

CERCETAREA METODELOR DE MODIFICARE A ACIDULUI HIALURONIC

Zadorojnâi Larisa¹, Zadorojnâi Alexandru², Scutari Corina³, Perdelcu Rodica³¹Universitatea Tehnică din Moldova, ²Universitatea de Stat din Moldova,³Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu"

Rezumat

Lucrarea prezintă „Cercetarea metodelor de modificare a acidului hialuronic” este dedicată studiului interacțiunii acidului hialuronic (AH) cu glicidil 2-acetoxibenzoat sau cu 2-acetoxibenzoil clorhidrat. Cercetarea metodelor de conjugare a AH cu unii derivați ai acidului salicilic, inclusiv aspirina, a fost efectuată pentru a obține noi produse farmaceutice.

Cuvinte cheie: acidul hialuronic, derivații acidului hialuronic, modificarea acidului hialuronic, aspirina.

Abstract

Research Methods of Modification of Hyaluronic Acid

The present work „Research Methods of Modification of Hyaluronic Acid” deals with the study of the reaction of hyaluronic acid (HA) with glycidyl 2-acetoxybenzoate or with 2-acetoxybenzoyl chloride. Research of conjugation methods of HA with some derivatives of salicylic acid, including aspirin, was made in order to obtain new pharmaceutical materials.

Keywords: hyaluronic acid, hyaluronic acid derivatives, hyaluronic acid modification, aspirin.

Acidul hialuronic este un polizaharid de origine animală, în componența moleculei căruia intră reziduurile acidului β -glucuronic și N-acetil- β -D-glucozaminei, conjugate prin legături β -(1-4) - și β -

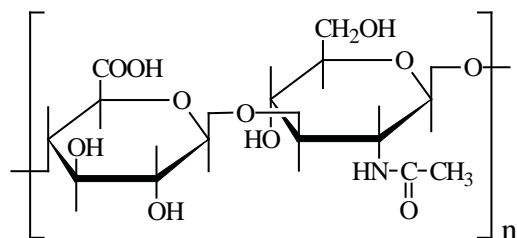


Fig.1. Structura acidului hialuronic

(1-3) - glicozide. Una din particularitățile benefice ale lui este hidrofilia înaltă. O moleculă de acid hialuronic este capabilă să mențină până la 500 molecule de apă [1]. O altă particularitate de bază a acidului hialuronic este biocompatibilitatea pronunțată. Eliberat din diverse surse și epurat prin metode corespunzătoare, se supune detașării imune în organism.

Actualmente atenția cercetătorilor este direcționată nu doar la perfectarea metodelor de eliberare și epurare a acidului hialuronic (AH), dar și ale metodelor de modificare a lui. Datorită prezenței în moleculă a numărului mare de grupe carboxilice, amide și hidroxile AH poate interacționa

cu multipli reagenți cu formarea derivaților de diversă origine, cu proprietăți, care diferă de cele ale AH inițial.

Una din cele mai utilizate reacții este formarea sărurilor AH cu substanțele care manifestă proprietăți esențiale. Spre exemplu, autorii [2] descriu obținerea sărurilor AH cu diverși aminoacizi. În acest scop la gelul hidric ale sărurilor de sodiu ale AH (3,3%) se adăuga soluția hidrică a aminoacidului clorhidrat. După atingerea pH până la 6,5 amestecul se supunea uscării prin sublimare. Astfel au fost obținute sărurile AH cu lizină, arginină, metionină și acidului asparaginic.

Acești derivați ai AH sunt recomandați pentru utilizare în compoziția produselor cosmetice și farmaceutice.

Un alt exemplu de utilizare a acestei metode este obținerea sărurilor AH cu ajutorul bazelor purinice și/sau pirimidinice [3]. Precum în cazul descris anterior, autorii preparau gelul hidric al hialuronatului de sodiu, la care se adăuga ulterior soluție de hidrociorură azotată alcalină. În unele experimente se utiliza regularitatea inversă de amestecare a reagenților – la soluția de hidrociorură azotată alcalină se adăuga gelul hidric al hialuronatului de sodiu. Amestecul obținut se supunea uscării de sublimare după omogenizare. În același brevet este descrisă obținerea derivaților AH, care conțin simultan atât baze purinice cât și/sau pirimidinice, precum și aminoacizi naturali sau oligomerii lor (polipeptide).

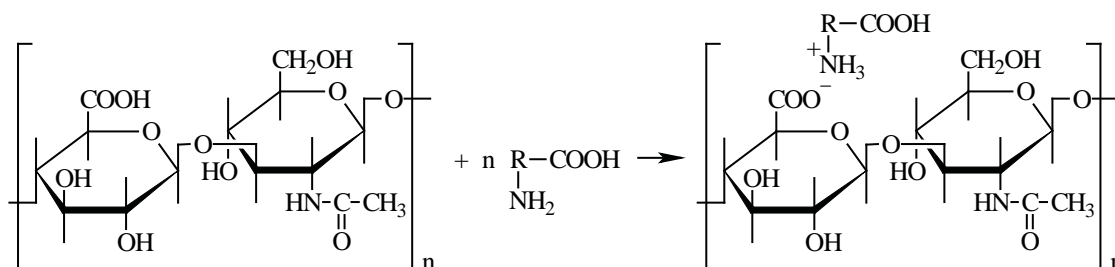


Fig. 2. Schema formării sărurilor AH cu aminoacizii

Prin altă metodă AH este modificat prin prelucrarea lui cu soluție dimetilformamidică a cloranhidridului, care conține reziduuri de substanțe farmacologic active. Pentru obținerea acestei cloranhidride, fenolul farmacologic activ, etanolul sau amina se prelucrează cu anhidridă, spre exemplu, cu acidul succinic [4]. Eterul compus acid obținut prin acțiunea oxalilclorurei în dimetilformamidă se transformă în cloranhidridă. Produsul de modificare prezintă un compus cu următoarea formulă:

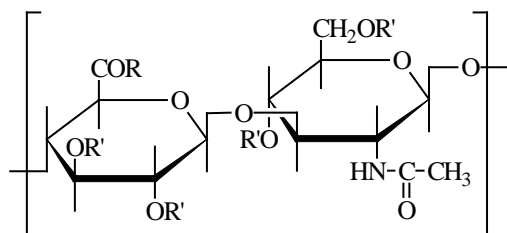


Fig. 3. Structura AH, modificat cu cloranhidridă.

R=OH, ONa sau reziduul etanolului; R' = H или $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{COR}'$ (n = 1-10, R'' - reziduul etanolului sau aminei farmacologic active).

Metodă identică este propusă pentru obținerea derivaților AH, care conțin reziduurile antioxidantului [5]. La soluția de sare metilcaprilamonică a AH, în N-metilpirrolidonă se adaugă 3,5-di-tret-butil-4-hidroxi-benzoilclorură. După finisarea reacției pentru obținerea sării de sodiu la amestec se adaugă soluție hidrică de NaCl, apoi NaHCO_3 și produsul se filtrează prin adaos de acetonă. În același brevet este descrisă obținerea derivaților AH prelucrați cu diverși reagenți.

Pentru obținerea eterului compus al AH conform grupării carboxilice, sarea tetrabutilamonică a AH se dizolvă

în dimetilsulfoxid [6] și la soluția căpătată se adaugă alchliodură. După păstrarea timp de 12 ore la temperatura de 30°C la amestec se adaugă soluție hidrică de NaCl și produsul se filtrează în proporție de 5:1 din volumul acetonei. Eterii, în care grupările carboxilice sunt esterificate, sunt recomandate pentru utilizare în medicină și chirurgia cosmetică.

Este descrisă obținerea diverselor amide și hidrazide ale AH. Spre exemplu, la soluția hidrică de AH și 4-aminoantipirinei se adaugă soluție NaOH și ulterior la temperatura camerei se introduce cantitatea calculată de carbodiimidă hidrosolubilă - 1-etil-3-[3-(diethylamino) propil] carbodiimidă [7].

La finele reacției în amestec se adaugă soluție NaOH și soluție saturată de NaCl, apoi produsul se sedimentează cu adaos de etanol. Conversia grupărilor carboxilice constituie 83% mol. În același brevet se descrie obținerea hidrazidelor substituite ale AH, care conțin reziduurile substanțelor medicamentoase. Prin interacțiunea AH cu dihidrida acidului dicarbonic în prezența carbodiimidei se obține hidrida AH substituit, la care pe cale de acilare se adaugă rest de ibuprofen.

Un număr enorm de lucrări sunt dedicate obținerii și studierii derivaților anexați ai derivaților AH. În funcție de gradul anexării poate fi mărită viscozitatea soluțiilor AH, sau acestea pot deveni insolubile în apă.

Anexarea se va efectua prin următoarele metode:

- prin interacțiunea cu carbodiimidele [8]. La soluția de AH, cu pH-ul de 4,75 se adaugă soluția de 1-etil-3-[3-(diethylamino)propil]carbodiimidei (EDC). După finisarea reacției se adaugă soluție NaCl și se sedimentează produsul cu volum triplat de etanol. În raportul

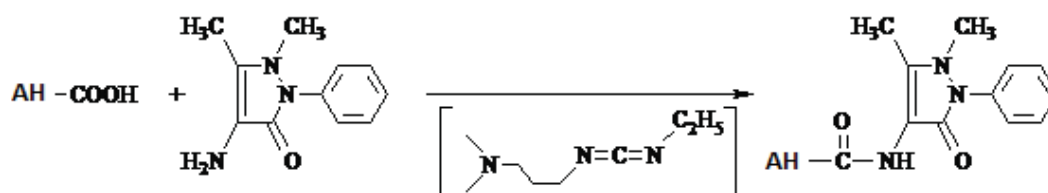


Fig. 4. Schema de formare a amidei AH, care conține 4-aminoantipirină

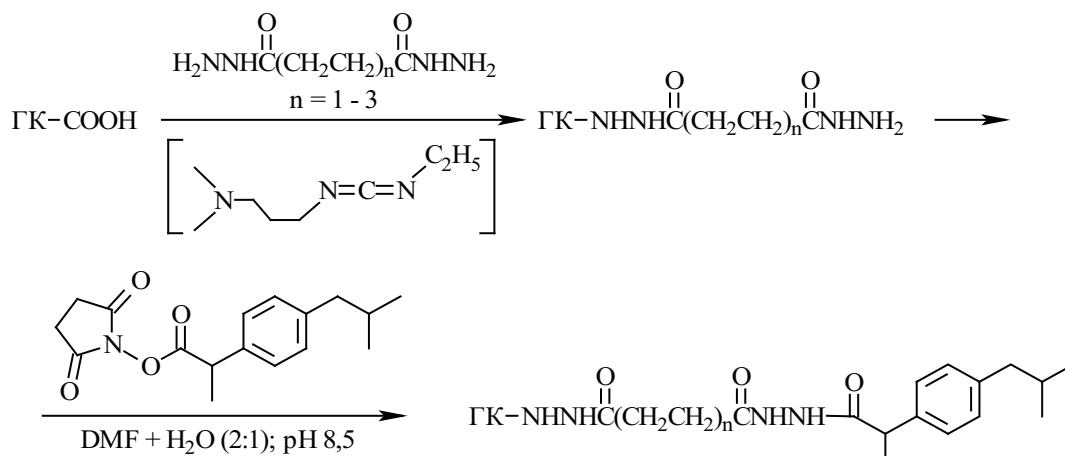


Fig. 5. Schema de formare a hidrazidei AH, care conține ibuprofen

molar EDC/AH 3,05% AH păstrează solubilitatea în apă și formează soluție vâscoasă. În concentrații mari AH modificat formează gel insolubil în apă;

– **prin interacțiunea cu epoxidele** [9]. Sarea sodică pulverulentă a AH se amestecă cu acid ascorbic și cu eterul diglicidic al dietilenglicolului. Amestecul se omogenizează în moară, se plasează pe partea inferioară a nicovalei Bridgman, se acoperă cu nicovalea superioară și se supune unei presiuni de 700 MPa la 20° C cu rotația unghiului nicovalei inferioare de 250°, timp de 1 min. Rata de eliminare a produsului este de 99%, gradul de umflare în apă atinge nivelul de 8 ml/g.

– **sub influența iradierii ultraviolete** [10]. Sarea de distearildimetilamoniu a AH se dizolvă în dimetilformamidă la 60°C. La soluție se adaugă cinamoilclorură și piridină, apoi se prelucrează termic la 60°C timp de 2 ore. Pentru suspendarea reacției și precipitarea produsului se adaugă metanol în raport de 1:5. Conform datelor analizei RMN se determină raportul de 1,3 grupări cinamoile la 1 fragment disaharid al AH. Produsul substituit se dizolvă în dimetilformamid și se supune iradierii ultraviolete cu lungimea de undă mai puțin de 290 nm de la lampa de mercur cu presiune înaltă la puterea de 500 Wat. După substituirea solventului cu apă se obține o substanță gelatinoasă - hialuronat fotoconjugat.

Actualmente se cunosc o mulțime de metode de modificare a AH, care, cu regret, nu sunt descrise în acest articol din lipsă de spațiu.

În cercetările noastre am încercat să modificăm AH prin introducerea în el a fragmentelor de acid acetilsalicilic

(aspirină). În una din metodele de modificare în calitate de liant între AH și aspirină am ales fragmentul de glicerină. Este atractiv prin faptul, că formează ușor legături eter-compuse hidrolizante, în urma cărora se obțin substanțe inofensive. Inițial am obținut cloranhidrida acidului acetilsalicilic, care ulterior a fost transformat în eterul glicidic al acidului acetilsalicilic:

Modelul AH, predestinat modificării, a fost dizolvat în apă, la soluția obținută s-a adăugat dimetilformamid pentru majorarea solubilității eterului adăugat în continuare. În amestecul obținut s-a introdus soluția eterului glicidic al acisului acetilsalicilic în dimetilformamid și s-a lăsat timp de 24 ore la 20°C.

Produsul a fost sedimentat prin adaos de etanol, a fost spălat de 3 ori cu etanol și uscat. Prezența fragmentelor de acid acetilsalicilic în produs a fost demonstrată cu ajutorul spectroscopiei-İK.

În altă metodă am încercat să introducem fragmente de acid acetilsalicilic prin acilare directă, fără utilizarea verigei liante. În acest scop din soluția hidrică a AH de 3,2% s-a sedimentat substanța cu acetonă. Sedimentul s-a spălat cu acetonă, apoi cu benzol și s-a transferat în fiola de sticlă. S-a adăugat trietilamină și cloralhidratul acidului acetilsalicilic. Soluția s-a înfiolat și s-a supus prelucrării termice timp de 2 ore pe baia de apă.

Ulterior fiola s-a deschis, sedimentul produsului a fost spălat de câteva ori cu benzol și uscat la aer. Prezența fragmentelor acidului acetilsalicilic în produsul obținut a fost demonstrată prin spectroscopie-İK, de asemenea, după hidroliza deplină s-a determinat și cantitativ prin fotocolorimetrie la 525 nm în prezența sării de Fe (III). Rezultatele

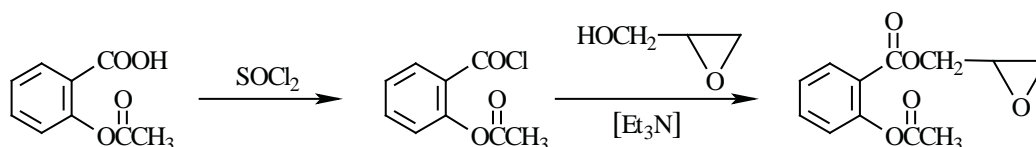


Fig. 6. Schema obținerii eterului glicidic al acidului acetilsalicilic.

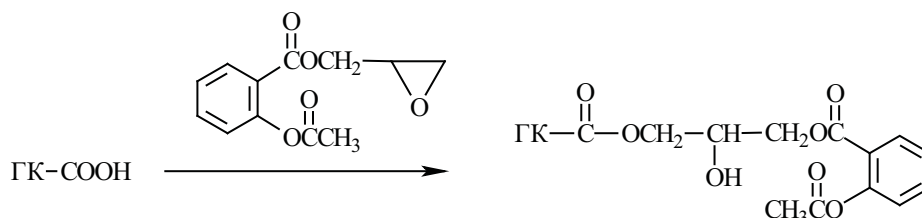


Fig. 7. Schema obținerii eterului compus al AH, cu conținutul rezidului de aspirină.

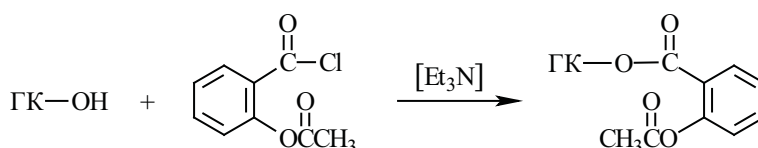


Fig. 8. Schema acilării AH cu cloranhidrida acidului acetilsalicilic.

măsurărilor atestă, că în 1 din 73 fragmente disaharide ale AH s-a dovedit prezența restului de acid acetilsalicilic.

Cele relatate mai sus denotă, că AH poate interacționa cu multipli reagenți cu formarea derivaților de diversă ori-

gine care manifestă proprietăți ce îi conferă particularitatea de a deveni un material fundamental în chirurgia plastică și oftalmologică, un component esențial ale multor produse cosmetice și farmaceutice.

Bibliografie:

1. Строителев В. В., Федорищев И. А. Гиалуроновая кислота – биологически активное вещество, обладающее защитными и иммуномодулирующими свойствами. В: Вестник новых медицинских технологий. 1997, т.46 №3, с.98.
 2. Abbiati Giuliana. Патент WO0008061, C08B 37/00, A61K 7/48, 47/36. "Reaction products of hyaluronic acid and natural amino acids and use in cosmetic and pharmaceutical compositions". 17 February 2000.
 3. Manenti Demetrio, Aita Gaspare. Патент WO2004013182, C08B 37/08, C08L5/08, A61K 47/36, 31/728, 7/00. "Hyaluronic acid derivatives". 12 February 2004.
 4. Khan Riaz, Konowicz A. Paul. Патент WO9635721, C08B 37/08, A61K 47/48. "A dicarboxylic acid hemiester or hemiamide with a pharmacologically active compound and with hyaluronic acid ester, a process for its preparation and a controlled release medicament containing this derivative". 14 November 1996.
 5. Нгуйен Туен Танх. Патент RU2174985. C08B 37/00, 37/08, A61K 31/715. «Полисахарид с привитым антиоксидантом и его способ получения». 20 октября 2001.
 6. Della Valle Francesco, Romeo Aurelio. "Hyaluronic acid esters and salts". Патент CA1341276, C08B 37/08, A61K 47/00, A61K 31/728, A61L 31/00. 31 July 2001.
 7. Понеделькина И. Ю. и др. Патент RU2283320, C08B 37/00, C08B 37/08, A61P 29/00. "Способ получения модифицированных гликозаминогликанов, обладающих анальгезирующими свойствами". 10 сентября 2006.
 8. Kuo Jing-Wen, Swann David A., Prestwich Glenn D. Patent US6096727, A61K 31/715, C08B 37/08. "Method for treating wounds using modified hyaluronic acid crosslinked with biscarbodiimide". 1 August 2000.
 9. Волков В. П. и др. Патент RU2382050. C08B 37/00. "Способ получения модифицированной аскорбиновой кислотой сшитой гиалуроновою кислоты и биоактивная композиция на ее основе". 20 февраля 2010.
 10. Yui Nobuhiko, Ooya Tooru, Sato Ikuo. Patent US2002143171, C08B 37/00. "Chemically modified hyaluronic acid or salts thereof, and a process for producing thereof". 3 October 2002.
-

*Depus în redacție – 15 octombrie 2013
Acceptat pentru publicație – 19 decembrie 2013*