

## TEHNOLOGII ȘI METODE DE OBTINERE A ACIDULUI HIALURONIC

*L. Zadorojnâi, dr.conf.univ.  
Universitatea Tehnică a Moldovei*

### INTRODUCERE

În literatura mondială de specialitate sunt descrise diverse metode de obținere și purificare ale acidului hialuronic (AH).

Acidul hialuronic se conține în țesuturile organismelor animale, matricea extracelulară și citoscheletul. În concentrație mai mare AH se conține în: lichidul sinovial, cordon ombilical, creastă de păsări, corp vitros al ochiului, creier, piele, cartilaje de rechini și balene [1]. În toate aceste țesuturi este însoțit de prezența altor mucopolizaharide, care deasemenea formează compuși intermoleculari împreună cu colagenul și alte proteine. Problema prioritară și cea mai dificilă în obținerea AH ține de înlăturarea cât mai deplină a componentilor secundari, inclusiv a proteinelor, fără afectarea masei moleculare a biopolimerului [2].

### 1. STUDIU ÎN DOMENIU

Pentru prima dată AH a fost obținut și cercetat în anul 1934 de Meyer K. și Palmer J.W., dar interesul sporit în obținerea AH a apărut după cel de-al II-lea război Mondial odată cu problema căutării substituenților corpului vitros al ochiului. În monografia [3] sunt tratate diverse metode de obținere a AH din cordonul ombilical al fătului bazate pe utilizarea soluției de acetat de sodiu, soluției diluate și concentrate de fenol, acid tricloracetic, clorură de sodiu, piridinei, fermenților etc. Toate aceste metode prezintă un interes științific deosebit, dar tehnologic metodele rămân a fi inconvenabile, deoarece necesită un volum mare de reagenți, înlăturarea ulterioară a reagenților toxici este dificilă, randamentul comparativ mic.

Balazs E. A. în anul 1979 relatează despre obținerea AH ultrapur, cu masă moleculară mare din țesuturi conjunctive de origine animală așa ca creste de cocoși, cordon ombilical, culturi bacteriene [4]. Metoda propusă constă în extragerea și purificarea hialuronatului de sodiu în mai multe etape consecutive, care durează mai mult timp și necesită un volum mare de muncă. Materia primă proaspăt colectată se spală minuțios cu apă pentru înlăturarea deplină a sângelui, se taie în bucăți mici și se congelează la  $-20$ – $30^{\circ}\text{C}$ . În stare congelată se

mărunțește apoi se dehidratează în câteva reprize (nu mai puțin de 3–4) cu etanol de 95%, care conține urme de cloroform (agent bacteriologic). Fiecare procedură de spălare–dehidratare durează 24 de ore. Masa obținută se extrage de două ori cu un amestec de apă–cloroform (20:1, v/v). O extracție durează 24 de ore și se efectuează la temperatura de  $4$ – $25^{\circ}\text{C}$ . La 2,5 kg de materie primă prelucrată s-a adăugat 10 litri de apă și 0,5 litri  $\text{CHCl}_3$  pentru umflare apoi la fiecare extracție – câte 15,75 litri amestec apă–cloroform. Extractele de AH se separă de țesut prin filtre de nailon și se împreunează. Pentru înlăturarea proteinelor la extractul obținut se adaugă așa o cantitate de NaCl cristalin ca să se obțină o soluție de 10%. Autorul afirmă că deproteinezarea extractului de AH obținut trebuie realizată cu mare precauție, deoarece foarte ușor poate decurge destrucția macromoleculi sub influența diferitor factori exteriori (ioni de fier, oxigen sau alți oxidanți care pot patrunde în soluție). Condițiile de separare a proteinelor din soluția de AH au fost determinate empiric și sunt considerate optime de autor. La soluția obținută se adaugă cloroform în raport de 1:1. Agitarea amestecului se face într-un vas de sticlă timp de 3–5 ore cu un agitator de teflon (la 120–300 rotații/min) sau cu vibrație. Aciditatea soluției se menține la pH 4–5 prin adăugare de HCl diluat și un volum echivalent de  $\text{CHCl}_3$ .

După 3–4 ore de agitare continuă, faza organică ( $\text{CHCl}_3$ ) se înlătură împreună cu stratul de proteine sedimentat la suprafața de separare a fazelor. Acest procedeu se repetă de mai multe ori, până când stratul de cloroform după agitare rămâne curat. Dacă în extractul obținut se conține o cantitate impunătoare de proteine atunci autorul propune utilizarea enzimelor. După a doua prelucrare a extractului cu  $\text{CHCl}_3$  în faza apoasă se adaugă 50–100 g enzime DNase și RNase, se agită continuu încă 24 ore. După 24 ore pH-ul soluției se aduce la 6–7 și se mai adaugă 50–100 mg Pronase. Soluția se agită în continuare încă 48 ore. În acest mod se înlătură cea mai mare parte de proteine din amestec. Dacă la etapa precedentă extractul s-a prelucrat numai cu  $\text{CHCl}_3$  atunci pH-ul soluției se ajustează cu soluția de 0,1N NaOH până la pH 6–7. La extrasul de AH cu pH-ul 6–7 se mai adaugă un volum echivalent de cloroform și se agită la

temperatura de 20–40°C timp de cinci zile. Autorul consideră că anume în cinci zile are loc denaturarea completă a proteinelor și a altor componente care pot cauza toxicitate și inflamație. După înlăturarea stratului de  $\text{CHCl}_3$  în faza apoasă rămâne numai hialuronatul de sodiu. Soluția obținută se centrifughează 4 ore, se filtrează prin filtru steril de teflon (diametrul porilor 0,2  $\mu\text{m}$ ). La filtratul obținut se adaugă 3 volume de etanol. AH se sedimentează și se separă, se redizolvă în 1,5 l apă bidistilată, care conține 0,1 mol NaCl și se sedimentează din nou. Această procedură se repetă de 5 ori. La a doua redizolvare în soluție se mai adaugă 1% de clorură de cetilpiridiniu. După ultima redizolvare AH se sedimentează cu 3 volume de acetonă sterilizată apoi se spală de câteva ori cu acetonă sterilizată și produsul obținut se usucă în vid. Randamentul AH constituie 0,08%. Conținutul de proteine în produs – 0,4%. Masa moleculară determinată - 1586000 D. Absorbanta soluției apoase de 1% AH la lungimea de unde 257 nm este de 0,243, iar la 280 nm – 0,198.

Metoda sa a permis obținerea primului preparat farmaceutic de AH cu denumirea comercială "Hea Lon" (Farmacia, Suedia), care până în prezent rămâne a fi unul din cei mai buni, dar și cel mai costisitor viscoprotector în oftalmologia chirurgicală. O doză de AH necesară pentru efectuarea unei operații chirurgicale este de 0,4  $\text{cm}^3$  soluție de 1%. Odată cu apariția preparatului "Hea Lon" s-au intensificat cercetările altor materiale cu proprietăți analogice în baza AH și altor polizaharide cum ar fi derivați ai celulozei [5].

Conform metodei expuse în lucrarea [6] din crestele de cucoși și găini este înlăturat sângele, apoi se mărunțesc, se spală de câteva ori cu etanol care conține cloroform. Extracția AH se realizează de două ori cu apă. Extractele obținute sunt deproteinate cu cloroform. După sedimentarea cu etanol și acetonă AH obținut este uscat. Preparatul astfel obținut cu denumirea "Hyalon" este deasemenea utilizat ca viscoprotector în oftalmologie. O metodă asemănătoare este descrisă și în lucrarea [7]. Randamentul produsului constituie 0,08% față de masa inițială. Conținutul substanțelor proteice este de 0,5% și includ aproximativ 0,2% ovalbumine cu proprietăți antigene. Metodele expuse rezolvă problema obținerii acidului hialuronic ultrapur, cu un conținut redus de proteine, științific dar nu și tehnologic. Randamentul scăzut, consumul sporit de alcool, acetonă și cloroform fac produsul costisitor.

Autorul invenției [8] obține AH prin fermentare. Din soluție AH este sedimentat în formă de complex polielectrolitic cu hitozan, care se

adaugă în formă de sare (exemplu acetat) în cantitate de 1,1–2,5 moli la un mol de AH extras. Scindarea complexului se realizează cu soluție apoasă de 0,001–1 n NaOH la temperatura de 20°C, în timp de la 10 min până la 10 ore.

Una din metodele timpurii de obținere a AH este descrisă de Asatiani V.S. în cartea sa [9] și constă în obținerea AH din cordoane ombilicale. Cordoanele ombilicale sunt spălate de sânge cu apă, apoi sunt deshidratate și degresate cu acetonă. După mărunțire se face extragerea AH cu apă și sedimentarea cu acetonă. Randamentul de obținere a AH constituie 6%, iar viscozitatea relativă a soluției de 1% este 3.

În invenția [10] Vunder P.A. și Murașev A.N. perfectează metoda precedentă. După mărunțire, spălare, degresare și deshidratare cordoanele ombilicale sunt supuse procesului de extracție cu apă la fierbere timp de 5-15 min. La 2 g masă uscată se adaugă 200  $\text{cm}^3$  de apă. După răcire extractul este centrifugat 15 min la o viteză 6000 rotații / min. Din extractul obținut AH este sedimentat cu acetonă în raport volumetric de 1:4. Se obține 0,28 g sediment, care conține AH și substanțe proteice. Ultimile sunt determinate prin metoda Lowry. Masa AH fără proteine constituie 10,2%. Viscozitatea relativă a soluției de 0,25% este 3.

Cu scopul de a simplifica procedura de extragere în invenția europeană [11] materia pri-mă preventiv degresată se spală cu alcool butilic, iar AH se sedimentează cu clorură de cetilpiridiniu sau bromură de hexadeciltrimetilamoniu. În continuare sedimentul este dizolvat în dodecilsulfat de sodiu și produsul este sedimentat cu etanol.

În invenția germană [12] hialuronatul de sodiu de uz cosmetic este extras din țesuturi animale și sedimentat cu acetonă. Extrasul obținut este prelucrat cu fermenți (papain), ultrafiltrat și produsul sedimentat cu clorură de cetilpiridiniu. Sedimentul de AH obținut este redizolvat în soluție de NaCl, din nou ultrafiltrat și produsul final sedimentat cu alcool.

În metodele expuse putem remarca randamentul mic de obținere a AH și utilizarea sărurilor cuaternare de amoniu cu radicali organici exotici.

Conform metodei expuse în referința [13] crestele de cucoși sunt extrase de două ori cu soluție apoasă de 5-25% (v/v) de alcool butilic sau propilic și izomerii lor. Extragerea durează aproximativ 32 de ore. La extractul obținut s-a adăugat NaCl cristalin până la separarea fazelor. AH este separat prin sedimentare din faza apoasă cu etanol. Cantitatea de proteine este mai mică de 1%, umiditatea – 15%. Absorbția în domeniul ultraviolet pentru soluția de 1% la lungimea de undă 257 nm

este mai mică decât 3,0, iar la 280 nm – mai mică decât 2. pH-ul soluției apoase de AH obținut constituie 5,5–7,5. Gradul de extragere a AH este de 50%, iar randamentul nu este indicat.

În referința [14] Laurent T.C. constată că în crestele de cocoși se poate conține până la 0,75% (m/m) AH. În corpul vitros al ochiului omului se conține aproximativ 0,02% (m/v) AH.

Conform invenției [15] crestele de cocoși sunt extrase cu apă sau soluție 1–15% NaCl la temperatura de 80°C, randamentul AH constituie 2%, conținutul de proteine 9%. Durata extracției constituie aproximativ 24 ore.

În invenția [16] AH este extras din lichidul sinovial al vițeilor, timp de o săptămână la temperatura de 5°C. Extrasul este filtrat prin vată de sticlă. La filtrat se adaugă NaCl cristalin până se obține o concentrație de 2 mol/l și soluție de 2% acid acetic în etanol. Sedimentul se separă și se dizolvă în soluție tampon – fosfat cu pH-ul 7. Proteinele se sedimentează cu tripsin timp de 2 ore la temperatura de 37°C în prezență de 0,05 mol/l  $\text{NaN}_3$ . AH este sedimentat la adăugarea NaCl cristalin până la o concentrație de 2 mol/l și soluție de 2% acid acetic în etanol. Conținutul de proteine constituie 0,5%. Dezavantajele metodei: randamentul mic și un mare volum de muncă.

Conform publicației [17] crestele de cocoși sunt extrase cu apă timp de 1–2 min la temperatura de 90–100°C. Amestecul obținut se răcește timp de 2–3 ore până la temperatura de 4–6°C. Se înlătură lipidele, se filtrează, se separă rămășița de creste. La filtratul obținut se adaugă cărbune activ în proporție de 1–2% față de masa inițială a materiei prime și se menține și se agită 1–2 ore. Amestecul se filtrează. La filtratul obținut se adaugă penicilină în proporție de 1–2% față de masa inițială a materiei prime și se menține 18–24 ore la temperatura de 20–22°C, apoi se usucă. Randamentul constituie 3,8–4,0% față de masa inițială a materiei prime. Viscositatea relativă a soluției apoase de 0,1% este de 4,0, conținutul de proteine constituie 0,4–0,5%.

În continuare Stecolnicov L. I. cu echipa sa propune o nouă metodă de extragere a AH [18]. Spre deosebire de metoda sa precedentă [17] autorii efectuează extragerea AH la temperatura camerei 20–22°C cu apă, în trei etape, în raport de 1 : (4–6 v) creste :  $\text{H}_2\text{O}$ , timp de 2–4 ore. Din extras AH este sedimentat cu acid tricloracetic în cantitate de 1–2% față de volumul extractului obținut. AH sub formă de sediment se ridică la suprafața fazei apoase, iar proteinele se sedimentează la fund. AH se spală de 3 ori cu acetonă și eter dietilic corespunzător în raport de 2–4 l la 1 kg materie primă. Sedimentul este uscat în aer apoi redizolvat în apă (2 v la 1 kg masă inițială), se filtrează și se sublimă.

Randamentul este de 5%, conținutul de proteine constituie 0,05%, iar viscositatea relativă a soluției de 0,1% la 20°C este de 6,0.

Autorii metodei [19] exclud sedimentarea AH din extracte cu alcool. Ei realizează extragerea cu 3–3,5 volume de apă acidulată cu acid acetic la pH 3–4 și temperatura 90–100°C, timp de 40–60 min. La extractele obținute se adaugă 1,0 și 1,5% cărbune activ și dietilaminoetilceluloză, corespunzător, timp de 1–2 ore la temperatura de 60–80°C. Soluția deproteinizată este filtrată la temperatura de 30–40°C prin filtre de hârtie, filtre de sticlă cu conținut de bor, membrane sterile de acetilceluloză și clorură de polivinil. Soluția obținută se usucă prin sublimare în condiții aseptice. Randamentul AH obținut este 0,09–0,12%. Conținutul de substanțe proteice în AH nu depășește 0,1%, iar ovalbumina nu depășește 0,001%. Conținutul total de proteine în preparatele de AH a fost determinat prin metoda clasică Kjeldahl, iar conținutul de ovalbumină a fost determinat cu sistemul de test imunofluorescent în faza solidă cu sensibilitatea 0,5 ng/cm<sup>3</sup>. Viscositatea relativă a soluției de AH 0,1% la 20°C constituie 12–14.

În scopul obținerii AH ultrapur metoda dată este performantă, dar include și unele dezavantaje cum ar fi: utilizarea filtrelor speciale din sticlă, din acetilceluloză și clorură de polivinil. Metoda este îndelungată și anevoioasă.

O altă echipă de autori ruși împreună cu Samoilenko I. I. propun următoarea metodă de obținere a AH din creste de cocoși și cordoane ombilicale [20]. Materia primă din care preventiv s-a înlăturat sângele se spală cu apă rece (10–15°C), se mărunțește la mașina de tocat carne și se îngheață până la –70°C. Se adaugă două părți de apă la o parte de masă congelată se încălzește timp de 15–25 min la temperatura de 95–100°C, se filtrează prin trei straturi de tifon sau se centrifughează. Rămășița de pe filtru se congelează din nou la temperatura de –70°C, iar filtratul se colectează. La masa congelată se adaugă apă în raport de 1:1,5 și se încălzește din nou timp de 15–25 min la temperatura de 95–100°C. Amestecul se filtrează prin tifon, filtratul se colectează, iar rămășița de pe filtru din nou se congelează și încă de trei ori se repetă procedura de congelare-extragere, utilizând de fiecare dată apă în raport de 1:1 față de masa rămășiței. Filtratele se împreunează și AH se elimină la acidularea extractului cu acid acetic. Randamentul AH constituie 5%. Conținutul de proteine a fost determinat după Lowry și constituie 4%, masa moleculară aproximativ este egală cu 1 mln. D și a fost calculată pe baza viscozității caracteristice. Omogenitatea produsului a fost confirmată cu

ajutorul efectului Tindal. Pentru înlăturarea mai deplină a proteinelor produsul a fost redizolvat în soluție diluată de NaOH și ultrafiltrat. Soluția de AH a fost leofilizată. Randamentul sumar se micșorează neînsemnat (4,5%), iar conținutul de proteine se micșorează de 10 ori.

În metoda [21] este prezentată schema unui proces de obținere în formă farmaceutică a soluției apoase de AH cu masă moleculară mare, de o anumită concentrație, sterilizată.

Această schemă de purificare ultrafină a AH conține multe etape sofisticate, automatizate, tehnologii foarte costisitoare și nu este clar dacă e posibilă organizarea unui așa proces de producere a formelor farmaceutice de AH în prezent în condițiile existente. locale real

În metoda propusă [22] creștele după spălare și degreasare cu alcool (1:2), sunt mărunțite și sunt supuse prelucrării cu ultrasunet la o frecvență de 16–20 kHz, timp de 5–10 min. Extragerea AH se efectuează cu apă la temperatura de 45–50°C, timp de 20–25 min. Separarea fazei apoase se realizează prin filtrare în vid, iar sedimentarea AH se obține cu etanol de 95% în raport volumetric de 1:3. Soluția apoasă este filtrată și filtratul este evaporat deasupra la oxid de fosfor (V) în vid. Randamentul constituie 11%. Partea de masă a proteinelor constituie 0,4%.

În invenția [23] autorii relatează despre obținerea și purificarea unei fracții de AH extrapur cu aplicație în oftalmochirurgie. Metoda propusă este laborioasă și costisitoare. Ea include utilizarea unor cantități mari de solvenți (etanol, acetonă), utilizarea helajilor și înlăturarea lor. În procesul de extragere și purificare se utilizează sitele moleculare DOWEX M-15, Celita, N-metilpirolidon sau dimetilsulfoxid, clorură de metilen, clorură de cetilpiridină, NaBr, NaCl. Randamentul produsului constituie 0,6%. Proteinele sunt înlăturate prin fermentare utilizând în acest scop enzimele (papain, pepsin, tripsin sau pronaza). Dozarea proteinelor în produsul final a fost efectuată prin metoda Lowry și constituie - 0,2%. Au fost determinate următoarele caracteristici a produsului obținut: viscozitatea statică este cuprinsă în intervalul 14,5–21 D/g fiind măsurată cu viscozimetrul Ubellodi la 25°C în soluție de 0,15 mol/l NaCl, pH-ul 7 și corespunde masei moleculare medii  $(0,75-1,23) \cdot 10^6$  D, absorbanta soluției apoase de 1% AH la lungimea de undă 257 nm și 280 nm nu depășește 1,0.

În brevetul [24] este descrisă utilizarea preparatelor de hialuronat de sodiu cu masa moleculară  $(1-2) \cdot 10^6$  D în oftalmochirurgie și tot odată în perioada post-operativă după înlăturarea cataractei. Preparatele conțin 12–20 mg/cm<sup>3</sup> hialuronat de sodiu în soluție fiziologică și manifestă o viscozitate cinematică de

$(4,5-6,4) \cdot 10^4$  cSt. În compoziția preparatelor se introduce anumite cantități de conservant, stabilizator și alte componente auxiliare. Sunt prezentate rezultatele testării clinice a preparatelor.

Brevetul românesc [25] se referă la un procedeu de obținere a AH și a sărurilor sale de sodiu și potasiu de uz cosmetic din umoarea vitroasă bovină. Extracția AH se efectuează cu paraxilensulfonat de sodiu în proporție de 10% față de masa materialului supus extracției., la temperatura de 60°C, sub agitare energetică, până la obținerea unui material omogen (6–8 ore). După aceasta materialul se răcește până la 0–4°C și sub agitare continuă se tratează cu soluție de HCl până la pH 3–3,5. sau cu soluție de 1 mol/l NaOH, corespunzător KOH. După 24 ore se filtrează pe pat de hyflosupercel. Dacă filtratul obținut este colorat, se tratează cu cărbune reactiv și se filtrează din nou. Soluția perfect limpede se răcește și se tratează cu un volum de alcool izopropilic. AH sedimentat se ține la rece încă 24 de ore, după care se izolează prin centrifugare. Se spală cu alcool izopropilic și cu acetonă sterilă, apoi se usucă pe clorură de calciu. Randamentul produsului față de volumul inițial al materiei prime este de 0,04% (m/v). Autorii afirmă că conținutul de proteine în produs este de 0,1–2%. Tratarea materialului cu acid tare sau bază tare, în procesul de extracție, schimbă puternic mediul. Nu sunt clare consecințele.

În brevetul [26] autorii Lutan V. și Bezdrîgin M. de la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova descriu metoda de obținere a AH biocompatibil de uz medicinal din cordoane ombilicale ale fătului. Materialul biologic este colectat și păstrat în etanol de 96%. După procedura de spălare mărunțire și deshidratare realizate la temperatura de 0–+4°C, autorii extrag AH în ser fiziologic (soluție 0,89 % NaCl) la rece în trei reprize, apoi la extractul obținut adaugă NaCl cristalin până la o concentrație de 25% și etanol în proporție de 1:3 pentru sedimentarea AH. AH obținut este recristalizat de 2–3 ori din ser fiziologic. Înlăturarea proteinelor se face cu CHCl<sub>3</sub> în proporție de 1:2 în 3–4 reprize până, soluția rămâne transparentă. După ultima procedură de deproteinizare AH se sedimentează cu etanol 96% (1:3). Randamentul produsului nu este indicat. Concentrația proteinelor determinată prin metoda Lowry este de 0,2 g/l, cea ce constituie 5% din masa totală dizolvată. Astfel autorii consideră că conținutul de AH este de 95% (m/m). Viscozitatea relativă a soluției de 0,2% AH este 5,0. Absorbanta soluției de 0,5% AH determinată la 257 nm (maximul de absorbție a nucleotidelor) este egală cu 0,712 un., iar la 280 nm (maximul de absorbție a

proteinelor) – cu 0,622 un. Spectrul densității optice a soluției de AH măsurat în domeniul 400–700 nm demonstrează maxim de 520–540 nm, ceea ce este specific pentru acidul hialuronic. Autorii au testat biologic produsul obținut și au demonstrat lipsa de toxicitate, de alergogenitate, de acțiune hepatotoxică și cardiotoxică, de acțiune iritantă, de acțiune asupra metabolismului mineral [27, 28].

Așa dar, diversitatea metodelor de obținere a acidului hialuronic în laborator este mare, dar nu există metode optime, tehnologic rezonabile, de extragere și purificare a acidului hialuronic la nivel industrial.

## 2. EXTRAGEREA ACIDULUI HIALURONIC DIN DIVERSE SURSE DE MATERIE PRIMĂ LOCALĂ

Proprietățile acidului hialuronic sunt determinate de masa moleculară, modul de extracție, urmele de proteine și alți proteoglicani care pot contamina preparatele obținute.

În cercetările efectuate acidul hialuronic a fost obținut din mai multe surse naturale de materie primă: creastă de găini (CG), creastă de cocoși (CC), corpul vitros al ochiului de bovină (CVB), cordon ombilical bovin (COB) [29–32].

În metoda propusă se efectuează degreasarea deplină a materiei prime până la extragerea AH, care decurge concomitent cu deshidratarea, în aparatul Soxhlet cu acetona, timp de 2 ore. Extragerea AH se efectuează cu soluție de NaCl numai la rece (4–10°C). Din extractul obținut la rece, AH se sedimentează cu etanol 96% sau acetona. Produsul se redizolvă și se elimină proteinele prin încălzire-răcire la pH 7 și prelucrare cu  $\text{CHCl}_3$  la pH 5–5,5. Din soluția obținută se sedimentează și se izolează hialuronatul de sodiu, respectiv AH, cu randamentul corespunzător.

Caracteristicile preparatelor obținute variază în funcție de sursa materiei prime. Pentru preparatele obținute s-a determinat partea de masă a acidului hialuronic în raport cu masa inițială supusă extracției ( $\omega$ ), partea de masă a proteinelor în

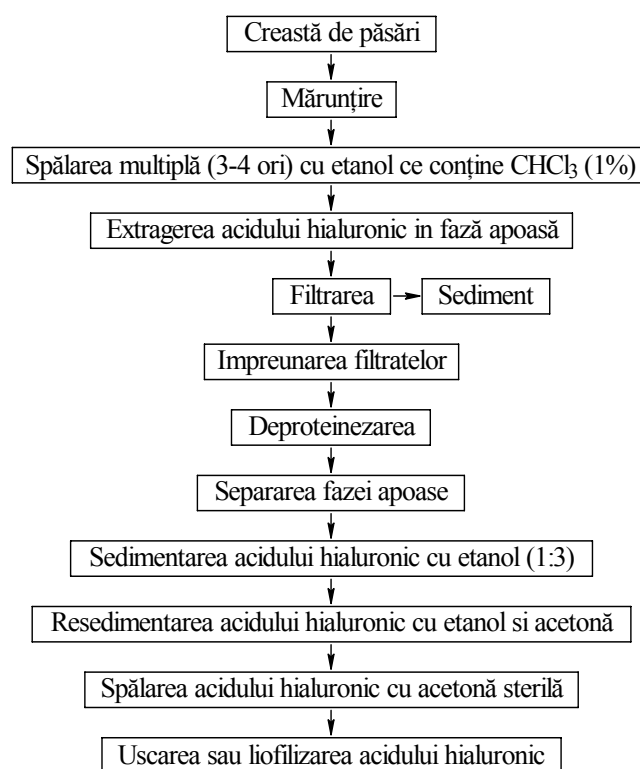
preparate (metoda Lowry) [33], viscozitatea relativă (metoda Ostwald)  $\eta$  [34] (Tab. 1.).

Identificarea AH în preparatele obținute a fost efectuată în baza spectrelor de absorbție în domeniul infraroșu [35].

Reeșind din rezultatele cercetărilor efectuate și disponibilitatea surselor de materie primă am convenit de a obține acidul hialuronic din creastă de pasări (găini și cocoși) colectate de la întreprinderile avicole locale [36–38].

Rezultatul cercetărilor constă în perfectarea procedurii de obținere a AH, sporirea gradului de extragere, reducerea cheltuielilor, ameliorarea calității produsului final adecvat pentru uz medicinal, cosmetic și alimentar.

Obținerea AH a fost realizată în mai multe etape conform schemei din fig. 1.



**Figura 1.** Schema procesului de obținere a acidului hialuronic

**Tabelul 1.** Caracteristica preparatelor de AH obținute din diverse surse de materie primă.

|                                  | CG  | CC  | CVB | COB |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| $\omega$ (%)                     | 0,4 | 0,6 | 0,1 | 1,4 |
| Proteine (%)                     | 5   | 4   | 3   | 3   |
| Viscozitatea relativă ( $\eta$ ) | 11  | 12  | 7   | 13  |

În acest scop s-au colectat 160 g de creste de găini și cocoși proaspete, îndată după sacrificarea păsărilor sănătoase de la întreprinderea Avicola "ROSO", s. Floreni, mun. Chișinău, s-au spalat de sânge cu apă rece (10–15°C) în 2–3 reprize timp de 5–6 ore apoi s-au mărunțit fin, astfel încât dimensiunile fragmentelor erau aproximativ de 1–3 mm. Mărunțirea s-a efectuat în combina Moulinex Genius 2000. La masa mărunțită s-a adăugat acetonă sau etanol de 96%, care conține 1%  $\text{CHCl}_3$  în raport de 1:3 și s-a lasat în frigider pentru 6–24 ore la temperatura de 0–4°C (etapa 1). În rezultat materia primă parțial s-a dehidratat și s-a micșorat volumul. Solventul s-a separat și s-a distilat, iar masa dehidratată parțial s-a introdus în aparatul Soxhlet și s-a extras cu acetonă (etapa 2). În rezultat a avut loc dehidratarea masei în continuare și extragerea concomitentă a substanțelor bioactive solubile în acetonă (lipide, fosfolipide, lipoproteine, glicolipide, glicolipoproteine, nucleotide, enzime etc., care ulterior pot contamina produsul final. După înlăturarea deplină a tuturor substanțelor bioactive cu efect negativ masa de creste s-a scos din aparat și s-a uscat în nișa cu ventilare până la dispariția mirosului de acetonă. Masa substanței uscate constituie 37 g.

În calitate de extragent pentru AH s-a utilizat soluția apoasă de 1 M NaCl. La masa uscată obținută (37 g) s-a adăugat 750  $\text{cm}^3$  soluție de 1 M NaCl și 2–3 picături de  $\text{CHCl}_3$  în calitate de agent bacteriologic. Amestecul s-a lasat în frigider pentru 24 ore la temperatura de 4–10°C. Amestecul s-a filtrat. Filtratul s-a colectat, iar la masa de creste, deja hidratată s-a adăugat o porție nouă de extragent și 2–3 picături de  $\text{CHCl}_3$ . Procedura s-a repetat analogic de trei ori (etapa 3). Rămășița după extragere s-a congelat pentru prelucrarea ulterioară. Cele 3 porții de extras s-au împreunat (în total 2 litri), s-au filtrat prin plasă de nailon, s-au centrifugat la 7000 rot./min timp de 20 min pentru înlăturarea impurităților și particulelor greu solubile. Soluția s-a răcit până la 4°C, s-a stabilit pH-ul la 5–5,5 cu soluție HCl 0,1 M și s-a adăugat etanol de 96% rece în raport de 1:3. Sedimentul format s-a separat și s-a dizolvat în 100  $\text{cm}^3$  soluție de 1 M NaCl, s-a încălzit 5–10 min până la temperatura de 70–80°C apoi rapid s-a răcit până la 18–20°C, s-a ajustat pH-ul la 5–5,5 cu soluție HCl 0,1 M și s-a adăugat  $\text{CHCl}_3$  în raport de 1:1, s-a agitat ușor cu agitator din sticlă numai într-o singură direcție, în pâlnia de decantare. Peste 24 ore s-a separat faza apoasă superioară și s-a colectat, faza organică ( $\text{CHCl}_3$ ) și proteinele sedimentate la interfață s-au înlăturat, iar solventul s-a distilat. Procedura s-a repetat de 3–4 ori până soluția apoasă a devenit transparentă sau puțin opalescentă (etapa

4). După ultima procedură de deproteizare pH-ul soluției s-a stabilit cu soluție diluată de NaOH la 7,5 – 8,0 și acidul hialuronic s-a sedimentat din faza apoasă, cu etanol de 96 % rece în raport de 1:3 în formă de sare de sodiu (P1). S-a obținut 0,785 g produs. Randamentul produsului obținut P1 constituie 0,5 %. Partea de masă a proteinelor, determinată prin metoda Lowry, în produsul final nu depășește 1 %. Spectrul în IR a produsului obținut confirmă autenticitatea AH.

Soluția apoasă de 1 % AH obținut prin procedeul propus reprezintă un lichid vâcos, greu eculent, străveziu sau puțin opalescent, fără culoare, fără miros. Viscositatea relativă a soluției de 0,1% AH măsurată cu viscosimetrul Ostwald la temperatura de 18°C a fost egală cu 12.

Absorbanța soluției de 1% AH măsurată la 257 nm (maximul de absorbție a nucleotidelor) și la 280 nm (maximul absorbției pentru proteine) – este mai mică de 0,1 un ( $l = 10$  mm).

Acidul hialuronic obținut se păstrează în etanol de 96%, în flacoane închise ferite de lumină, la temperatura de 0–4°C.

Rămășița de la etapa 3 s-a dezghețat și s-a adăugat la ea 700  $\text{cm}^3$  soluție de 1M NaCl și 2–3 picături de  $\text{CHCl}_3$ . Amestecul obținut s-a încălzit pe baia de apă la temperatura de 50–60°C timp de 3 ore (etapa 5). Apoi amestecul s-a filtrat prin plasă de nailon sterilizată. Filtratul s-a centrifugat la 7000 rot./min timp de 30 min.

El este vâcos și s-a gelatinizat în frigider. La extractul obținut s-a adăugat acetonă în raport de 1:3 (v/v). Produsul sedimentat (P2) s-a separat, s-a spalat cu acetonă și s-a uscat. Analiza produsului obținut P2 a fost efectuată după aceeași parametri ca și analiza produsului P1. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1. La produsul P2 a fost efectuată analiza calitativă și cantitativă a conținutului de proteine la analizatorul de aminoacizi. Pentru analiză s-a dizolvat 58 mg de produs P2 în 10 ml soluție. S-a constatat că produsul P2 conține 64,7 % proteine. Soluția de 1% a produsului P2 prezintă absorbție în domeniul ultraviolet la lungimea de undă 266,5 nm egală cu 0,609 un. ( $l=10$  mm).

## Bibliografie

1. Zadorojnăi L. Despre unele aspecte ale acidului hialuronic obținut din diverse surse naturale. Meridian Ingineresc, Chișinău, 2005, Nr. 2, p. 54-57.
2. Turley E., Moore D. Biochem. biophys. Res. Commun., 1984. V. 121, p. 808-814.

**Tabelul 2.** Caracteristica produselor obținute (P1 – hialuronatul de sodiu; P2 – complexul acid hialuronic-proteină)

| Nr/o | Produsul obținut | Randamentul produsului (%) | Partea de masă a proteinelor (%) | Viscozitatea relativă a soluției (18°C) | Viscozitatea cinematică (St) |
|------|------------------|----------------------------|----------------------------------|---|------------------------------|
| 1    | P1               | 0,5                        | 1                                | 12                                      | 0,13                         |
| 2    | P2               | 12                         | 64,7                             | 13                                      | 0,14                         |

3. *Metody himii uglevodov. Per. s angl., pod red. Kochetkova N.K., M., izd-vo "Mir", 1967, str. 368-370.*
4. *Balazs E.A., Riverdale N.Y. Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof. Patent USA, 4141973, 1979,*
5. *Van Brunt J. Biotechnology, 1986, V. 4, p.780.*
6. *Layton G.T., Stanwerth D.R., I. Immunol. Methods, 1984, Vol. 42, p.329.*
7. *Hafizova L.T., Kuznecov V.P. i dr. Medicinskaja promyshlenost' i biotehnologija, M., 1992, vyp. 8-9, str. 32*
8. *Loth Fritz, Verfahren zur Gewinnung von Hyaluronsaure. Patent DE, 19712931, 1998,*
9. *Asatiani V.S. Fermentnye metody analiza, M., "Nauka", 1969, str. 566.*
10. *Vunder P.A., Murashev A.N. Sposob poluchenija gialuronovoj kisloty, Saratov. Gos. Univ. Patent URSS 950735, 1982,*
11. *Hildesheim J. Non-inflammatory hyaluronic acid fraction and process for preparing it. Patent EP 0239335, 1987.*
12. *Drizen A. Kosmetische Zusammensetzungen und Isolation und Reinigung von in kosmetischen Zusammensetzungen verwendeten Natrium-Hyaluronat-Fraktionen. Patent DE 4004001, 1990,.*
13. *Rjashencev V.Ju., Nikol'skij S.F., Vajnerman E.S. i dr. Sposob poluchenija gialuronovoj kisloty. Patent RU 2017751, 1994,*
14. *Laurent T. C. Chemistry and Molekular Biology of the Intercellular Matrix, Ed. E. A. Balazs, London, 1970, Academic Press, Vol.2., pp 730-763.*
15. *Muhtarov Je. I., Tulupova G.B., Gromov I. Ju. Sposob poluchenija preparata gialuronovoj kisloty. Patent RU, 2055079, 1996,*
16. *Cullis-Hill D. Preparation of Hialuronic acid from Synovial fluid. Patent US, 4879375, 1989,.*
17. *Stesol'nikov L.I., Ryl'cev V.V., Ignatjuk T.E. i dr. Sposob poluchenija gialuronovoj kisloty. Patent URSS, 16116926, 1989,*
18. *Stesol'nikov L.I., Ryl'cev V.V., Virnik R.B. i dr. Sposob poluchenija gialuronovoj kisloty. Patent RU, 2046801, 1995,*
19. *Stesol'nikov L.I., Samojlenko I.I., Kornilova A.A. Sposob poluchenija gialuronovoj kisloty. Patent RU, 2074196, 1997,*
20. *Samojlenko I.I., Epifanov A.E. Sposob poluchenija gialuronovoj kisloty. Patent RU, 2115662, 1998,*
21. *Carlino Stefano, Process for preparing a sterile high molecular weight Hyaluronic acid formulation. Patent WO, 014399, A1, 2004.*
22. *Antipova L.V., Poljanskih S. V., Aleksjuk M.P. Sposob poluchenija gialuronovoj kisloty. Patent RU, 2114862, C1, 1998.*
23. *Aurelio Romeo, Silvana Lorencii. Frakcija gialuronovoj kisloty ili ejo soli, sposob ochistki jetoj frakcii, sposoby poluchenija jetoj frakcii, farmacevticheskij preparat i sredstva, ispol'zuemye v oftal'mologii. Patent RU, 2128666, S1, 1999,*
24. *Dale P. DeVore, David A., Swann, Bernard P. Sullivan. Sodium hyaluronat composition. Patent US, 4920104, 1988,*
25. *Rădulescu G., Lupescu I., Petrea D. M., Hildegard S., Panaitescu M. Procedeu de obținere a acidului hialuronic și a sărurilor sale de sodiu sau potasiu, de uz cosmetic. Brevet RO, 116283, B, 1995.*
26. *Lutan V., Bezdrâghin M. Procedeu de obținere a acidului hialuronic. Brevet MD, 1617, C08B37/08, 2001,*
27. *Bezdrîghin M. Acțiunea biologică, biocompatibilitatea și inofensivitatea acidului hialuronic obținut din diferite surse naturale. Realizări științifice în farmacologie. Chișinău, 1999, P.171-177.*
28. *Bezdrîghin M. Studiul comparativ al proprietăților fizice, fizico-chimice,*

biocompatibilității și inofensivității acidului hialuronic obținut din diferite surse biologice (cordoane ombilicale umane, creste de cocoș și corp vitros bovin), autoreferat al tezei de doctor în științe farmaceutice. Chișinău, 2000, Conducător șt. Lutan V.

**29. Zadorojnâi L., Sturza R., Zadorojnâi A.** Cercetarea metodelor de obținere a acidului hialuronic. *Book of Abstracts XXIX-th Romanian Chemistry Conference, Călimănești-Căciulata, Rm.Vâlcea, România, 4-6 october, 2006, p. 18.*

**30. Zadorojnâi L., Zadorojnâi A.** The comparative investigation of methods for separation and purification of hyaluronic acid from different natural sources, *Presentations on II<sup>nd</sup> International Conference of the Chemical Society of the Republic of Moldova "Achievements and Perspectives of Modern Chemistry", Chișinău, 1-3 october, 2007, p.44.*

**31. Zadorojnâi L., Zadorojnâi A.** Studiu comparativ a preparatelor de acid hialuronic obținute din diverse surse de materie primă locală, *Teze la Conferința Colaboratorilor, doctoranzilor și studenților Universității Tehnice a Moldovei, Chișinău, U.T.M., 16-17 noiembrie, 2007, Vol. II, p 12-13*

**32. Zadorojnâi L., Zadorojnâi A.** Analiza comparativă a preparatelor de acid hialuronic obținute din diverse surse de materie primă. *Book of Abstracts XXX-th Romanian Chemistry Conference, Călimănești-Căciulata, Rm.Vâlcea, România, 8-10 october, 2008, p. 30.*

**33. Fillipovich Ju.B., Egorova T.A., Sevast'janova G.A.** *Praktikum po obschej biohimii, M., Prosveschenie, 1975, str.75-76.*

**34. Rabek Ja.** *Jeksperimental'nye metody v himii polimerov, ch. I, M., 1983, izd. MIR, s.131-139.*

**35. Nakanisi K.,** *Infrakrasnye spektry i stroenie organicheskikh soedinenij. Perevod s angl. Kupletskoj N.B. i Jepshtejn L.M., Izd-vo "Mir", Moskva, 1965.*

**36. Zadorojnâi L.** *Procedeu de obtinere a acidului hialuronic, hialuronatului de sodiu si complexului acid hialuronic-proteine*”Brevet MD 3099, C08B 37/08, 2006. BOPI, № 7, p.29.

**37. Zadorojnâi L., Sturza R., Zadorojnâi A.** Obținerea acidului hialuronic din surse naturale locale. *Teze la Conferința Științifică Internațională "Învățământul superior și cercetarea - piloni ai societății bazate pe cunoaștere". Rezumatele comunicărilor, Științe reale Chișinău, 28 septembrie, 2006, p. 157*

**38. Zadorojnâi L., Sturza R., Zadorojnâi A.** *Procedeu de obținere a acidului hialuronic, Teze la Conferința Jubiliară a Colaboratorilor, doctoranzilor și studenților a Universității Tehnice a Moldovei, Chișinău, 17-18 noiembrie, 2006, Vol. II, p. 29-31.*