



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00595**

(22) Data de depozit: **25/09/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2021 BOPI nr. **3/2021**

(71) Solicitant:

• INSTITUTUL DE CHIMIE
MACROMOLECULARĂ "PETRU PONI"
IAȘI, ALEEA GRIGORE GHICA VODA
NR.41 - A, IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:

• SUFLET MIHAELA DANA,
STR.VASILE LUPU, NR.118, BL.C1, SC.B,
ET.3, AP.14, IAȘI, IS, RO;

• FUNDUEANU CONSTANTIN MARIETA,
ALEEA TUDOR NECULAI, NR.57, BL.975,
SC.A, AP.15, IAȘI, IS, RO;
• IOANID EMIL GHIOCEL, STR.SARARIEI,
NR.43, IAȘI, IS, RO;
• DARABĂ OANA MARIA, STR.REPUBLICII,
BL.36, SC.C, ET.1, AP.1, FĂLTICENI, SV,
RO;
• AFLORI MAGDALENA,
STR. GRIGORE URECHE NR. 1,
BL. MĂRĂCINEANU, ET. II, AP. 9, IAȘI, IS,
RO

(54) PROCEDEU DE OBȚINERE A UNOR MICROGELURI SUPERABSORBANTE BIOCOMPATIBILE

(57) Rezumat:

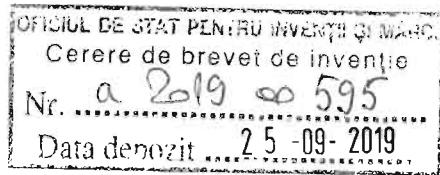
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor microgeluri superabsorbante biocompatibile cu aplicare în domeniul medical, farmaceutic și/sau cosmetic. Procedeul, conform inventiei, constă în amestecarea continuă a microsfereelor de polizaharidă neutră de tip curdlan, hidratate în prealabil cu apă bidistilată, adăugarea unei soluții de hidroxid de sodiu cu o concentrație de 10...40% în care se dizolvă borohidrură de sodiu și

1,2-dicloretan, ca dispersant și agentul de cuaternizare sintetizat din epiclorhidrină și o amină terțiară, rezultând o pulbere fină formată din microsfere cu o dimensiune medie de 30...110 µm, cu un factor de umflare de 285...1255% și o capacitate de reținere a apei de 185...270 g apă/1 g microsfere.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozitivelor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





PROCEDEU DE OBȚINERE A UNOR MICROGELURI SUPERABSORBANTE BIOCOMPATIBILE

Invenția se referă la un procedeu de obținerea de microgeluri sferice superabsorbante prin funcționalizarea suplimentară a unor microgeluri neionice pe bază de polizaharidă (celuloză, curdlan, dextran, pululan, etc) destinate utilizării ca materiale purtătoare de agenți terapeutici, cu proprietăți superabsorbante, netoxice, destinat dezvoltării domeniului medical, farmaceutic și/sau cosmetic.

Microgelurile sunt particule de structuri polimerice reticulate (hidrogeluri cu dimensiuni micrometrice) obținute prin diverse procedee de reticulare chimică (covalent) sau fizică (electrostatic, legături de hidrogen, interacțiuni de tip Van der Waals, etc.) a unuia sau a mai multor polimeri. În general, cantitatea de apă reținută de microgeluri reprezintă în jur de 25% din greutatea totală a microgelurilor. În cazul în care conținutul de apă depășește 85% din greutatea totală, hidrogelul se numește superabsorbant.

În domeniile strategice privind siguranța populației precum domeniile medicale, farmaceutice, cosmetice, biocompatibilitatea și biodegradabilitatea transportorilor de agenți terapeutici sunt cerințe primordiale pentru ca materiale polimere vizate să poată fi utilizate ca purtători de substanțe active sau bioactive. Având în vedere aceste cerințe, utilizarea polimerilor naturali, a polizaharidelor (celuloză, curdlan, dextran, pululan, gellan, xantan etc) ca polimeri de plecare pentru obținerea de transportori rezolvă din start această cerință.

Curdlanul este o polizaharidă neutră, sintetizată de microorganismul *Agrobacterium* biovar 1 (cunoscută ca *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* strain 10C3), cu o structură liniară formată din unități de D-glucoză unite prin punți glucozidice β -(1→3) și cunoscută ca având proprietăți anti-tumorale [Mycological research 111 (2007) 635 – 652; American Journal of Immunology 8(2), 38-43, 2012].

Microgeluri sferice pe bază de curdlan neutru se obțin fie prin reticularea chimică a curdlanului cu un agent de reticulare (ca de exemplu epiclorhidrina) utilizând tehnica de reticulare în emulsie apă/ulei [Carbohydrate Polymers 94 (2013) 889– 898; International

Journal of Biological Macromolecules 44(3) 2009, 215-221], fie prin reticulare fizică (ca de exemplu reacții de chelatizarea cu ioni metalici [CN107828776 (A)-2018-03-23]). Cu toate că în procedeul chimic de obținere este folosită epiclorhidrina ca reticulant, există studii de biocompatibilitate care confirmă netoxicitatea acestor microgeluri [Carbohydrate Polymers 94 (2013) 889– 898].

Dezavantajul major al acestor microgeluri sferice pe bază de curdlan nativ (neutră deci neionic) este eliberarea bruscă a agentului terapeutic în organism, ca urmare a reținerii acestuia numai prin forțe de adsorbție.

Alte dezavantaje ale acestor microsfere de curdlan neionic sunt:

- capacitatea mică de reținere a agenților terapeutici, deci o eficiență mică de încărcare cu agenți terapeutici;
- eliberarea bruscă a agenților terapeutici adsorbiți;
- capacitatea mică de umflare (factorul de umflare, q , este 7, determinat în apă distilată, la temperatura camerei).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția de față constă în extinderea domeniului de utilizare a microgelurilor pe bază de curdlan prin dezvoltarea de noi produse cu aplicare în domeniul medical, farmaceutic și/sau cosmetic.

Procedeu de obținere a microgelurilor sferice superabsorbante înălțătură dezavantajele de mai sus prin aceea că microsferele neutre de curdlan sunt funcționalizate suplimentar cu grupări cuaternare de amoniu, ce se obțin prin amestecarea continuă, timp de 6 - 24 de ore, la o temperatură de 50°C - 70°C, a microsfierelor hidratate în prealabil în apă bidistilată, în care se adaugă o soluție de hidroxid de sodiu cu concentrația de 10-40% în care s-a dizolvat borohidrură de sodiu, 1,2-dicloretan ca dispersant și agentul de cuaternizare ce se găsește în raport molar de 1:1 până la 1:15 față de polizaharidă, agentul fiind obținut prin reacția timp de 24-48 ore dintre epichlorhidrină și amina terțiară în raport molar de 1:1, rezultând microgeluri cationice cu grupe cuaternare de amoniu, ce se spală de minim trei ori cu apă deionizată pentru îndepărțarea substanțelor nereacționate, se deshydratează treptat cu un amestec de apă-metanol în raport de 75:25 până la 25:75, metanol, amestec metanol-acetonă în raport de 75:25 până la 25:75, acetonă, apoi se usucă în etuvă la temperatură de 40 - 60°C și vid înaintat 0,08 bari, timp de minim 24 h, produsul final prezintându-se ca o pulbere albă, granulară, netoxică cu posibilitatea de a fi utilizată în domeniul farmaceutic și/sau medical.

Avantajele pe care le rezolvă invenția de față constă în:

- obținerea unor microgeluri sferice ionice cu grupări cationice de amină cuaternară;
- microgelurile au o capacitate mare de umflare;

- capacitate mare de reținere a agenților terapeutici;
- permit eliberarea treptată a agenților terapeutici adsorbiți;
- microgelurile sunt biocompatibile, deci netoxice.

Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției.

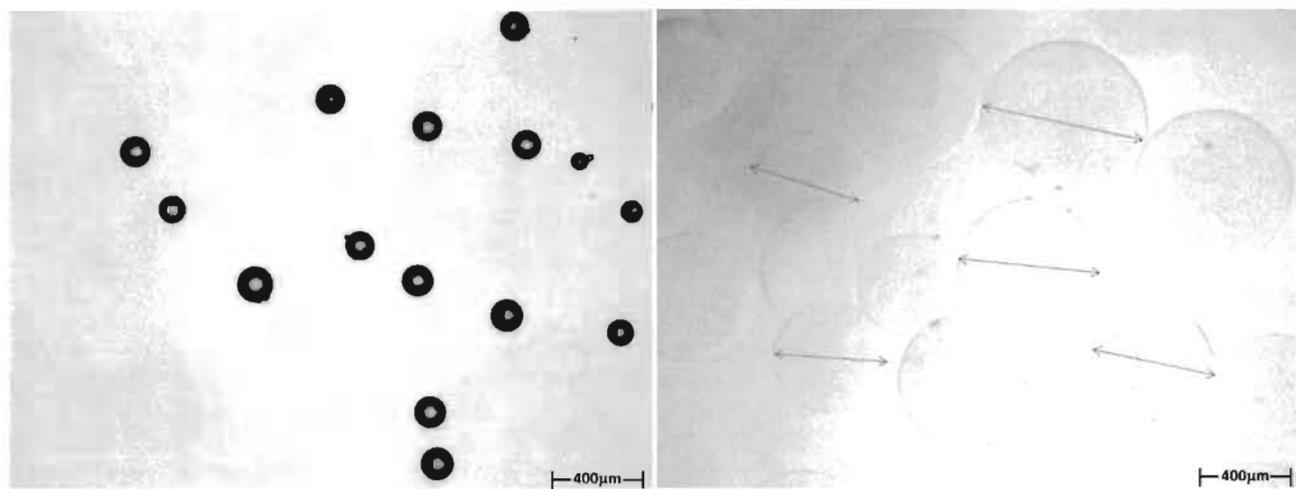
Exemplu

Procedeul de funcționalizare suplimentară a microgelurilor pe bază de curdlan, prin introducerea de grupări cuaternare de amoniu (dimetiletil, dimetiloctil, dimetilhexil, dimetildodecil, etc) conform invenției, constă în umflarea într-un balon de reacție a 0,5...2 g microsfere de curdlan neutru, cu dimensiunea de 30-110 μm , în 15...40 ml apă bidistilată, timp de 24 h sub o ușoară agitare mecanică 30-80 rpm. Concomitent într-un alt balon prevăzut cu sistem de agitare mecanic se realizează agentul de cuaternizare, prin amestecarea continuă la 50-100 rpm a 3,8 ml amina terțiară (dimetiletil, dimetilhexil, dimetiloctil, dimetildodecil, etc) cu 1,45 ml epiclorhidrină (într-un raport molar 1:1) un timp de 24...48 h, la temperatura camerei. În balonul de reacție cu microsferele umflate se adaugă 5...15 ml soluție hidroxid de sodiu 10-40% în care se dizolvă 5...15 mg borohidrură de sodiu, și 30...50 ml 1,2 dicloretan ca mediu de dispersie. Întreg sistemul se menține sub agitare mecanică la 40...70 rpm, 2...3 ore, la temperatura camerei, apoi se adaugă agentul de cuaternizare. Reacția decurge la temperatura de 50-70 °C, timp de 24 h.

Recuperarea microsfereelor funcționalizate cu grupe cuaternare de amoniu, se face prin filtrare pe pâlnie filtrantă cu porozitatea G2-G3, apoi microsferele se spală pentru îndepărțarea substanțelor nereacționate în mai multe etape și anume: cu apă bidistilată de 3-4 ori, cu acid clorhidric 0,1N pentru a avea grupele cuaternare în formă clorhidrat, apoi treptat cu un amestec de apă-metanol în raport volumetric de la 75:25 până la 25:75, metanol absolut, amestec de metanol-acetonă în raport volumetric de la 95:5 până la 5:95, acetonă, iar la final microgelurile complet deshidratate sunt uscate în etuvă la temperatura de 40-60 °C și vid 0,08 bari timp de 24 ore.

În continuare, sunt prezentate date cu referire la invenție și în legătură cu Fotografile 1 și 2, cu Figurile 1, 2 și 3, și cu Tabelul 1.

În Fotografia 1 sunt prezentate imaginile de microscopie optică, realizate cu microscopul optic tip Morphologi G3 (Malvern Instruments, UK), a microgelurilor de curdlan, funcționalizate cu grupări cuaternare de dimetiloctil amoniu, în formă deshidratată precum și hidratată în apă bidistilată.



Fotografia 1. Imagine de microscopie optică a microgelurilor sferice de curdlan funcționalizate cu grupări cuaternare de dimetiloctil amoniu: în formă deshidratată (stânga) și în formă hidratată (dreapta)

În tabelul 1 sunt înregistrate principalele caracteristici ale microgelurilor sferice de curdlan funcționalizate cu grupări cuaternare de dimetiloctil amoniu precum diametru mediu în formă deshidratată și hidratată, densitatea vrac, factorul de umflare și capacitatea de schimb.

Tabel 1. Principalele caracteristici a microgelurilor sferice de curdlan funcționalizate cu grupare cuaternară de dimetiloctil amoniu

Parametru	Caracteristici	
Diametru mediu, în stare deshidratată (μm)	30 - 110	
Diametru mediu, în stare hidratată (μm)	620 - 950	
Densitate vrac (g/mL)	0,703 ± 0,01	
Factor de umflare, (%) $q = \frac{(v_f - v_0)}{v_0} \times 100$	pH=5,5	800
	pH=1,2	380
	pH=7,4	1010
Capacitatea de reținere (g apă/g microgeluri)	25°C	185
	37°C	270
Capacitatea de schimb (mechiv./g)	0,93	

în care: factorul de umflare (q) a microgelurilor a fost calculat cu ecuația din tabelul 1, v_0 – volumul de microgeluri în formă uscată (ml); v_f – volumul microgelurilor în formă hidratată

(ml), la echilibru; Capacitatea de schimb a microgelurilor reprezintă numărul de miliechivalenți de grupe cuaternare ce se găsesc într-un gram de microgeluri în formă uscată.

În figura 1 este prezentată influența pH-ului mediului asupra capacitatei de umflare, la temperatura camerei, a microgelurilor sferice de curdlan funcționalizate cu grupări cuaternare de dimetiloctil amoniu în comparație cu capacitatea de umflare a microgelurilor neionice de curdlan.

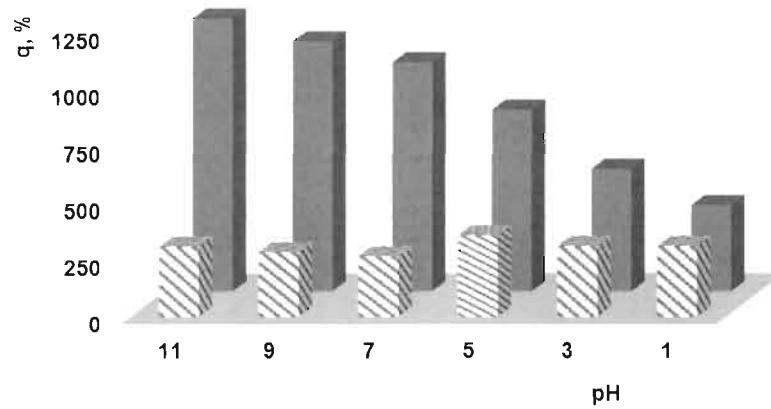


Figura 1. Capacitatea de umflare, la temperatura camerei: (hasurat) microgeluri neionice de curdlan; (gri) microgeluri de curdlan funcționalizate (cationice)

În figura 2 este prezentată influența pH-ului mediului și a temperaturii asupra umflării microgelurilor sferice de curdlan funcționalizate cu grupare cuaternară de dimetiloctil amoniu.

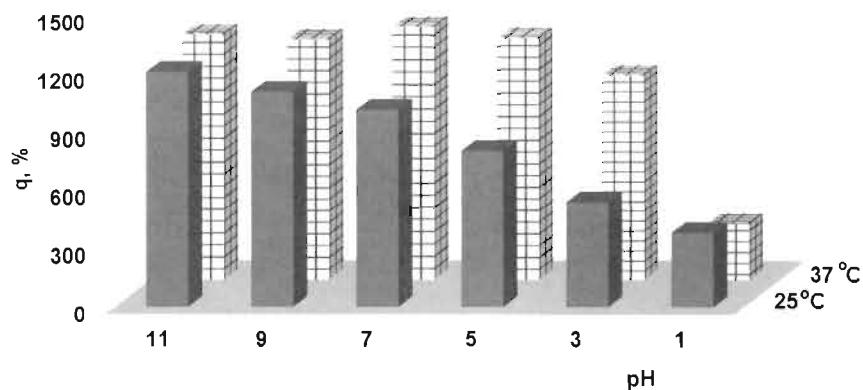


Figura 2. Influența pH-ului mediului și a temperaturii asupra umflării microgelurilor sferice de curdlan funcționalizate cu grupare cuaternară de dimetiloctil amoniu

Testul de citotoxicitate se realizează atât prin metoda extractului, cât și prin metoda contactului direct, microsferele fiind sterilizate în prealabil timp de 30 min cu o soluție de alcool etilic 70%. În metoda extractului, microsferele de curdlan funcționalizate cu grupări cuaternare de dimetiloctil amoniu, sterilizate, se pun în contact cu mediul de cultură. Soluția este incubată timp de 24 de ore la temperatură de 37°C, apoi centrifugată timp de 5 minute la 2000 rotații/min. Extractul (partea limpede) se pune în contact cu celule fibroblaste, testarea se face pentru 3 diluții diferite, raportate la volumul de lucru al flaconului de cultură de 7 ml, și anume: o diluție de 50% ce reprezintă 3,5 ml extract cu 3,5 ml mediu de cultură; o diluție de 25%, adică 1,75 ml extract cu 5,25 ml mediu de cultură și o diluție de 10% adică 0,7 ml extract cu 6,3 ml mediu de cultură. Testul se realizează în triplicat. Concomitent, se realizează triplicate și pentru proba martor, adică celule cu mediul de cultură fără extract. Vitalitatea celulară se evaluează după 24, 48 și 72 ore. În Figura 3 se prezintă viabilitatea celulelor fibroblaste după 24, 48 și 72 de ore de incubare în prezența extractului.

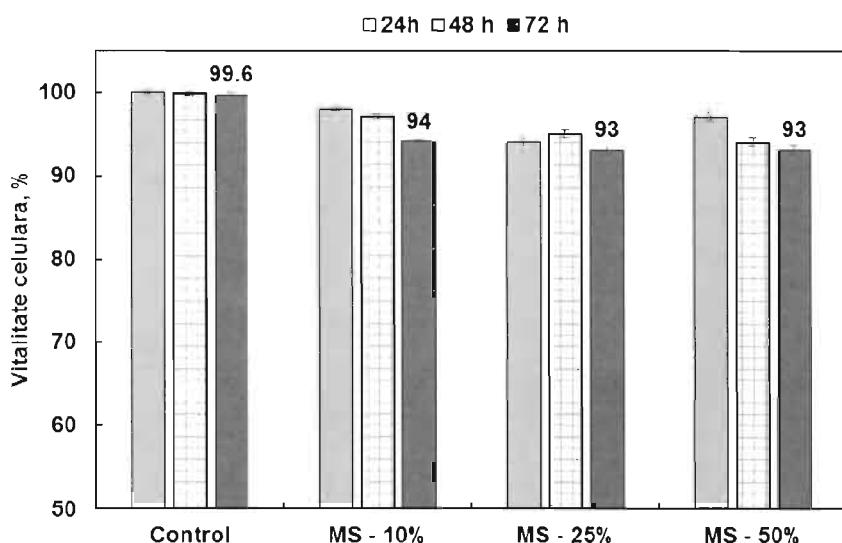
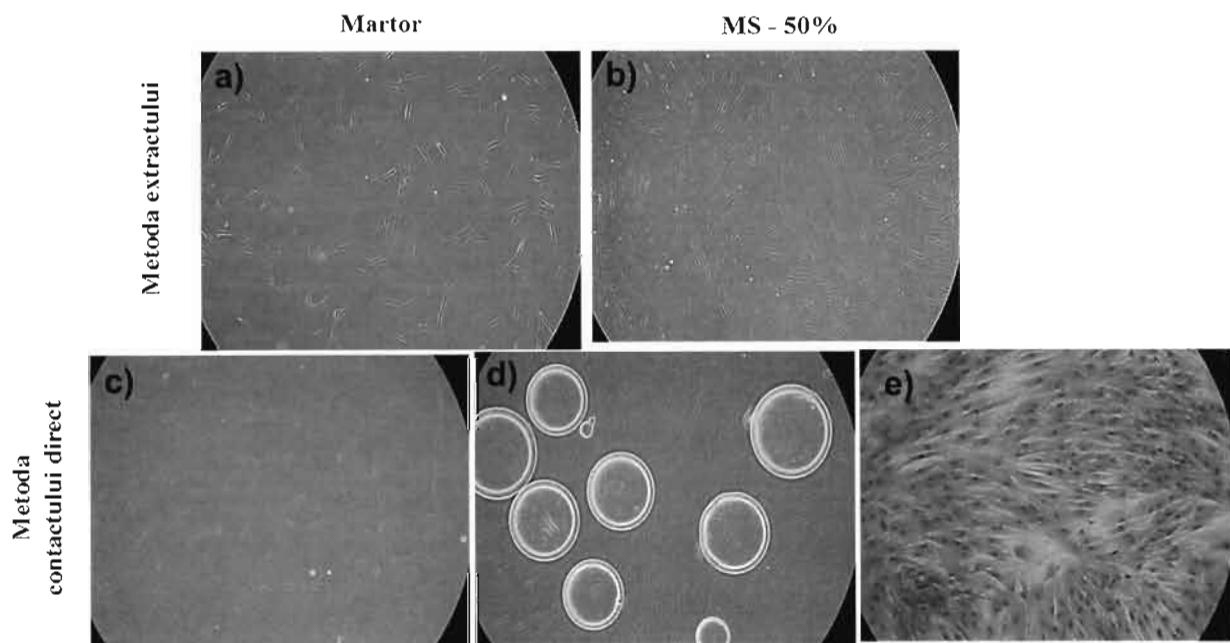


Figura 3. Viabilitatea celulelor fibroblaste, după 24, 48 și 72 de ore de incubare în prezența extractului de microgeluri funcționalizate cu grupe cuaternare de dimetiloctil amoniu (diluții 10%, 25%, 50%)

Metoda contactului direct se realizează prin punerea în contact a celulelor fibroblaste cu microgelurile de curdlan cu grupări cuaternare de dimetiloctil amoniu, în vederea analizei morfologice a celulelor. Sedimentul de gel, rămas după centrifugare, se pune în contact cu celulele fibroblaste. După 72 ore de incubare celulele sunt analizate la microscopul inversat tip OLYMPUS, cu sistem de achiziție a imaginii digitale.

Morfologia celulelor fibroblaste crescute în prezență microsferelor se studiază prin fixare și colorare. Fixarea se realizează prin spălarea celulelor cu o soluție Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline și punerea în contact cu o soluție Bouin, timp de 10 min. După fixare celulele se spală cu apă ultrapură și se colorează, utilizând hematoxilină-eozină. Celulele astfel pregătite se analizează cu microscopul inversat.

Fotografia 2 prezintă imaginile de microscopie optică a celulelor după 72 de ore de incubare prin metoda extractului (a și b) și prin metoda contactului direct la concentrația maximă de lucru de 50% (c - e). Fotografia 2e prezintă morfologia celulelor fibroblaste după fixare și colorare.



Fotografia 2. Analiză morfologică a celulelor fibroblaste după 72 de ore, pentru microgelurile funcționalizate cu grupare cuaternară de amoniu: (a și b) metoda extractului; (c-e) metoda contactului direct

Analizând rezultatele putem spune că microgelurile de curdlan, funcționalizate cu grupe cuaternare de dimetiloctil amoniu, cu capacitatea de schimb de 0,93 mechiv./g, nu afectează morfologia celulelor fibroblaste și nu împiedică proliferarea acestora, ceea ce confirmă că acestea sunt citocompatibile.

REVENDICARE

Procedeu de obținere a unor microgeluri sferice superabsorbante, biocompatibile, prin funcționalizarea suplimentară a microsferelor pe bază de curdlan cu un agent de cuaternizare cu grupare cuaternară de amoniu, **caracterizat prin aceea că** se realizează prin amestecarea continuă la 30-80 rpm, timp de 6 - 24 de ore, la temperatura de 50 până la 70°C a 0,5-2 g microsfere de curdlan neutru, cu dimensiunea de 30-110 µm, hidratate în prealabil în 15-30 ml apă bidistilată, cu 5-20 ml soluție de hidroxid de sodiu cu concentrația de 10-40% în care se dizolvă 5-20 mg borohidrură de sodiu, 22-90 ml 1,2-dicloretan, ca dispersant, și agentul de cuaternizare, ce se găsește în raport molar de 1:1 până la 1:15 față de polizaharidă, agent cuaternar obținut prin reacția timp de 24 h la temperatura camerei dintre epichlorhidrină și amina terțiară în raport molar de 1:1, rezultând microgeluri cationice, ce se purifică prin spălare de minim trei ori cu apă deionizată și se deshydratează treptat cu un amestec de apă-metanol de la 75:25 până la 25:75, metanol, metanol-acetonă de la 75:25 până la 25:75, acetonă, apoi se usucă în etuvă la temperatura de 40 - 60°C și vid 0,8 bari un timp de 24 h, produsul final prezintându-se ca o pulbere fină albă, cu aspect granular, formată din microsfere cu dimensiunea medie de 30 - 110 µm, cu un factor de umflare de 285-1255 %, o capacitate de reținere a apei de 185 g apă/g de microsfere, la 25°C și respectiv 270 g apă/g de microsfere la 37°C, funcție gradul de substituție obținut, grad ce poate varia între 0,01 și 0,5, și de agentul cuaternar utilizat, produsul final fiind biocompatibil, având o vitalitate celulară de 93% după 72h, microgelurile fiind destinate utilizării în domeniul medical, farmaceutic și/sau cosmetic.