorizare și control cât și căile de acces nu pot fi similare cu cele din biotehnologie.

În hemodializă parametrii monitorizați sunt temperatura, presiunea și conductivitatea lichidului obținut în urma dializei. Creșterile necontrolate de temperatură, în cazul dializei, pot distruge sistemul biologic. Volumele relativ mari de lichid folosite în timpul hemodializei sunt preparate prin diluția continuă a substanțelor concentrate, în timpul tratamentului și de aceea modificarea izotonicității sângelui poate fi foarte periculoasă pentru pacient.

## Bibliografie

1. E. Klein și F. Villarroel (eds.), *Evaluation of Hemodialyzers and Hemodialysis Membranes*, DHEW publicația nr. (NIH) 77-1294, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington D.C., 1977.
2. E. Leonard și R. L. Dedrick, *chem. Eng. Prog. Szmp. Ser.*, 1986, 64, 15.
3. D. O. Conney, *Biomedical Engineering Principles*, Marcel Dekker, New York, 1976.
4. F. A. Goth, în *Technical Aspects of Renal Dialysis* (T. H. Frost, ed.), Pitman, Tunbridge Wells, England, 1978, 1-20.
5. N. A. Hoenich, T. White, J. Luno, F. Liano și D. N. S. Kerr, în *Technical Aspects of Renal Dialysis* (T. H. Frost, ed.), Tunbridge Wells, England, 1978, 38-44.
6. J. E. Sigdell, *Artif. Organs*, 1984, 8, 234.
7. W. J. Kolff, în *Artificial Liver and Artificial Cells*, (T. M. S. Chang, ed.), plenum, New York, 1978, 11-22.

8. L. W. Henderson, în *Artificial Liver and Artificial Cells*, (T. M. S. Chang, ed.), Plenum, New York, 1978, 39-46.
9. M. J. Lysaght, C. A. Ford, C. K. Colton, R. A. Stone și L. W. Henderson, în *Technical aspects of Renal Dialysis* (T. H. Frost, ed.), Tunbridge Wells, England, 1978, 81-95.
10. E. Quellhorst, B. Schuenemann și B. Doht, în *Technical aspects of Renal Dialysis* (T. H. Frost, ed.), Tunbridge Wells, England, 1978, 96-106.
11. S. T. Boen, *Medicine*, 1961, 40, 243.
12. G. P. Grodstein, M. J. Blumenkrantz, J. D. Kopple, J. K. Morna și J. W. Bobrun, *Kidney Int.*, 1981, 19, 564.
13. P. Berck, în *Artificial Liver and Artificial Cells*, (T. M. S. Chang, ed.), Plenum, New York, 1978, 281-292.
14. T. Horiuchi, H. Kambic, S. Takatani și Y. Nose, *Topics in Plasmapheresis: A Bibliography of Therapeutic Applications and New Techniques*, International Society for Artificial Organs, Cleveland, 1982.
15. R. C. Eberhart, S. K. Dengle și R. M. Curtis, *Artif. Organs*, 1979, 21, 19.
16. P. H. Mook, P. Wong, C. R. H. Wildevuur, P. J. D. Mayers și J. D. S. Gaylor, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 1983, 29, 215.
17. W. Murphy, L. A. Trudell, L. I. Friedman, M. Kakavan, P. D. Richardson, K. Karlson și P. M. Galetti, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 1974, 20, 278.
18. N. Dean și R. J. Wineman, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 1989, 55, 1245.
19. M. Kaye, R. Gagnon, B. Mulhearn și D. Spergel, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 1989, 55, 234.
20. T. G. Kaufmann și E. F. Leonard, *AIChE, J.*, 1968, 14, 421.
21. H. Naito, T. Miyazaki, N. Shimuzu și K. Yoneda, *Artif. Organs Suppl.*, 1981, 5, 670.
22. P. Konstantin, H. Goehl și C. Gullberg, *Artif. Organs Suppl.*, 1981, 5, 691.
23. J. Wezmar și E. F. Leonard, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 1970, 16, 115.
24. M. Odian și E. F. Leonard, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 1968, 14, 19.
25. A. L. Zydney și C. K. Colton, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 1982, 28, 408.
26. T. A. Stepner și E. F. Leonard, *J. Membrane Sci.*, 1989, 34, 345.
27. T. G. Kaufmann și E. f. Leonard, *A.I.Ch.E. J.*, 1968, 14, 110.
28. E. N. Lightfoot, în *Transport Phenomena and Living Systems*, Wiley, New Zork, 1974, 158-194.
29. P. M. Galletti, în *Advances in Biomedical Engineering and Medical Physics*, vol. 2 (S. N. Levine, ed.), Wiley, New York, 1968, 11-123.

30. O. Kedem și A. Katchalsky, *Biochim. Biophys. Acta*, **1978**, 47, 229.
31. J. A. Lane și J. W. Riggle, *Chem. Eng. Prog. Symp. Ser.*, **1959**, 55, 127.
32. P. R. Craddock, J. Fehr, A. P. Dalmaso, K. L. Brigham și H. S. Jacob, *J. Clin. Invest.*, **1977**, 59, 879.
33. H. Bauer, H. Brunner, H.E. Franz și B. Bültmann, *Contrib. Nephrol.*, **1983**, 36, 9.
34. S. Keva și M. Jacobson, *Contrib. Nephrol.*, **1983**, 36, 82.
35. F. C. Pearson, J. Bohon, W. Lee, G. Bruszer, M. Sagona, R. Dawe, G. Jakubowski, D. Morrison și C. Dinarello, *Artif. Organs*, **1984**, 8, 291.
36. W. Fassbinder și K.-M. Koch, *Contrib. Nephrol.*, **1983**, 36, 51.

---

**Tiparul s-a executat sub c-da nr. 374/1997,  
la Tipografia Editurii Universității din București**

---





ISBN: 973 - 575 - 301 - 4

Lei 15000