

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO DEL HUMOR VÍTREO DE *Oreochromis niloticus*

OPTIMIZATION OF THE HYALURONIC ACID EXTRACTION METHOD OF THE VITREOUS HUMOR OF *Oreochromis niloticus*

Pérez-Gumeta, B.D.¹, Meza-Gordillo, R.^{1*}, Ventura-Canseco, L.M.C.¹, Enciso-Sáenz, S.¹, Abud-Archila, M.¹, Villalobos-Maldonado, J.J.¹, Cruz-Rodríguez, R.I.¹, Ayora-Talavera, T.R.²

¹Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. Carretera Panamericana km 1080, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

²Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología Del Estado de Jalisco, Unidad Mérida. Parque Científico Tecnológico de Yucatán, KM 5.5 Sierra Papacal-Chuburná Puerto, CP 97302, Mérida, Yucatán.

*Autor para correspondencia: rociomezagordillo@gmail.com

RESUMEN

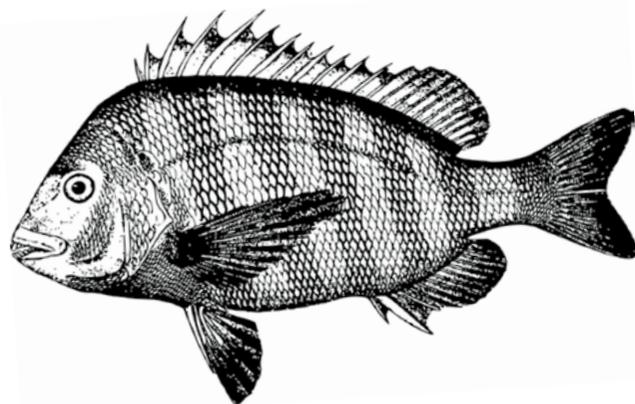
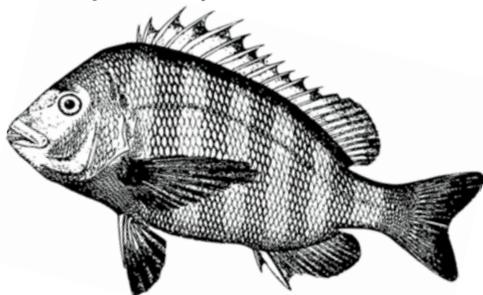
El ácido hialurónico es un polímero con propiedades viscoelásticas e hidrofílicas de gran importancia principalmente en la industria farmacéutica. En el presente proyecto se realizaron extracciones de ácido hialurónico (AH) evaluando dos diferentes métodos, químico y enzimático empleando humor vítreo de residuos acuícolas como material biológico. Con base en el análisis de varianza simple existe diferencia estadísticamente entre los métodos de extracción, siendo el método enzimático el de mayor rendimiento ($8 \times 10^{-3} \pm 4.62 \times 10^{-4} \%$), mientras que en el método químico la concentración fue de $2.2 \times 10^{-3} \pm 5.77 \times 10^{-5} \%$.

Palabras clave: Ácido hialurónico, extracción, *Oreochromis niloticus*, residuos acuícolas.

ABSTRACT

Hyaluronic acid is a polymer with viscoelastic and hydrophilic properties of which makes it of great importance mainly in the pharmaceutical industry. In this project were evaluated two different methods of extractions, chemical and enzymatic using vitreous humor of *Oreochromis niloticus* as a biological material waste. Based on the analysis of simple variance ANOVA confirms that there is statistically significant difference between extraction methods, being the enzymatic method of higher performance ($8 \times 10^{-3} \pm 4.62 \times 10^{-4} \%$), while with chemical method the concentration was $2.2 \times 10^{-3} \pm 5.77 \times 10^{-5} \%$.

Key words: Hyaluronic acid, extraction, *Oreochromis niloticus*, fishing residues.



Agroproductividad: Vol. 11, Núm. 6, junio. 2018. pp: 128-134.

Recibido: enero, 2018. **Aceptado:** mayo, 2018.

INTRODUCCIÓN

El ácido hialurónico (AH) pertenece al grupo de los glucosaminoglucanos que son polisacáridos lineales, formados por un amino azúcar y un ácido urónico o galactosa (Kogan *et al.*, 2007), como lo son el dermatán sulfato, condroitina 4-sulfato y condroitina 6-sulfato (Kakehi *et al.*, 2003), siendo el AH el más simple en estructura, así también el único no asociado covalentemente con un núcleo proteico, además de que es sintetizado en la matriz extracelular del tejido conectivo al contrario de los demás glucosaminoglucanos que son sintetizados en el aparato de Golgi. Debido a su alta masa molar y a sus propiedades reológicas tiene un papel fisiológico importante en los organismos vivos, así como en diversas aplicaciones médicas. El AH puede retener agua en el tejido y con ello cambiar el volumen dérmico y compresibilidad, sirve, además, como un lubricante y amortiguador en las articulaciones (Meyer, 1947), también funge como eliminador de radicales libres generados por los rayos ultravioleta de la luz solar (Kogan *et al.*, 2007). En los últimos años, las investigaciones científicas han tenido un amplio enfoque en la búsqueda de fuentes biológicas para la obtención de AH, esto se debe a la alta demanda de este polisacárido en medicina, la industria farmacéutica y cosmética. Se han reportado diversas fuentes biológicas entre las que destacan el obtenido de crestas de gallo (Sim *et al.*, 1994), humor vítreo bovino (Gherezghiher *et al.*, 1987), líquido sinovial vacuno (Cullis-Hill, 1989), cordón umbilical humano (Lago *et al.*, 2005), ojos de pez espada y tiburón (Vázquez *et al.*, 2012), moluscos (Arumugam *et al.*, 2016) y fermentaciones (Myoung, 1996). Dentro

de las fuentes biológicas que tienen mayores concentraciones de AH se encuentran las crestas de gallo con un rendimiento de 0.8 a 4.5% p/p, así también el líquido sinovial bovino con rendimiento de 1.5 a 4% p/p, mientras que las demás fuentes de obtención de este carbohidrato tienen rendimientos por debajo de 0.53% p/p, siendo los métodos químico y enzimático los reportados para su extracción. De acuerdo con la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2012), la producción mundial cosechada de pescado fue de 158 millones de toneladas. Aproximadamente el 86% de esta producción se utiliza para consumo humano directo, el 14% restante se destina a productos alimentarios, en particular la fabricación de harina y aceite. Se calcula que el volumen de residuos producidos por las plantas de procesamiento es de 50%. Con base en esto, se observa un área de oportunidad para su uso en la obtención de moléculas de alto interés comercial como el AH, con la finalidad de proporcionar valor agregado a dichos subproductos que no cuentan con una disposición final adecuada y que son vertidos directamente al mar o a rellenos sanitarios, ocasionando problemas de contaminación. Con base en los reportes de estas fuentes biológicas, se infiere que podemos obtener AH del humor vítreo de cualquier especie. Es por ello que en el presente trabajo se utilizaron cabezas de tilapia (*Oreochromis niloticus*) como materia prima, aprovechando este material biológico que no tiene utilidad después del proceso de fileteado de pescado. Aunque existe metodología descrita donde se evalúan los métodos de extracción químico y enzimático, no hay reportes de estudios de optimización de las condiciones de extracción de AH a partir

de *Oreochromis niloticus*. Por lo anterior, en este proyecto se evaluó el efecto del método de extracción sobre el rendimiento de AH, con el fin de optimizar las condiciones de extracción del método que genere mayor rendimiento, confirmándose la presencia y el peso molecular del AH obtenido bajo las condiciones óptimas, mediante espectroscopia de infrarrojo, ultravioleta y electroforesis de agarosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron cabezas de tilapia (*Oreochromis niloticus*) recolectadas en los expendios de pescado del mercado local de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Las cabezas fueron lavadas y pesadas en una balanza granataria (Ohaus, USA), posteriormente se retiraron los ojos de manera manual y se procedió a retirar el humor vítreo con la ayuda de un bisturí, se adicionó nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Los análisis proximales realizados al humor vítreo fueron humedad (AOAC, 1990, 934.01), grasas por método Soxhlet (AOAC 1990, 991.36), proteínas por el método Kjeldahl (AOAC 1990, 954.01), y azúcares totales por el método fenol-sulfúrico (Dubois, 1956).

Extracción química

Para realizar la extracción química de AH se siguió la metodología empleada por Lago (2005), para lo que se pesaron 20 g de humor vítreo, se adicionaron 80 mL de NaCl al 0.2% y se dejó reposar durante 15 minutos, se centrifugó (Eppendorf, modelo 5810R) a 4 000 rpm por 20 min a una temperatura de 25°C . El sobrenadante fue tratado con 6 mL de bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB) al 1% dejando reposar por 15 min, y se centrifugó 20 min a 4000 rpm y 25°C . Al precipitado se

le agregaron 2.1 mL de CaCl 0.9 M y 1.23 mL de etanol acuoso, después se centrifugó a 4000 rpm por 20 min, el sobrenadante se lavó con 0.6 mL de cloroformo durante cuatro veces en un embudo de separación. Al volumen resultante se le agregó 5.1 mL de etanol y 5.1 mL de acetona. Se dejó reposar 12 h, después se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min, se recuperó el precipitado de cada tratamiento y se dejó secar en tubos Falcon de 50 mL durante una semana en una campana de extracción a temperatura ambiente, finalmente el extracto fue almacenado en refrigeración a 4 °C.

Extracción enzimática

Se tomaron 28 g de humor vítreo, se desengrasó con acetona 1:0.25 (g mL⁻¹) y se secó a 60 °C durante 6 h, posteriormente se solubilizó (1:100, g mL⁻¹) en acetato de sodio 100 mM, pH 5.5, EDTA 5 mM y cisteína 5 mM. Se añadieron 100 mg de papaína por gramo de humor vítreo seco, se incubó 24 h a 60 °C a 100 rpm. Posteriormente se puso a ebullición durante 10 min, centrifugó a 4000 rpm durante 15 min y se añadieron tres volúmenes de etanol saturado con acetato de sodio con respecto al sobrenadante y se almacenó a 4 °C durante 24 h. El precipitado fue recuperado por centrifugación a 4000 rpm durante 15 min, y secado a 60 °C durante 6 h (Volpi *et al.*, 2005), el extracto fue mantenido en tubos Falcon y refrigerado a 4 °C.

Caracterización de ácido hialurónico: Identificación del ácido hialurónico por electroforesis en gel de agarosa

El gel de agarosa se preparó a una concentración de 0.5% en 0.04 M de acetato de bario y pH 5.8 (Volpi, 2003). La electroforesis se realizó con una solución 0.05 M de 1,2-diaminopropano (a pH 9 con CH₃COOH) en 150 min a 50 mA. Después de la migración, el gel fue sumergido en solución de CTAB al 0.1% durante 6 h, posteriormente el gel fue retirado de la solución y teñido con stains-all. Pasado el tiempo de tinción, las muestras en el gel presentaron una coloración azul. Para la identificación del AH en el extracto obtenido por el método químico y enzimático, se utilizó un estándar de AH con peso molecular de 8-15 kDa. Para determinar el peso molecular de los extractos se empleó un marcador de AH (Hyalose LLC Inc.). Los pesos de este marcador se encuentran en un intervalo de 25 a 500 kDa. Todos los reactivos y estándares utilizados fueron marca Sigma Aldrich.

Espectroscopía de Infrarrojo

Los extractos sólidos (químico y enzimático) fueron sometidos a espectroscopía de infrarrojo en el equipo Nicolet IR 6000 marca Thermo Scientific, para determinar la presencia de los grupos amino, carboxilo e hidroxilo presentes en la estructura del AH. La transmitancia fue leída entre 500 y 4000 cm⁻¹ (Kanchana *et al.*, 2013).

Diseño experimental

Para la realización del diseño experimental, primeramente, se evaluaron los métodos de extracción, y mediante el análisis de varianza simple se determinó que el método enzimático generó el mayor rendimiento de AH, es por ello que se propuso el diseño central compuesto 2²+Estrella en el que se evaluaron dos factores y dos niveles (Concentración de enzima: 80, 120 mg enzima mg⁻¹ muestra; y tiempo de incubación: 12 y 24 h). Con este diseño experimental se generaron 10 bioensayos con tres repeticiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis proximal

De acuerdo a lo reportado, el componente principal del humor vítreo es el agua, seguido de grasas, proteínas y carbohidratos (Cuadro 1). Aunque actualmente no se tienen reportes de análisis proximales de humor vítreo de tilapia, estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos de otras especies.

Autores como Theocharis *et al.* (2002), estudiaron el humor vítreo de cerdo (*Sus scrofa domesticus*) teniendo como resultado la siguiente composición: 90±4.0 µg mL⁻¹ de ácido úrico, 120±6.0 µg mL⁻¹ de hexosaminas totales, 80±5.0 µg mL⁻¹ de hexosas totales, 22±1.5 µg mL⁻¹ de ácido siálico, 700±29 µg mL⁻¹ de proteínas totales y 150±8.0 µg mL⁻¹ de colágeno. Pavona *et al.* (2008), caracterizaron la composición del humor vítreo de *Rana temporaria* L. reportando 1.6-1.9 g L⁻¹ de proteína total, 0.5 g L⁻¹ de albúmina, 3-8 µmol L⁻¹ de ácido úrico, 0.33-0.48 unidades relativas de colágeno, así como una máxima absorbancia de 0.318 y una longitud

Cuadro 1. Cuantificación de humedad, grasas, proteínas, carbohidratos totales del humor vítreo de tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Determinación	Concentración (%)	Desv. Std.	Referencia
Humedad	98.28	±0.29	AOAC 1990, 934.01
Grasas	1.02	±0.06	AOAC 1990, 991.36
Proteínas	0.66	±0.08	AOAC 1990, 954.01
Carbohidratos totales	5.2×10 ⁻³	±0.0002	Dubois, 1956

de onda de máxima absorbancia de 268 nm. El contenido y concentración de los componentes del humor vítreo presentan variaciones dependiendo de la especie, aunque como característica común, los carbohidratos son las biomoléculas presentes en menor proporción.

Rendimiento de extracción de AH a partir del método químico y enzimático

El análisis estadístico mostró diferencia significativa entre tratamientos, siendo el enzimático el más eficiente ($8 \times 10^{-3} \%$), en comparación con el método químico ($2.2 \times 10^{-3} \%$) (Figura 1).

La diferencia observada en los métodos de extracción, se debe a que los mecanismos difieren en la molécula objetivo, es decir, mientras que en el método enzimático se utiliza a la papaína para hidrolizar a las proteínas (principalmente colágeno), que interaccionan con el AH presente en el humor vítreo para así liberarlo; en el método químico se utilizan reactivos que interaccionan directamente con la estructura del AH, generando rompimiento de sus enlaces, afectando el rendimiento de extracción. De manera detallada, en el método químico, los cationes presentes en las moléculas iónicas del NaCl, CaCl₂ y el CTAB solvatan a los átomos de oxígeno presentes en los enlaces glucosídicos β 1-4 entre el ácido glucurónico y la N-acetilglucosamina, debilitando el enlace y produciendo su rompimiento. El método químico modifica la estructura del AH, lo que genera menor rendimiento (Lago *et al.*, 2007).

Con relación a la cantidad de AH extraído, se puede mencionar que es similar a lo reportado en la literatu-

ra, ya que Gherezghiher *et al.* (1987), extrajo AH a partir de bovino por el método químico con un rendimiento de $3 \times 10^{-1} \%$ al igual que lo reportado por Vázquez *et al.* (2012) mediante el mismo método a partir de humor vítreo de tiburón y de humor vítreo de pez espada, obteniendo $5.5 \times 10^{-3} \%$ y $3 \times 10^{-1} \%$, respectivamente.

Optimización del método enzimático

Se optimizaron las condiciones del método enzimático con el diseño central compuesto 2^2 +estrella con los factores y niveles descritos en la metodología. Posterior al análisis de datos se obtuvo el diagrama de Pareto estandarizado con el que se determina la magnitud y la importancia de un efecto. En este caso como se observa en la Figura 2, todos los factores e interacciones fueron influyentes en la variable de respuesta (rendimiento %), excepto el factor tiempo de incubación. Adicionalmente, el factor concentración de la enzima (mg de enzima g⁻¹ de muestra) tiene un efecto positivo sobre la variable dependiente, es decir que un incremento de esta variable provoca un aumento en el rendimiento, siendo este efecto el de mayor importancia.

La ecuación de regresión obtenida fue la siguiente: Rendimiento = $-0.000667368 + 0.0000110532$ *Concentración de enzima (mg de enzima g⁻¹ de muestra) + 0.0000227184 *Tiempo de incubación(h) - $3.93885E-8$ *Concentración de enzima (mg de enzima g⁻¹ de muestra)² - $1.62993E-7$ *Concentración de enzima (mg de enzima g⁻¹ de muestra) *Tiempo de incubación(h) - $1.87089E-7$ *Tiempo de incubación(h)², la cual permitió trazar un gráfico de superficie de respuesta (Figura 3), a partir del cual se obtuvo una res-

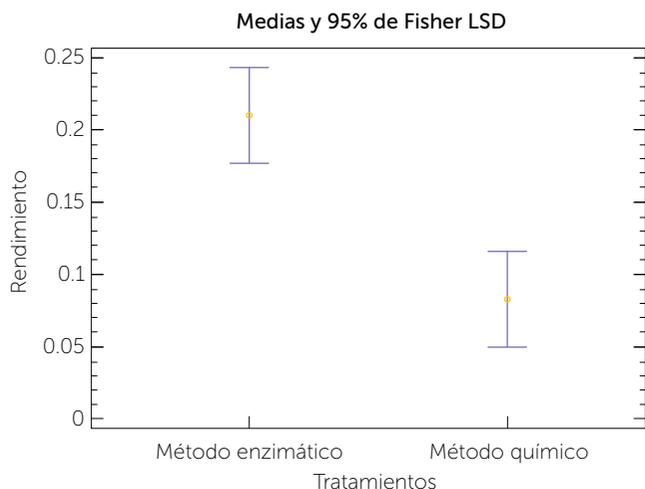


Figura 1. Análisis de varianza ANOVA simple del contenido de AH presente en los extractos químico y enzimático (nivel de confianza del 95%).

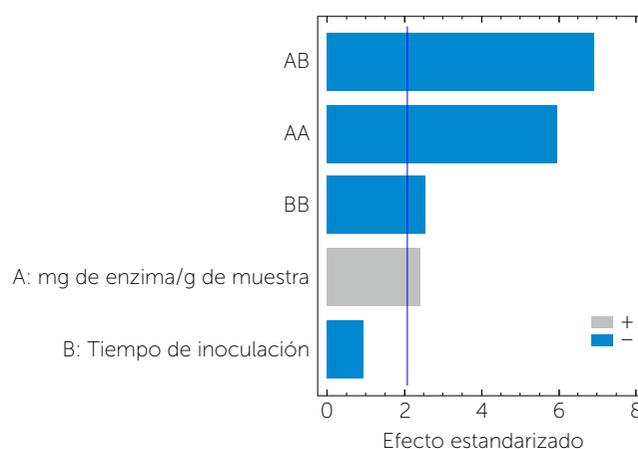


Figura 2. Diagrama de Pareto estandarizada para rendimiento, factores, sus interacciones y efectos, efecto positivo (+), efecto negativo (-).

puesta equivalente a las condiciones óptimas para lograr la máxima respuesta (Cuadro 2).

Caracterización de ácido hialurónico: Barrido espectral UV-VIS

Posterior a la extracción química, enzimática, y a la optimización, se realizó la caracterización mediante espectroscopia de UV-VIS, IR, y electroforesis en gel de agarosa. Al realizar el barrido espectral de UV-VIS de 190 a 1100 nm, se observó una longitud de onda de máxima absorbancia de 213 nm para el estándar, 237 nm para el extracto químico, 257 nm para el extracto enzimático y 205 nm para el obtenido por la optimización. Esta banda se debe a la transición electrónica $n \rightarrow \pi^*$ del grupo carbonilo presente en el ácido glucurónico y a la transición $n \rightarrow \sigma^*$ de los heteroátomos (O y N) presentes en la estructura del AH (Figura 4).

Espectroscopia de Infrarrojo

En el espectro de infrarrojo se observaron las bandas correspondientes a la vibración de tensión del enlace N-H de amino, con desplazamiento de 3100 cm^{-1} ; la banda correspondiente al enlace O-H del anillo, presente en 3500 cm^{-1} ; las bandas correspondientes a los enlaces $\text{Csp}_3\text{-H}$ de los ciclos de los carbohidratos presentes en 2960 cm^{-1} y la señal en 1540 y 1400 cm^{-1} correspondiente a enlaces $\text{Csp}_3\text{-Csp}_3$. La banda de 1700 cm^{-1} corresponde al grupo carbonilo del ácido glucurónico, confirmando su presencia, así como el enlace C-N en 1090 cm^{-1} , lo cual confirma la presencia de glucosaminoglucanos, familia a la que pertenece el AH. Aunque se observan las señales de los hidrógenos que confirman la presencia del AH en el extracto, se observan también otras señales que no corresponden a esta estructura, que posiblemente sean de

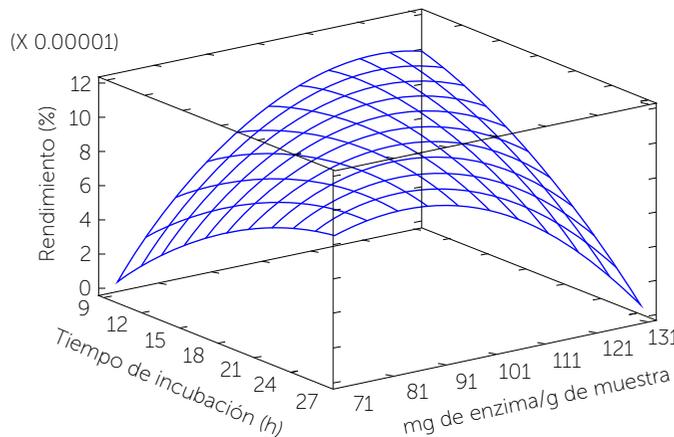


Figura 3. Superficie de respuesta estimada para el rendimiento (%).

Cuadro 2. Optimización de la respuesta en función de los niveles máximos y mínimos de los factores experimentales.

Factor	Nivel bajo	Nivel alto	Óptimo
Concentración de enzima (mg de enzima g^{-1} de muestra)	72	128	120
Tiempo de inoculación (h)	9.5	26	9.5

el gel se confirma presencia de AH dado que este carbohidrato se enlaza electrostáticamente con el stains-all dando coloración azul las bandas correspondientes al hialuronano.

naturaleza proteica, coincidiendo con el barrido espectral de UV-VIS, por lo que es recomendable la purificación de AH.

Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para confirmar presencia de AH empleando stains-all, el gel obtenido se presenta en la Figura 5. Con

Volpi *et al.* (2003) confirmaron presencia de AH con electroforesis en gel de agarosa de muestras extraídas de mejillones (*Mytilidae*), Sadhasivam *et*

al. (2013) confirmaron presencia de AH y otros GAG's en muestras extraídas de raya jaspeada (*Aetobatus narinari*), teniendo como resultado un gel con bandas de distintas tonalidades. Con lo que se pudo corroborar que las bandas de AH únicamente fueron teñidas con stains-all. El peso molecular del estándar utilizado fue de 8 a 15 kDa, por lo que se puede inferir que el peso molecular de los extractos crudos de AH obtenido por del método enzimático y químico, podrían estar en ese rango. Para confirmar el peso molecular del AH presente en los extractos químico y enzimático, además del obtenido con los parámetros óptimos se realizó una electroforesis en gel de agarosa utilizando el estándar de pesos moleculares de AH (Hyalose LLC Inc.). En el

gel (Figura 6) se aprecian las bandas del marcador molecular (MM) observándose de mayor a menor peso molecular de arriba hacia abajo (509 kDa, 321 kDa, 214-30 kDa), y de las muestras extraídas (O1, O2). Teniendo en cuenta los pesos moleculares y el número de bandas, se determi-

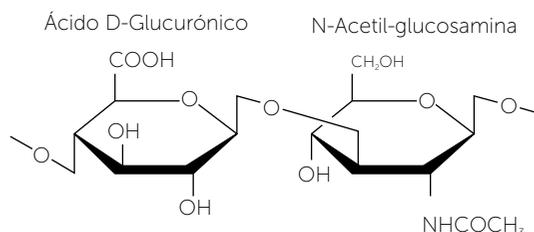


Figura 4. Estructura de ácido hialurónico y el enlace de unión entre el ácido D-glucurónico y la N-acetil-glucosamina (Kakehi *et al.*, 2003)

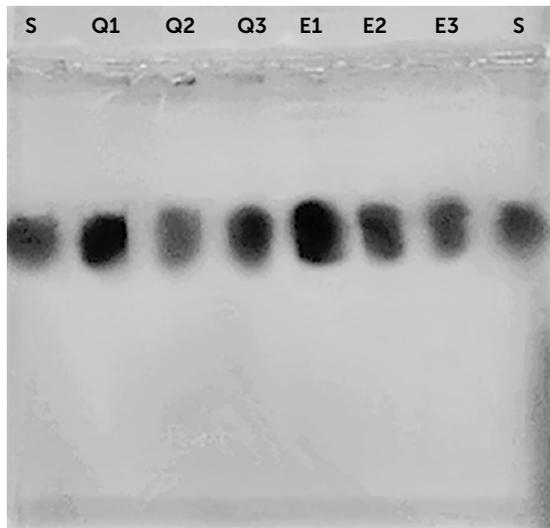


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa. Muestras extraídas con el método químico (Q1, Q2, Q3) y el método enzimático (E1, E2, E3), estándar (S).

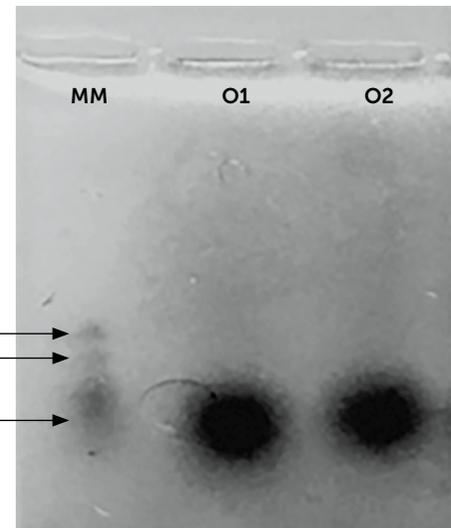


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa, marcador molecular de AH (MM), y extractos obtenidos bajo las condiciones óptimas (O).

na que el peso molecular de los extractos oscila entre 214-30 kDa.

Solamente existen dos reportes de extracción de AH proveniente de especies marinas donde indica el peso molecular del polímero (Vázquez *et al.*, 2012). El proveniente de tiburón (*Carcharodon* L.) tuvo un peso molecular de 2,000 kDa y el de pez espada (*Xiphias gladius* L.) fue de 1,600 kDa; aunque estos pesos moleculares son mayores a los obtenidos en este estudio, con base en los antecedentes analizados, se infiere que el peso molecular de AH estará definido por la especie. Es importante hacer notar que el AH de menor peso molecular, puede ser utilizado para aplicaciones dérmicas en donde se requieren moléculas pequeñas que sean capaces de ser absorbidas por la dermis. Con el análisis de varianza simple se demuestra que existe diferencia estadísticamente significativa entre los métodos de extracción químico y enzimático, dado que, en el método químico, las sales interactúan directamente con el ácido hialurónico se obtiene menor rendimiento, mientras que, en el método enzimático, las enzimas interactúan con las proteínas presentes, siendo este el que proporciona mayor rendimiento.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron las condiciones óptimas (concentración de enzima: 120 mg de enzima g⁻¹ de muestra y un tiempo de incubación de 9 ½ h) para la extracción de ácido hialurónico por el método enzimático.

co a partir de humor vítreo de *Oreochromis niloticus*. Se confirmó la presencia de ácido hialurónico en el humor vítreo de *Oreochromis niloticus* extraído bajo las condiciones óptimas, y su peso molecular oscila entre 30-214 kDa.

LITERATURA CITADA

- Arumugam M., Mohan K., Abirami P., Kanchana S. 2016. Isolation and characterization of molluscan glycosaminoglycans from Pazhayar, South-East coast of India. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(2), 100-105.
- Cullis-Hill. 1989. Patente nº US 4879375 A. Europa.
- FAO.2012. www.fao.org/3/a-i2727s.pdf.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and related substances. *Nature*, 167.
- Gherezghiher T., Koss M.C., Nordquist R.E., Wilkinson C. P. 1987. Analysis of vitreous and aqueous levels of hyaluronic acid: application of high-performance liquid chromatography. *Experimental Eye Research*, 347-349.
- Kakehi K., Kinoshita M., Yasueda S. 2003. Hyaluronic acid: separation and biological implications. *Journal of chromatography B*, 347-355.
- Kanchana S., Arumugam M., Giji S., Balasubramanian T. 2013. Isolation, characterization and antioxidant activity of hyaluronic acid from marine bivalve mollusc *Amussium pleuronectus* (Linnaeus, 1758). *Bioactive Carbohydrate Dietary Fibre*, 1-7.
- Kogan G., Soltés L., Stern R., Gemeiner P. 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range. *Biotechnology Letters*, 17-25.
- Lago G., Oruña L., Cremata J. A., Pérez C., Coto G., Lauza E., Kennedy J. F. 2005. Isolation, purification and characterization of hyaluronan. *Carbohydrate Polymers*, 321-326.
- Meyer K., Palmer J.W. 1934. The Polysaccharide of the vitreous humor. *Biological Chemistry*, 629-634.

- Myoung G.P.J. 1996. Patente nº 5 496 726. Rep. of Korea.
- Naumann H.N. 1959. Postmortem chemistries of human vitreous body in man. Arch Ophthalmol, 356-363.
- Nordmann J., Brini A., Bronner A., Gerhard J. 1968. Biologie et chirurgie du corps vitré. Chimie, 95-167.
- Pavona I., Sharova N., Dmitrieva S., Levin P., Tatikolov A. 2008. Characterization of the composition of the aqueous humor and the vitreous body of eye of the frog *Rana temporaria* L. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 676-681.
- Sadhasivam G., Arumugam M., Abirami P., Balasubramanian T. 2013. Isolation and characterization of hyaluronic acid from the liver of marine stingray *Aetobatus narinari*. International Journal of Biological Macromolecules, 54, 84– 89.
- Sim J. S., Nakano T., Nakano K. 1994. A simple rapid method to estimate hyaluronic acid concentrations in rooster comb and wattle using cellulose acetate electrophoresis. Agric. Food Chem., 42, 2766-2768.
- Theocharis D., Noulas A., Theocharis A., Feretis E., Papageorgakopoulou N., Karamanos N. 2002. Pig vitreous gel: Macromolecular composition with particular reference to hyaluronan-binding proteoglycans. Biochimie, 295-302.
- Vázquez J.A., Murado M.A., Montemayor M.I., González M.P. 2012. Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. Food and Bioproducts Processing, 491-489.
- Volpi N., Maccari F. 2003. Purification and characterization of hyaluronic acid from the mollusc bivalve *Mytilus galloprovincialis*. Biochimie, 619-625.
- Volpi N., Maccari F., Titze J. 2005. Simultaneous detection of submicrogram quantities of hyaluronic acid and dermatan sulfate on agarose-gel by sequential staining with toluidine blue and stain-All. Chromatography B, 131-135.

