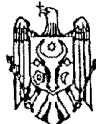




MD 3099 F1 2006.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 3099 (13) F1  
(51) Int. Cl.: C08B 37/08 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<b>Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării</b>	
(21) Nr. depozit: a 2005 0349 (22) Data depozit: 2005.11.29	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2006.07.31, BOPI nr. 7/2006
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: ZADOROJNAI Larisa, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI, MD	

(54) Procedeu de obținere a hialuronatului de sodiu, acidului hialuronic și  
complexului acid hialuronic-proteină

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la un procedeu de obținere a hialuronatului de sodiu, acidului hialuronic și complexului acid hialuronic-proteină, care pot fi utilizate în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică.

Esența invenției constă în aceea că procedeu include spălarea creștelor de cocoși, găini cu apă la temperatura de 10...15°C timp de 5...6 ore, mărunțirea și deshidratarea lor în acetonă sau etanol de 96%, care conține 1% CHCl<sub>3</sub>, în raport de 1:3, după care se lasă pentru 6...24 ore la temperatura de 0...4°C, apoi solventul se separă și se efectuează deshidratarea suplimentară și degresarea cu acetonă în aparatul Soxhlet timp de 2 ore, sedimentul obținut se usucă și se supune extragerii cu soluție apoasă de 1M NaCl în două stadii: I stadiu la rece la 4...10°C și al II-lea stadiu la încălzire până la 50...60°C, totodată la I stadiu se efectuează extragerea în raport de 1:20 de trei ori, se separă reziduul de extract, după care se efectuează sedimentarea acidului hialuronic din extract cu

2  
etanol de 96% în raport de 1:3, sedimentul se redizolvă și se elimină proteinele din el la încălzire și răcire la pH 5,0...5,5, se adaugă CHCl<sub>3</sub> în raport de 1:1, se separă faza apoasă, se tratează cu etanol de 96% în raport de 1:3, se separă sedimentul format de hialuronat de sodiu cu un conținut de proteină de cel mult 1%, iar acidul hialuronic se obține la acidularea cu HCl a soluției apoase de hialuronat de sodiu; la al II-lea stadiu reziduul obținut la I stadiu se extrage în raport de 1:3, apoi se sedimentează cu acetonă obținând un complex acid hialuronic-proteină cu un conținut de proteină de 65%.

15  
Revendicări: 1  
Figuri: 2

MD 3099 F1 2006.07.31

## MD 3099 F1 2006.07.31

3

### Descriere:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a hialuronatului de sodiu, acidului hialuronic (AH) și complexului acid hialuronic-proteină, care pot fi utilizate în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică.

5 AH este semicristalin, de culoare albă, solubil în apă și insolubil în solvenți organici. Soluția apoasă posedă o viscozitate înaltă. Macromolecula AH este construită din resturile acidului  $\beta$ -glucuronic și N-acetil- $\beta$ -D-glucozaminei care alternează liniar, fiind unite consecutiv prin legăturile  $\beta$  - (1 $\rightarrow$ 4) și  $\beta$  - (1 $\rightarrow$ 3) glicozidice. AH izolat din diverse surse conține diferite cantități de proteine. Masa moleculară a AH variază în limitele  $7,7 \cdot 10^4 \dots 28 \cdot 10^6$  D în funcție de tipul țesutului conjunctiv, condițiile fiziologice locale, metoda de obținere și purificare, precum și de alți factori. Cu cât este mai mare masa moleculară, cu atât asimetria macromoleculei și viscozitatea soluțiilor vor crește. S-a constatat că în complexul acid hialuronic – proteină, partea proteică ocupă o poziție centrală de tipul unui miez, de la care spre exterior pornesc lanțurile lungi de AH. Ultimul este unul din cele mai importante mucopolizaharide ale țesutului conjunctiv. Conținutul de AH în diverse țesuturi și lichide fiziologice este divers. În cantitate mai mare se conține în culturile de streptococi, în corpul vitros al ochiului, lichidul sinovial, cordonul ombilical, creștele de cocoși, unde se află legat de proteine și, frecvent, alături de alte mucopolizaharide.

15 Este cunoscut procedeu de obținere a AH ultrapur din creștele de cocoși și cordonul ombilical [1]. Procedeu de Balazs constă în extragerea și purificarea hialuronatului de sodiu în mai multe etape consecutive, care durează mult timp și necesită un volum mare de muncă. Materia primă proaspăt colectată după spălare minuțioasă și înlăturarea sângelui prin dializă îndelungată se congelează. În stare congelată se mărunțește și se deshidratează în 3...4 reprize cu cantități mari de etanol de 96% ce conține cloroform. Fiecare procedură durează 24 ore. Extragerea se efectuează cu apă, după care urmează deproteinizarea cu cloroform și NaCl. Dacă conținutul de proteine este mare, autorul utilizează enzimele (Dnase, Rnase, Pronase) după a doua repriză de deproteinizare. Dacă se utilizează numai  $\text{CHCl}_3$ , atunci deproteinizarea se realizează în 5 zile la agitare continuă la temperatura de 20...40°C. La resedimentare se utilizează clorura de cetilpiridină.

20 Tehnologia de obținere a acestui preparat este complicată și necesită un mare volum de muncă și timp îndelungat. Preparatul devine foarte costisitor, datorită complexității purificării lui, utilizării unei cantități enorme de solvenți la toate etapele, îndeosebi la spălare, deshidratare și degresare. Randamentul produsului este mic (0,08%) și produsul nu este lipsit de proteine (0,4%). Viscositatea cinematică a soluției de 11% la 25°C este de 37,091 cSt. Pentru soluția de 1% (m/v) AH în soluție de 0,15M NaCl  $A_{257} = 0,243$ ,  $A_{280} = 0,198$ . Absorbanța soluției la lungimile de undă 257 și 280 nm demonstrează prezența nucleotidelor și proteinelor în produsul final obținut.

35 Este cunoscut procedeu de obținere a AH de uz cosmetic din creștele de cocoși [2], unde creștele de cocoși după spălare cu apă rece sunt tratate în multe reprize cu o cantitate considerabilă de etanol de 96% sau izopropanol pentru înlăturarea deplină a sângelui, dezactivarea enzimelor, înlăturarea lipidelor, deshidratarea țesutului. Mărunțirea se efectuează după deshidratare, apoi urmează extragerea AH cu apă sau soluție de 1...15% NaCl timp de 18 ore, la o temperatură nu mai mare de 80°C. Preparatul de AH este sedimentat cu etanol sau acetona. Randamentul constituie 1,92%, conținutul de proteine 9%, viscozitatea cinematică a soluției apoase de 0,1% - 6,3 cSt, absorbanța la 540 nm - 0,1.

40 Mărunțirea masei deshidratate este dificilă. Utilizarea unei cantități impunătoare de solvenți la deshidratare și înlăturarea substanțelor bioactive cu efect negativ, conținutul sporit de proteine fac produsul costisitor. Absorbanța soluției la 540 nm nu prezintă informație despre conținutul de acid hialuronic în produs. În acest domeniu absoarbe nu acidul hialuronic, ci complexul acidului glucuronic cu carbazolul.

45 Este cunoscut procedeu de obținere a AH ultrapur din creștele de cocoși și găini [3], unde etapele de spălare, deshidratare și degresare sunt efectuate la fel ca în procedeele precedente, corespunzător, cu apă, etanol cu conținut de 1% cloroform cu cantități mari și în multe reprize. Autorii modifică condițiile de extragere și purificare ulterioară a extractului de AH. Ei utilizează la procesul de extragere 3... 3,5 volume de apă acidulată cu soluție de 1M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  până la pH 3...4 și efectuează extragerea AH la temperatura de 90...100°C timp de 40...60 min, într-o singură repriză. Extractul obținut după filtrare prin vată se prelucrează cu doi sorbenți, mai întâi cu cărbune activat (1%, m/m), apoi cu DEAE-celuloză (firma „Sigma”, SUA cu capacitatea 0,9 mehv./g) în raport de 1 : 1,5, timp de 1...2 ore, la temperatura de 60...80°C. Autorii afirmă că în așa condiții are loc sorbția maximă a proteinelor din extract. În extract rămân 0,8...1,4% proteine. O purificare mai deplină a extractului autorii o efectuează prin filtrare pe hârtie, pe filtre de sticlă cu conținut de bor, pe membrane de acetilceluloză și clorură de polivinil la temperatura de 30...40°C și presiunea de 0,5...0,7 atm.

## MD 3099 F1 2006.07.31

4

Randamentul produsului constituie 0,09...0,12%. Viscositatea relativă a soluției de 0,1%, la 20°C este de 12...14, conținutul de proteine este mai mic de 0,1%, inclusiv ovalbumină mai puțin de 0,001%.

5 Realizarea procesului de extragere la temperatura de 90...100°C în mediul acid poate provoca hidroliza macromoleculilor de AH pe legăturile  $\beta - (1 \rightarrow 4)$  și  $(-)\beta - (1 \rightarrow 3)$  glicozidice. Eliminarea cărbunelui după absorbție, blocarea filtrelor, menținerea temperaturii joase și a presiunii în procesul de lucru sunt dificile. Utilizarea tehnologiilor sofisticate de purificare și randamentul mic fac produsul foarte costisitor.

10 Este cunoscut procedeul de obținere a AH din creste de cocoși [4], unde crestele de cocoși după spălare se mărunțesc și se congelează la -20...-70°C, se adaugă apă (1 : 2), compoziția se încălzește 15...20 min la temperatura de 90...100°C, se filtrează și procedura se repetă de 3 ori. La filtratele colectate se adaugă acid acetic și se separă produsul. Randamentul constituie 5%, conținutul de proteine după Lowry nu depășește 4%. Masa moleculară 1 mln. Omogenitatea se confirmă prin efectul Tyndall.

15 Procedeul propus pare a fi simplu, dar autorii nici la o etapă nu înlătură lipidele, nucleotidele și alte substanțe bioactive cu masă moleculară mică, care contaminează produsul final. Nu se indică nici cantitatea de acid acetic care se utilizează la sedimentarea produsului. Pentru înlăturarea suplimentară a proteinelor autorii propun ca produsul obținut să fie dizolvat în soluție diluată de NaOH, apoi soluția se ultrafiltrează și se liofilizează. Se știe că mediul bazic, ca și mediul acid, provoacă hidroliza macromoleculilor de AH pe legăturile glicozidice  $\beta - (1 \rightarrow 4)$  și  $\beta - (1 \rightarrow 3)$ . Ca rezultat la micșorarea cantității de proteine se va micșora și viscozitatea soluției și masa moleculară a AH obținut. Menținerea temperaturii scăzute în procesul de lucru necesită un consum suplimentar de energie și face produsul final costisitor. Viscositatea nu este indicată.

20 Cel mai apropiat procedeu de obținere a AH biocompatibil de uz medicinal, din cordoane ombilicale este [5]. Materialul biologic colectat se spală în 3 reprize cu etanol de 96% (1 : 2), câte 24 ore fiecare, la temperatura de -15...-20°C, până faza etanolică devine transparentă. La masa deshidratată de cordoane ombilicale se adaugă soluție izotonică de NaCl (1 : 2) în 3 reprize a câte 24 ore fiecare, la temperatura de +4°C. Soluția apoasă se scurge și la masa hidratată se adaugă din nou etanol de 96% (1 : 2), pentru 24 ore la temperatura de -15...-20°C. După această procedură cordoanele se mărunțesc (2...4 mm) și din nou se amestecă cu etanol de 96% (1 : 2), în 2 reprize câte 24 ore fiecare, la temperatura de -15...-20°C. Procedura se repetă până faza etanolică devine transparentă. Cordoanele ombilicale mărunțite și spălate în etanol se supun hidratării cu ser fiziologic (1 : 2) în 3 reprize a câte 24 ore fiecare, la temperatura de 0...+4°C. Filtratele se înlătură prin decantare, iar masa de cordoane se supune extragerii cu ser fiziologic (1 : 2) în 3 reprize a câte 24 ore fiecare, la temperatura de +4°C. Fiecare extragere se agită mecanic și soluția de AH se separă prin filtru de tifon separat. La fiecare porție se adaugă NaCl cristalin până la concentrația finală de 25%, se amestecă până la dizolvarea sării și se lasă pentru 24 ore în frigider, apoi se centrifughează la 2500 rot./min timp de 1 oră pentru a înlătura particulele mari de țesut. AH se sedimentează din fiecare porție în formă de sare cu etanol 96% (1 : 3). AH se redizolvă în ser fiziologic și se recrystalizează prin procedura descrisă mai sus de 2...3 ori până când soluția de acid hialuronic devine transparentă. Deproteinizarea se face cu  $\text{CHCl}_3$  (1 : 2) la pH 6 în 3...4 reprize. Separarea fazelor se efectuează la centrifugare timp de 30 min și 8000 rot./min. Faza apoasă se colectează și AH se sedimentează prin procedura descrisă mai sus. Randamentul produsului nu este indicat. Concentrația proteinelor după Lowry este de 0,2 g/l, ceea ce constituie 5% din masa totală dizolvată. Astfel autorii consideră că conținutul de AH este de 95%. Viscositatea relativă a soluției de 0,2% AH este 5,0. Pentru soluția de 45 0,5% AH  $A_{257} = 0,712$ ,  $A_{280} = 0,622$ . Spectrul densității optice a soluției de AH măsurat în domeniul 400...700 nm demonstrează maxim la 520...540 nm, ceea ce este specific pentru acidul hialuronic, relatează autorii. Absorbanța la 520...540 nm manifestă complexul acidului glucuronic cu carbazolul, dar nu nemijlocit AH. Autorii au testat biologic produsul obținut și au demonstrat lipsa de toxicitate, de alergogenitate, de acțiune hepatotoxică și cardiotoxică, iritantă, și asupra metabolismului mineral.

50 În procedeul descris pregătirea materiei prime pentru extragerea acidului hialuronic (spălare, deshidratare) este îndelungat, necesită un volum mare de muncă și consum enorm de etanol de 96%, cloroform și apă. Menținerea temperaturii scăzute (-15...-20°C) în procesul de lucru necesită un consum suplimentar de energie. Înlăturarea apelor de la procedura de hidratare provoacă pierdere de AH. Randamentul produsului obținut nu este indicat, dar conținutul relativ sporit de proteine reduce valoarea produsului. Lipsa de materie primă în cantități suficiente pentru producere limitează utilizarea procedurii [5] în scopuri practice.

60 Dacă din materia primă nu se înlătură pe deplin lipidele și substanțele bioactive cu efect negativ înainte de efectuarea extragerii AH, atunci în procesul de extragere ele contaminează complexul AH – proteină și înlăturarea lor la următoarea etapă de purificare este dificilă, cu consum sporit de cloroform în mai multe reprize și scăderea randamentului produsului final.

## MD 3099 F1 2006.07.31

5

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în lărgirea posibilităților tehnologice de obținere a AH din surse naturale locale ieftine, simplificarea procedurii tehnologice de obținere și purificare a AH, reducerea timpului de prelucrare a materiei prime cu un volum minim de solvenți, înlăturarea deplină a lipidelor și substanțelor bioactive cu efect negativ, sporirea gradului de extragere a AH, reducerea cheltuielilor pentru obținerea AH de uz medicinal, cosmetic și alimentar.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60

Esența invenției constă în aceea că procedeul include spălarea creștelor de cocoși, găini cu apă la temperatura de 10...15°C timp de 5...6 ore, mărunțirea și deshidratarea lor în acetonă sau etanol 96%, care conține 1% CHCl<sub>3</sub>, în raport de 1:3, după care se lasă pentru 6...24 ore la temperatura de 0...4°C, apoi solvenții se separă și se efectuează deshidratarea suplimentară și degresarea cu acetonă în aparatul Soxlet timp de 2 ore, sedimentul obținut se usucă și se supune extragerii cu soluție apoasă de 1M NaCl în două stadii: I stadiu la rece la 4...10°C și al II-lea stadiu la încălzire până la 50...60°C, totodată la I stadiu se efectuează extragerea în raport de 1:20 de trei ori, se separă reziduu de extract, după care se efectuează sedimentarea acidului hialuronic din extract cu etanol 96% în raport de 1:3, sedimentul se redizolvă și se elimină proteinele din el la încălzire și răcire la pH 5,0...5,5, se adaugă CHCl<sub>3</sub> în raport de 1:1, se separă faza apoasă, se tratează cu etanol 96% în raport de 1:3, se separă sedimentul format de hialuronat de sodiu cu un conținut de proteină de cel mult 1%, iar acidul hialuronic se obține la acidularea cu HCl a soluției apoase de hialuronat de sodiu; la al II-lea stadiu reziduu obținut la I stadiu se extrage în raport de 1:3, apoi se sedimentează cu acetonă obținând un complex acid hialuronic-proteină cu un conținut de proteină de 65%.

În procedeul propus ca sursă de materie primă se utilizează creștele de găini și cocoși care pot fi colectate la întreprinderile avicole locale ca subproduse care n-au întrebuințare directă în industria alimentară și sunt o sursă reală de materie primă ieftină la obținerea AH.

Rezultatul invenției constă în obținerea AH din surse naturale locale ieftine - crește de păsări; simplificarea procedurii tehnologice de obținere și purificare a acidului hialuronic prin utilizarea aparatului Soxlet, care permite reducerea timpului de prelucrare a materiei prime, micșorarea volumului de solvenți organici utilizați și înlăturarea deplină a lipidelor și substanțelor bioactive cu efect negativ; sporirea gradului de extragere a acidului hialuronic prin realizarea procesului de extragere în două stadii, la rece și la încălzire; îmbunătățirea calității produselor obținute; reducerea cheltuielilor pentru obținerea acidului hialuronic de uz medicinal, cosmetic și alimentar.

Fig. 1. Schema procesului de obținere și purificare a acidului hialuronic și a hialuronatului de sodiu.

Fig. 2. Spectrul de absorbție în IR a hialuronatului de sodiu (P1).

Obținerea AH a fost realizată conform schemei din fig. 1.

În acest scop au fost colectate crește de găini și cocoși proaspete, îndată după sacrificarea păsărilor sănătoase de la întreprinderea Avicola „ROSO”, s. Floreni, mun. Chișinău.

35  
40  
45  
50  
55

Creștele colectate se spală de sânge cu apă rece (10...15°C) în 2...3 reprize timp de 5...6 ore, apoi se mărunțesc fin (dar nu se omogenizează), astfel ca dimensiunile fragmentelor să fie aproximativ de 1...3 mm. La masa mărunțită se adaugă acetonă sau etanol de 96%, care conține 1% CHCl<sub>3</sub> în raport de 1 : 3 și se lasă în frigider pentru 6...24 ore la temperatura de 0...4°C (etapa 1). Ca rezultat are loc deshidratarea parțială și micșorarea volumului materiei prime. Solvenții se separă și se recuperează, iar masa deshidratată parțial se introduce în aparatul Soxlet și se extrage cu acetonă timp de 2 ore (etapa 2). Ca rezultat are loc deshidratarea și degresarea completă a materiei prime și extragerea concomitentă a substanțelor bioactive solubile în acetonă (lipide, fosfolipide, lipoproteine, glicolipide, glicolipoproteine, nucleotide, enzime etc. cu proprietăți pirogene, fluorogene, antigenice), care ulterior pot contamina produsul final. Utilizarea acetonei este convenabilă, deoarece temperatura de fierbere este relativ joasă (56°C) și dizolvă bine toate tipurile de lipide. Numai după înlăturarea deplină a tuturor substanțelor bioactive cu acțiune toxică masa de crește se scoate din aparatul Soxlet și se usucă în nișa cu ventilare până la dispariția mirosului de acetonă (4...5 ore). În aparatul Soxlet are loc prelucrarea materiei prime în mod continuu, ceea ce la etapa dată permite înlăturarea deplină a apei, grăsimilor și a substanțelor bioactive cu efect negativ, care pot contamina produsele finale, reducerea timpului de lucru și utilizarea unui volum mult mai mic de solvent decât în metodele cunoscute până în prezent. Spre deosebire de procedeul descris în cea mai apropiată soluție, unde pregătirea materiei prime pentru extragerea AH se efectuează numai prin spălare periodic repetată cu cantități mari de alcool și ser fiziologic, operațiile cu aparatul Soxlet sunt mult mai efective și mai ușor de realizat, ceea ce constituie și un avantaj al procedurii propuse.

După dispariția mirosului de acetonă, masa de crește se hidratează și în același timp din ea se extrage AH, lipsit de lipide, fosfolipide, lipoproteine, glicolipide, glicolipoproteine, nucleotide, enzime etc. (etapa 3). În calitate de extragent pentru AH s-a utilizat soluție apoasă de 1M NaCl. La masa obținută se adaugă soluție de 1M NaCl în raport de 1 : 20 (m/v) față de masa uscată și 2...3 picături de CHCl<sub>3</sub> în calitate de agent bactericid (antiseptic). Amestecul se lasă în frigider pentru 24 ore la temperatura de 4...10°C. Procesele de hidratare și extragere decurg concomitent. Prezența

## MD 3099 F1 2006.07.31

6

clorurii de sodiu în faza apoasă creează o forță ionică satisfăcătoare în mediul neutru, care facilitează eliminarea AH din țesut. Amestecul se filtrează. Filtratul se colectează, iar la masa de creste deja hidratată se adaugă o porție nouă de extragent și 2...3 picături de  $\text{CHCl}_3$ . Procedura se repetă analogic de trei ori. Rămășița după extragere se păstrează în stare congelată pentru prelucrarea ulterioară. Cele 5  
3 porții de extras cu conținut de AH se împreunează, se filtrează prin plasă de nailon, se centrifughează la 7000 rot./min timp de 20 min pentru înlăturarea impurităților și particulelor greu solubile. Soluția se răcește până la 4°C, se ajustează pH-ul la 5,0...5,5 cu soluție HCl 0,1 mol/l și se adaugă etanol de 96% rece în raport de 1 : 3. Sedimentul format se separă, se dizolvă în soluție de 1M NaCl, se încălzește 5...10 min până la temperatura de 70...80°C, apoi rapid se răcește până la 10  
18...20°C, se ajustează pH-ul la 5,0...5,5 cu soluție HCl 0,1M și se adaugă  $\text{CHCl}_3$  în raport de 1 : 1, se agită ușor cu agitator din sticlă într-o singură direcție. Peste 6...24 ore se separă faza apoasă superioară și se colectează, iar faza organică ( $\text{CHCl}_3$ ) și proteinele sedimentate la interfață se înlătură și se recuperează solventul. Procedura se repetă de 3...4 ori până când soluția apoasă rămâne transparentă sau puțin opalescentă (etapa 4). După ultima procedură de deproteinizare pH-ul soluției 15  
se ajustează cu soluție diluată de NaOH la 7,5...8,0 și acidul hialuronic se sedimentează din faza apoasă cu etanol de 96% rece în raport de 1 : 3 în formă de sare de sodiu (P1). Randamentul produsului obținut P1 constituie 0,5%. Partea de masă a proteinelor determinată prin metoda Lowry în produsul final nu depășește 1%. Soluția apoasă de 1% AH obținut prin procedeul propus reprezintă un lichid vâcos, greu eculent, străveziu sau puțin opalescent, fără culoare, fără miros. Viscositatea 20  
relativă a soluției de 0,1% AH măsurată cu viscosimetrul Ostwald la temperatura de 18°C a fost egală cu 12. Absorbția 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. (1 = 10 mm). Spectrul în IR al produsului obținut confirmă autenticitatea AH (fig. 2).

Acidul hialuronic obținut se păstrează în etanol de 96%, în flacoane închise ferite de lumină, la 25  
temperatura de 0...4°C.

Rămășița de la etapa 3 se dezgheață și se adaugă la ea soluție de 1M NaCl în raport volumetric de 1 : 3 și 2...3 picături de  $\text{CHCl}_3$ . Amestecul obținut se încălzește pe baie de apă la temperatura de 50...60°C timp de 3 ore (etapa 5). Apoi amestecul se filtrează prin plasă de nailon sterilizată. Filtratul se centrifughează la 7000 rot./min timp de 30 min. El este vâcos și se gelatinizează în frigider. La 30  
extractul obținut se adaugă acetonă în raport de 1 : 3 (v/v). Produsul sedimentat (P2) se separă, se spală cu acetonă și se usucă. Analiza produsului obținut P2 a fost efectuată după aceiași 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-au dizolvat 58 mg de produs P2 în 10 ml soluție. S-a constatat că produsul P2 conține 64,6% 35  
proteine cu compoziția prezentată în tabelul 2. Soluția de 1% a produsului P2 prezintă absorbție în domeniul ultraviolet la lungimea de undă 266,5 nm egală cu 0,609 un. (1 = 10 mm).

Procesul de extragere se realizează în 2 stadii. Prima extragere se efectuează la rece în trei reprize și permite obținerea AH cu un conținut scăzut de proteine, care poate fi utilizat atât în domeniul farmaceutic cât și în domeniile cosmetic și alimentară. 40

A doua extragere se realizează la temperatura de 50...60°C și permite obținerea unei cantități suplimentare de AH cu conținut de proteine. Deoarece preventiv se efectuează o extragere deplină a substanțelor bioactive cu efect negativ, produsul obținut (P2) reprezintă un complex al AH cu proteinele compoziția cărora a fost determinată. Acest produs poate fi utilizat în industria alimentară ca ingredient sau compus de bază în diverse suplimente alimentare și în industria cosmetică la 45  
prepararea cremelor, măștilor, șampoanelor, săpunului etc. Produsul P2 poate fi purificat suplimentar de proteine prin procedeul cunoscut.

### Exemplu

S-au colectat 160 g de creste de găini și cocoși proaspete, îndată după sacrificarea păsărilor sănătoase, s-au spălat 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 50  
efectuat în combina Moulinex Genius 2000. La masa mărunțită s-a adăugat acetonă, care conține 1%  $\text{CHCl}_3$  în raport de 1 : 3 și s-a lăsat în frigider la temperatura de 0...4°C (etapa 1). După 6 ore solventul s-a separat și s-a distilat, iar masa deshidratată parțial s-a introdus în aparatul Soxlet și s-a extras (degresat) cu acetonă timp de 2 ore (etapa 2). După degresare masa de creste s-a scos din aparatul Soxlet și s-a uscat în nișa cu ventilație până la dispariția mirosului de acetonă. După 55  
dispariția mirosului de acetonă masa substanței uscate a constituit 37 g.

În calitate de extragent pentru AH s-a utilizat soluția apoasă de 1M NaCl. La masa uscată obținută (37 g) s-au adăugat 750 cm<sup>3</sup> soluție de 1M NaCl și 2...3 picături de  $\text{CHCl}_3$ . Amestecul s-a lăsat în frigider pentru 24 ore la temperatura de 4...10°C, apoi s-a filtrat. Filtratul s-a colectat, iar la masa de 60  
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

## MD 3099 F1 2006.07.31

7

ulterioară. Cele 3 porții de extras s-au împreunat (în total 2 l), 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 5,0...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 cm<sup>3</sup> soluție de 1M 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 5,0...5,5 cu soluție HCl 0,1 M și s-a adăugat CHCl<sub>3</sub> în raport de 1 : 1, s-a agitat ușor cu agitator din sticlă într-o singură direcție, în pâlnia de decantare. Peste 24 ore s-a separat faza apoasă superioară și s-a colectat faza organică (CHCl<sub>3</sub>) și proteinele sedimentate la interfață s-au înlăturat, iar solventul s-a distilat. Procedura s-a repetat de 3...4 ori până când soluția apoasă a devenit transparentă sau puțin opalescentă (etapa 4). După ultima procedură de deproteinizare 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-au 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 al produsului obținut confirmă autenticitatea hialuronatului de sodiu (Fig.2). AH se obține din soluția apoasă a hialuronatului de sodiu la acidulare cu HCl.

Soluția apoasă de 1% AH obținut prin procedeul propus reprezintă un lichid vâscos, 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.

Absorbția 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-au adăugat la ea 700 cm<sup>3</sup> soluție de 1M NaCl și 2...3 picături de CHCl<sub>3</sub>. Amestecul obținut s-a încălzit pe baie 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 vâscos și s-a gelatinizat în frigider. La extractul obținut s-a adăugat acetona în raport de 1 : 3 (v/v). Produsul sedimentat (P2) s-a separat, s-a spălat cu acetona și s-a uscat. Analiza produsului obținut P2 a fost efectuată după aceiași 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-au dizolvat 58 mg de produs P2 în 10 ml soluție. S-a constatat că produsul P2 conține 64,7% proteine cu compoziția prezentată în tabelul 2. 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).

Tabelul 1

Caracteristica produselor obținute

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

Tabelul 2

40 Compoziția calitativă și cantitativă a aminoacizilor din produsul P2

	?M/100 mg	mg/100 mg	mM/g	azot in mg/100 mg
Acidul aspartic	24,9318	3,2935	0,2493	0,34904
Treonina	11,7768	1,4026	0,1178	0,16488
Serina	15,9810	1,6796	0,1598	0,22373
Acidul glutamic	52,2660	7,6883	0,5227	0,73172
Prolina	13,0443	1,5014	0,1304	0,18262
Glicina	261,0336	19,5958	2,6103	3,65447
Alanina	53,1720	4,7371	0,5317	0,74441
Valina	17,7482	2,0783	0,1775	0,24848
Cisteina	46,7801	5,6206	0,4678	1,30984
Metionina	26,2385	3,9148	0,2624	0,36734
Izoleucina	12,5406	1,6453	0,1254	0,17557
Leucina	19,3458	2,5382	0,1935	0,27084

## MD 3099 F1 2006.07.31

8

Tirozina	15,2280	2,7593	0,1523	0,21319
Fenilalanina	11,2201	1,8536	0,1122	0,15708
Lizina	15,0103	2,1944	0,1501	0,42029
Histidina	7,6302	1,1839	0,0763	0,32047
Triptofan	3,0765	0,6282	0,0308	0,08614
Arginina	1,7756	0,3093	0,0178	0,09943
Amoniac	7,5397	0,1284	0,0754	0,10556
Σ aminoacizilor	608,7993	64,6242	6,0880	9,71955
Σ ind.schimb.azot.	616,3389	64,7526	6,1634	9,82510

### 5 (57) Revendicare:

Procedeu de obținere a hialuronatului de sodiu, acidului hialuronic și complexului acid hialuronic-proteină care include spălarea creștelor de cocoși, găini cu apă la temperatura de 10...15°C timp de 5...6 ore, mărunțirea și deshidratarea lor în acetonă sau etanol de 96%, care conține 1% CHCl<sub>3</sub>, în raport de 1:3, după care se lasă pentru 6...24 ore la temperatura de 0...4°C, apoi solventul se separă și se efectuează deshidratarea suplimentară și degresarea cu acetonă în aparatul Soxhlet timp de 2 ore, sedimentul obținut se usucă și se supune extragerii cu soluție apoasă de 1M NaCl în două stadii: I stadiu la rece la 4...10°C și al II-lea stadiu la încălzire până la 50...60°C, totodată la I stadiu se efectuează extragerea în raport de 1:20 de trei ori, se separă reziduul de extract, după care se efectuează sedimentarea acidului hialuronic din extract cu etanol de 96% în raport de 1:3, sedimentul se redizolvă și se elimină proteinele din el la încălzire și răcire la pH 5,0...5,5, se adaugă CHCl<sub>3</sub> în raport de 1:1, se separă faza apoasă, se tratează cu etanol de 96% în raport de 1:3, se separă sedimentul format de hialuronat de sodiu cu un conținut de proteină de cel mult 1%, iar acidul hialuronic se obține la acidularea cu HCl a soluției apoase de hialuronat de sodiu; la al II-lea stadiu reziduul obținut la I stadiu se extrage în raport de 1:3, apoi se sedimentează cu acetonă obținând un complex acid hialuronic-proteină cu un conținut de proteină de 65%.

25

### (56) Referințe bibliografice:

1. US 4141973 1979.02.27
2. RU 2055079 C1 1996.02.27
3. RU 2074196 C1 1997.02.27
4. RU 2115662 C1 1998.07.20
5. MD 1617 G2 2001.02.28

**Șef Secție:**

GUȘAN Ala

**Examinator:**

EGOROVA Tamara

**Redactor:**

CANȚER Svetlana

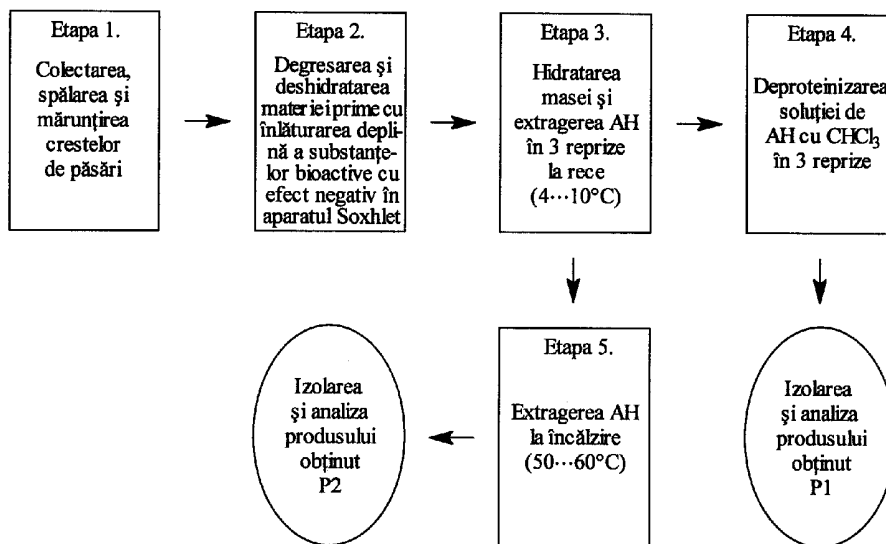


Fig. 1

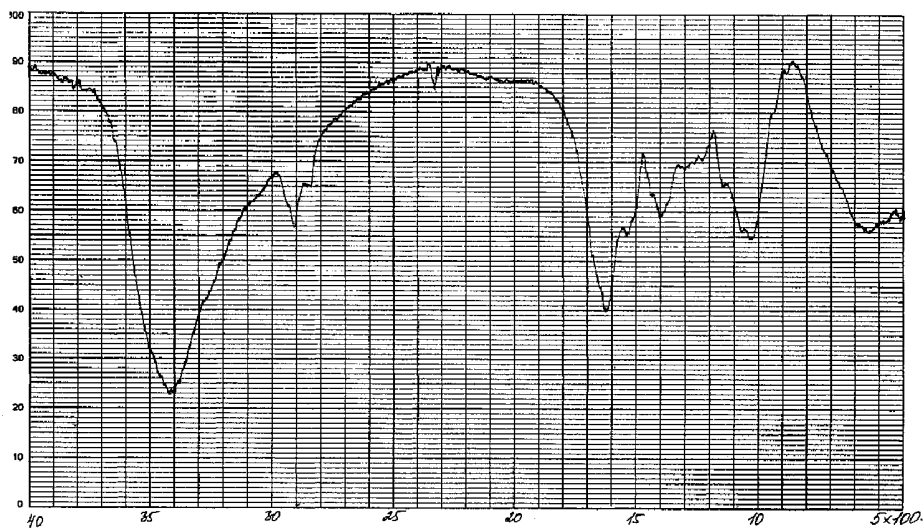


Fig. 2

## RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2005 0349		
(22) Data depozit: 2005.11.29		
(51) : <b>Int.Cl: C08B 37/08</b> (2006.01) Alți indici de clasificare:		
<b>Titlul</b> : Procedeu de obținere a hialuronatului de sodiu, acidului hialuronic și complexului acid hialuronic-proteină		
(71) Solicitantul : UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI, MD		
Termeni caracteristici : hialuronatului de sodiu, acidului hialuronic гиалуронат натрия, гиалуронобаякислота		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.		
MD baza de date 1994-2005 EA buletine oficial 1995-2005 SU colecția de certificate de autor, inclusiv și colecția „nepublică”)		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	1. US 4141973 1979.02.27	1
A	2. RU 2055079 C1 1996.02.27	1
A	3. RU 2074196 C1 1997.02.27	1
A	4. RU 2115662 C1 1998.07.20	1
A	5. MD 1617 G2 2001.02.28	1
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
<b>* categoriile speciale ale documentelor consultate:</b>		<b>P</b> - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
<b>A</b> - document care definește stadiul anterior general		<b>T</b> - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria care conține baza invenției
<b>E</b> - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		<b>X</b> - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
<b>L</b> - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres ( se va indica motivul)		<b>Y</b> - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
<b>O</b> - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		<b>&amp;</b> - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2006.05.29
Examinatorul		EGOROVA Tamara