



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00666**

(22) Data de depozit: **31.08.2009**

(41) Data publicării cererii:
28.02.2011 BOPI nr. 2/2011

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE
ASACHI" DIN IAȘI, BD. D. MANGERON,
NR. 67, IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:
• CAȘCAVAL DAN, ȘOSEAUA BĂRNOVA,
NR. 29, IAȘI, IS, RO;

• GALACTION ANCA IRINA, STR. N.GANE,
NR. 30, IAȘI, IS, RO;
• BLAGA ALEXANDRA CRISTINA,
STR. CERNĂ, NR. 5, BL. A 22, ET. 1, AP. 5,
IAȘI, IS, RO

(54) **PROCEDEU DE MĂRIRE A ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A
GENTAMICINEI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de mărire a activității antimicrobiene a gentamicinei. Procedeul conform invenției constă din îndepărtarea selectivă a gentamicinei C_1 , componentă cu cea mai scăzută activitate biologică, din soluția rezultată în urma biosintezei, prin extracția reactivă în raport 1:1 a soluției apoase conținând gentamicina, ajustată la o valoare pH = 8, cu diclormetan conținând 1-6% acid di(2-etilhexil)fosforic,

la 25°C, sub agitare intensă timp de 1 min, urmată de separarea și reextracția gentamicinelor C_{1a} și C_2 din faza organică, în raport 1:1, cu soluție apoasă 0,2...1,1% de acid sulfuric, la 25°C, sub agitare intensă timp de 1 min.

Revendicări: 1



PROCEDEU DE MĂRIRE A ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A GENTAMICINEI

DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la un procedeu original de creștere a activității antimicrobiene a gentamicinei prin îndepărtarea din amestecul de biosinteză a componentei cu activitatea biologică cea mai redusă.

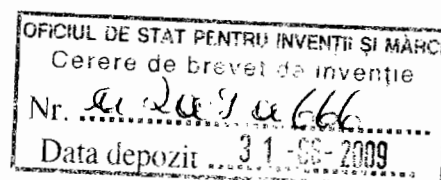
Gentamicina are un spectru larg de acțiune antibacteriană, fiind activă împotriva infecțiilor cu bacterii gram-pozitive și gram-negative, incluzând și tulpinile rezistente la tetraciclină, cloramfenicol, kanamicină, colistină (*Pseudomonas*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Aerobacter*, *Moraxella*, *Neisseria*) [1-3].

Acest antibiotic se obține prin biosinteză de către microorganismul *Micromonospora purpurea* sau *Micromonospora echinospora*, produsul rezultând sub forma unui amestec complex de componenți cu structură foarte apropiată. Dintre aceștia, trei sunt cei mai importanți, și anume gentamicinele C_1 , C_{1a} și C_2 [2,3]. Valorile medii ale proporțiilor în care se găsesc acești componenți în produsul de biosinteză sunt: gentamicina C_1 30-35%, gentamicina C_{1a} 25%, gentamicina C_2 40-45% [4].

Activitatea antimicrobiană a componenților care alcătuiesc gentamicina obținută prin biosinteză este semnificativ diferită. Astfel, cea mai activă este gentamicina C_{1a} , activitatea acesteia fiind puțin superioară celei a gentamicinei C_2 . Cea mai slabă activitate antimicrobiană o manifestă gentamicina C_1 [5].

În prezent se cunoaște procedeu de separare la nivel industrial a gentamicinei din lichidele de fermentație, care se realizează prin sorbție pe cationiți, urmată de eluție cu o soluție 4-5% acid sulfuric, din eluatul neutralizat, purificat și concentrat la vid, gentamicina fiind precipitată în mediu de acetonă sub formă de sulfat [2,6].

Procedeu cunoscut și aplicat în prezent prezintă următoarele dezavantaje:



- nu permite fracționarea amestecului complex de gentamicine obținut prin biosinteză, respectiv nu elimină din acest amestec gentamicina C₁;

- necesită un consum ridicat de materiale, în special acetonă;

- utilizarea schimbătorilor de cationi presupune și regenerarea acestora, ceea ce mărește durata etapei tehnologice de separare și purificare a gentamicinei și conduce la pierderi de produs.

Scopul invenției îl reprezintă utilizarea unui procedeu original de mărire a activității antimicrobiene a gentamicinei.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unei gentamicine cu activitate antimicrobiană ridicată prin îndepărtarea din amestecul de biosinteză a gentamicinei cu cea slabă activitate biologică, și anume gentamicina C₁.

Invenția are aplicabilitate în industria farmaceutică, respectiv în industria de biosinteză.

Procedeul conform invenției prezintă **urmatoarele avantaje** :

- prin utilizarea acestui procedeu, crește conținutul de gentamicine cu activitate antimicrobiană ridicată în amestecul obținut prin biosinteză;

- prin creșterea activității antimicrobiene a gentamicinei se reduce cantitatea de antibiotic prescrisă pentru tratamentele diferitelor infecții, reducându-se și potențialele efecte secundare asociate tratamentului;

- prin utilizarea extracției reactive și reextracției cu soluție de acid sulfuric pentru purificarea gentamicinei se reduce numărul etapelor necesare și se elimină consumurile și, implicit, costurile suplimentare de materiale;

- procedeul se poate aplica folosind orice extractor utilizat la nivel industrial;

- prin acest procedeu se obțin randamente finale ridicate de separare a gentamicinelor cu activitate antimicrobiană ridicată;

- aplicarea acestui procedeu evită pierderile de gentamicine active;

- solventul (amestecul de acid di-(2-etilhexil) fosforic și diclormetan) utilizat la extracția reactivă poate fi regenerat și utilizat practic într-un număr nelimitat de cicluri de separare;

- procedeul este ecologic, datorită regenerării continue a solventului.

Procedeul, conform invenției, constă în două etape: în prima etapă se îndepărtează gentamicina C₁ din amestecul de biosinteză, prin extracția sa reactivă selectivă cu o soluție de 10-60 g/l acid di-(2-etilhexil) fosforic în diclormetan, iar în etapa a doua se realizează reextracția

gentamicinelor C_{1a} și C_2 din extractul obținut în prima etapă cu o soluție apoasă de 2-11 g/l acid sulfuric. Ambele etape se desfășoară la 25°C, timp de 1 minut.

Se dau mai jos câteva exemple de realizare a invenției :

Exemplul I

Se prepară 50 ml soluție apoasă care conține 50 g/l gentamicină de biosinteză (care conține 31,92% gentamicină C_1 , 24,20% gentamicină C_{1a} , 43,88% gentamicină C_2). Se corectează pH-ul soluției apoase la valoarea 8 cu o soluție 3% hidroxid de sodiu. Soluția astfel obținută se supune extracției cu 50 ml diclormetan care conține 10 g/l acid di-(2-etilhexil) fosforic, într-o coloană de sticlă de 200 ml prevăzută cu un sistem de agitare vibratorie care realizează o amestecare intensă a fazelor (agitare vibratorie cu frecvența vibrațiilor de 50 Hz și amplitudinea de 4 mm), la temperatura de 25°C, timp de 1 minut. Emulsia rezultată se separă într-un separator centrifugal la 6000 rot/min. Randamentele de extracție sunt în ordine: 58% pentru gentamicina C_1 , 24% pentru gentamicina C_2 , 18% pentru gentamicina C_{1a} .

Extractul obținut conține un amestec de gentamicine constituit din 72% gentamicina C_1 și 28% gentamicine active C_{1a} și C_2 . Pentru recuperarea gentamicinelor active, extractul se supune reextracției, în aceeași coloană de extracție și în aceleași condiții de operare, cu 50 ml soluție apoasă de 2 g/l acid sulfuric. Emulsia rezultată se separă într-un separator centrifugal la 6000 rot/min. Randamentul reextracției gentamicinelor active C_{1a} și C_2 este de 97%.

Se reunesc rafinatul obținut din etapa de extracție reactivă cu soluția acidă obținută după reextracție. În amestecul de gentamicine din soluția rezultată, conținutul gentamicinelor cu cea mai mare activitate antimicrobiană (gentamicinele C_{1a} și C_2) este de 90%. Comparativ cu soluția apoasă inițială a amestecului complex de biosinteză, pierderea totală de gentamicine active microbiologic este de 0,3%.

Regenerarea soluției de acid di-(2-etilhexil) fosforic în diclormetan se realizează prin reextracția gentamicinei C_1 neextrasă și a urmelor de gentamicine C_{1a} și C_2 cu o soluție apoasă 12 g/l acid sulfuric, în raport volumic de 1:1, în condiții de operare identice cu cele descrise mai sus.

Exemplul II

Se prepară 50 ml soluție apoasă care conține 50 g/l gentamicină de biosinteză (care conține 31,92% gentamicină C_1 , 24,20% gentamicină C_{1a} , 43,88% gentamicină C_2). Se corectează pH-ul soluției apoase la valoarea 8 cu o soluție 3% hidroxid de sodiu. Soluția astfel obținută se

15

supune extracției cu 50 ml diclormetan care conține 60 g/l acid di-(2-etilhexil) fosforic, într-o coloană de sticlă de 200 ml prevăzută cu un sistem de agitare vibratorie care realizează o amestecare intensă a fazelor (agitare vibratorie cu frecvența vibrațiilor de 50 Hz și amplitudinea de 4 mm), la temperatura de 25°C, timp de 1 minut. Emulsia rezultată se separă într-un separator centrifugal la 6000 rot/min. Randamentele de extracție sunt, în ordine: 77% pentru gentamicina C₁, 70% pentru gentamicina C_{1a}, 68% pentru gentamicina C₂.

Extractul obținut conține un amestec de gentamicine constituit din 36% gentamicina C₁ și 64% gentamicine active C_{1a} și C₂. Pentru recuperarea gentamicinelor active, extractul se supune reextracției, în aceeași coloană de extracție și în aceleași condiții de operare, cu 50 ml soluție apoasă de 11 g/l acid sulfuric. Emulsia rezultată se separă într-un separator centrifugal la 6000 rot/min. Randamentul reextracției gentamicinelor active C_{1a} și C₂ este de 83%.

Se reunesc rafinatul obținut din etapa de extracție reactivă cu soluția acidă obținută după reextracție. În amestecul de gentamicine din soluția rezultată, conținutul gentamicinelor cu cea mai mare activitate antimicrobiană (gentamicinele C_{1a} și C₂) este de 87%. Comparativ cu soluția apoasă inițială a amestecului complex de biosinteză, pierderea totală de gentamicine active microbiologic este de 0,8%.

Regenerarea soluției de acid di-(2-etilhexil) fosforic în diclormetan se realizează prin reextracția gentamicinei C₁ neextrasă și a urmelor de gentamicine C_{1a} și C₂ cu o soluție apoasă 20 g/l acid sulfuric, în raport volumic de 1:1, în condiții de operare identice cu cele descrise mai sus.

Bibliografie

1. T. Korzybski - Antibiotics: origin, nature and properties, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1978, p. 712.
2. C. Dăescu - Chimia și tehnologia medicamentelor, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1994, p. 264.
3. D.A. Williams, T.L. Lemke - Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2002.
4. P.J. Claes, R. Busson, H. Vanderhaeghe - J. Chromatogr., 1984, 298, p. 445.
5. S. Yoshizawa, D. Fourmy, J.D. Puglisi - EMDO J., 1998, 17 (22), p. 6437.
6. C. Oniscu - Chimia și tehnologia medicamentelor, Ed. Tehnică, București, 1988, p. 135.

PROCEDEU DE MĂRIRE A ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A GENTAMICINEI

REVENDICARI

Procedeul în două etape de îndepărtare selectivă a gentamicinei C_1 din amestecul de gentamicine obținut prin biosinteză caracterizat prin aceea că soluția apoasă care conține amestecul biosintetic de gentamicine se supune extracției reactive cu diclormetan care conține acid di-(2-etilhexil) fosforic acid în concentrație de 10- 60 g/l, sub o agitare intensă a fazelor, la o temperatură de 25°C, timp de 1 min, urmată de reextracția gentamicinelor C_{1a} și C_2 din extract cu o soluție apoasă de 2-11 g/l acid sulfuric, sub o agitare intensă a fazelor, la o temperatură de 25°C, timp de 1 min.