

STUDIUL ȘI ANALIZA PROCESULUI DE EXTRACȚIE ȘI PURIFICARE A ACIDULUI HIALURONIC DIN MATERIE PRIMĂ DE ORIGINE ANIMALĂ

**Autori: Larisa ZADOROJNĂI*, Alexei BAERLE*, Iurie SUBOTIN*,
Ana VEREJAN*, Alexandru ZADOROJNĂI ****

***Universitatea Tehnică a Moldovei**

****Universitatea de Stat din Moldova**

Abstract: În lucrare este cercetat procesul de obținere a acidului hialuronic din creastă de păsări pentru utilizare practică. Acidul hialuronic se utilizează în calitate de medicament la tratamentul eczemelor, combustiilor pielii și ulcerelor trofice, în oftalmochirurgie ca protector mecanic, în compoziția cremelor, loțiunilor, geleurilor, măștilor și alte forme cosmetice inclusiv cosmetica decorativă. În industria alimentară acidul hialuronic se utilizează ca ingredient în diverse suplimente alimentare pentru întărirea sistemului imun și prevenirea diferitor maladii inclusiv a cancerului.

Cuvinte cheie: acid hialuronic, utilizare, obținere, extracție, purificare, creastă de păsări

1. Introducere

Prima evidență documentară de obținere a preparatelor de acidului hialuronic se atestă în anul 1934 în lucrările savanților K. Meyer și J. W. Palmer. Ei au extras acidul hialuronic din corpul vitros al ochiului bovinelor. Dar interesul sporit în obținerea acidului hialuronic a apărut după cel de-al II-lea război Mondial odată cu problema căutării substituenților corpului vitros al ochiului. Producerea și utilizarea acidului hialuronic în toată lumea este în continuă creștere. În prezent sunt cunoscute multe produse ce contin acid hialuronic, de exemplu: Juviderm, Restylane, Perlane, Hylaform, HydraFill etc. Cu toate acestea la noi în țară acidul hialuronic este puțin cunoscut ca substanță farmaceutică și cosmetică. Din medicamente a fost înregistrată doar Curiozina (Ungaria). Necesitățile mereu crescânde de acid hialuronic pentru farmaceutică, cosmetică și industria alimentară impun investigații în scopul cercetării proprietăților lui, căutarea surselor locale de acid hialuronic, elaborarea metodelor rentabile de obținere și producere a acidului hialuronic autohton, a derivaților chimici și a preparatelor medicamentoase și cosmetice în baza lui. Acidul hialuronic reprezintă un prețios biomaterial natural, biocompatibil, inofensiv, non-alergic [1]. Din aceste motive el devine unul din cei mai „agreabili” ingrediente cosmetici. Emulsiile pe baza lui au o consistență moale și fină. Preparatele sunt compatibile cu pielea și nu dau reacții alergice. Proprietăți deosebite manifestă nu numai acidul hialuronic dar și sărurile sale de sodiu, potasiu, calciu, zinc etc., care cu succes se utilizează în cosmetică. Acidul hialuronic este un hidratant excelent. O moleculă de acid hialuronic poate reține pînă la 500 molecule de apă, formînd o peliculă fină pe suprafața pielii, care crează un efect de hidratare sporită. Cu cît masa moleculară a preparatului este mai mare cu atît și efectul hidratării este mai mare [2].

Important este că macromolecula acidului hialuronic poate fi conjugată cu compuși bioactivi de importanță farmaceutică. Așa dar, acidul hialuronic poate fi un vehicol de medicamente la aplicarea topică, care dirijează absorbția acestora [3]. Noi avem în țară destule surse ieftine pentru producerea acidului hialuronic. Problema constă în elaborarea metodelor economic rezonabile de obținere și purificare a acidului hialuronic și derivaților săi în cantități suficiente pentru a fi comercializat și utilizat la producerea altor compuși bioactivi în baza lui.

2. Importanța și domeniile de utilizare a acidului hialuronic

Datorită proprietăților sale, acidul hialuronic este unul dintre cele mai atractive biomateriale pentru industria farmaceutică și cea de produse cosmetice. Acidul hialuronic asigură lubrifierea și hidratarea țesuturilor conectante, inclusiv cele de la nivelul epidermei. În lipsa lubrifierii și a hidratării țesuturile își pierd elasticitatea și în cazul epidermei, duce la apariția ridurilor și a cutelor. Datorită structurii sale, acidul hialuronic formează la nivelul pielii un film invizibil, transparent și

elastic, acționând în același timp în profunzime, la nivelul țesuturilor precum și la nivelul cartilajelor, articulațiilor. Rolul său este de a menține cele mai importante caracteristici ale epidermei tinere și sănătoase: suplețea, elasticitatea și tonicitatea. Capacitatea acidului hialuronic de a restabili matricea interstițială și turgorul pielii și de a lichida ridurile este cu succes folosită pentru "întinerirea" pielii. Acidul hialuronic este un glicozaminoglican, component esențial al spațiului extra celular, în care sunt suspendate fibrele de colagen și elastină. Are o capacitate crescută de a reține apa, asemănător unui "burete" ce permite menținerea hidratării, elasticității, fermității pielii. Din nefericire, capacitatea organismului de a produce acid hialuronic scade odată cu înaintarea în vârstă, și astfel țesutul cutanat devine deshidratat, ridat, cu tonicitate diminuată. Injecțiile cu acid hialuronic se utilizează mai mult de 12 ani în Europa și au înlocuit treptat injecțiile cu colagen de origine bovină, care se complicau uneori cu reacții alergice și necesitau teste prealabile. Fiind un agent de umplere natural rata reacțiilor alergice este foarte scăzută de 0.06% față de 3% în cazul colagenului. Acidul hialuronic se utilizează pentru umplerea ridurilor și augmentarea buzelor. De asemenea, acidul hialuronic este o componentă importantă a cartilajului. În acest rol el amortizează șocurile în articulații, dar are și efect de lubrifiere și protecție a articulațiilor în cazul inflamațiilor cronice (de exemplu artrita). Vindecă cu succes și întinderile de ligamente. Acidul hialuronic este un ingredient important în preparatele anti-osteoartrită și este frecvent injectat în articulații, fiind un tratament foarte eficient.

Acidul hialuronic ajută sistemul imunitar, acționând ca antioxidant, sporește reținerea apei în țesuturi, crește lubrifierea valvelor cardiace, și are rol de adjuvant în tratamentul anti-infecție. În anii 1990, preparatele cu acid hialuronic au început să fie utilizate și în oftalmologie, la tratarea sechelelor de leziuni pe corneea. Pe lângă faptul că menține articulațiile lubrificate, acidul hialuronic ajută la reținerea apei și în alte țesuturi ale corpului, asigurând hidratarea fibrelor de colagen și elastină. Interesul pentru folosirea acidului hialuronic ca ingredient bioactiv în produsele de îngrijire a pielii a apărut odată cu descoperirea că volumul lui din epidermă scade cu vârsta. Efectele sale extraordinare de umplere a ridurilor și de netezire au fost demonstrate clinic. Tot studiile clinice au arătat că acidul hialuronic ajută la vindecarea mai rapidă a rănilor și la estomparea cicatricilor.

În prezent se utilizează procedurile de injecție a acidului hialuronic cross-linked pentru umplerea ridurilor și mărirea buzelor, așa numitele fillere [4]. În acest scop sunt comercializate așa produse ca Amalian (Suedia), Perfectha (Franța), Remake (Italia), Aphrodite Gold (Germania) etc. Spre deosebire de multe substanțe biologice active, acidul hialuronic își arată toate proprietățile sale valoroase, la concentrații foarte mici (0,01-0,1%), ce ar oferi o cosmetică eficientă, ale căror prețuri se vor potrivi atât pentru producători, cât și pentru consumatori. Practic, aceasta se referă la acidul hialuronic cu o greutate moleculară mare, care în prezent face parte din creme de hidratare, ruj și balsamuri de buze, creme anticelulitice, loțiuni de protecție solară și antiinflamatoare pentru vindecarea rănilor [5, 6]. Conținutul de acid hialuronic în corpul uman este un factor important de care depinde imunitatea și procesul fiziologic de îmbătrânire a organismului. Pentru întărirea sistemului imunitar și prevenirea diferitor maladii inclusiv a cancerului sunt preparate diverse "adaosuri alimentare" în care acidul hialuronic se utilizează ca ingredient sau chiar ca compus de bază [7, 8]. El este numit "steaua" - cosmetologiei, "speranța" - întineririi și "chezășia" - frumuseții. Beneficii ale suplimentării cu acid hialuronic:

- Efect cosmetic: hidratarea pielii dinspre interior spre exterior, rectificând astfel ridurile;
- Efect anti-artritic: lubrifică articulațiile în special la genunchi și șolduri;
- Efect rejuvenant, anti-îmbătrânire: pentru bărbați și femei între 40-50 ani care încep să vadă în oglindă semnele îmbătrânirii.

Efectele se fac evidente rapid, după începerea suplimentării organismului cu acid hialuronic.

3. Rezultate și discuții: Extragerea și purificarea acidului hialuronic din creastă de păsări

În baza investigațiilor literare efectuate s-a constatat, că există diverse metode de obținere și purificare a acidului hialuronic. Diversitatea resurselor de materie primă de origine animală este mare: creastă de cocoși și găini, cartilaje, corp vitros bovin, cordon ombilical etc. Metodele

existente de obținere și purificare a preparatelor sunt costisitoare și sofisticate, iar randamentul de obținere este mic. Purificarea preparatelor de acid hialuronic este un proces îndelungat și necesită un consum mare de solvenți, iar regenerarea solvenților nu este deplină. În scopul îmbunătățirii condițiilor de obținere a preparatelor de acid hialuronic de uz cosmetic și alimentar s-a hotărât de a perfecta etapa de extragere a acidului hialuronic din materia primă. Pentru realizarea cercetărilor s-a convenit de a obține acid hialuronic din creastă de păsări (găini și cocoși), care au fost procurate de la fabrica avicolă din satul Iurevca, raionul Cimișlia. Crestele au fost colectate proaspete îndată după sacrificarea păsărilor sănătoase și au fost prelucrate conform schemei din brevetul MD 3099, modificând extragentul, pH-ul, temperatura [9]. Crestele colectate s-au spalat de sânge cu apă rece (4–8°C) apoi s-au lasat pentru 24 ore în apă slab acidulată (pH 5,5–6) la rece pentru înlăturarea completă a sîngelui. Procedura de spălare cu apă s-a repetat de 2–3 ori, până când crestele devin albe și apa rămâne curată. Masa de creste s-a mărunțit (dar nu se omogenizează), astfel ca dimensiunile fragmentelor să fie aproximativ de 2–5 mm. La masa mărunțită s-a adăugat alcool etilic de 96% în raport de 1:2 și s-a lasat în frigider pentru 24 ore. În rezultat are loc deshidratarea parțială și micșorarea volumului materiei prime. Alcoolul s-a separat și s-a recuperat parțial, iar la masa deshidratată s-a adăugat extragentul (apă distilată, soluție NaCl diferite concentrații, soluție NaOH de 0,01 mol/l). Următoarea etapă este hidratarea masei uscate și extragerea acidului hialuronic. În acest scop s-au efectuat mai multe probe de extragere a acidului hialuronic în diferite condiții. Din fiecare probă s-a extras acidul hialuronic cu acelaș extragent de trei ori peste fiecare 48 ore. La fiecare extracție în soluție s-a adăugat câte 5 ml cloroform în calitate de agent antiseptic. Conform datelor analizei s-a constatat că conținutul de substanțe extractibile la prima extracție este mai mare și se micșorează, corespunzător, la extracția a doua, a treia. Extractele obținute sunt contaminate cu proteine. Conținutul lor în extracte depinde de condițiile de extracție. După extracție urmează etapa de purificare a extractelor obținute. Purificarea extractelor de acid hialuronic se acează pe înlăturarea cât mai deplină a proteinelor din soluție. În literatura de specialitate sunt descrise mai multe metode de înlăturare a proteinelor: precipitarea cu săruri [10, 11], coagulare, denaturare [12]. Pentru înlăturarea proteinelor legate covalent de acidul hialuronic se utilizează fermenți [13]. Noi am convenit la înlăturarea proteinelor prin metoda de sedimentare a lor la interfața a doi solvenți nemiscibili H₂O – CHCl₃. Inițial această metodă a fost utilizată de Balazs E.A. [14]. Metoda constă în prelucrarea extractelor obținute cu cloroform în raport de 1:1. La fiecare extract obținut s-a adăugat cloroform. Amestecul s-a agitat periodic, timp de 5 ore, apoi s-a lăsat pentru 24 ore în frigider, la temperatura de 4–5°C, pentru strarificare. Proteinele se sedimentează la interfață, formând un strat subțire, care se înlătură prin decantare. Apoi la soluția apoasă s-a adăugat o porție nouă de cloroform și procedura s-a repetat din nou. Fiecare extract s-a prelucrat în așa mod de 3 ori până soluția apoasă devine transparentă sau puțin opalescentă. Prin analiză s-a constatat că conținutul de proteine dizolvate în soluție se înlătură maximal după 4 prelucrări cu cloroform. Mai eficient decurge procesul de înlăturare a proteinelor, dacă încălzim soluția la aproximativ 30°C și o agităm în continuu. Extractele s-au împreunat și din nou s-au prelucrat cu cloroform pentru înlăturarea cât mai deplină a proteinelor. Soluția obținută s-a filtrat prin plasă de nailon, s-a centrifugat la 7000 rot/min timp de 20 min pentru înlăturarea impurităților și particulelor greu solubile. Din soluția deproteinezată s-a sedimentat acidul hialuronic, prin amestecarea a doi solvenți miscibili cu condiția că acidul hialuronic este greu solubil în unul din ei. Cel mai frecvent se utilizează acetona, diferiți alcooli, soluții de săruri saturate etc. Pentru sedimentarea acidului hialuronic soluția s-a răcit până la 4°C, la diferite valori a pH-ului, și s-a adăugat etanol de 96% rece în raport de 1:3. Ajustarea pH-ului s-a efectuat cu soluție HCl de 0,01 mol/l sau cu soluție NaOH de 0,01 mol/l, Etanolul și cloroformul după prelucrare s-au recuperat prin distilare. Acidul hialuronic sedimentat s-a spalat de 3 ori cu acetonă absolută, apoi s-a uscat. În dependență de condițiile de extragere, randamentul produsului obținut este diferit și în mediu constituie 0,4–1,2%. Acidul hialuronic în produsele obținute a fost identificat după spectrul de absorbție în IR. Partea de masă a proteinelor a fost determinată prin metoda Lowry și constituie 3–5%, partea de masă a acidului hialuronic recalculată după masa acidului glucuronic analizat

constituie 70–77%. Acidul hialuronic obținut se păstrează în etanol de 96% , în flacoane închise ferite de lumină, la temperatura de 0–4°C. Soluția apoasă de 1% acid hialuronic obținută prin procedeul propus reprezintă un lichid vâscos, greu eculent, străveziu sau puțin opalescent, fără culoare, fără miros. Viscositatea relativă a soluției de 0,1% acid hialuronic, măsurată cu viscosimetrul Ostwald la temperatura de 20°C, a fost egală cu 7.

Concluzii

S-a efectuat un studiu multilateral al metodelor de obținere și purificare a acidului hialuronic din creastă de păsări. Au fost perfectate condițiile de extragere și purificare a acidului hialuronic din creastă de păsări. S-a stabilit că pH-ul, temperatura, natura extragentului, raportul de volum a extragentului și cloroformului influențează procesul de extragere și purificare a acidului hialuronic. S-a stabilit că pH-ul egal cu 7, raportul de volum a extragentului și cloroformului 1:1, temperatura de purificare cu cloroform 30°C sunt parametri optimali în procesul tehnologic de obținere a acidului hialuronic.

Bibliografie

1. V. Lutan ș.a., Acidul hialuronic-procedee biochimice, efectele biologice și perspectivele utilizării în medicină, farmaceutică și cosmetologie , Anale științifice ale Universității de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițeanu”, “Probleme medico-biologice și farmaceutice” Vol. I, Chișinău, 2005, ed. VI, P. 181–184.
2. Zadorojnâi L. Despre unele aspecte ale acidului hialuronic obținut din diverse surse naturale, Meridian Ingineresc, U.T.M., 2005, Nr. 2, P. 54-57.
3. Zadorojnâi A., Zadorojnâi L.” Modificarea acidului hialuronic cu compuși bioactivi”, Book of Abstracts XXX-th Romanian Chemistry Conference, Călimănești-Căciulata, Rm.Vâlcea, România, 8-10 october, 2008, P. 29, ISBN 978-973-750-124-0.
4. Patent US 4636524, 1987, Balazs E.A. et al, Cross-linked gels of hyaluronic acid and products containing such gels.
5. Патент RU 2172168, А 61 К9/08, 9/06, 31/728,2001 / Лебедев Е., М., Федорищев ИА., Композиция заживления ран на основе гиалуроновой кислоты.
6. Патент RU 2159111, А 61 К 31/715, 2000, / Лебедев Е., М., Федорищев ИА., Композиция для ухода за кожей лица.
7. Patent WO 9420115, 1994. Brown K. K., Hyaluronic acid used as a cancer treatment.
8. Patent WO 9530423, 1995, Folk R.E., Cancer treatment and metastasis prevention.
9. Brevet MD 3099, C08B 37/08, 2006, Zadorojnâi L. „Procedeu de obtinere a acidului hialuronic, hialuronatului de sodiu si complexului acid hialuronic-proteine”, BOPI, № 7, p.29.
10. Patent DE, 19712931, 1998, Loth Fritz, Verfahren zur Gewinnung von Hyaluronsaure.
11. Patent EP 0239335, 1987, Hildesheim Jean, Non- inflammatory hyaluronic acid fraction and process for preparing it.
12. Patent RU, 2074196, 1997, Стесольников Л.И., Самойленко И.И., Корнилова А.А., Способ получения гиалуроновой кислоты.
13. Patent DE 4004001, 1990, Drizen Alan, Kosmetische Zusammensetzungen und Isolation und Reinigung von in kosmetischen Zusammensetzungen verwendeten Natrium-Hyaluronat-Fraktionen.
14. Patent USA, 4141973, 1979, Balazs E.A., Riverdale N.Y., Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof.