

Newsletter

GammaPlus



10

Creșterea competitivității prin inovare și îmbunătățirea proceselor de fabricație cu iradiere gamma tehnologice

Editori:

- **Valentin Moise**, Cercetător Științific gr. III la IFIN-HH IRASM
- **Mihalis Cutrubinis**, Cercetător Științific gr. III la IFIN-HH, Departamentul de Iradiere Tehnologice IRASM
- **Mihaela Ene**, Cercetător Științific gr. III la IFIN-HH, Departamentul de Iradiere Tehnologice IRASM
- **Diana Savu**, Cercetător Științific gr. III la IFIN-HH Departamentul de Fizica Vieții și a Mediului
- **Dan Enache**, Șef Departament Centrul de Transfer Tehnologic și Marketing din IFIN-HH

29 Martie 2019

Analize GC-MS pentru industria farmaceutică - identificare de compuși necunoscuți, determinare de solvenți și monomeri reziduali

Progresul in domeniul farmaceutic este unul dintre factorii cheie in cresterea sperantei de viata, astfel, cercetarea si productia de medicamente si dispozitive medicale a luat amploare in ultimele decenii. Efectele secundare care rezulta din interactia substantelor si a contaminantilor este indezirabila, motiv pentru care este deosebit de importanta folosirea celor mai pure substante si echipamente sau materiale purificate in productia de medicamente. Metodele si regulile de fabricare, depozitare sau testare sunt definite si standardizate de catre Farmacopee. Datorita prezentei solventilor, monomerilor reziduali sau a altor impuritati care pot proveni din procesul de fabricare sau ambalare, poate fi afectata temperatura de tranzitie vitroasa sau alte caracteristici fizo-chimice precum permeabilitatea, cristalinitatea, proprietatile de dizolvare, ducand astfel la modificarea efectului terapeutic. Astfel, pentru analiza calitativa si cantitativa a compusilor volatili si semivolatili, cea mai adecvata metoda este tehnologia tandem GC-MS, utilizand un cromatograf de gaze cuplat la un spectrometru de masa, care identifica molecule bazandu-se pe un anumit tipar caracteristic de fragmentare, la timpi de retentie specifici.

Succesul aplicarii tehnicii GC-MS in analiza farmaceutica este datorat eficientei crescute a separarii, a sensibilitatii detectiei, chiar si in cazul unor cantitati foarte mici de analiti de interes, dar si datorita acuratetii si a preciziei in cazul analizelor cantitative ale matricilor complexe. Pe langa aceste avantaje se mai poate adauga timpul scurt de analiza si buna rezolutie, fapt care face aceasta tehnica foarte utila in controlul calitatii in industria farmaceutica. Analiza utilizand cromatografia de gaze presupune doi pasi generali- primul de separare a compusilor de interes si cel de-al doilea de cuantificare a acestora. Detectorii utilizati in GC avand timpi diferiti pentru fiecare compus, in cazul unei detectii cantitative a unor compusilor intr-o separare, detectorul trebuie calibrat utilizand solutii standard. Dupa injectia

acestora si compararea lor cu timpii de retentie ai probelor, se realizeaza analiza calitativa a probelor, iar intercompararea ariilor picurilor permite cuantificarea analitului. Cat despre spectrometria de masa, aceasta se bazeaza pe masurarea raportului dintre masa si numarul sarcinilor pozitive sau negative ale ionilor (m/z) din matricea analizata, dupa ionizare. Informatia obtinuta din MS este in esenta calitativa (informatia structurala a fragmentelor obtinute, determinarea masei moleculare) sau cantitativa (utilizand standard interne sau externe).

Solventii sau monomerii reziduali sunt impuritati organice volatile care sunt utilizati sau rezultati in procesul de sinteza a substantelor utilizate in medicamente si dispozitive medicale sau in excipientii utilizati in producerea formularilor, iar multi dintre acesti compusi nu pot fi inlaturati complet prin procesele standard de fabricatie. Solventi organici precum benzenul, stirenul, acetonitrilul, acetona sau metanolul sunt deseori utilizati in industria farmaceutica pentru producerea ingredientelor active sau a invelisurilor polimerice pentru anumite comprimate si astfel in fabricarea produsului final. Chiar si dupa procesul de uscare, multi dintre acesti solvent volatili sunt inevitabil inca prezenti in produsul final, afectand proprietati fizico-chimice precum dimensiunea particulei, stabilitate, viteza de solubilizare sau pot fi chiar adevarate pericole pentru sanatate.

Clasificarea solventilor reziduali dupa evaluarea riscurilor, conform Agentiei Europene de Medicina (EMA)/ ICH este:

- Clasa I de solventi: solventi de evitat - substante carcinogene cunoscute, posibil carcinogene si cu risc pentru mediu;
- Clasa II de solventi: solventi de limitat- substante carcinogenice non-genotoxice sau neurotoxice sau teratogenice; solventi presupusi ca avand alte toxicitati reversibile;
- Clasa III de solventi: solventi cu potential toxic scazut; nu necesita limita de expunere; PDE (expunere zilnica permisa) < 50 mg/zi.

Tabel 1: Clasa I de solventi în produsele din industria farmaceutică și limitele de concentrație

Solvent	Limita de concentratie (ppm)	Categoria de pericol
Benzen	2	Carcinogenic
Tetraclorura de carbon	4	Toxic si risc pentru mediu
1,2-Diclorețan	5	Toxic
1,1-Dicloroetena	8	Toxic
1,1,1-Tricloroetan	1500	Risc pentru mediu

Tabel II: Exemple de solvent din clasa II și limitele de concentrație

Solvent	PDE (mg/zi)	Limita de concentratie (ppm)
Acetonitril	4.1	410
Cloroform	3.6	360
Diclorometan	6	600
Formamida	2.2	220
Hexan	2.9	290
Metanol	30	3000

Asadar, tehnica GC-MS este utilizata pe scara larga ca tehnica analitica de rutina in analiza calitativa si cantitativa a produselor farmaceutice si dispozitivelor medicale, in special pentru determinarea impuritatilor reziduale dar si a altor compusi organici volatili necunoscuti.



Bibliografie:

C. Witschi, E. Doelker, Eur J Pharm Biopharm, 1997, 43, 3, 215-242
European Pharmacopoeia, vol 1, 2017, 2.2.46
European Pharmacopoeia 8.0, 2.2.43
EMA/CHMP/ICH/82260/2006, ICH guideline Q3C (R7) on impurities: guideline for residual solvents, 2018

Drd. Silvana Vasilca, chimist analist
e-mail: silvana.vasilca@nipne.ro
<http://gammaplus.nipne.ro/>

SDS-PAGE ca metodă de analiză a macromoleculelor proteice din compoziția dispozitivelor medicale

Separarea proteinelor prin electroforeză denaturantă (SDS-PAGE)

Migrarea macromoleculelor aflate în soluție, în câmp electric în funcție de sarcina electrică, mărimea și forma lor, se numește electroforeză.

Proteinele conțin în molecula lor sarcini electronegative și electropozitive, datorită prezentei grupărilor ionizabile ale aminoacizilor constituenți. În mediu bazic, proteinele au tendința de a fi încărcate electronegative, datorită reacției: $R-COOH \rightarrow R-COO^- + H_2O$. În mediu acid, proteinele au sarcini net electropozitive, datorită reacției: $R-NH_2 \rightarrow R-NH_3^+ + H_2O$.

Pe baza acestei comportări, dacă un amestec de proteine este plasat într-un câmp electric, cele cu sarcina negativă vor migra spre anod, cele cu sarcina pozitivă spre catod, iar cele pentru care pH-ul soluției de migrare reprezintă tocmai pH izoelectric, vor rămâne pe linia de start.

Viteza cu care are loc migrarea unei proteine depinde de raportul dintre sarcinile electronegative și cele electropozitive din macromolecula precum și de forma și dimensiunile acesteia; este, asadar, o caracteristică a unei proteine într-un pH dat. Pe baza acestei proprietăți, electroforeza este o metodă utilizată frecvent pentru separarea proteinelor, îndeosebi în scop analitic, însă metoda se poate folosi și în scop preparativ (benzile obținute sunt excizate din gel și proteinele, mai departe, purificate).

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) utilizează pentru migrare un gel puternic hidratat de poli-acrilamidă, a cărui porozitate poate fi reglată. Înainte de a fi încărcate în godeuri, proteinele, în soluție, sunt denaturate. Pentru aceasta, solventul utilizat pentru dizolvarea proteinelor conține un detergent anionic numit dodecil sulfat de sodiu, care se leagă de regiunile hidrofobe ale proteinelor, cauzând despachetarea lor și eliberarea lanțurilor polipeptidice din agregatele moleculare. Prin adăugarea, la soluția proteică, a agentului reducător mercaptoetanol, punctile disulfurice (-S-S-) dintre lanțurile polipeptidice ale unei proteine sunt rupte, fiecare lanț polipeptidic putând fi analizat separat.

SDS-PAGE este o metodă strict dependentă de interacțiune prealabilă a proteinelor cu dodecilsulfatul de sodiu (SDS). Detergentul (SDS) va perturba inițial zonele hidrofobe ale proteinelor, iar pe măsura ce are loc desinderea structurii terțiare, va rupe și celelalte forțe care susțin structura proteinei (legături de hidrogen și Van der Waals). Proteina își va pierde forma globulară sau fibrilară și va deveni liniară.

Dispozitive medicale din compozite proteice

În următorii câțiva ani se așteaptă generații noi de materiale compozite de proteine cu proprietăți optice, electrice, chimice și mecanice controlate, pentru o gamă de scopuri medicale. Componentele medicale pe bază de compozite proteice (de exemplu: suturi, plăci, șuruburi, geluri injectabile) pot fi concepute pentru nevoi diferite de reparare a țesuturilor, cum ar fi os, ligament sau mușchi. Micro-ace pe bază de compozite proteice sau alte dispozitive microformate pot fi proiectate pentru a controla eliberarea locală a medicamentului în vindecarea rănilor sau pentru a trata bolile cronice. Aplicațiile ulterioare pentru compozitele proteice ar putea include dispozitive electronice degradabile și flexibile cum ar fi meta-materiale sau LED-uri flexibile, în timp ce materiale optice implantabile din compozite de proteine ar putea fi utilizate pentru diagnostic și tratament medical in vivo. Aceste biomateriale pe bază de compozite proteice ar oferi o nouă generație de dispozitive medicale reglabile și cu funcții de selectivitate, asigurând în același timp controlul interfețelor biologice, proprietăți-

lor mecanice și o durată de viață programabilă in vivo. Astfel de materiale ar putea oferi opțiuni importante pentru dispozitivele implantabile în care se evită recuperarea postoperatorie chirurgicală (Xiao Hu et. al., 2012).

În cazul unor astfel de dispozitive medicale din materiale proteice sau compozite pe baza de proteine structurale, prezentate sub forma de filme, spume sau agregate poroase (ex. pansamente din collagen), geluri, fibre (ex. fire de sutură chirurgicală din matase naturală), grefe și particule/dispersii, tehnica SDS-PAGE poate fi folosită pentru caracterizarea comportării macromoleculelor constituențe în diferite etape de fabricație: hidroliza, încălzire sau răcire, diferite metode de purificare / spalare, precum și comportarea la sterilizare prin iradiere. Astfel, este de așteptat ca tratamentele agresive vor scindea proteinele, generând benzi suplimentare, de greutate mai mică (fig. 1). În cazul tratamentelor de cross-linkare (ex. pansamente elastice din elastina solubilă, acid hialuronic și fibroina din matase - Serban et. al., 2010), fenomen ce se poate obține inclusiv prin iradiere la doze foarte mari, tehnica SDS-PAGE va evidenția macromolecule mai mari (se vor genera benzi suplimentare de greutate mai mare decât a componentelor).

De asemenea, acolo unde procesul trebuie optimizat pentru reglarea tipului de moleculă, a formei sau a lungimii fibrilelor (ex. rețele din collagen-elastina) prin raportul între componente ori prin modularea unor parametri fizici (ex. câmpul electric aplicat), analiza SDS-PAGE poate pune în evidență diferențele între mai multe rețete de fabricație, corelat cu proprietățile mecanice.

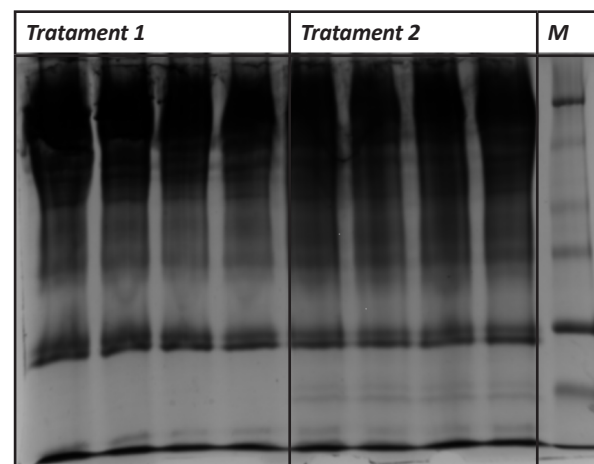


Fig. 1. Evidențierea diferențelor dintre două tratamente industriale de purificare a collagenului utilizat la fabricarea de dispozitive medicale, pe care 4 replicare; s-a pus în evidență îndepărtarea unor fragmente peptidice mici, de cca 10KDa, la tratamentul nr. 1 (sageata).

M= marker de greutate moleculară

Bibliografie:

1. M.A. Serban, et al. Biomacromolecules, 11 (2010), p. 2230
2. Xiao Hu, Peggy Cebe, Anthony S. Weiss, Fiorenzoomenetto, David L. Kaplan. "Protein-based composite materials", Materials Today, Volume 15, Issue 5, 2012, Pages 208-215, ISSN 1369-7021.

Cercetător Științific gr. III, Dr. Mihaela ENE, e-mail: mene@nipne.ro
Biolog, Andreea Simona BALTAC, e-mail: andreea.manea@nipne.ro
<http://gammaplus.nipne.ro/>

Implanturi metalice - biocompatibilitatea suprafețelor

Materialele metalice biocompatibile sunt utilizate sub diferite forme ca implanturi biomedicale, asigurând forța și duritatea necesare în părțile importante ale corpului. Compoziția materialelor implantului metalic este semnificativ diferită de cea a osului natural, cu toate acestea rezistența necesară și rezistența la oboseală pentru implanturile portante pot fi realizate numai de metale, utilizarea acestora fiind inevitabilă în ortopedie și stomatologie.

Deși metalele biocompatibile prezintă proprietăți mecanice excelente în legătură cu comportamentul lor față de țesuturile umane, în aplicațiile biomedicale există două probleme majore asociate cu utilizarea lor, care pot deveni importante la ceva timp după implantare. Un prim efect post-operator este de "stress shielding", atribuit preluării a unei mari părți din efortul mecanic al osului, ceea ce duce la scăderea încărcării țesutului osos în comparație cu starea sa naturală neimplantată, și implicit la slăbirea oaselor. După o perioadă mai lungă de timp poate apărea efectul produs prin eliberarea unor particule de uzură cu potențial toxic pentru organismul gazdă. Aceste probleme conduc la necesitatea modificării suprafeței implanturilor metalice. Schimbarea caracteristicilor de suprafață ale implanturilor metalice, având drept scop o mai bună interacțiune biologică cu țesuturile organismului gazdă, este o zonă activă de cercetare.^{1,2,3}

Tratarea suprafeței sau modificarea suprafeței este considerată o preocupare majoră în cercările recente privind dezvoltarea de biomateriale metalice. Tratamentul include modificarea morfologică de suprafață și modificarea chimică. Morfologia suprafeței, cum ar fi rugozitatea, textura și porozitatea, sunt caracteristici importante ale implantului deoarece influențează capacitatea celulelor de a adera la un substrat solid. În cazul modificării chimice, scopul este realizarea unui răspuns biologic specific pe suprafața metalică și creșterea stabilității biomoleculelor.

Printre diversele biomateriale metalice, titanul și aliajele acestuia rămân unele dintre cele mai populare. Este un metal potrivit pentru implanturile osoase datorită rezistenței excelente la coroziune, a biocompatibilității, proprietăților mecanice și a unui raport mare rezistență-greutate.

În laboratorul de evaluare a biocompatibilității materialelor și dispozitivelor medicale (Bioeval, parte din proiectul GammaPlus) au fost desfășurate de-a lungul timpului astfel de cercetări care vizează evaluarea funcționalității și biocompatibilității unor modele experimentale de structuri pe baza de titan cu aplicații biomedicale.

Astfel, în cadrul proiectelor de cercetare (contractul UEFISCDI PN-II-PT-PCCA no. 6/2012) au fost efectuate studii experimentale care urmăreau testarea unor structuri tridimensionale biofuncționalizate din titan produse prin micro-structurarea cu ajutorul tehnicilor laser, a suprafeței suportului din titan și acoperirea acestor micro-structuri cu polimeri conductori. Deoarece se urmărea dezvoltarea de structuri cu potențială aplicabilitate în ingineria țesutului osos, evaluarea biocompatibilității a fost efectuată pe o linie celulară model și anume pre-osteoblaste MG-63 (Figura 1)⁴. Studiile specifice în astfel de testări includ evaluarea atașării și proliferării celulelor la suport, analiza morfologiei celulelor atașate și studii legate de diferențierea celulelor pre-osteoblaste (un marker timpuriu al diferențierii este producerea de fosfatază alcalină) și procesul de mineralizare declanșat în urma acestei diferențieri (nivel de mineralizare).

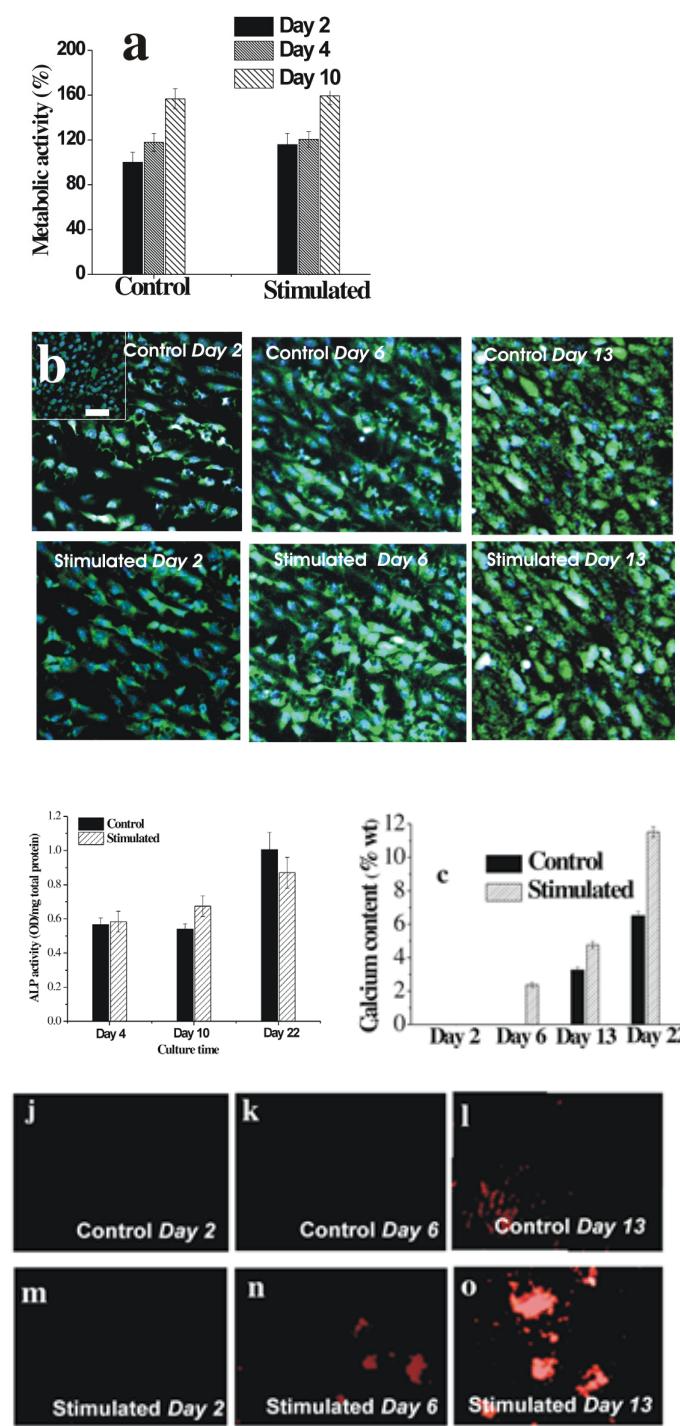


Figura 1. Celule osoase MG-63 crescute pe suport de titan microstructurat și acoperit cu polimeri conductori: A) Activitatea metabolică. B) Activitatea ALP. C) Depozite de calciu (Luăte din "Electrically stimulated osteogenesis on Ti-PPy/PLGA constructs prepared by laser-assisted processes." Materials Science and Engineering: C 55 (2015): 61-69, Paun, Irina Alexandra, et al.).

Cateva dintre aceste rezultate ilustrate in Figura 1 sugereaza ca micro-rugozitatea produsa la suprafata suportului din titan si acoperirea acestei suprafete cu polimeri ofera rezistenta mecanica si suport pentru cresterea si diferentierea osteoblastica.

In cazul implanturilor dentare pe baza de titan, exista studii clinice care demonstreaza biocompatibilitatea acestora prin cresterea directa a tesutului osos pe suprafata titanului, fenomen denumit osteointegrare. Mai nou, osteointegrarea este definita ca o reactie la corp strain in urma careia se formeaza la interfata un tesut osos ca o reactie de aparare, in sensul demararii implantului de celelalte tesuturi. Cercetarile legate de os in domeniul implantologiei au fost centrate in jurul a doua aspecte importante: imbunatatirea procesului de osteointegrare si pe mentinerea implantului bine integrat pe termen cat mai lung.

Caracteristicile de suprafata ale unui biomaterial, cum ar fi un implant dentar realizat din titan, exercita o influenta decisiva asupra vitezei osteointegrarii. Un implant care are o osteointegrare rapida poate permite o incarcare mai timpurie a implantului, un aspect benefic pentru pacient.

In ultimii ani, un subiect de cercetare important in domeniul implantologiei dentare este modificarea suprafetei implantului. Exista numeroase studii in vivo care demonstreaza influenta caracteristicilor suprafetei implantului din titan asupra osteointegrarii acestuia. In plus, exista multe informatii din studii in vitro care documenteaza influenta modificarilor suprafetei titanului asupra celulelor osteoblastice.

In acest sens, si in cadrul laboratorului nostru au fost demarate studii experimentale care urmaresc testarea biocompatibilitatii unor biomateriale metalice pe baza de titan folosite pentru implanturi dentare cu suprafete functionalizate (Figura 2), rezultatele obtinute demonstrand ca proprietatile suprafetelor implantului joaca un rol important in influentarea diferitelor procese biologice care au loc la interfata implant – tesut.

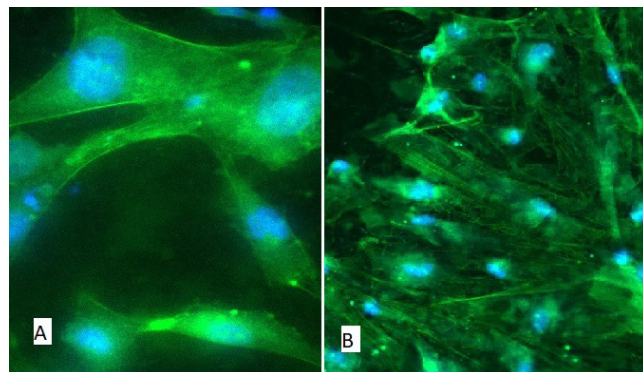


Figura 2. Imagini microscopie de fluorescență cu celule osteoblastice fetale umane hFOB 1.19 (A) și fibroblaste gingivale umane HGF-1 (B) crescute pe suport de titan cu suprafață funcționalizată.

In concluzie, suprafata implantului metalic, prin proprietatile sale identificate ca factori importanti pentru atingerea si mentinerea osteointegrarii, furnizeaza site-uri pentru ancorarea celulelor si pentru stabilitate mecanica si serveste drept ghid structural care ofera o interfata adecvata pentru a permite integrarea in tesutul gazda.

Referințe

1. Branemark, P. I. (1977). Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl., 16.
2. Guglielmotti, M. B., Olmedo, D. G., & Cabrini, R. L. (2019). Research on implants and osseointegration. Periodontology 2000, 79(1), 178-189.
3. Albrektsson, T., & Wennerberg, A. (2019). On osseointegration in relation to implant surfaces. Clinical implant dentistry and related research.
4. Paun, I. A., Stokker-Cheregi, F., Luculescu, C. R., Acasandrei, A. M., Ion, V., Zamfirescu, M., ... & Dinescu, M. (2015). Electrically stimulated osteogenesis on Ti-PPy/PLGA constructs prepared by laser-assisted processes. Materials Science and Engineering: C, 55, 61-69.

Maria Adriana Acasandrei, specialist Biocompatibilitate,
email: macasan@nipne.ro
<http://gammaplus.nipne.ro/>



Guvernul Romaniei
Programul Operațional Competitivitate



GAMMA-PLUS

Creșterea competitivității prin inovare
și îmbunătățirea proceselor de fabricație cu iradiere gamma
tehnologice



Devino partener

Criterii de selectie

Lista propuneri intreprinderi

Login

Descriere proiect

Rezultate

Oferta servicii

Echipa de management

Infrastructura

Parteneri

Publicatii

Revista Gamma +

Evenimente

Adrese utile

Contact



Gamma Plus - Prezentare generala

Proiectul GAMMA PLUS isi propune sa sprijine intreprinderile, in special cele din domeniul medico-farmaceutic, sa utilizeze infrastructura si competentele IRASM (Centrul de Iradiere Tehnologice in Scopuri Multiple) si ale laboratorului BIOEVAL, din IFIN-HH, pentru dezvoltarea de produse, tehnologii si servicii inovatoare, ori imbunatatirea celor existente, prin optimizarea proceselor de fabricatie. Pentru aceasta, au fost stabilite 3 obiective principale:

- Transferul de cunostinte pentru introducerea iradierilor tehnologice cu radiatii gamma in fluxul de fabricatie al produselor medico-farmaceutice
- Dezvoltarea unor produse noi sau imbunatite prin utilizarea iradierii cu radiatii gamma.
- Cresterea competitivitatii economice prin introducerea noului procedeu de fabricatie si/sau optimizarea proceselor existente.

IFIN-HH pune la dispozitia producatorilor romani de toate talii, atat tehnologia de iradiere cu radiatii ionizante gamma, cat si o gama larga de teste si incercari fizice, chimice si biologice, pentru investigarea efectelor iradierii si/sau certificarea produsului. Pe langa **infrastructura** de iradiere si testare (laboratoare), IFIN-HH pune la dispozitie **personal competent**, cu o vasta experienta in domeniul serviciilor oferite si cu vechime de peste 10 ani in colaborarea cu intreprinderi.

Transferul de cunostinte propus pentru implementarea proiectului include:

- **Cunostinte privind selectarea materialelor la proiectarea produsului medico-farmaceutic.**

Iradierea tehnologica, in particular sterilizarea cu radiatii ionizante, ofera avantaje competitive substantiale fata de alte procedee de fabricatie, din punct de vedere al consumurilor energetice, al aspectelor ecologice si, nu in ultimul rand, al costului de fabricatie. Se are in vedere compatibilitatea materialulelor cu acest procedeu tehnologic. Pe langa experienta si expertiza in reglementarea acestui domeniu, IRASM dispune de un laborator de calificare la iradiere care ofera servicii de testare fizico-chimica pentru stabilirea compatibilitatii unui anumit material sau produs cu procesarea prin iradiere.

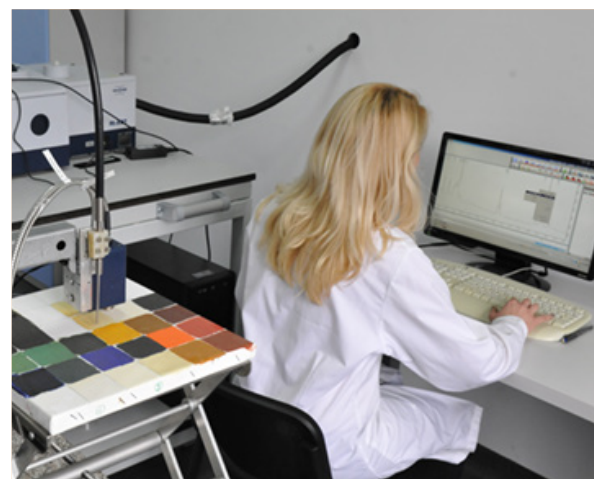
- **Cunostinte privind validarea procesului.**

In cazul particular al sterilizarii dispozitivelor medicale, validarea sterilizarii este o cerinta esentiala pentru obtinerea marcatului CE. IRASM dispune de laborator de testare microbiologica si de infrastructura pentru iradiere experimentale, care permit realizarea testelor de validare in conditii performante si competitive. Laboratorul microbiologic este acreditat ISO 17025 si are Autorizatie Buna Practica (GMP) pentru Controlul calitatii produselor medicamentose.

- **Cunostinte privind biocompatibilitatea produselor.**

Biocompatibilitatea este o cerinta esentiala pentru o categorie larga de produse medicale, cosmetice sau alimentare. Biocompatibilitatea trebuie testata in corelare cu compatibilitatea cu procesarea prin iradiere.

Principalele domenii de aplicatii ale iradierilor tehnologice, pe plan mondial, includ: produse medico-farmaceutice, produse din materiale polimerice (pentru electrotehnica, pentru ambalare, etc.), produse/suplimente alimentare.



*Titlul proiectului: Creșterea competitivității prin inovare și îmbunătățirea
proceselor de fabricație cu iradiere gamma tehnologice
Proiect cofinanțat din Fondul European pentru Dezvoltare Regională
prin Programul Operațional Competitivitate 2014-2020*

Editorul materialului: Institutul Național de Fizică și Inginerie Nucleară Horia Hulubei (IFIN-HH)

Data publicării: 29 Martie 2019

Conținutul acestui material nu reprezintă în mod necesar poziția oficială a Uniunii Europene