



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

SABRINA ALVES DE OLIVEIRA

**ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO  
DA CRISTA DE FRANGO E INCORPORAÇÃO EM  
MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA**

SABRINA ALVES DE OLIVEIRA

**ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO  
DA CRISTA DE FRANGO E INCORPORAÇÃO EM  
MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer.  
Coorientador: Prof. Dr. Renato M. R. Viana.

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Oliveira, Sabrina Alves de.

Isolamento e purificação de ácido hialurônico da crista de frango e incorporação em membranas de celulose bacteriana / Sabrina Alves de Oliveira. - Londrina, 2017.  
100 f. : il.

Orientador: Cesar Augusto Tischer.

Coorientador: Renato Marcio Ribeiro Viana.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Ácido hialurônico - Tese. 2. Celulose bacteriana - Tese. 3. Crista de frango - Tese. 4. Compósitos poliméricos - Tese. I. Tischer, Cesar Augusto. II. Ribeiro Viana, Renato Marcio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

SABRINA ALVES DE OLIVEIRA

**ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO DA  
CRISTA DE FRANGO E INCORPORAÇÃO EM MEMBRANAS DE  
CELULOSE BACTERIANA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Izabel Cristina Riegel Vidotti Miyata  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

---

Prof. Dr<sup>o</sup>. Admilton G. de Oliveira Junior  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de Abril de 2017.

*Dedico esse trabalho a minha mãe, que infelizmente não pode presenciar a concretização de mais um sonho, mas que sempre me deu apoio e me mostrou que não deveria desistir de alcançar meus objetivos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e as agências de fomentos CAPES, CNPq e Fundação Araucárias pela oportunidade de realizar esta pesquisa e pelo amparo financeiro.

Ao Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer por aceitar ser meu orientador durante o mestrado, pelas oportunidades de aprendizado que me foi concedido, pelos conhecimentos transmitidos, pelos conselhos profissionais, pelas idéias inovadoras, mas sobretudo pela sua amizade e pelo incentivo para o desenvolvimento dessa formação.

Ao Renato Marcio Ribeiro Viana pela prontidão em auxiliar nas dúvidas que iam surgindo durante a pesquisa, pelas vezes que me ajudou no laboratório, pelo incentivo e pela amizade que fizemos durante esse período.

A Paula C. S. Tischer pela paciência em me auxiliar nas dúvidas, pelo tempo que se dedicou as análises de AFM e SEM, pelas palavras de incentivo e amizade e por ter aceitado ser banca deste trabalho.

A Prof. Dr<sup>a</sup>. Izabel Riegel Vidotti por ter realizado a análise de HPSEC e TGA e pela atenção prestada nos momentos que precisamos.

Ao meu pai (Roberto), meus irmãos (Junior e Gabriel), minha tia (Maria Julia), meu tio (Djalma) e meu namorado (Guilherme) que esteve comigo em todos os momentos em que precisei, me apoiando e incentivando para que não desistisse desse sonho. A vocês todo meu amor e gratidão.

Ao grupo de pesquisa de Gliconjugados que em muitas vezes colaboraram no desenvolvimento das análises experimentais dessa pesquisa, pela companhia no laboratório e pelas longas conversas durante esse período.

Aos colaboradores do departamento de Biotecnologia e Bioquímica por ter me auxiliado em todos os momentos que precisei.

Aos professores do departamento de Biotecnologia e Bioquímica pelas aulas ministradas e pelos conhecimentos transmitidos.

Gostaria de agradecer também algumas pessoas especiais que foram muito importantes durante esse período, Monica, Nicole, Karina, Andressa, Melissa, Dani, Amanda, Kamila, Ana Camila, e Hanny, pela amizade construída no decorrer desses dois anos, pelos momentos de descontrações, pelos incentivos, pelas longas

conversas e pelas ajudas nas disciplinas.

Enfim, gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos meus amigos que torceram e colaboraram para o meu sucesso e concretização deste trabalho.

OLIVEIRA, Sabrina Alves de. **Isolamento e purificação de ácido hialurônico da crista de frango e incorporação em membranas de celulose bacteriana**. 2017. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

O ácido hialurônico (HA) é um polissacarídeo constitutivo com unidades repetidas de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina que pode ser encontrado na matriz extracelular de vertebrados e possui aplicação na engenharia de tecidos ou como suporte para a regeneração e cicatrização de feridas. Este composto pode ser extraído da crista de frango utilizando diferentes métodos. A celulose bacteriana (BC), produzida pela *Gluconacetobacter hansenii*, é um biofilme de alto grau de cristalinidade que tem sido utilizado para fins terapêuticos como membrana cicatrizante. Visando a produção de compósitos poliméricos com HA para aplicações diversas na área da saúde, este trabalho teve como objetivo extrair o HA de cristas de frango e incorporá-lo durante a processo de fermentação da celulose bacteriana com intuito de trazer as propriedades intrínsecas de cicatrização do HA para celulose bacteriana. Neste estudo, para o isolamento do HA primeiramente foram realizados testes preliminares com intuito de estabelecer as melhores condições para definir a metodologia de isolamento de HA da crista de frango. A metodologia definida envolveu etapas de digestão proteolítica e lipídica, extração com resina aniônica, tratamento com sais baseado no efeito salting-out, precipitação com etanol e secagem. Para a caracterização do material isolado foram realizadas as técnicas de espectroscopia de RMN e no infravermelho, termogravimetria e cromatografia de exclusão por tamanho para determinação da massa molar e homogeneidade. Os compósitos poliméricos foram produzidas na presença de ácido hialurônico isolado da crista de frango em diferentes tempos de fermentação, especificamente no primeiro e no terceiro dia de fermentação. As membranas nativas e compósitos poliméricos foram caracterizadas em relação à sua estrutura, morfologia e cristalinidade. O processo de isolamento e purificação resultou na obtenção de um HA de baixa massa molar com características estruturais semelhantes ao material comercial padrão. Os resultados demonstraram que as membranas de fato incorporaram o HA. As membranas produzidas no terceiro dia apresentaram melhor incorporação de HA-SAB entre a nanofibra de celulose, resultando em membranas com maior estabilidade térmica, maior rugosidade e menor cristalinidade. Os compósitos poliméricos produzidos apresentam potencial para futuras aplicações biomédicas, como na regeneração e cicatrização de feridas pela presença do ácido hialurônico, um glicosaminoglicano com alta afinidade biológica.

**Palavras-chave:** Ácido hialurônico. Celulose bacteriana. Crista de frango. Compósitos poliméricos.

OLIVEIRA, Sabrina Alves de. **Isolation and purification of hyaluronic acid of chicken comb and incorporation in bacterial cellulose membranes**. 2017. 100 p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA) is a constitutive polysaccharide constituted of disaccharides units of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine that found in the extracellular matrix and it is a material used in tissue engineering and scaffolding for wound regeneration. Hyaluronic acid can be extracted from chicken comb using different methods. The bacterial cellulose (BC), from *Gluconacetobacter hansenii*, is a biofilm with a high degree of crystallinity that also can be used for therapeutic purposes and as a candidate for healing wounds. Aiming at the production of polymeric composites with HA for different applications in the health area, this work had as objective extract the HA from chicken comb and incorporate it during of production of bacterial cellulose with the aim of bringing the intrinsic properties of HA to bacterial cellulose. In this work, for the isolation process of HA first were carried out tests preliminary with aim of establish the best steps for define the methodology of isolation of HA from chicken comb. The methodology defined involved steps of proteolytic and lipid digestions, extraction with anionic resin, treatment with salts (calcium chloride and phosphate disodium) based in the effect salting out, precipitation with ethanol and drying. For the characterization of the material were performed the techniques NMR and infrared spectroscopy, thermogravimetric and size-exclusion chromatography to determine the molar mass and polydispersity. The polymeric composites were produced in presence of hyaluronic acid isolated from chicken comb on different days of fermentation, specifically on the first and third day of fermentation. Native membrane and polymeric composites were characterized with respect to their structure, morphology and crystallinity. The process of extraction and purification of hyaluronic acid resulted in low molar mass hyaluronic acid with structural characteristics similar to the standard commercial hyaluronic acid. The results demonstrated that the membranes (BC/HA-SAB) of fact incorporated the HA. The membranes produced on the third day presented better incorporation of HA-SAB between cellulose nanofiber, resulting in membranes with higher thermal stability, higher roughness and lower crystallinity. The polymeric composites produced presented potential for future biomedical applications, such as regeneration and healing of wounds by the presence of HA, a glycosaminoglycan with high affinity biological.

**Keywords:** Hyaluronic acid. Bacterial cellulose. Chicken comb. Composites polymeric.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do ácido hialurônico .....	21
Figura 2 – Conformação helicoidal da cadeia do ácido hialurônico: (A) Conformação de uma cadeia simples de HA; (B) Conformação da dupla hélice do HA.	22
Figura 3 - Estrutura química da celulose com ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular .....	31
Figura 4 - Representação da estrutura da celulose I: I $\alpha$ (triclínica) (a) e I $\beta$ (monocíclica) (b) .....	32
Figura 5 - Via bioquímica para a síntese de celulose por <i>G. xylinus</i> .	35
Figura 6 - Fluxograma do processo de extração do ácido hialurônico da crista de frango. ....	42
Figura 7 - Fluxograma do processo produção de membranas de celulose nativa e dos compósitos poliméricos .....	44
Figura 8 - Ilustração das etapas do processo de extração do ácido hialurônico da crista de frango: (A) Antes e depois da ação das enzimas (protease e lipase) sobre as cristas de frango, fase lipídica descartada do processo; (B) Antes de depois da interação da resina aniônica com solução resultante da etapa anterior. Fase líquida descartada do processo; (C) Antes e depois da análise cromatográfica. A eluição do GAG ocorreu com um solução de cloreto de sódio 12%; (D) Precipitação salting out com fosfato dissódico e cloreto de cálcio; (E) Após a precipitação ocorreu a filtração e o precipitado foi descartado e a parte líquida continuou no processo para precipitação com etanol; (F) Com a formação do precipitado o material foi filtrado e retido no papel filtro; (G) Produto obtido após a secagem. ....	50
Figura 9 - Espectro de Infravermelho (FT-IR) do Ácido Hialurônico Padrão (HA-P) e do Ácido Hialurônico isolado da crista de frango (HA-SAB). ....	52
Figura 10 - Espectro de RMN no estado sólido ( <sup>13</sup> C CP MAS RMN) do Ácido Hialurônico isolado da crista de frango (HA-SAB) (A) e do Ácido Hialurônico Padrão (HA-P) (B). ....	54
Figura 11 - Curva de TGA para o HA-P e HA-SAB (N <sub>2</sub> atmosfera, a 50 mL.min <sup>-1</sup> )....	56
Figura 12 - Curva de DTG para o HA-P e HA-SAB .....	57
Figura 13 – Perfis cromatográficos do HA-SAB dialisado e não dialisado .....	59

Figura 14 - Perfil de eluição do HA-P e HA-SAB pela cromatografia de exclusão por tamanho .....	61
Figura 15 - Espectro de FT-IR da membrana de celulose bacteriana (BC) e dos compósitos poliméricos (BCHA-SABT0 e BCHA-SABT3) .....	64
Figura 16 - Espectro de <sup>13</sup> C CP MAS RMN da celulose bacteriana nativa (BC) (A) e dos compósitos poliméricos (BCHA-SABT0 (B) e BCHA-SABT3 (C)).....	66
Figura 17 - DRX da celulose bacteriana nativa (BC) (verde) e dos compósitos poliméricos (BCHA-SABT0 (preto) e BCHA-SABT3 (vermelho)).....	69
Figura 18 - Termograma da celulose bacteriana nativa (BC) e dos compósitos poliméricos (BCHA-SABT0 e BCHA-SABT3) .....	71
Figura 19 - DTG da celulose bacteriana nativa (BC) e dos compósitos poliméricos (BCHA-SABT0 e BCHA-SABT3) .....	72
Figura 20 - Imagens de AFM da celulose bacteriana nativa (BC) e dos compósitos poliméricos (BCHA-SABT0 e BCHA-SABT3) .....	74
Figura 21 - Imagens de MEV da BC (A), BCHA-SABT0 (B) e BCHA-SABT3 (C) .....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração de ácido hialurônico em tecidos e fluidos.....	24
Tabela 2 – Principais etapas para extração de HA a partir de tecidos conectivos ....	29
Tabela 3 - Comparação das bandas de absorção obtidas no espectro de HA-SAB e HA-P pelo FT-IR.....	53
Tabela 4 – Dados da massa molar ponderal $M_w$ , massa molar média $M_n$ e grau de polidispersão ( $M_w/M_n$ ) do HA-SAB dialisado e do HA-P .....	60
Tabela 5 – Índice de cristalinidade ( $I_c$ ) a partir de DRX e CP-MAS RMN, conteúdo de HA nas membranas por CP-MAS RMN, largura das fitas de celulose e rugosidade dos compósitos poliméricos e nativa. ....	68
Tabela 6 – Resultados da análise termogravimétrica. $T_{10\%}$ é a temperatura correspondente a 10% de perda de massa. $T_{máx}$ é a temperatura de máxima taxa de perda de massa. ....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica
BC	Celulose Bacteriana
BC-HA	Membrana de celulose bacteriana com ácido hialurônico
BCHA-SABT0	Membrana de celulose bacteriana com ácido hialurônico de crista de frango no primeiro dia de fermentação
BCHA-SABT3	Membrana de celulose bacteriana com ácido hialurônico de crista de frango no terceiro dia de fermentação
BSE	Bovine Spongiform Encephalopathy
c-di-GMP	Ácido diguanilmonofosfato
Cel I	Celulose do tipo I
CS	Celulose sintase
DRX	Difração de Raio X
DTG	Termogravimetria derivada
FT-IR	Espectroscopia do infravermelho
GAGs	Glicosaminoglicanos
GK	Glicoquinase
GlcNAc	$\beta$ -1,3-N-acetil-D-glicosamina
GlcUA	$\beta$ -1,4-D-glucurônico
HA	Ácido Hialurônico
HA-P	Ácido Hialurônico Padrão
HA-SAB	Ácido Hialurônico isolado da crista de Frango
HPSEC	Cromatografia de exclusão por tamanho
HS	Meio de cultivo Hestrin-Schramm's
$I_c$	Índice de cristalinidade
LS	Dispersão de luz
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PD	Polidispersidade
PGM	Fosfoglucomutase
RI	Índice de refração
RMN	Ressonância magnética nuclear

T0	Primeiro dia de fermentação
T3	Terceiro dia de fermentação
TGA	Análise termogravimétrica
UDP-glicose	Uridina difosfato glicose
UGP	UDP-glicose-pirofosforilase

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
2	JUSTIFICATIVA.....	19
3	OBJETIVOS .....	20
3.1	Objetivo Geral .....	20
3.2	Objetivos Específicos .....	20
4	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	21
4.1	Ácido Hialurônico e suas propriedades .....	21
4.1.1	<i>Fontes de ácido hialurônico .....</i>	<i>23</i>
4.1.2	<i>Métodos de obtenção de ácido hialurônico .....</i>	<i>25</i>
4.1.3	<i>Aplicações do ácido hialurônico.....</i>	<i>29</i>
4.2	Celulose Bacteriana .....	30
4.2.1	<i>Produção de Celulose Bacteriana.....</i>	<i>33</i>
4.2.1.1	<i>Condições para produção da celulose bacteriana.....</i>	<i>35</i>
4.2.2	<i>Aplicações Celulose Bacteriana .....</i>	<i>37</i>
4.2.3	<i>Compósitos poliméricos a base de Celulose Bacteriana .....</i>	<i>38</i>
5	MATERIAIS E MÉTODOS .....	40
5.1	Materiais.....	40
5.2	Métodos.....	40
5.2.1	<i>Testes Preliminares.....</i>	<i>40</i>
5.2.2	<i>Método de extração do ácido hialurônico das cristas de frango .....</i>	<i>41</i>
5.2.3	<i>Produção de membranas de celulose .....</i>	<i>43</i>
5.2.3.1	<i>Microrganismo, condição de estocagem e preparo do meio de cultura.....</i>	<i>43</i>
5.2.3.2	<i>Preparo do pré-inoculo e processo de Fermentação.....</i>	<i>43</i>
5.2.4	<b><i>Caracterização do Ácido Hialurônico Isolado (HA-SAB), da membrana de celulose bacteriana nativa e dos compósitos poliméricos .....</i></b>	<b><i>45</i></b>
5.2.4.1	<i>Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....</i>	<i>45</i>
5.2.4.2	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética (RMN) .....</i>	<i>45</i>
5.2.4.3	<i>Análise termogravimétrica (TGA) .....</i>	<i>46</i>

5.2.4.4	<i>Determinação da massa molar e homogeneidade do HA-SAB e HA-P</i>	46
5.2.4.5	<i>Difração de Raio X (DRX)</i>	47
5.2.4.6	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	48
5.2.4.7	<i>Microscopia de força atômica (AFM)</i>	48
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
<b>6.1</b>	<b>Otimização do processo de isolamento do ácido hialurônico</b>	<b>49</b>
<b>6.1.1</b>	<b><i>Caracterização do ácido hialurônico da crista de frango</i></b>	<b>52</b>
6.1.1.1	<i>Caracterização espectroscópica do ácido hialurônico da crista de frango</i>	52
6.1.1.2	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	55
6.1.1.3	<i>Determinação da Massa Molar</i>	58
<b>6.2</b>	<b>Caracterização das membranas de celulose nativa e dos compósitos poliméricos</b>	<b>62</b>
<b>6.2.1</b>	<b><i>Análises espectroscópicas da celulose bacteriana nativa e dos compósitos poliméricos</i></b>	<b>62</b>
<b>6.2.2</b>	<b><i>Disposição cristalina da celulose bacteriana nativa e dos compósitos poliméricos</i></b>	<b>67</b>
<b>6.2.3</b>	<b><i>Análise termogravimétrica das membranas</i></b>	<b>70</b>
<b>6.2.4</b>	<b><i>Propriedades das superfícies das membranas de celulose determinadas por MEV e AFM</i></b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>78</b>
	<b>ANEXO</b>	<b>87</b>
	<b>ANEXO A - Artigo publicado no periódico International Journal Biological Macromolecules.</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Devido aos avanços na área biotecnológica, nota-se o grande interesse no desenvolvimento de produtos que auxiliem na recuperação, reconstrução e na cicatrização de tecidos danificados ou doentes. Dentre esses produtos destaca-se o ácido hialurônico e a celulose bacteriana que possuem propriedades de suma importância para área médica e cosmética.

O ácido hialurônico (HA) é um polissacarídeo linear de alta massa molar que contém em sua estrutura unidades dissacarídicas de  $\beta$ -1,4-D-glucurônico (GlcUA) e  $\beta$ -1,3-N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) que estão repetidas alternadamente, sendo esse pertencente ao grupo das substâncias glicosaminoglicanas (GAGs) não-sulfatadas. O HA possui propriedades viscoelástica e de alta capacidade de retenção de água, o que é de grande interesse para indústria farmacêutica e cosmética (ARMSTRONG; JOHNS, 1997; WARD; THIBEAULT; GRAY, 2002).

O HA comercial pode ser de origem microbiana ou de origem animal obtido a partir do cordão umbilical, líquido sinovial, humor vítreo e também da crista de galo (COLLINS; BIRKINSHAW, 2013; FRASER; LAURENT; LAURENT, 1997; KOGAN et al., 2007). Dentre essas fontes destaca-se a crista de frango que é um subproduto da indústria avícola que apresenta concentrações de HA, no entanto é destinada para formulações de rações. A produção de HA a partir da crista de frango envolve diferentes etapas de purificações com intuito de eliminar proteínas e outros glicosaminoglicanos que estejam agregados nesse tecido (LAI; LIN; LIN, 2012). Portanto, além do aproveitamento do subproduto, crista de frango, que atualmente é descartado, pode-se produzir uma macromolécula com inúmeras aplicações, como na viscosuplementação do fluido das articulações, em cirurgias oftalmológicas, na cicatrização e regeneração de tecidos, no preenchimento cutâneo e como agente de liberação controladas de fármacos (BROWN; JONES, 2005).

Além do HA existe outra macromolécula que se destaca na engenharia de tecidos, a celulose bacteriana (BC). A BC é um polissacarídeo linear que apesar de possuir uma estrutura quimicamente idêntica a celulose vegetal, formada de um  $\beta$ -glucano unido por ligações  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4, difere-se por ser sintetizada por meio da bactéria gram-negativa *Gluconoacetobacter xylinus* e por apresentar um arranjo cristalino tridimensional altamente organizado e livre de hemicelulose e lignina (KLEMM et al., 2005). Esse arranjo cristalino é formado a partir do momento em que as cadeias de

glucano são sintetizadas pela *G. xylinus* por meio da ação da enzima celulose sintase (ENDLER; SANCHEZ-RODRIGUEZ; PERSSON, 2010).

Essa rede tridimensional confere a BC propriedades, como alta cristalinidade, hidrofiliabilidade, elasticidade, propriedades mecânicas e uma nanoestrutura porosa que forma uma matriz perfeita para regeneração e cicatrização epidérmica, pois mantém o ambiente úmido e serve como uma barreira física contra qualquer infecções externa (CZAJA et al., 2006, 2007; RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015). Outra propriedade importante da BC é a sua biocompatibilidade com tecidos humanos.

Devido às propriedades da BC destaca-se algumas aplicações na área da saúde, como na regeneração e cicatrização de queimaduras e feridas crônicas (KWAK et al., 2015; SOLWAY; CLARK; LEVINSON, 2011), como suporte para substituição de vasos sanguíneos (SCHERNER et al., 2014), e na utilização como pele artificial ou como matrizes de *scaffolds* na engenharia de tecidos (CZAJA et al., 2006; KESHK, 2014).

Levando em consideração a formação de compósitos poliméricos a partir da BC, na literatura pode-se verificar diferentes compostos que podem ser adicionados no meio de cultivo para melhorar as propriedades da membrana de celulose. Dentre esses compósitos baseados em celulose bacteriana evidencia-se a BC/ácido hialurônico obtido de fermentação com *Streptococcus* (EL-HOSENY et al., 2015; LOPES et al., 2014), BC/óxido de grafeno (ZHU et al., 2015), BC/poli-3-hidroxi-butirato (PHB) (RUKA; SIMON; DEAN, 2013), BC/sulfato de condroitina (EL-HOSENY et al., 2015), e BC/ amido (GRANDE et al., 2009).

O compósito BC/HA têm sido aplicado no processo de reparação tecidual e na cicatrização de tecidos e feridas, pois o HA contido na membrana contribui na proliferação, diferenciação e regeneração de tecidos doentes, permitindo a migração de células durante a cura (GERECHT et al., 2007). A formação desse compósito visa compensar as limitações da BC e da HA, um em relação ao outro, um vez que a BC contribuiria na resistência mecânica do material e o HA influenciando na adesão e crescimento celular.

Neste trabalho foi estabelecido um processo de isolamento de HA de um subproduto da indústria avícola, a crista de frango. O HA isolado foi caracterizado e adicionado ao meio de cultivo para produção da BC em diferentes momentos de fermentação com intuito de verificar a influência deste composto na síntese, estrutura,

morfologia e estabilidade térmica da membrana. O compósito polimérico produzido pode ser um potencial material no campo biomédico, com sua principal aplicação na regeneração do tecido.

## 2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que o subproduto da indústria avícola, crista de frango, apresenta quantidades consideráveis de ácido hialurônico (HA) e que o Brasil é considerado um dos países que mais produz a carne de frango, conseqüentemente gera grandes quantidades desse subproduto durante o abate, pretende-se utilizar esse subproduto como uma fonte de matéria-prima para um produto de alto valor agregado, como o ácido hialurônico. Sendo assim, visando a importância do HA e o reaproveitamento das cristas de frango, espera-se estabelecer uma metodologia para isolamento do HA a partir da crista de frango, diferentes dos encontrados na literatura.

Além do isolamento e caracterização do HA de origem animal, nesse trabalho objetiva-se a aplicação do mesmo em membrana de celulose bacteriana para aumentar o valor agregado da membrana de celulose bacteriana com HA, aqui denominados de compósitos poliméricos, e para produzir membranas de celuloses bacteriana com novas funcionalidades para aplicação na área da saúde. Através da sinergia das propriedades de ambos os biomateriais acredita-se que irá melhorar a interação com os tecidos biológicos no processo de cicatrização e na reparação tecidual.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Extrair e caracterizar o ácido hialurônico (HA) da crista de frango e incorporá-lo em membranas de celulose bacteriana através da adição deste em diferentes tempos de cultivo durante o processo fermentativo.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

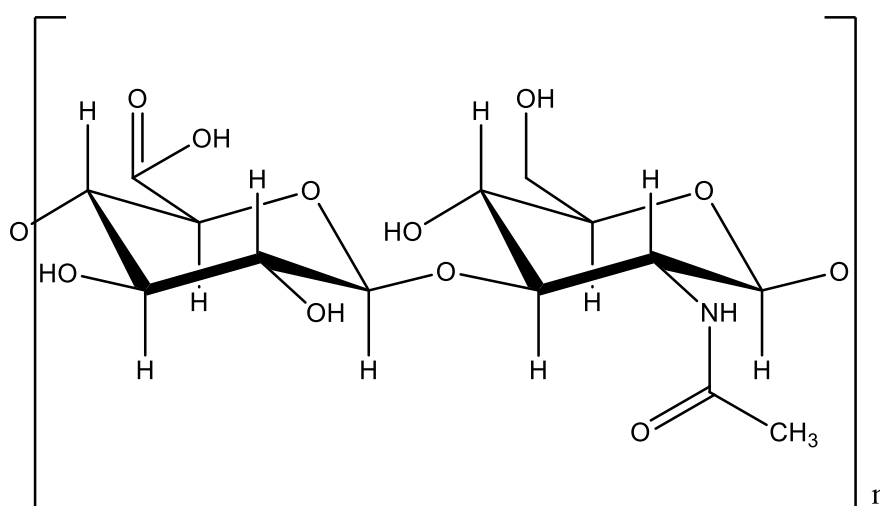
- Extrair o ácido hialurônico da crista de frango.
- Caracterizar o ácido hialurônico em relação a identidade estrutural, massa molar e estabilidade térmica.
- Produzir celulose bacteriana com a adição de ácido hialurônico em diferentes momentos de fermentação.
- Caracterizar a incorporação de ácido hialurônico nas membranas de celulosas produzidas em diferentes momentos de fermentação.
- Avaliar a interferência do ácido hialurônico na estrutura, cristalização, morfologia e na estabilidade térmica da celulose bacteriana.

## 4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 4.1 Ácido Hialurônico e suas propriedades

O ácido hialurônico é um polissacarídeo linear, que pertence ao grupo dos glicosaminoglicanos não-sulfatados, que contém em sua estrutura unidades dissacarídicas polianiónicas de ácido  $\beta$ -1,4-D-glucurônico (GlcUA) e  $\beta$ -1,3-N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) repetidas alternadamente, como ilustrado na Figura 1, resultando em uma cadeia linear de 2.000 a 25.000 unidades dissacarídicas (CHONG et al., 2005; KOGAN et al., 2007). As unidades dissacarídicas presentes na estrutura do HA podem apresentar massa molar de aproximadamente 4 milhões de Daltons (Da) (COWMAN; MATSUOKA, 2005; NECAS et al., 2008).

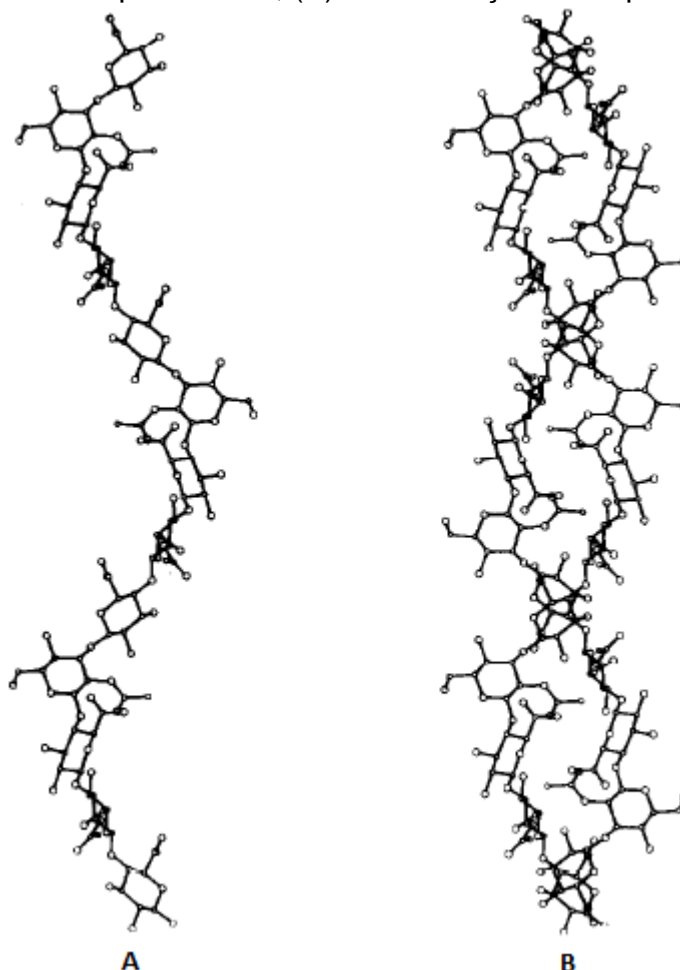
**Figura 1** - Estrutura química do ácido hialurônico



**Fonte:** Próprio autor

A estrutura do HA no estado sólido, determinada pela análise de difração de raios x, apresentou conformação helicoidal com 2 a 4 unidades dissacarídeas por cada volta de acordo com os íons presentes, conforme ilustrado na Figura 2. A estabilização da estrutura de HA é dependente das ligações de hidrogênio entre os resíduos dos monossacarídeos adjacentes (COWMAN; MATSUOKA, 2005).

**Figura 2** – Conformação helicoidal da cadeia do ácido hialurônico: (A) Conformação de uma cadeia simples de HA; (B) Conformação da dupla hélice do HA.



**Fonte:** Adaptado de Sheehan, Gardner e Atkins (1977)

Quando em soluções aquosas o HA apresenta propriedades viscoelásticas e alto grau de hidratação, formando um gel consistente, devido às cargas negativas presente na estrutura, pois atraem cátions e moléculas de águas (ARMSTRONG; JOHNS, 1997; WARD; THIBEAULT; GRAY, 2002). A viscosidade do HA se dá pela interação da molécula de HA com a água, quando esse não está interagido com outras substâncias. O que garante a interação com a água são as hidroxilas que estão nas posições equatoriais, as quais garantem o caráter hidrofílico da molécula, resultando em uma estrutura de fita torcida (NECAS et al., 2008). As conformações e interações do HA dependem do ambiente, da força iônica, interações de íons específicos, constante dielétrica, forças mecânicas e da interação com outras substâncias, como proteínas e lipídeos (COWMAN; MATSUOKA, 2005). Através desse comportamento classifica-se o HA como um lubrificante biológico, o que é abundantemente

encontrado nos fluidos sinoviais e bainhas dos tendões (FRASER; LAURENT; LAURENT, 1997).

A solubilidade do HA em água é determinado pelas cargas presentes em sua estrutura. Para se tornar insolúvel este polímero pode ser convertido em uma substância sem carga através de reações de derivatização, como reações de esterificação. O hialuronato de sódio é solúvel em soluções de cloreto de sódio mas é quase insolúvel em solventes orgânicos, principalmente em solventes não miscíveis em água. Além disso é sensível à hidrólise ácida e alcalina e quando exposto a temperaturas elevadas (~100 °C) sua molécula pode ser inicialmente degradada (BECKER et al., 2009). Quando submetido a uma acidificação fraca com ácido acético a viscosidade do HA pode ser afetada irreversivelmente (IGNATOVA; GUROV, 1990).

#### **4.1.1 Fontes de ácido hialurônico**

Nos tecidos conectivos dos animais são encontrados dois componentes essenciais, as células e a matriz celular. A matriz celular é composta por diferentes macromoléculas, como as glicoproteínas e proteoglicanos, que formam uma estrutura altamente organizada, ocupando todo o espaço extracelular. Os componentes moleculares são sintetizados pelas células presentes na matriz. As macromoléculas principais encontradas na matriz celular são: os glicosaminoglicanos (GAGs) e proteínas, como o colágeno, elastina, fibronectina e laminina (DAVIES, 2001).

O ácido hialurônico (HA) é um dos glicosaminoglicanos da matriz celular (GOLD, 2007), sendo que também pode ser encontrado na matriz extracelular, matriz pericelular e intracelular (COWMAN; MATSUOKA, 2005). Na matriz extracelular o HA tem a função de organizar e estabilizar a estrutura através das interações com as células e outros componentes, como as proteínas, formando agregados moleculares (NECAS et al., 2008).

Nos vertebrados as maiores concentrações de HA são encontradas em tecidos conectivos, como a crista de frango e cartilagem nasal, no cordão umbilical e no fluido sinovial, sendo que nos tecidos o HA preenche o espaço entre as células agindo como um componente estrutural (KOGAN et al., 2007). Além dessas fontes também é possível encontrar no pulmão, rim, cérebro, músculo e no fígado em pouca quantidade (FRASER; LAURENT; LAURENT, 1997) ou ser produzido por alguns microorganismos (KOGAN et al., 2007). Dentre os agentes microbianos que produzem

o HA destaca-se *Pasteurella multocida*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus equi* e *Streptococcus uberis* (BOERIU et al., 2013).

A concentração de HA é diversificada dependendo do tecido e do fluido em que se encontra. Na Tabela 1 encontra-se a lista de algumas fontes de HA consideradas relevantes com suas respectivas concentrações.

**Tabela 1** – Concentração de ácido hialurônico em tecidos e fluidos

Fontes	Concentrações	Referências
Cordão umbilical humano	4,1 mg/mL de tecido	(KOGAN et al., 2007; LAURENT; FRASER, 1992; MEYER; PALMER, 1934)
Fluido sinovial humano	1420 – 3600 mg/L	(KOGAN et al., 2007; LAURENT; FRASER, 1992)
Humor vitreo humano	140 – 338 mg/L	(KOGAN et al., 2007; LAURENT; FRASER, 1992)
Pele de Humano Adulto	7 – 8 g	(SCHIRALDI; GATTA; ROSA, 2010)
Crista de galo	7500 mg/L	(KOGAN et al., 2007; LAURENT; FRASER, 1992)

O HA comercial pode ser de origem animal ou de origem microbiana, sendo que ambos apresentam a mesma estrutura química, podendo diferir apenas na massa molar. Na crista de galo pode ser encontrado uma das maiores concentrações de HA, conforme dados da Tabela 1 (KOGAN et al., 2007; LAURENT; FRASER, 1992).

As cristas são classificadas como um tecido conjuntivo denso que possuem regiões distintas em sua estrutura. O tecido subcutâneo da crista apresenta um núcleo central com uma divisão fibrosa, simétrica e densa extremamente vascularizada, com a presença de tecido adiposo. Na derme encontra-se material interfibrilar contendo polissacarídeos e na parte subpítelial contém capilares largos, o que dá a cor vermelha para esse tecido (SZIRMAI, 1966).

No geral as cristas são formadas por componentes fibrilares e por algumas substâncias intercelulares que são controladas por alguns fatores, como a idade, o sexo e os agentes endógenos e exógenos do animal. Dentre esses fatores destaca-se questões hormonais. Alguns hormônios esteroides (androgênios) causam efeitos sobre a estrutura dos tecidos conjuntivos de todo o corpo, proporcionando um aumento do teor de glicosaminoglicanos, no conteúdo de água do tecido e no tamanho da estrutura (BALAZS; SZIRMAI; BERGENDAHL, 1959).

Os glicosaminoglicanos são umas das substâncias intercelulares mais abundantes na crista. O ácido hialurônico é o principal componente, embora exista outros glicosaminoglicanos sulfatados. Além dos GAG também é possível encontrar proteínas, mas em menor concentração, e um elevado teor de água (SZIRMAI, 1966).

Além da raça, a idade, o estado hormonal do animal, os métodos de isolamento e purificação também interferem no rendimento e qualidade do HA extraído (SWANN, 1968).

#### **4.1.2 Métodos de obtenção de ácido hialurônico**

O ácido hialurônico pode ser extraídos utilizando diferentes métodos e fontes. Antigamente relatava-se que o HA de origem animal apresentavam algumas desvantagens, como: presença de hialuronidase endógena no tecidos dos animais, que hidrolisam a cadeia do polímero formado; métodos de extração que requerem tempo e condições específicas para serem realizados; baixo rendimento; e risco de contaminação com proteína e vírus, sendo que esse risco pode ser minimizado se a fonte de HA vier de animais saudáveis, que são controladas criteriosamente através de vistorias dos órgãos competentes, e o material obtido ser purificado até atingir o nível de qualidade aceitável (VAZQUEZ et al., 2013).

Mediante aos problemas relatados acima, o HA isolado das cristas de aves devem passar por etapas de purificações sucessivas e ser realizado dentro dos padrões de qualidade exigidos nas legislações vigentes para evitar contaminações desse material e eliminar maior quantidade de proteínas e glicosaminoglicanos que estejam agregados nesse tecido (LAI; LIN; LIN, 2012).

Não é apenas o HA de origem animal que apresentam algumas desvantagens. O HA proveniente de processos fermentativos possui alta massa molar e maior rendimento, mas também oferecem riscos de contaminações com endotoxinas bacterianas, proteínas e ácidos nucleicos, o que exige um processo de purificação mais eficaz para produção de um HA de alta pureza (BOERIU et al., 2013; LAI; LIN; LIN, 2012). Sendo assim, acredita-se que estudos atuais envolvendo a produção de HA de origem animal, a partir cristas de frango oriundas de abatedouro certificado, é uma opção para desenvolver novas metodologias de isolamento de HA e produzir um material de interesse comercial.

O primeiro processo de isolamento de HA de origem animal foi desenvolvido por Meyer e Palmer em 1934. Meyer e Palmer (1934) isolaram pela primeira vez um polissacarídeo do corpo vítreo, retirados dos olhos bovinos, com solução aquosa de acetona. Com os resultados obtidos eles evidenciaram que a substância possuía moléculas de ácido urônico, e a denominaram de ácido hialurônico (MEYER; PALMER, 1934). Boas (1949) utilizando a metodologia descrita acima isolou o ácido hialurônico das cristas de aves de diferentes raças. Assim, após a purificação com clorofórmio-álcool amílico, o rendimento obtido foi de aproximadamente 0,6% do peso de tecido seco desengordurado (BOAS, 1949).

Acredita-se que para o processo de isolamento de HA de alguns tecidos, são necessárias algumas etapas consideradas como essências: deslipidificação, digestão enzimática com uma protease, purificação, precipitação, filtração, secagem e moagem (AUTRET, 2004).

Na literatura foram encontradas diferentes metodologias para obtenção de HA provenientes de diferentes fontes. Abaixo segue descrito algumas metodologias encontradas e na Tabela 2 é possível verificar as principais etapas utilizadas em cada metodologia:

- **Extração enzimática.** Nakano, Nakano e Sim (1994) quantificaram o ácido hialurônico presente na crista de galo através do método de eletroforese usando acetato de celulose. Para quantificar foi necessário isolar o GAG. A técnica de isolamento envolveu algumas etapas: as cristas foram desidratadas a temperatura ambiente com acetona, secas, digeridas com a papaína em solução tampão de fosfato dissódico pH 6,5, centrifugadas e dialisadas por 24 horas.

Tsiganos, Vynios e Kalpaxis (1986) extraíram o HA da crista de galo para verificar a interação das proteínas que estão ligadas não covalentemente. Por tal motivo, o HA foi extraído pela técnica cromatografia de troca iônica. As cristas de galo foram trituradas, deixadas em solução de acetato de sódio por 10 dias, para ocorrer a extração, e digeridas com Condroitinase ABC e Papaína. Os extratos foram concentrados e precipitados com ácido tricloroacético e sulfato de amônio, para liberar proteínas e ácidos nucleicos. O produto obtido passou por uma coluna de DEAE-celulose, onde foi eluída com um gradiente de acetato de sódio, pH 5.8, e precipitado com etanol.

- **Extração com acetato de sódio sem enzimas.** Boas (1949) isolou o ácido hialurônico da crista de galo. Para isso as cristas foram trituradas, desidratadas

com acetona por várias vezes e secas. Após a preparação das cristas, o material desidratado e seco passou por 10 etapas de extração com solução de acetato de sódio a 5% em intervalos de 24 horas. O produto obtido nas extrações era um material viscoso. Esse material foi separado dos resíduos da crista e precipitado com 1,5 volume de álcool etílico. O precipitado foi centrifugado, resuspenso em solução de acetato de sódio e centrifugado novamente. As proteínas foram retiradas através da adição de clorofórmio e clorofórmio álcool amílico. O produto formado foi dialisado, acidificado a pH 4,0, precipitado com álcool etílico, desidratado e seco. De 500 g de crista de galo rendeu 500 mg de HA (BOAS, 1949; KANG et al., 2010).

▪ **Extração com água destilada seguido de processo enzimático.** As cristas de galo foram cortadas, desidratadas, deslipidificadas em acetona e pesadas. Após essa preparação, foi adicionado água destilada, permanecendo em repouso por 48 horas, sendo o produto obtido centrifugado. Após a centrifugação foi adicionado solução de cloreto de sódio 0,2 mol/L no sobrenadante e o HA foi precipitado com 3 volumes de álcool etílico 95% (Fração I). O resíduo da centrifugação foi novamente triturado, colocado em água destilada 4 °C por 3 dias para a extração e centrifugado, sendo que não houve a formação de precipitado quando adicionado álcool etílico (Fração II). Novamente houve a adição de cloreto de sódio 1 Mol/L a 4 °C no resíduo da centrifugação para extração, sendo este material precipitado com etanol (Fração III). O precipitado foi suspenso em solução tampão tris pH 8,0 e digerido com uma pronase. O produto foi centrifugado, sendo que no sobrenadante foi adicionado etanol, e o precipitado retirado. As frações precipitadas foram lavados com etanol e éter, secos e pesados (SWANN, 1968).

Em outro trabalho para obtenção de HA de baixo peso molecular as cristas de galo foram desidratadas com acetona e moídas, resultando em partículas de 1 a 2 mm. O material foi submetido a uma etapa de extração, onde foi umedecido com água destilada por aproximadamente 2 horas, sendo essa etapa repetida por três vezes. A solução resultante continha proteínas, que foram removidas através da adição da mistura de cloreto de sódio e clorofórmio por um período de 3 horas. O material obtido submetido a uma etapa de precipitação com etanol, o precipitado separado por uma filtração a vácuo, resultando o produto bruto (HA). O produto bruto dissolvido em solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L e clorofórmio, para remoção das proteínas, para que então passe por uma etapa de digestão enzimática. Por fim, o material passa por

etapas de precipitação, para que então o material seja esterilizado a vácuo (ALKAYALI, 2006).

- **Tratamento com sais:** Cristas de galo foram descongelados, moídas e lavadas com 70% de etanol por duas vezes seguidas de lavagem com etanol 95%. Em seguida as cristas foram misturadas com 3 L de água a 50°C para adição de uma protease. Após a digestão, a camada superior que continha lipídeos foi eliminada e a camada de baixo foi reaproveitada passando por uma nova digestão com protease durante 12 horas. Assim a solução foi filtrada até se obter uma solução límpida e um extrato de HA foi obtido. O extrato foi misturado com solução de NaCl e precipitado com etanol. O precipitado foi filtrado e seco por liofilização. Em seguida o pó do extrato de HA obtido foi dissolvido em 1 L de água destilada, formando uma solução aquosa a 0,1%. Solução com sais de cálcio e fosfato foram preparadas e misturados em conjunto com a solução do extrato. Após agitação da solução houve a adição de NaOH até o pH 10. A solução resultante foi filtrada e centrifugada. Corrigido o pH da solução, adicionou-se NaCl e precipitou-se com etanol 95%. Assim o material foi filtrado e seco por liofilização, obtendo concentrações de proteínas inferiores a 0,02% e 90% de pureza de HA (KIM et al., 2007).

- **Extração do HA e purificação por ultrafiltração dos globos oculares de peixe.** Existem concentrações consideráveis de HA no humor vítreo de olhos de peixe. Murado et. al. (2012) extraíram e purificaram o HA do humor vítreo de olhos de peixe. Para o processo de extração utilizaram olhos do peixe espadarte e tubarão. Os olhos foram cortados e separados por uma tela de nylon. O humor vítreo foi clarificado, centrifugado, diafiltrado, misturados com solução de cloreto de sódio e precipitados com álcool etílico. A solução resultante da precipitação foi incubada a 5°C, ocorrendo a sedimentação do precipitado. O sobrenadante foi descartado. O sedimento foi redissolvido em água e adicionado álcool etílico e neutralizado. A solução foi centrifugada ocorrendo a separação do HA das proteínas. Por fim, ocorreu mais etapas para purificação, e concentração por diafiltração e ultrafiltração. As etapas de purificação incluídas nesse experimento tiveram o objetivo de eliminar as proteínas que estavam ligadas a matriz do proteoglicano (MURADO et al., 2012).

**Tabela 2** – Principais etapas para extração de HA a partir de tecidos conectivos

<b>Metodologia</b>	Desidratadas (acetona)	Trituração	Trituração	Trituração	Trituração	Trituração	
	Secagem	Extração (Acetato de Sódio)	Desidratadas (acetona)	Desidratadas (etanol)	Desidratadas (acetona)	Desidratadas (etanol)	
		Digestão Enzimática	Secagem		Centrifugação	Digestão enzimática	
	Digestão Enzimática	Tratamento (Ácido tricloroacético e sulfato de amônio)	Extração (Acetato de sódio)	Tratamento (NaCl/ Clorofórmio)	Precipitação (etanol)	Precipitação (etanol)	Filtração
			Precipitação (etanol)		Digestão Enzimática	Precipitação (NaCl e Etanol)	
	Centrifugação	Purificação (DEAE-celulose)	Tratamento (clorofórmio e álcool amílico)	Precipitação (etanol)	Centrifugação	Centrifugação	Precipitação (NaCl e Etanol)
Diálise			Tratamento (Cloreto de cálcio e fosfato)				
Diálise	Precipitação (etanol)	Acidificação	Secagem	Precipitação (etanol)	Precipitação (etanol)	Correção de pH	
		Precipitação (etanol)		Filtração			
<b>Referências</b>	Nakano, Nakano e Sim (1994)	Tsiganos, Vynios e Kalpaxis (1986)	Boas (1949); Kang et al. (2010)	Alkayali (2006)	Swann (1968).	Centrifugação	
						Secagem	Liofilização
						KIM et al. (2007)	

#### 4.1.3 Aplicações do ácido hialurônico

No mercado, o HA é um dos glicosaminoglicanos que possui alto valor econômico e tem inúmeras aplicações (VÁZQUEZ et al., 2013). As características físico-químicas notáveis do HA, como viscoelasticidade, biocompatibilidade e não imunogenicidade levam a sua aplicação na área farmacêutica e médica. O HA auxilia em processos cirúrgicos oftalmológicos, na cicatrização e regeneração de feridas, na

lubrificação do fluido das articulações e até mesmo como agente de liberação de drogas por diferentes meios de administração, como em uso tópico ou injetável (BROWN; JONES, 2005).

O HA de baixa massa molar tem aplicação em formulações farmacêuticas especificamente na formação de hidrogel e fármacos para articulações (YEUNG; MARECAK, 1999). Uso tópico de HA é utilizado para redução dos sinais de envelhecimento da pele. Teste de permeação de HA de diferentes pesos moleculares evidenciaram que ácido hialurônico de baixo peso molecular (20-300 KDa) penetra mais facilmente na pele, oferecendo a proteção e sustentação e hidratação da epiderme, já o ácido hialurônico de alto peso molecular (1000-1400 KDa) é considerado impermeável, fazendo com que sua ação seja na superfície garantindo apenas que não ocorra perda de água (ESSENDUBI et al., 2015).

Price, Berry e Navsaria (2007) apresentaram o efeito da aplicação de ácido hialurônico nas rugas faciais em 22 indivíduos. Eles verificaram que houve uma melhora significativa nos sinais de envelhecimento, ou seja, nas linhas de expressão e rugas faciais, e onde foi aplicado o HA confirmaram a recuperação da elasticidade da pele, evidenciando sua eficácia.

O ácido hialurônico também age como um suporte ou matriz para regeneração de tecidos de feridas crônicas, auxiliando no reparo da região lesionada. A sua ação é devido a algumas características do material, como biodegradabilidade, biocompatibilidade, lubrificação da região para diferenciação e crescimento celular e manutenção de um ambiente hidratado para infiltração das células (COLLINS; BIRKINSHAW, 2013).

Existem no mercado vários produtos à base de ácido hialurônico (Hylaform, Captique, Restylane, Juvederm, Belotero, Puragen e Puragen Plus) que são destinados a correções de lesões na pele. Esses produtos são utilizados para corrigir alterações decorrentes ao envelhecimento, como rugas, olheiras, entre outras (GOLD, 2007).

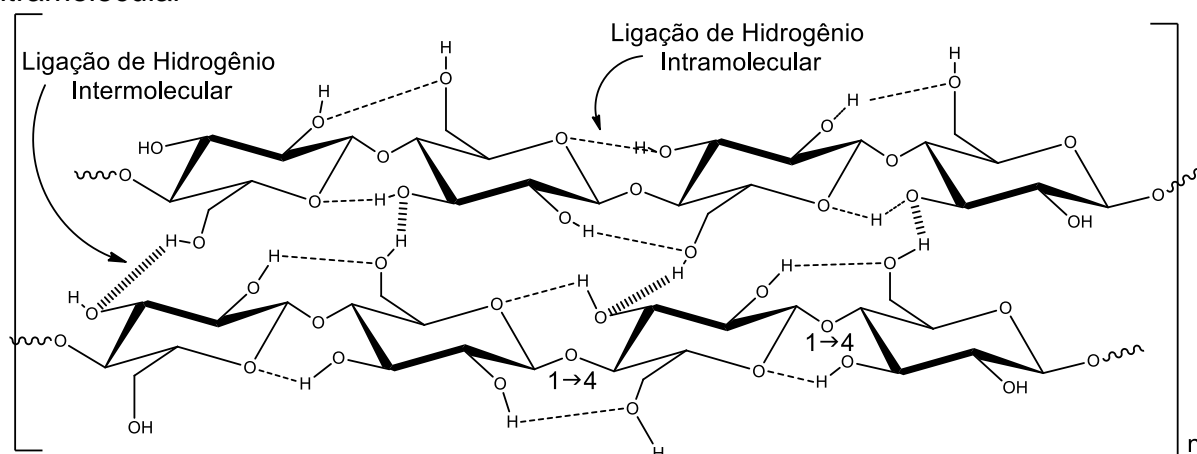
## **4.2 Celulose Bacteriana**

As macromoléculas que dão resistência e servem como estrutura das paredes celulares, matrizes ou exoesqueletos são considerados como polímeros estruturais (SCHNEPP, 2013). A celulose é um dos polímeros estruturais que pode

ser encontrado em árvores, plantas, algumas algas e também ser biossintetizado extracelularmente por algumas espécies de bactérias (MOON et al., 2011).

A celulose é um polissacarídeo que possui em sua estrutura unidades repetidas de  $\beta$ -D-Glucose que estão unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (KLEMM et al., 2005), conforme ilustrado na figura 3. A celulose bacteriana possui uma nanoestrutura fibrilar com grupos de hidroxilas livres, possibilitando a formação de ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular que permite sua alta conformabilidade, as quais determina suas propriedades mecânicas e físicas, como tração e rigidez da estrutura (CZAJA et al., 2007; SOLWAY; CLARK; LEVINSON, 2011).

**Figura 3** - Estrutura química da celulose com ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular

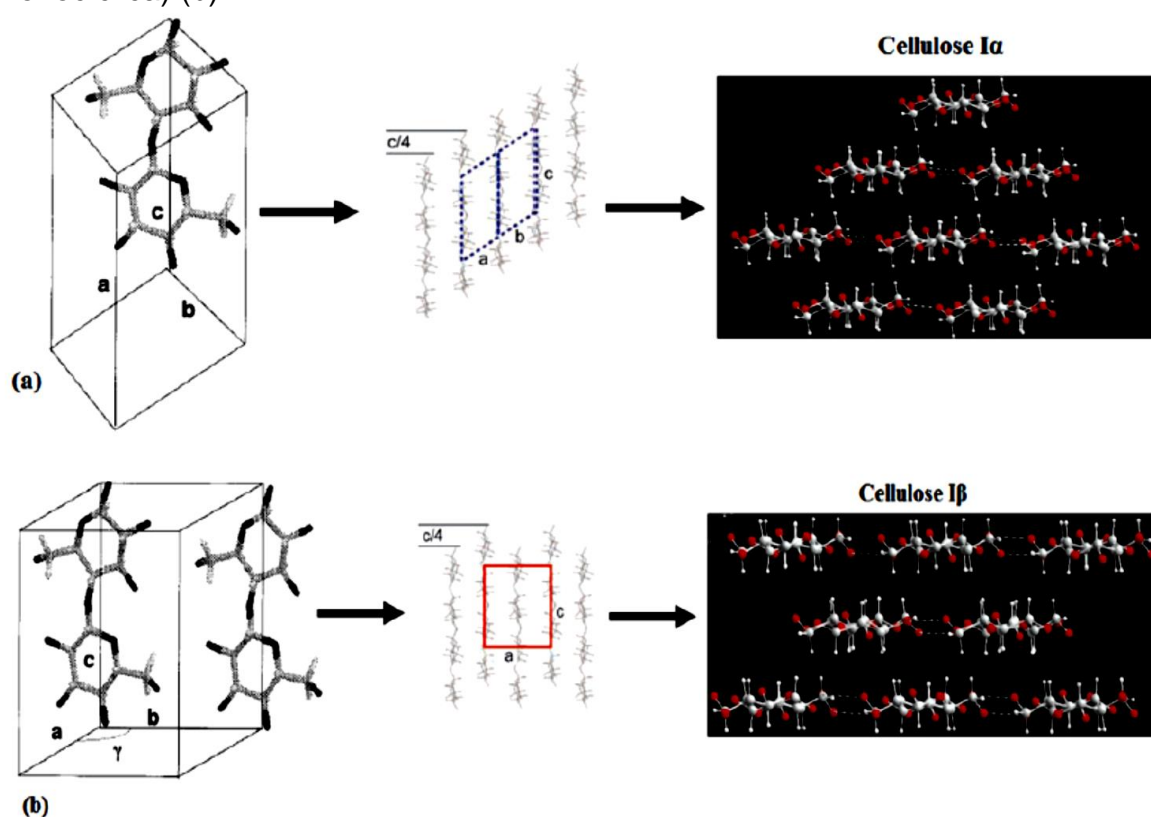


Fonte: Próprio autor

A celulose também pode apresentar diferentes formas cristalinas das cadeias, como a celulose I (cel I), celulose II (cel II) e celulose III (cel III). A cel I é o padrão da celulose nativa e mais predominante na natureza, a qual possui duas formas cristalina distintas:  $I\alpha$  (triclínica) e  $I\beta$  (monocíclica) (ATALLA; VANDERHART, 1984; FARIA-TISCHER et al., 2015), apresentando uma estrutura de cadeias paralelas (Figura 4) (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991). A predominância de cada forma cristalina irá depender da origem da celulose, ou seja, na celulose bacteriana prevalece a estrutura  $I\alpha$ , enquanto que em celulose vegetal se predomina a estrutura  $I\beta$  (SUGIYAMA; PERSSON; CHANZY, 1991). A cel II possui cadeias antiparalelas monoclinicas e podem ser obtidas através da conversão da celulose nativa em cel II através de reações de mercerização e regeneração. A conversão de cadeias paralelas

em anti-paralelas são irreversíveis (FARIA-TISCHER et al., 2015; KOLPAK; BLACKWELL, 1976; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991). Por fim, a cel III apresenta-se em duas formas, que são resultantes da conversão de cel I  $\rightarrow$  cel III<sub>I</sub> e cel II  $\rightarrow$  cel III<sub>II</sub>, após um tratamento com amônia líquida. As conversões são consideradas reversíveis, onde verifica-se que ambas possuem células unitárias monocílicas, sendo que a cel III<sub>I</sub> possui cadeias paralelas e cel III<sub>II</sub> possui cadeias anti-paralelas (SARKO; MUGGLILB, 1973).

**Figura 4** - Representação da estrutura da celulose I: I $\alpha$  (triclínica) (a) e I $\beta$  (monocíclica) (b)



Fonte: POLETTI; PISTOR; J., 2013

As microfibrilas de celulose estão distribuídas em regiões ordenadas (região cristalina) e em regiões menos ordenadas (regiões amorfas) (KLEMM et al., 2005). Através de análises de Raio X é possível verificar o perfil de cristalinidade da estrutura da celulose, classificando a celulose nos diferentes tipos existentes. Cel I (I $\alpha$ ), quando analisada por Raio X, apresentou reflexos no  $2\theta$  em torno de 14,5, 16,7, 20,2 e 22,5°. A cel II, monocíclica, no mesmo domínio angular apresentou reflexos em torno de 12,2, 19,9 e 21,3°. Já a cel III no mesmo domínio angular apresentou os

seguintes reflexos: 11,7, 17,3 e 20,8 °. Além desses dados, a cristalinidade do material é menor em cel II e cel III quando comparado com cel I (FARIA-TISCHER et al., 2015; ISOgai et al., 1989; SUGIYAMA; PERSSON; CHANZY, 1991).

Outro aspecto importante é a morfologia das diferentes formas estruturais da celulose. Através da técnica de AFM (Microscopia de Força Atômica) é possível verificar que a cel I apresenta feixes de fita com largura média de 57 nm, a cel II apresenta uma estrutura mais homogênea, sem fitas, e a cel III apresenta microfibrilas de 34 nm (FARIA-TISCHER et al., 2015).

Devido as características estruturais desse biomaterial, a celulose bacteriana apresenta propriedades únicas, como: alta resistência a tração, elevado grau de polimerização, alta capacidade de retenção de água, chegando até 100 vezes seu peso, e alto índice de cristalinidade (70 a 80 %). O grau de polimerização da celulose bacteriana depende das condições de cultivos estabelecidas e do microrganismo utilizado, variando de 300 a 10.000 unidades de celobiose (CHAWLA et al., 2009; VITTA; THIRUVENGADAM, 2012).

#### **4.2.1 Produção de Celulose Bacteriana**

A celulose bacteriana foi descoberta através de um experimento desenvolvido por Hestrin e Schramm em 1954. Esses pesquisadores produziram celulose bacteriana com a bactéria gram-negativa *Acetobacter xylinum* utilizando glicose como substrato e com aplicação de oxigênio durante o processo de fermentação. Através desse experimento evidenciaram que a celulose produzida apresentava-se livre de lignina, hemicelulose, pectina e outras substâncias (HESTRIN; SCHRAMM, 1954).

Em 1997, a *A. xylinum*, utilizada por Hestrin e Schramm, foi reclassificada para *Gluconacetobacter xylinus* por Yamada, Hoshino e Ishikawa (YAMADA; HOSHINO; ISHIKAWA, 1997). A *Gluconacetobacter xylinus* apresenta-se em forma de bastonetes e são estritamente aeróbicas (MOOSAVI-NASAB; YOUSEFI, 2010). Microrganismos do gênero *Gluconacetobacter* são usualmente encontrados na produção de vinagre, bebidas alcoólicas e em sucos de frutas (GONZÁLEZ et al., 2004).

Além da *G. xylinus* existem outras bactérias do mesmo gênero que são biossintetizantes de celulose bacteriana, como a *Gluconacetobacter hansenii*, que foi

o microrganismo utilizado nesse trabalho. A *G. hansenii* apresenta-se em forma de bastonetes com dimensões de 0,5 – 0,8 até 1,0 – 1,5  $\mu\text{m}$  (LISDIYANTI et al., 2006).

Atualmente a via da biossíntese (Figura 5) para produção de celulose é bem conhecida. As reações da via ocorre entre a membrana externa e a membrana citoplasmática denominada de região periplasmática. Nessas reações envolve a conversão da glicose, como substrato, em celulose, através da ação de quatro enzimas específicas. Primeiramente a glicose é fosforilada em glicose-6-fosfato pela ação da enzima glicoquinase (GK). Em seguida glicose-6-fosfato é convertida em glicose-1-fosfato pela ação da enzima fosfoglucomutase (PGM) através de uma reação de isomerização. Após a reação de conversão a glicose-1-fosfato é transformada em uridina difosfato glicose (UDP-glicose) pela enzima UDP-glicose-pirofosforilase (UGP). Por fim, a molécula de UDP-glicose produzida é utilizada como substrato pela enzima celulose sintase (CS) para dar início a reação da polimerização da glicose nas cadeias  $\beta$ -1,4-glicose (LEE et al., 2014; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

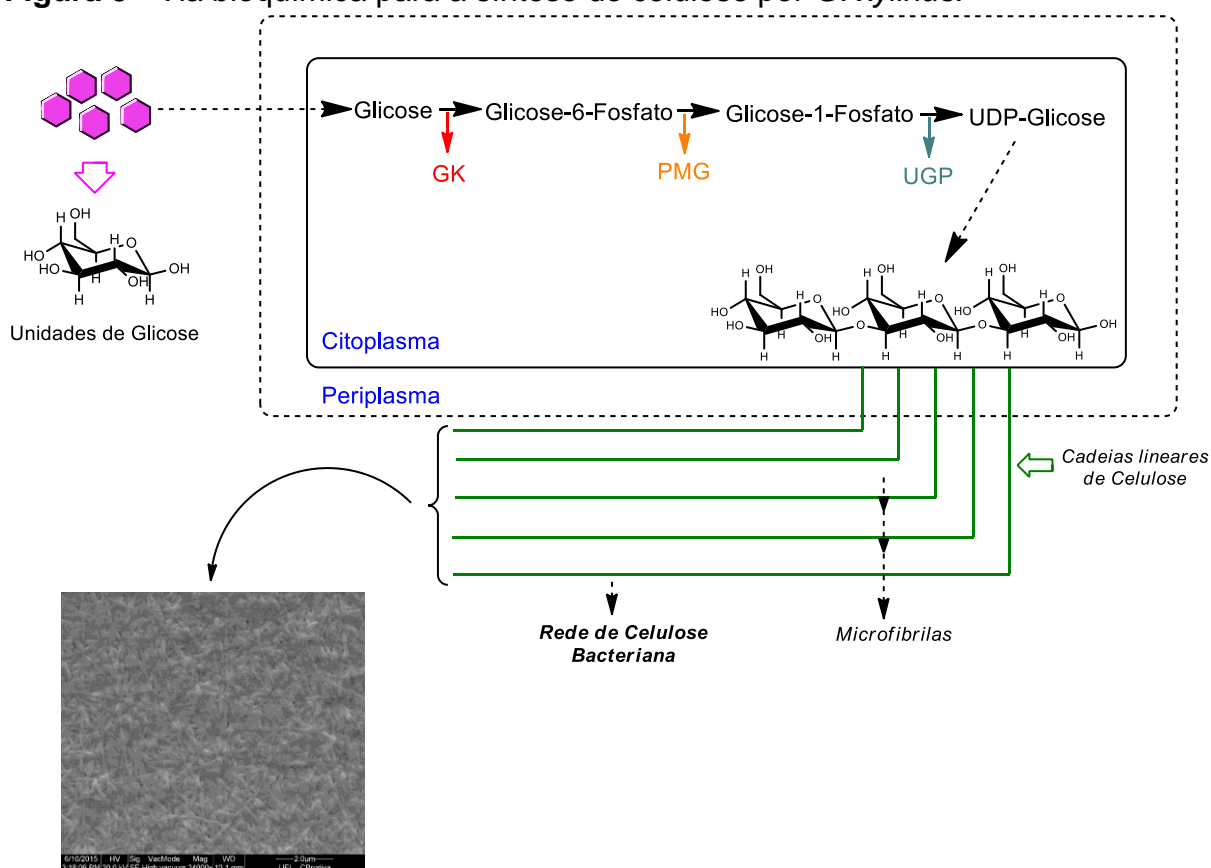
Em uma única célula a celulose sintase pode polimerizar cerca de 200.000 moléculas de glicose por segundo, sendo que cada microfibrila de celulose apresenta de 1 a 25 nm de largura, correspondendo de 10 a 250 fitas, e 1 – 9  $\mu\text{m}$  de comprimento, correspondendo a 2.000 a 18.000 resíduos de glicose. Cada fita de celulose liberada extracelularmente é composta por aproximadamente 46 microfibrilas de celulose (LIN et al., 2013).

Após a polimerização dos monômeros de glicose em cadeias poliméricas lineares ocorre a excreção dessas cadeias para superfície celular no ambiente extracelular através do complexo parede/membrana para que possam ser unidas e cristalizadas em fitas de microfibrilas de celulose altamente organizadas através da ação da enzima celulose sintase (CHAWLA et al., 2009; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991). A celulose sintase é ativada alostericamente pelo ácido diguanilmonofosfato (c-di-GMP) que está ligado a membrana. Caso esse ativador esteja ausente a enzima permanece inativa ou apresenta baixa atividade enzimática, mas com a adição de dinucleotídeos cíclicos estimula a ação da celulose sintase. O di-GMPc é considerado um efetor alostérico que se liga reversivelmente na enzima em um sítio distinto ao do substrato (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

A película de celulose bacteriana formada na interface ar/líquido tem mais acesso ao oxigênio necessário para seu crescimento, tem a função de proteger as

células contra as radiações UV, aumentando a capacidade de colonização das bactérias sobre os substratos presentes no meio de cultivo e por ser um biomaterial higroscópico permite manter a umidade do ambiente enquanto a bactéria está produzindo (CHÁVEZ-PACHECO et al., 2004; WILLIAMS; CANNON, 1989).

**Figura 5** - Via bioquímica para a síntese de celulose por *G. xylinus*.



**Fonte:** Próprio autor

Considerando que a película gelatinosa de celulose bacteriana excretada é de alto grau de pureza, o método purificação para eliminação de impureza é relativamente simples, ou seja, a membrana de celulose deve ser tratada com uma solução de hidróxido de sódio para eliminação das bactérias que estão inseridas na película e em seguida lavada com água exaustivamente até pH neutro (KESHK, 2014; MOON et al., 2011).

#### 4.2.1.1 Condições para produção da celulose bacteriana

As condições em que são submetidas a cultura pode influenciar na estrutura e forma da membrana de celulose produzida. Na literatura encontra-se estudos de produção de celulose em condições estáticas e sob agitação, o que origina microfibrilas de diferentes formas. Quando a cultura é estática a membrana de celulose produzida pelo microrganismo fica aglomerada na superfície e as microfibrilas encontram-se uniaxialmente orientadas. Quando a cultura sob condição agitada forma-se pedaços de membranas dispersos no meio, ou seja, apresenta um estrutura desordenada com microfibrilas mais finas devido a força que é exercida durante a agitação (CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004; GOELZER et al., 2009; KESHK, 2014). As microfibrilas de celulose produzidas por fermentação em condições estáticas por 10 dias, utilizando como substrato a glicose, apresentam membranas com uma largura de 60 – 80 nm (GOELZER et al., 2009).

Além da estrutura o rendimento da celulose bacteriana também é dependente da condições submetidas (agitação ou estática), do meio de cultivo e da concentração da fonte de carbono utilizado (CHAWLA et al., 2009). Diferentes fontes de carbono, como monossacarídeos, dissacarídeos e álcoois podem ser utilizados como substrato para produção de membranas de celulose por *G. xylinus*. Utilizando o glicerol como fonte de carbono resulta em um maior rendimento e uma menor taxa de consumo, já a glicose, como fonte de carbono, é consumida quase totalmente depois de 7 dias de fermentação e proporciona maiores valores de cristalinidade para celulose bacteriana (KESHK; SAMESHIMA, 2005). Fontes alternativas, como resíduos industriais, também podem ser utilizados como fontes de carbono, o que impacta no custo da produção (GOELZER et al., 2009). Quando cultivada em condições estáticas no terceiro dia de incubação a quantidade de celulose aumenta linearmente (MASAOKA; OHE; SAKOTA, 1993).

Outro fator importante para produção de BC é o pH, podendo variar de acordo com a fonte de carbono utilizada. A faixa de pH deve estar entre de 4,0 – 6,0. Em cultura estática ocorre a diminuição do pH devido a respiração celular que envolve a oxidação do etanol a ácido acético e a conversão de glicose em ácido glucônico (LIN et al., 2013; MASAOKA; OHE; SAKOTA, 1993), sendo assim o pH deve ser monitorado constantemente. A temperatura ótima de produção de BC varia entre 28 °C a 30 °C (IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000).

#### **4.2.2 Aplicações Celulose Bacteriana**

Ao longo do tempo inúmeros estudos vêm demonstrando diversas aplicações para a celulose bacteriana devido as suas propriedades. Na área da saúde a membrana de celulose bacteriana tem seu maior uso, no tratamento de feridas e em enxerto ósseo ou de pele, pois possui uma estrutura microfibrilar que se assemelha a matrix extracelular da pele humana, auxiliando no processo de cicatrização (CZAJA et al., 2007; LUAN et al., 2012).

A membrana de celulose bacteriana proporciona o crescimento dos vasos sanguíneos, regulando a angiogênese, e a formação de derme e epiderme através da regulação da expressão de colágeno, sem efeitos tóxicos (KWAK et al., 2015). Queimaduras de segundo grau e feridas de úlceras diabéticas também podem ser curadas pela aplicação de membranas de celulose bacteriana, a qual atua como suporte para regeneração do tecido e formação de células endoteliais, encurtando o tempo de epitelização (SOLWAY; CLARK; LEVINSON, 2011). Por ser um material transparente as membranas de celulose proporcionam o monitoramento da cicatrização de ferida quando utilizado como um curativo na superfície da pele (LI et al., 2014).

Devido às propriedades mecânicas desse biomaterial também vem se estudando o uso da celulose como tecido cardiovascular (KESHK, 2014). A celulose bacteriana na forma de hidrogéis tubulares foram aplicadas em ovelhas como enxerto vasculares com intuito de substituir as artérias caróticas. A BC desempenhou um papel importante como um suporte para neoformação da parede vascular, porém de baixa permeabilidade, sendo considerado como um material promissor para cirurgias cardiovascular (SCHERNER et al., 2014).

Ressaltando que, para ser utilizada como material biomédico deve ser biocompatível, ou seja, quando em contato com o ser vivo não deve causar nenhum feito tóxico ou alérgico (CZAJA et al., 2007).

Além da área da saúde a celulose bacteriana pode ser aplicada em alto falantes e fone de ouvido, propiciando alta velocidade do som e baixa perda de dinâmica; na produção de papel; em dispositivos médicos; em membrana de separação, entre outras finalidades (IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000).

A celulose bacteriana também possui aplicação na área alimentícia devido algumas propriedades, como capacidade de formar géis e alta viscosidade. Dentre as

suas aplicações destaca-se o gel de celulose bacteriana, denominado de Nata, que atualmente é utilizada como sobremesa; a utilização em alimentos como espessante, estabilizante e modificador da textura; e a utilização como material de embalagem de alimentos (SHI et al., 2014).

#### **4.2.3 Compósitos poliméricos a base de Celulose Bacteriana**

A junção de diferentes compostos com a celulose bacteriana formam compósitos poliméricos com cristalinidades e propriedades térmicas diferentes (OLIVEIRA BARUD et al., 2015). O desenvolvimento de materiais artificiais com princípios biomiméticos tem sido estudado. Esses biomateriais tem como característica uma estrutura fibrosa em nanoescala que podem ser utilizados na reprodução da matriz extracelular, permitindo a construção de andaimes com base em nanofibras que auxiliam na engenharia de tecidos. Diferentes biopolímeros naturais unidos podem formar nanofibras multifuncionais com atuação na regeneração tecidual (ASHAMMAKHI et al., 2012).

Na literatura pode-se encontrar diferentes exemplos de compostos que podem ser adicionados no meio de cultivo da celulose bacteriana com intuito de avaliar as alterações na morfologia, rendimento e cristalinidade e produzir diferentes biomateriais para aplicação na área biomédica, como o Ácido Hialurônico produzido por *Streptococcus* (DE OLYVEIRA et al., 2015; LOPES et al., 2014), óxido de grafeno (ZHU et al., 2015), poli-3-hidroxibutirato (PHB) (RUKA; SIMON; DEAN, 2013), ágar (BAE; SUGANO; SHODA, 2004), condroitin sulfato (EL-HOSENY et al., 2015) e amido (GRANDE et al., 2009). Esses compostos interagem com a rede fibrilar da celulose bacteriana que está sendo produzida pela bactéria (RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015).

A mistura de um biopolímero natural, como ácido hialurônico, com a celulose bacteriana resulta em membranas híbridas com diferentes cristalinidades e diferentes propriedades térmicas e morfológicas (LOPES et al., 2014). Quando formados os compósitos de BC-HA, o HA interage com as nanofibrilas de celulose bacteriana pelas regiões amorfas (LI et al., 2014). O HA tem um papel importante nas membranas de celulose, pois contribuem para proliferação, diferenciação e migração das células durante a regeneração e cicatrização de tecidos (GERECHT et al., 2007).

Membranas de BC-HA foram desenvolvidas através da impregnação da celulose bacteriana em diferentes concentrações de HA. Após o desenvolvimento do material houve a caracterização. Mediante aos resultados obtidos através de testes de crescimento celular e análise histológica verificou-se que o compósito formulado apresentou melhor capacidade de absorção de água, quando comparado com a BC pura, o que satisfaz aos requisitos de respiração da pele lesada. Os filmes BC-HA também proporcionaram o crescimento, adesão e proliferação das células de fibroblastos humanos, evidenciando sua baixa toxicidade, e dependendo da concentração de HA utilizada apresentou resultados significantes na reparação de tecido (LI et al., 2015).

Em relação à capacidade de retenção de água, quando formado BC-HA, o HA aumenta a hidrofiliabilidade da superfície da película, fazendo com que a perda de água pela celulose seja mais lenta, o que permite que o ambiente em que está aplicada a película permaneça úmido por mais tempo, aumentando a capacidade de cicatrização (LI et al., 2014).

Nesse sentido a formação de biomateriais compostos por celulose bacteriana e ácido hialurônico desperta interesse tanto por obter novos materiais que apresentam propriedades distintas e/ou melhoradas, tanto pela sua capacidade de mimetizar um ambiente mais próximo ao tecido original (pele) acelerando a regeneração.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Materiais

As cristas de frango utilizada para o isolamento do ácido hialurônico foi obtida de um abatedouro localizado em Jaguapitã no estado do Paraná, onde foram mantidas congeladas em freezer a -20°C. O ácido hialurônico isolado (HA-SAB) passou por um processo enzimático com duas enzimas: uma lipase denominada de Lipolase (Lipolase 100 L, batch LAP40080) e uma protease denominada de Novo Pro-D (Novo Pro-D Enzyme, batch PBVD1001). Ambas enzimas foram gentilmente fornecidas pela Novozymes Latin América (Araucária, Paraná, Brasil). A resina aniônica utilizada no processo de isolamento do ácido hialurônico foi a LEWATIT S 5428 da Lanxess, São Paulo.

O ácido hialurônico padrão (HA-P; Hyaluronic Acid sodium salt produzido a partir de *Streptococcus equi*; batch BCBB0912) foi comprado na empresa Sigma-Aldrich e a cepa utilizada nesse estudo para a produção de celulose bacteriana foi a *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769, sendo essa obtida na Fundação André Tosello localizado em Campinas, São Paulo.

### 5.2 Métodos

#### 5.2.1 Testes Preliminares

Para realização dos teste preliminares 1,2 kg de cristas de frango foram descongeladas e trituradas até virar uma pasta com auxílio de um liquidificador. Em seguida as cristas foram desidratadas com acetona e deslipidificadas com clorofórmio pelo método de Shoxlet. Após essa etapa o material obtido passou por uma digestão enzimática com uma protease sob condições controladas, pH 7,8 e temperatura 58°C respectivamente. O material obtido foi precipitado com etanol na proporção de 1:1 (v/v) e seco em estufa a 50 °C por no mínimo 12 horas.

Devido os resultados insatisfatórios obtidos nesse primeiro teste foram realizadas novas etapas. O produto obtido foi submetido a uma nova digestão enzimática com uma protease, diálise com água destilada, centrifugação a 9.000 RPM e 6 °C por 10 minutos, liofilização, lavagem com etanol, centrifugação e secagem em estufa a 50 °C por no mínimo 12 horas (OLIVEIRA, 2015).

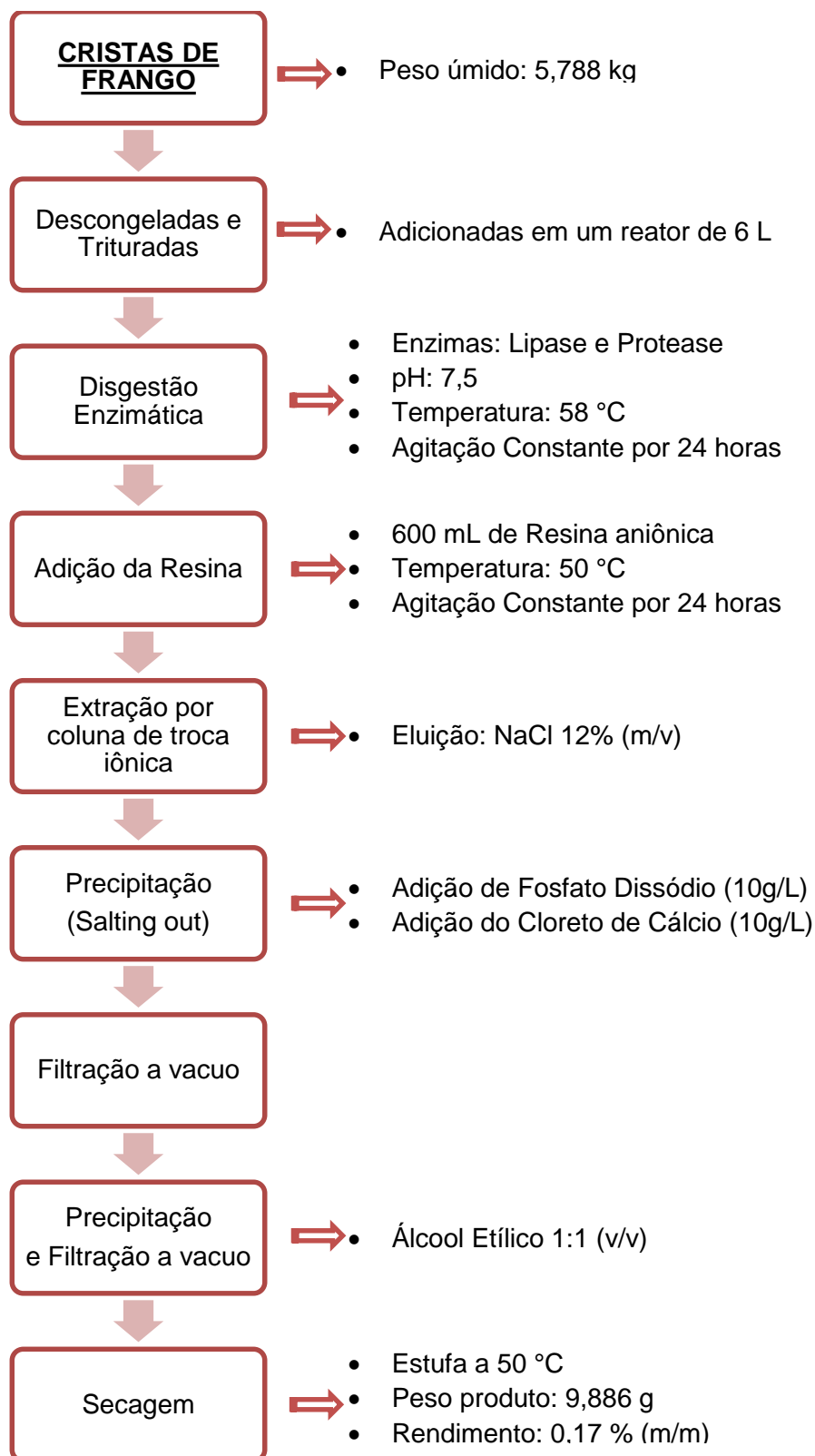
### **5.2.2 Método de extração do ácido hialurônico das cristas de frango**

5,788 kg de cristas de frango foram descongeladas e trituradas com água destilada até virar uma pasta com auxílio de um liquidificador. As cristas foram submetidas a uma digestão enzimática com uma Protease (Enzima Novo Pro D - Novozymes) e uma Lipase (Lipolase - Novozymes). O pH e a temperatura do processo foram monitorados para que permanecesse dentro da faixa de pH e temperatura ótima da ação das enzimas, pH aproximadamente 7,5 e temperatura aproximadamente 58°C. Primeiramente, logo após a correção do pH e temperatura, foi adicionado 3 mL da Lipolase nos seguintes tempos: *tempo 0*: 1 mL; *tempo 1 (dez minutos depois da primeira adição)*: 1 mL; *tempo 2 (dez minutos depois da segunda adição)*: 1 mL. A lipolase ficou agindo por uma hora. Em seguida a protease foi adicionada em três tempos, conforme os tempos estabelecidos para a adição da lipolase. A etapa de digestão enzimática ocorreu sob agitação constante.

A solução resultante formou duas fases, sendo a fase lipídica descartada e na fase aquosa adicionada resina aniônica e a solução aquecida a 50°C por 14 horas. Após a interação da resina com a amostra, a resina foi coletada e o líquido, considerado com efluente, foi descartado. A resina foi transferida para uma coluna e eluída com solução de cloreto de sódio 12% (m/v).

O extrato de HA obtido foi tratado com cloreto de cálcio (10 g/L) e fosfato dissódico (10 g/L), onde foi primeiramente adicionado o fosfato dissódico e após 10 min. de reação foi adicionado o cloreto de cálcio. Ao término dessa etapa a solução permaneceu em repouso até a formação de um precipitado, sendo esse filtrado para separação de impurezas proteicas da solução. Na solução filtrada foi adicionado etanol na solução, em uma proporção de 1:1 (v/v), e deixado em repouso no congelador por 24 horas. Após o tempo determinado, a solução foi filtrada a vácuo, sendo que o precipitado ficou retido no papel filtro. O material foi seco a 50 °C.

**Figura 6** - Fluxograma do processo de extração do ácido hialurônico da crista de frango.



Fonte: Próprio autor

### **5.2.3 Produção de membranas de celulose**

#### **5.2.3.1 *Microrganismo, condição de estocagem e preparo do meio de cultura***

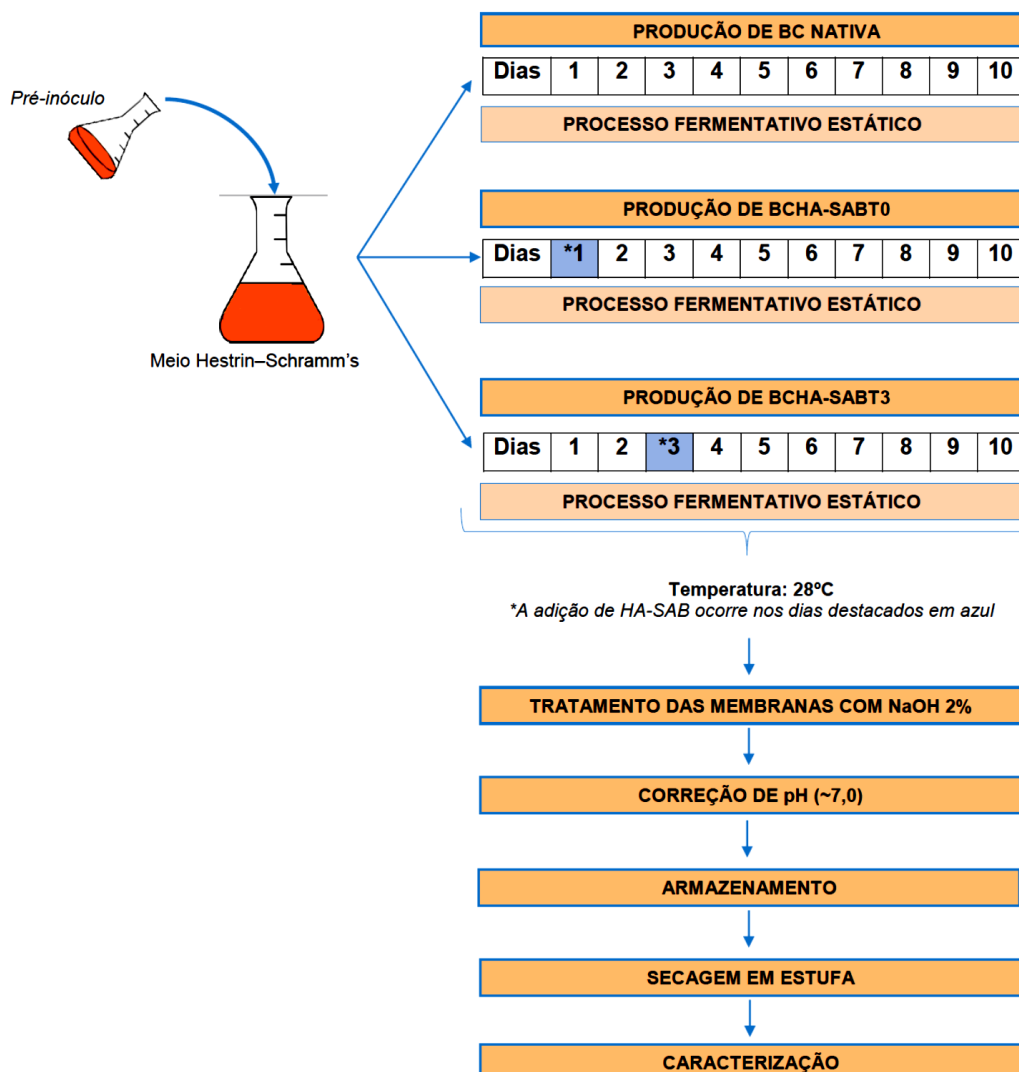
As bactérias utilizadas neste estudo para produção de membrana de celulose bacteriana foi a *Gluconacetobacter hansenni* ATCC 23769 de procedência da fundação André Tosello, Campinas, São Paulo, Brasil. A cepa *G. Hansenni* foi estocada em glicerol 30 % a -80 °C. O meio para produção das membranas é

#### **5.2.3.2 *Preparo do pré-inoculo e processo de Fermentação***

A cepa bacteriana *G. hansenni* foi ativada e sincronizada em meio de Hestrin-Schramm's (HS) constituído de 32 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 4 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 4 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 4 g.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,92 g.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, por 48 horas e 28 °C. A concentração das células foram ajustadas para 5 % e uma alíquota de 1 µL foi transferida para 80 mL de meio HS modificado.

Pela agitação do frasco durante o crescimento da cultura apareceu uma fina suspensão de células e aglomerados irregulares de diferentes tamanhos. Após dois dias de crescimento as células em suspensão foram transferidas para um erlenmeyer contendo 720 mL de meio Hestrin-Schramm's, misturadas e transferidas para placas de petri em um volume de 55 mL em cada placa. A produção de celulose bacteriana foi realizada em condições estáticas por 10 dias a 28°C, independente da presença ou não do ácido hialurônico.

**Figura 7** - Fluxograma do processo produção de membranas de celulose nativa e dos compósitos poliméricos



Fonte: Próprio autor

Os compósitos poliméricos de celulose bacteriana e ácido hialurônico (BCHA-SAB) foram obtidas pela adição de uma solução de HA-SAB 11% (m/v), previamente preparada, nas placas de petri contendo 55 mL do inóculo, resultando em uma concentração final de 1% (m/v) de HA-SAB. O HA-SAB foi adicionado ao inóculo em dois momentos diferentes: no primeiro dia de fermentação (BCHA-SABT0) e no terceiro dia de fermentação BCHA-SABT3. Ao término dos dez dias de fermentação as membranas de celuloses bacterianas foram removidas da cultura estática e purificadas através da imersão em uma solução aquosa de NaOH 2% por um dia. As películas de celulose bacteriana nativa e os compósitos poliméricos foram lavadas com água destilada exaustivamente até remover completamente a solução

alcalina e deixa-las em pH neutro. As membranas foram secas em estufas a 40 °C (LOPES et al., 2014).

#### **5.2.4 Caracterização do Ácido Hialurônico Isolado (HA-SAB), da membrana de celulose bacteriana nativa e dos compósitos poliméricos**

##### **5.2.4.1 Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)**

Os espectros de FT-IR das amostras foram obtidos através do espectrômetro de infravermelho Shimadzu FT-IR 8300 (Shimadzu, Japan) no modo de transmissão e no intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros de FT-IR foram realizados no Laboratório Multiusuário da Universidade Estadual de Londrina.

Uma porção da amostra de HA-SAB foi misturada com um sal, o brometo de potássio (KBr), triturou e prensou através de uma prensa hidráulica em alta pressão, a fim de formar uma pastilha translúcida por onde a luz pode passar. O brometo de potássio não interfere nos resultados, pois não absorve as radiações infravermelha, fazendo com os sinais sejam apenas do analito. Também foi realizado análise de FT-IR do ácido hialurônico padrão para comparação dos espectros obtidos.

Para análise das membranas foram utilizadas amostras secas de membranas de celulose bacteriana nativa e dos compósitos poliméricos. Essas amostras foram analisadas diretamente no equipamento através de um suporte.

##### **5.2.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética (RMN)**

Para caracterização do HA-SAB, HA-P, membrana de celulose nativa e compósitos poliméricos por RMN os experimentos foram realizados a 24 °C no equipamento ADVANCE 400 da Bruker que está localizado no Laboratório Multiusuário de Ressonância Magnética Nuclear da UEL. Este equipamento foi operado a 100,6 MHz para carbono ( $^{13}\text{C}$ ) através da técnica de polarização cruzada (CP) e rotação no ângulo mágico (MAS).

Através dos espectros foi possível calcular o índice de cristalinidade das membranas com a Equação 1, onde  $I_c$  é o índice de cristalinidade,  $I$  é o valor da integração do pico cristalino do C4 e  $I_a$  é o valor da integração do pico amorfo do C4.

A integração dos picos foi realizada com auxílio do software 1D NMR Processor (FARIA-TISCHER et al., 2015).

$$I_c = I/(I_a + I) \times 100 \text{ Equação 1}$$

#### 5.2.4.3 *Análise termogravimétrica (TGA)*

A degradação térmica do HA-P e HA-SAB foi realizada através do analisador térmico fabricado pela Netzsch, modelo STA 449 F3 Jupiter. Durante a análise foi utilizado N<sub>2</sub> como gás de purga com uma vazão de 50 mL.min<sup>-1</sup>. Os experimentos foram conduzidos em condições atmosféricas controladas, na faixa de 25 ° a 900 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °/min. Aproximadamente 5 mg de amostra foi colocada no cadinho de alumina, utilizando um cadinho vazio como referência.

A análise termogravimétrica das membranas de celuloses nativa e dos compósitos poliméricos foi realizado em condições atmosféricas controladas, em uma taxa de aquecimento de 30 °C por min. na faixa de 50 ° a 600 °C, usando o TGA o analisador térmico 50 Shimadzu (LOPES et al., 2014).

A análise de degradação térmica do HA-SAB e HA-P foi realizada na Universidade Federal do Paraná e das membranas foram realizados no Laboratório Multiusuário da Universidade Estadual de Londrina.

#### 5.2.4.4 *Determinação da massa molar e homogeneidade do HA-SAB e HA-P*

HPSEC (Cromatografia de Exclusão por tamanho de alta performance) acoplada com multidetectores foi utilizada para determinar a massa molar numérica (*M<sub>n</sub>*), a massa molar média ponderal (*M<sub>w</sub>*) e a polidispersividade ( $PD = M_w/M_n$ ) das amostras em um modelo Waters 2410 equipado com quatro colunas (Ultrahydrogel 2000, 500, 250 e 120 de peso molecular, variando de  $7 \times 10^6$  a  $1 \times 10^2$  g mol<sup>-1</sup>, Milford, MA, EUA). Este equipamento estava ligado em série e acoplado ao sistema multidetecção consistindo de um detector de índice de refração (RI) Waters 2410 (Milford, MA, USA) e de um detector de espalhamento de luz laser multi angular (MALLS) DSP-F Wyatt Technology (Santa Barbara, CA, EUA).

Utilizou-se  $\text{NaNO}_2$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) contendo  $\text{NaN}_3$  ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) como eluente a um fluxo de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ . As amostras HA-P e HA-SAB foram dispersas no eluente gerando concentrações de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente, e filtradas ( $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ , filtros de acetato de celulose, Millipore). Após a extração, o material resultante correspondente a amostra HA-SAB foi dialisada antes da preparação das experiências HPSEC. Os experimentos foram conduzidos a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . O valor  $dn/dc$  foi obtido a partir da literatura (KANG et al., 2010) e definido a  $0,185 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . Os dados foram analisados utilizando o software ASTRA 4.70.07.

#### 5.2.4.5 Difração de Raio X (DRX)

As amostras das membranas de celulose bacteriana nativa e dos compósitos poliméricos foram analisadas por difratometria de raios X  $\theta - 2\theta$  utilizando o Difratômetro Panalytical X'Pert PRO MPD. O feixe monocromático incidente de Cu (K2) foi excitado a  $40 \text{ kV}$  e  $30 \text{ mA}$ , sendo registrado a partir de  $5$  a  $60^\circ$  ( $2\theta$ ) com uma taxa de varredura de  $0,002^\circ/\text{s}$ . O tamanho do cristalito foi medido pela equação de Scherrer (Equação 2), onde  $K$  é  $0,90$  (fator de forma), o comprimento de onda é  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$  e  $\theta$  é o ângulo de difração a partir da amostra em graus e  $\beta$  é a largura a meia altura (FWHM) em  $2\theta$  radianos. Para a difração de Raio-X os picos obtidos estavam de acordo com a função lorentziana, sendo assim  $\beta$  deveria ser corrigido subtraindo-se pela FWHM instrumental ( $\beta_{\text{inst}}$ ) a partir da medida  $1$  ( $\beta_{\text{meas}}$ ), conforme demonstrado na Equação 3 (MERCURI et al., 2015).

$$D = \frac{k \cdot \lambda}{\beta_{2\theta} \cdot \cos \theta} \quad \text{Equação 2}$$

$$\beta_{2\theta} = \beta_{\text{measured}} - \beta_{\text{instrumental}} \quad \text{Equação 3}$$

O índice de cristalinidade foi determinado pelo método de Segal (Equação 4), onde  $I_{\text{am}}$  é a intensidade do halo amorfo em  $18,05^\circ$  ( $2\theta$ ) e  $I_{002}$  é a intensidade do pico de difração 002 da celulose.

$$I_c = 1 - I_{\text{am}}/I_{002} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

#### 5.2.4.6 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

A morfologia das membranas foi analisada usando microscópio eletrônico FEI Quanta 200 (Holanda). Fragmentos de NXN foram montados em suporte de alumínio com fita de carbono dupla face, pulverizadas com um filme de ouro (40 – 50 nm) (BALTEC SDC 050, Alemanha) e observadas em microscópio eletrônico de varredura. As eletromicrografias foram elevadas em modo topográficos (elétrons secundários) a 20 kV. As foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

#### 5.2.4.7 *Microscopia de força atômica (AFM)*

As imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) foram obtidas no modo Tapping Mode usando microscópio NanoSurf Flex AFM (NanoSurf, Switzerland). A análise foi realizada em ar à temperatura ambiente e as imagens de topografia (10x10  $\mu\text{m}^2$ , 512 x 512 pixels) foram coletadas com velocidade de escaneamento de 1 a 3 Hz. O tratamento das imagens foi feito usando o software Gwyddion e foram analisadas topografia e rugosidade das membranas. As imagens de microscopia de força atômica foram realizadas na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Otimização do processo de isolamento do ácido hialurônico**

Durante a etapa de otimização do processo de isolamento do ácido hialurônico da crista de frango foram realizados alguns testes preliminares com intuito de definir as principais etapas de produção do ácido hialurônico e obter um material mais puro.

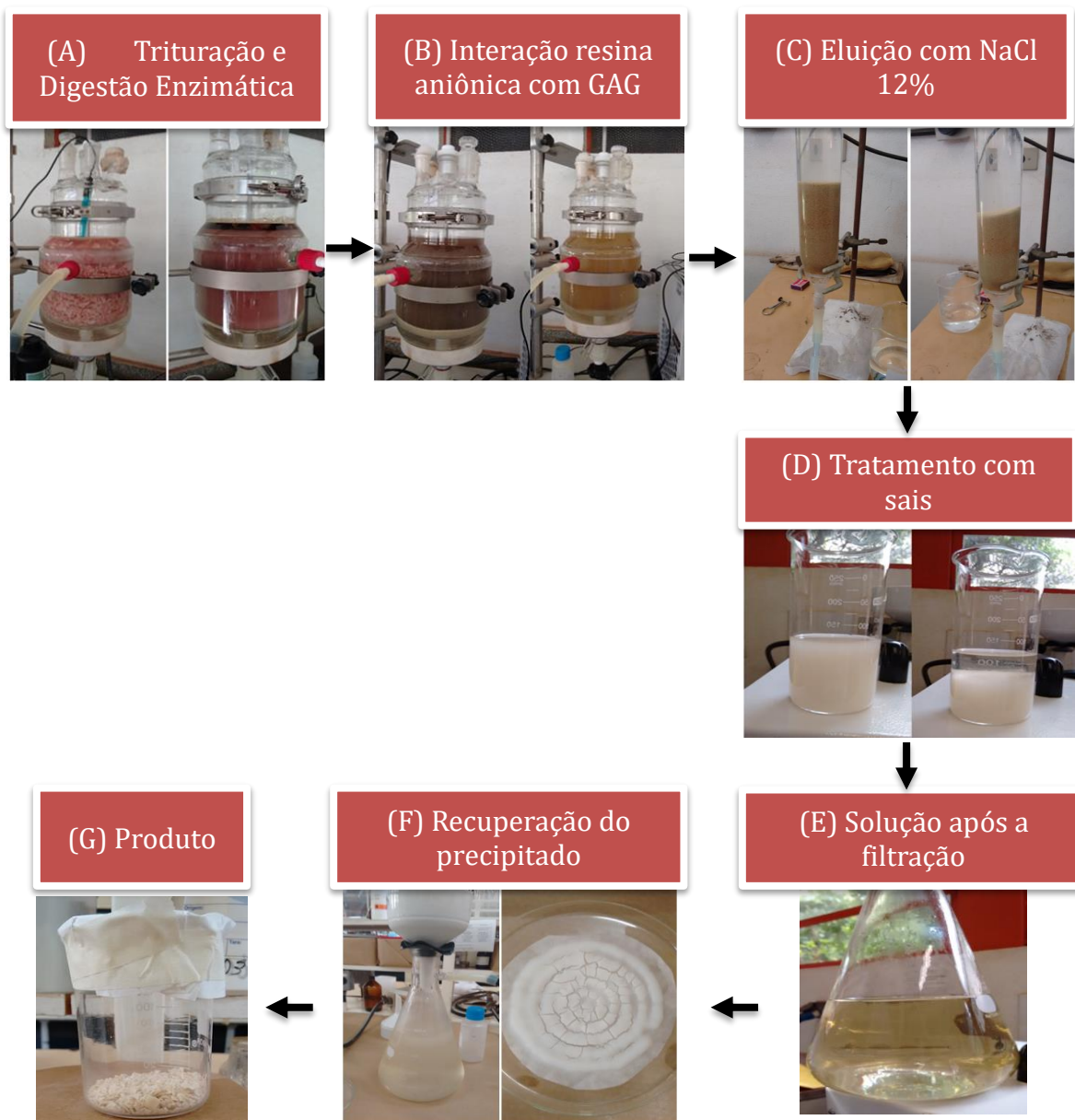
Os primeiros testes realizados envolveram etapas de trituração, desidratação com acetona, deslipidificação com clorofórmio pelo método de Soxhlet, digestão enzimática com uma protease comercial, precipitação com etanol e secagem, porém quando analisado o material por RMN de  $^{13}\text{C}$  verificou-se grande quantidade de aminoácidos e lipídeos. Com os resultados obtidos o produto foi submetido a um novo processo, que envolveram etapas de digestão enzimática com uma protease, diálise, centrifugação, lavagem com etanol, centrifugação e secagem, no entanto quando caracterizado o material pela técnica de RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido foi verificado grande quantidade de proteína, sendo inviável uma nova purificação.

Após resultados não satisfatórios foi definido uma nova metodologia para isolamento do ácido hialurônico. O novo processo estabelecido envolveu a utilização de uma mistura de enzimas comerciais (protease e lipase), devido a algumas vantagens, quanto ao desmembramento do material orgânico do subproduto animal se comparado ao processo de deslipidificação com solvente orgânico, que gera ainda um passivo ambiental grande. Outra mudança foi a utilização de uma resina aniônica, visto que permitem a separação de compostos ionizados de modo seletivo frente aos neutros, extraindo o produto de interesse, e ainda pode ser reutilizado em novas extrações.

Em ambos os processos as cristas de frango foram primeiramente trituradas e houve a utilização de pelo menos uma enzima (protease). A trituração e homogeneização do tecido aumentam a superfície de contato do material, facilitando o processo de extração. Processos enzimáticos e com solventes orgânicos agem nas estruturas celulares facilitando a desintegração do material e liberação do glicosaminoglicano, HA (IGNATOVA; GUROV, 1990).

A Figura 8 contém a sequência das etapas do processo de isolamento de HA da crista de frango otimizado.

**Figura 8** - Ilustração das etapas do processo de extração do ácido hialurônico da crista de frango: **(A)** Antes e depois da ação das enzimas (protease e lipase) sobre as cristas de frango, fase lipídica descartada do processo; **(B)** Antes e depois da interação da resina aniônica com solução resultante da etapa anterior. Fase líquida descartada do processo; **(C)** Antes e depois da análise cromatográfica. A eluição do GAG ocorreu com um solução de cloreto de sódio 12%; **(D)** Precipitação salting out com fosfato dissódico e cloreto de cálcio; **(E)** Após a precipitação ocorreu a filtração e o precipitado foi descartado e a parte líquida continuou no processo para precipitação com etanol; **(F)** Com a formação do precipitado o material foi filtrado e retido no papel filtro; **(G)** Produto obtido após a secagem.



Levando em consideração as etapas utilizadas no isolamento do HA da crista de frango destaca-se o uso de uma resina de troca iônica sintética. Resinas ou colunas de troca iônica auxiliam no fracionamento do ácido hialurônico com diferentes

massas moleculares a partir de um gradiente de eluição, sendo que em concentrações baixas, em torno de 0,05 M do eluente (NaCl), ocorre primeiramente a eluição de substâncias indesejáveis, como as proteínas (BERMAN, 1963; SHIMADA; MATSUMURA, 1977; YUAN et al., 2015). O fracionamento do HA ocorre quando o grupo carboxílico da molécula de HA está na sua forma ionizada COO<sup>-</sup> (carboxilato), pKa em torno de 4, fazendo com que ocorra a interação deste com a resina, trocando o grupamento aniônico. Portanto, quanto maior o número de grupos carregados presentes na molécula maior será a massa molar do glicosaminoglicano obtido.

Após a eluição do extrato foi realizado um tratamento com sais de cloreto de cálcio e fosfato dissódico. Este tratamento baseia-se no efeito de "*salting out*". O efeito *salting out* está relacionado com a redução da solubilidade em água da proteína em uma solução, pela adição de sais, ocorrendo assim a precipitação (ARAKAWA; TIMASHEFF; ARAKAWA S.N., 1984). A ordem de adição dos sais e a escolha dos mesmos foi baseada na série de Hofmeister, que classifica a influência dos íons em uma variedade de processos aquosos. Na série contém uma sequência de íons classificados de acordo de sua capacidade de interferir na solubilidade de proteínas (Ânions: CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> > SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> > H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> > F<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > NO<sub>3</sub><sup>-</sup> > I<sup>-</sup> > ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> > SCN<sup>-</sup> / Cátions: Mg<sup>2+</sup> < Ca<sup>2+</sup> < H<sup>+</sup> < Na<sup>+</sup> < K<sup>+</sup> < Cs<sup>+</sup> < NH<sub>4</sub><sup>+</sup> < N(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>+</sup>). O efeito dos ânions é maior do que dos cátions em uma solução, sendo que os membros iniciais da série aumentam a tensão superficial, diminui a solubilidade (*salting out*) e aumenta a estabilidade das proteínas (MÜLLER; FAUDE, 2008; ZHANG; CREMER, 2006). O extrato de ácido hialurônico foi tratado com cloreto de cálcio e fosfato dissódico para a precipitação de impurezas proteicas. Esse método de purificação é eficaz e reduz o uso de materiais orgânicos tóxicos e ainda reduz etapas adicionais (KIM et al., 2007).

O processo de isolamento de ácido hialurônico utilizado neste trabalho resultou na produção de um HA de baixa massa molar, conforme será discutido no item 6.1.1.3 deste trabalho. Em geral, o ácido hialurônico extraído da crista de galo apresenta uma massa molar em torno de 1.10<sup>6</sup> KDa (SWANN, 1967). Foi obtido 9,886g de ácido hialurônico (HA-SAB) a partir de 5,788 kg de crista de frango, resultando em um rendimento de aproximadamente 0,17 % m/m em relação ao tecido úmido. O baixo rendimento e baixa polidispersividade do HA obtido pode estar relacionado com a série de etapas que é submetida a crista de frango para o isolamento do ácido hialurônico (BOERIU et al., 2013). Através dessa série de etapas acredita-se que a baixa polidispersividade mostrou que a padronização do processo

foi eficiente, pois foi possível obter de forma homogênea HA de peso moleculares próximos.

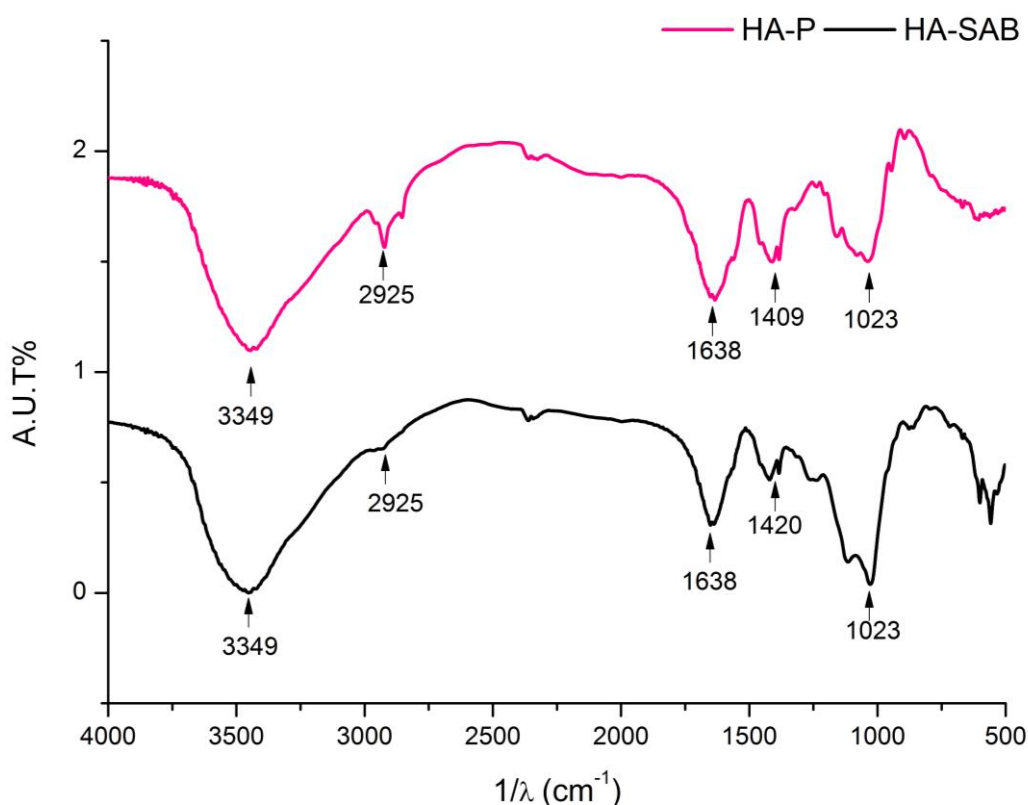
### 6.1.1 Caracterização do ácido hialurônico da crista de frango

#### 6.1.1.1 Caracterização espectroscópica do ácido hialurônico da crista de frango

Para caracterizar a estrutura do material isolado da crista de frango foram realizadas análises de espectroscopia no infravermelho (FT-IR) e ressonância magnética nuclear (RMN). O material isolado de crista de frango foi analisado comparativamente ao ácido hialurônico de *Streptococcus equi*, aqui denominado de HA-P (Hyaluronic Acid sodium salt Sigma, from *S. equi*; batch BCBB0912).

Foram analisadas duas amostras por FT-IR (Figura 9): HA-SAB e HA-P para identificação e verificação da estrutura do material isolado, na qual foi realizado a comparação dos espectros com intuito de analisar os grupos químicos que estão presentes na molécula. Bandas de absorção específicas encontradas em ambos os espectros confirmaram a identidade do material isolado.

**Figura 9** - Espectro de Infravermelho (FT-IR) do Ácido Hialurônico Padrão (HA-P) e do Ácido Hialurônico isolado da crista de frango (HA-SAB).



A presença de uma banda em  $3349\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a região de estiramento do OH e NH. Banda de absorção de C-H alifático foi verificada em  $2925\text{ cm}^{-1}$ . A banda em  $1638\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao grupo C=O de amidas. A banda em  $1420\text{ cm}^{-1}$  confere ao estiramento do  $\text{COO}^-$ , a qual se refere ao grupamento ácido da molécula de HA. As bandas em  $1638$  e  $1420\text{ cm}^{-1}$  está relacionada ao modo de alongamento assimétrico (C=O) e simétrico (C-O) dos grupos carboxilos presente no ácido hialurônico (CHANG; LIAO; CHEN, 2013) . A banda de absorção em  $1023\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento da ligação de C-OH. Os deslocamentos do grupo COOH protonado são descritos em  $1735$  e  $1255\text{ cm}^{-1}$  (GILLI et al., 1994; WU, 2012). Todas as bandas de absorção citadas acima foram baseadas em resultados similares encontrados na literatura (ALKRAD et al., 2003; KIM et al., 2008; REDDY; KARUNAKARAN, 2013; WU, 2012).

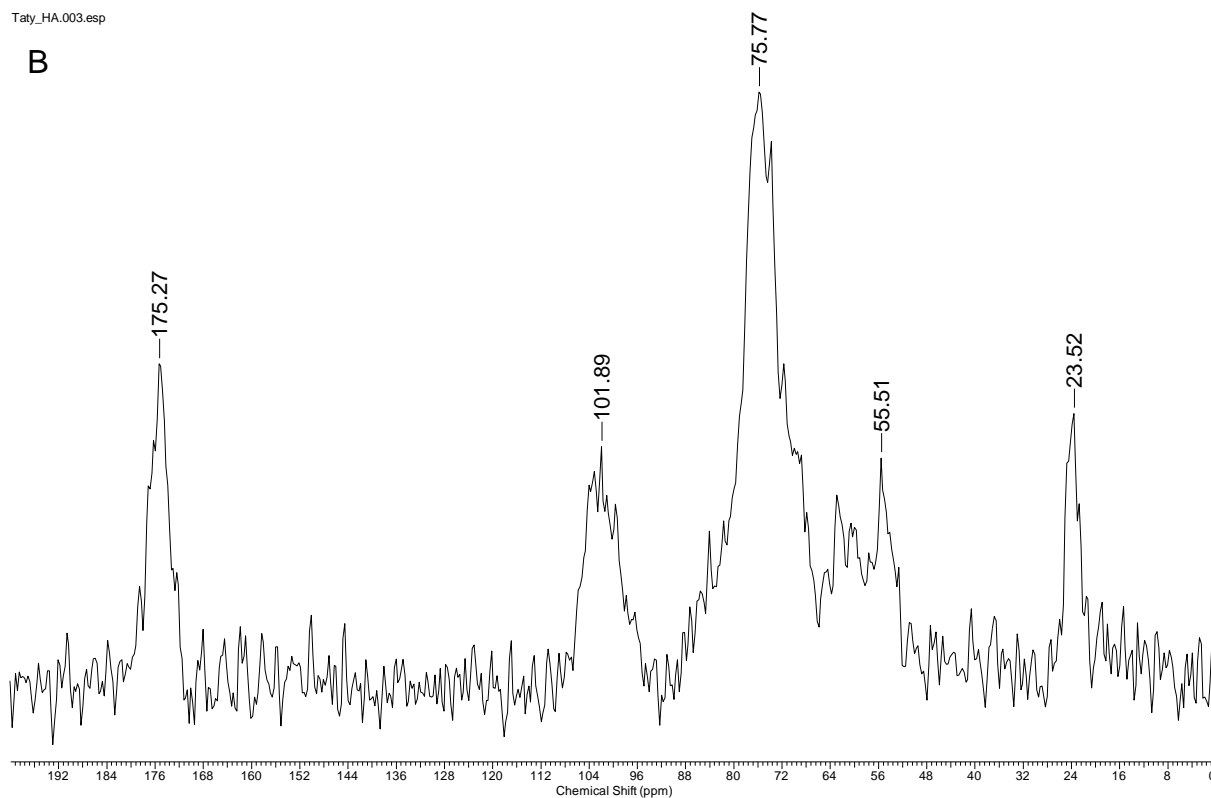
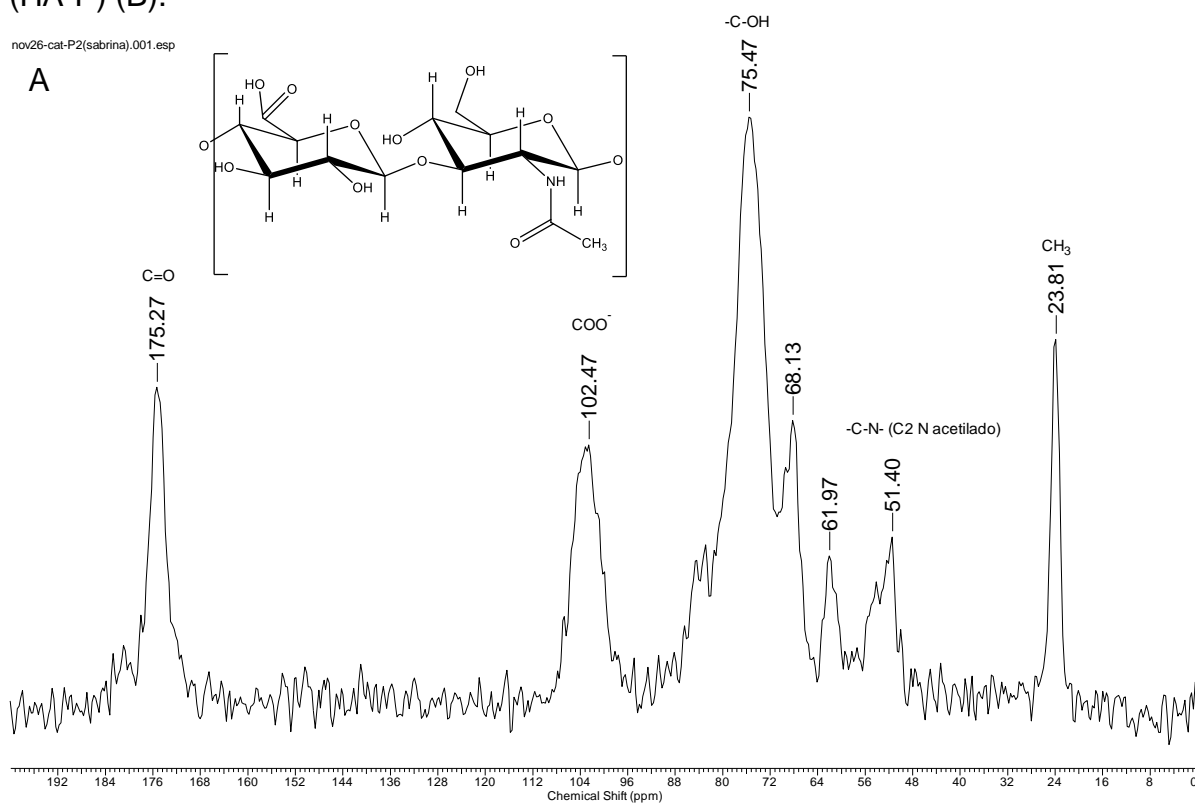
As bandas de absorção obtidas no espectro do HA-SAB foram semelhantes ao HA-P. Na Tabela 3 segue comparação das bandas de absorção de ambos os materiais (HA-SAB e HA-P).

**Tabela 3** - Comparação das bandas de absorção obtidas no espectro de HA-SAB e HA-P pelo FT-IR

<b>Bandas FT-IR</b>	<b>Comprimento de Onda (<math>\text{cm}^{-1}</math>) - HA-P</b>	<b>Comprimento de Onda (<math>\text{cm}^{-1}</math>) - HA-SAB</b>
Estiramento do OH e NH	3349	3349
Estiramento de C-H	2925	2925
Carbonila (C=O) e amida I	1638	1638
Amida II	1556	1559
C-O grupo ácido	1409	1420
Estiramento de C-OH	1023	1023

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido do ácido hialurônico isolado da crista de frango (HA-SAB) e do ácido hialurônico padrão (HA-P) estão apresentados na Figura 10.

**Figura 10** - Espectro de RMN no estado sólido ( $^{13}\text{C}$  CP MAS RMN) do Ácido Hialurônico isolado da crista de frango (HA-SAB) (A) e do Ácido Hialurônico Padrão (HA-P) (B).



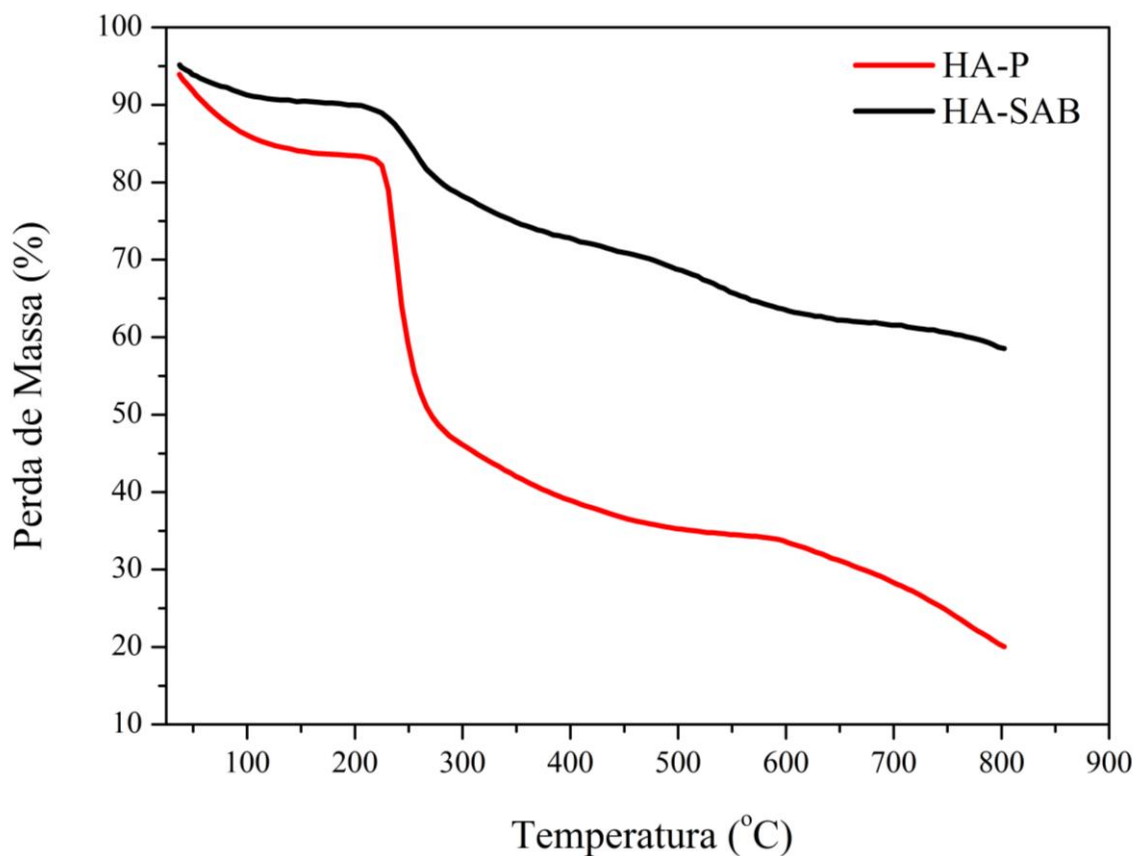
Analisando os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  acima verificou-se a presença de sinais característicos da molécula de HA em ambos os espectros. Sinal em 175,3 ppm indica a presença de carbonilas, 101,9 ppm atribui-se ao C1 que está ligado a dois átomos de oxigênio, 75,8 ppm refere-se aos carbonos secundários ligados a hidroxilas (C-OH), 55,5 ppm indica o C2 N-acetilado e 23,5 ppm refere-se ao grupo metila da acetamida. Dados similares foram obtidos por Scott e Heatley (1999), utilizando a técnica de RMN  $^{13}\text{C}$  para avaliar a estrutura do ácido hialurônico de alta massa molar antes e depois de passar por uma hidrólise com hialuronidase (SCOTT; HEATLEY, 1999).

#### 6.1.1.2 *Análise Termogravimétrica (TGA)*

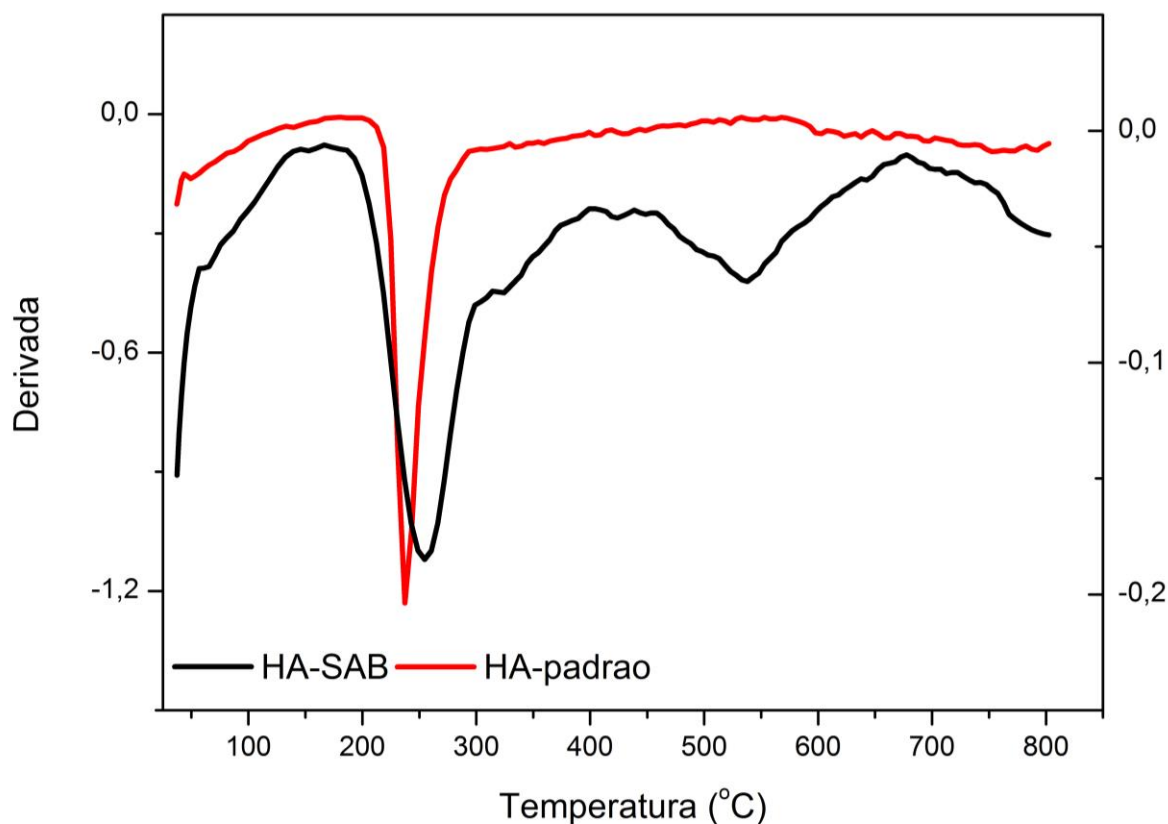
A degradação térmica de HA-P e HA-SAB pode ser comparativamente estudadas pelos dados demonstrados na Figura 11 e na Figura 12. Ambas as amostras têm três eventos de perda de massa. No primeiro evento, de 25 a 120 °C, ocorre a degradação de compostos de baixa massa molar presentes na molécula de HA, como a perda de moléculas de água. A partir de 220 °C considera-se o segundo evento onde ocorre a perda de massa de ambas as amostras devido a clivagem das ligações, o que conduz a formação de  $\text{CO}_2$ , água e outras substâncias derivadas de hidrocarbonetos, sendo que a perda de massa é mais evidente para HA-P. O terceiro evento está relacionado com temperaturas acima de 280 °C, na qual apresentou perda de massa contínua para ambas as amostras.

O segundo evento é menos intenso na amostra HA-SAB possivelmente pela presença de sais resultantes do processo de extração do HA da crista de frango. Essas outras moléculas podem estar ligadas ao HA estabilizando sua estrutura reduzindo sua degradação térmica e a perda de massa. O HA-P de maneira diferente apresenta intensa perda de massa a partir de 220 °C o que sugere sua maior pureza.

A diferença notável entre as amostras foi identificada no valor da massa residual (em % de perda de massa), exatamente a 800°C, na qual o HA-P e o HA-SAB apresentaram ~20% e ~59% de massa residual respectivamente. Essa diferença está relacionada com a pureza do material isolado da crista de frango. O HA-SAB pode estar agregado com substâncias de baixa massa, sais eventualmente, em sua estrutura, gerando um maior percentual de resíduos carbonáceos. Habitualmente, foram encontrados resíduos de elevada massa para HA (CHEN et al., 2014).

**Figura 11** - Curva de TGA para o HA-P e HA-SAB (N<sub>2</sub> atmosfera, a 50 mL.min<sup>-1</sup>)

Através da curva de DTG foi possível observar um único processo de perda de massa para ambas as amostras, sendo esse representado por um único pico acentuado. A temperatura na qual ocorre o máximo de velocidade de perda de massa ( $T_{máx.}$ ) para HA-P e HA-SAB foi em 234,28 °C e 254,87 °C respectivamente, o que corresponde a uma perda de massa de aproximadamente de 28,1% para HA-P e 15,7% para HA-SAB em relação a massa inicial da amostra, mostrando pouca diferença nos valores de  $T_{máx.}$  para ambos os materiais, mostrando similaridade na molécula isolada quando comparada com o padrão.

**Figura 12** - Curva de DTG para o HA-P e HA-SAB

Lewandowska e colaboradores (2016) produziram e caracterizaram blendas com ácido hialurônico. Curvas de TGA foram apresentadas com dados referentes ao ácido hialurônico puro e da blenda produzida. Em relação ao ácido hialurônico puro foi identificado três eventos, o primeiro evento relacionado com a perda de água, o segundo relacionado com a decomposição do HA e desintegração parcial das ligações intermoleculares da molécula em temperaturas na faixa de 200 – a 300°C e o terceiro envolvendo a massa residual (28,6%), dados também semelhantes ao encontrado neste trabalho (LEWANDOWSKA et al., 2016a). Através da análise de DTG Vasi e colaboradores (2014) estabeleceram que a temperatura onde ocorre a velocidade máxima de perda de massa ( $T_{máx.}$ ) do ácido hialurônico era de 244°C (VASI et al., 2014). Neste trabalho foram obtidos valores similares de  $T_{máx}$  para HA-P e HA-SAB, em torno de 237,3 e 254,8 °C.

### 6.1.1.3 Determinação da Massa Molar

Amostras de HA-P e o HA-SAB foram submetidas a análise de cromatografia de exclusão por tamanho (HPSEC) detectores de espalhamento de luz (light scattering - LS 90 °) e de índice de refração (RI) para determinação da massa molar média ponderal ( $M_w$ ), massa molar numérica ( $M_n$ ) e grau de polidispersão ( $M_w/M_n$ ). O detector de dispersão de luz é sensível a concentração e a massa molar enquanto o detector de índice de refração depende apenas da concentração.

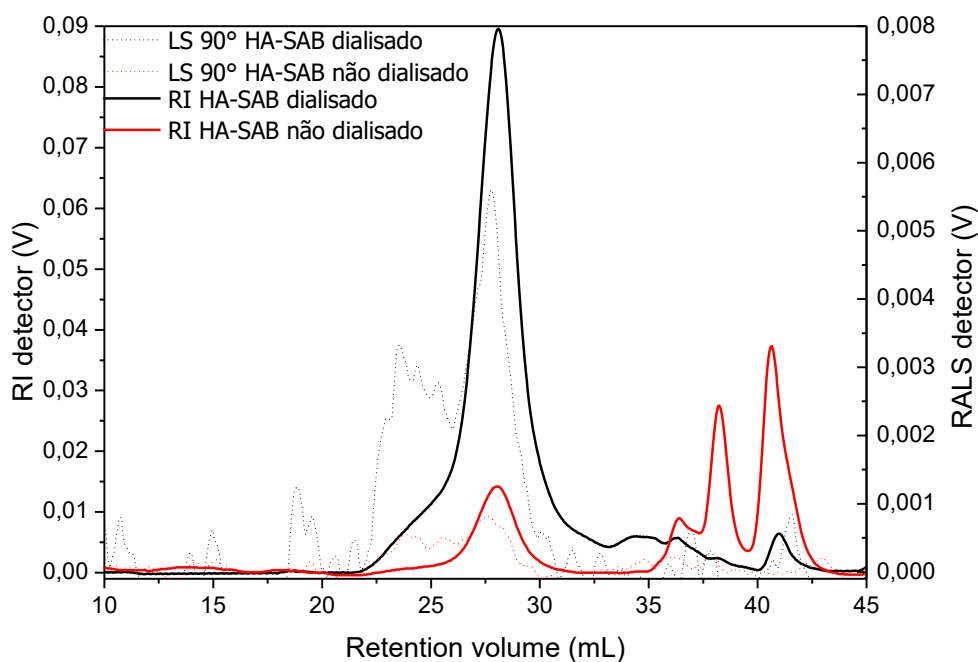
Para execução da técnica a amostra a ser analisado é carregada pelo solvente através de colunas preenchidas com material poroso, o qual possibilita a separação da amostra de acordo com o tamanho devido a permeabilidade da mesma nos poros. As moléculas de maior massa possuem tempo de retenção inferiores as moléculas de menores massas, podendo ser visualizadas primeiro no perfil de eluição (KOSTANSKI; KELLER; HAMIELEC, 2004).

A massa molar de HA depende de alguns fatores como fonte de obtenção e o processo de isolamento e purificação, podendo variar na escala de  $10^4$  a  $10^6$  Da. A determinação do peso molecular por espalhamento de luz requer o incremento do índice de refração ( $dn/dc$ ) das soluções de HA (LAPCÍK L JR AND et al., 1998). Os valores de  $dn/dc$ , que refere-se a mudança no índice de refração em relação à concentração da amostra analisada, usados neste trabalho foram baseados em valores de amostras comerciais divulgados em artigos científicos (KANG et al., 2010).

Primeiramente a análise foi realizada sem processo de purificação adicional do HA-SAB. Resultados da amostra de HA-SAB bruta apresentaram erros maiores que 50%, demonstrando que o processo utilizado para isolamento do mesmo não foi o suficiente para remoção de outras substâncias de massa molares inferiores, como sais. Portanto, o HA-SAB foi submetido a um processo de dialise para ser purificado e analisado novamente para determinação da massa molar e seu grau de polidispersidade.

Para o processo de dialise a amostra HA-SAB foi solubilizada (500 mg em 10 ml de água Milli-q) e dialisada contra 5 L de água Milli-q com membrana de cut-off de 2000 DA, que foi trocada 3 vezes durante um período de 24 h (totalizando 15 L de água). Durante as trocas de água foi observado que a amostra apresentava concentrações crescentes de material precipitado no interior da membrana de diálise.

**Figura 13** – Perfis cromatográficos do HA-SAB dialisado e não dialisado



A amostra de HA-SAB após a diálise apresentou um perfil (Figura 13) mais homogêneo do que a amostra do material bruto. No perfil cromatográfico do HA-SAB antes da diálise apresentou uma distribuição mais ampla com quatro populações distintas observado pelo detector de índice de refração, que seria de massas molares menores e de maiores concentrações, e um perfil de baixa intensidade verificada pelo detector de espalhamento de luz. Após a diálise, foi verificado que o perfil cromatográfico do HA-SAB foi alterado, apresentando um pico entre 20 a 35 mL, pelo detector RI, sem outras populações de maior intensidade, demonstrando maior concentração de um composto de maior massa. Pelo detector de LS 90° o HA-SAB dialisado apresentou populações distintas de baixa intensidade e um pico de intensidade maior, porém todos os picos estão dentro da faixa de eluição detectada por RI.

Através dos perfis cromatográficos foi possível calcular a massa molar ponderada média, a massa molar média e o grau de polidispersão das amostras HA-P e HA-SAB após a diálise, conforme dados demonstrados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Dados da massa molar média ponderal ( $M_w$ ), massa molar numérica ( $M_n$ ) e polidispersão ( $M_w/M_n$ ) do HA-SAB dialisado e do HA-P

Parâmetros	HA-SAB Dialisado	HA-P
Massa injetada	2,5 mg	1,0 mg
Massa recuperada	0,902 mg	0,814 mg
dn/dc	0,185	0,185
$M_w$	25.610 ± 14%	687.200 ± 4%
$M_n$	27,390 ± 15%	647.100 ± 4%
$M_w/M_n$	1,0690 ± 0,227	1,062 ± 0,710

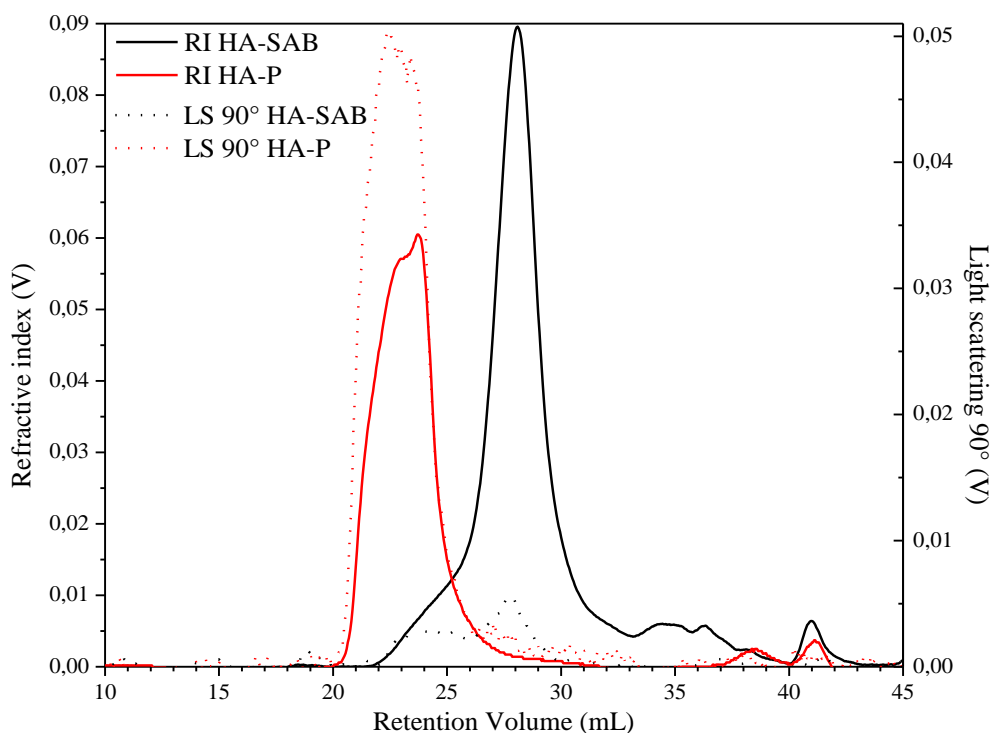
A recuperação da amostra padrão foi de 81% enquanto que para HA-SAB foi de apenas 36%. Ao comparar os cromatogramas antes e depois da diálise das amostras HA-SAB podemos observar um aumento da contribuição do primeiro pico (massas mais elevadas) e uma grande redução dos picos em maiores volumes de eluição. A dificuldade de solubilização observada após a diálise pode ser fruto da perda das cadeias pequenas (sais) da amostra que estabilizam a estrutura do HA, contribuindo para a maior solubilidade.

Os perfis de eluição HPSEC das amostras HA-P e HA-SAB dialisado, utilizando os detectores de dispersão de luz (light scattering - LS 90 °) e de índice de refração (RI), estão ilustrados na Figura 14. Os cromatogramas são compostos por um pico principal, começando com um volume de retenção de cerca de 20 mL, apresentando resposta nos detectores RI e LS.

Para HA-P, pode-se observar um pico de ombro à direita (24 mL) e dois sinais menores em tempos de retenção de 35 e 40 mL, mas não geram sinal correspondente ao detector LS. O perfil observado para HA-P evidencia uma distribuição homogênea com uma polidispersidade  $PD = 1,06$  e uma massa molar média ponderal de  $6,87 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ , sendo caracterizada como um ácido hialurônico de massa molar média (KANG et al., 2010). Quando se obtém valores de polidispersidade entre 1,2 a 2,3 considera-se que o material é altamente polidisperso (BOERIU et al., 2013). Sendo assim, valores de PD em torno de 1,06 e 1,07, obtidos nesses experimentos, são considerados de um material pouco polidisperso, pois está abaixo dessa faixa.

O cromatograma do HA-SAB é composto por um sinal principal a partir do volume de retenção de aproximadamente 22 mL em ambos os detectores RI e LS, apresentando um grande pico de ombro à esquerda (centrado em ~ 24 mL) com baixa intensidade no RI Detector. Dois sinais menores à direita também foram observados, com pico de RI mal resolvido e amplo (~ 33 e 40 mL). Estes picos menores não geraram sinal no detector LS. A homogeneidade de HA-SAB (PD = 1,07) é semelhante ao observado em HA-P, no entanto, a massa molar média em peso para HA-SAB é de  $2,56 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ , sendo de uma ordem de magnitude menor.

**Figura 14** - Perfil de eluição do HA-P e HA-SAB pela cromatografia de exclusão por tamanho



Em geral, HA tem massa molar de  $10^6 - 10^7 \text{ g mol}^{-1}$  e uma distribuição de massa molar ampla. Ambos os parâmetros têm impacto na sua aplicação, especialmente no campo biomédico (LIU et al., 2011). Normalmente, a massa molar de HA extraído da crista de frango é inferior a  $1,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ , quando um método de preparação apropriado é adotado (como filtração), e é altamente polidisperso (KHANMOHAMMADI et al., 2014).

HA com 50 KDa tem uma melhor penetração na pele quando comparado com HA de massa molar maior. O HA de baixa massa influencia na expressão de

muitos genes, principalmente os genes que contribuem para diferenciação de queratinócitos, e melhora sinais de envelhecimento com a aplicação tópica (FARWICK; LERSCH; STRUTZ, 2008).

Neste estudo, o processo aplicado para obtenção de HA a partir da crista de frango foi capaz de extrair moléculas de HA de baixa massa molar, altamente homogêneo e com dispersidade muito baixa ( $\sim 1,0$ ), o que é de alto interesse, uma vez que não há necessidade de aplicar etapas adicionais para produzir massa molar baixa.

Além do processo de isolamento utilizado outro fator pode ter contribuído para obtenção de HA de baixa massa. As cristas foram obtidas de um grupo de animais abatidos estritamente com 45 dias, sob mesma dieta e condições de manejo, sendo assim impõe-se que o perfil estrutural seja semelhante, o que inferem sobre baixa variabilidade na massa molar do HA isolado.

## **6.2 Caracterização das membranas de celulose nativa e dos compósitos poliméricos**

### **6.2.1 Análises espectroscópicas da celulose bacteriana nativa e dos compósitos poliméricos**

A incorporação de HA-SAB nas membranas de celulose pode ser estudada pela avaliação dos espectros de FT-IR. Como pode ser observado na Figura 15 bandas de absorção características do HA foram encontrados nos espectros dos compósitos poliméricos.

O espectro da celulose bacteriana nativa possui bandas de absorção que caracterizam esse material, como em  $3358\text{ cm}^{-1}$  para o estiramento de OH;  $2915\text{ cm}^{-1}$  estiramento de CH e CH<sub>2</sub>;  $1649\text{ cm}^{-1}$  deformação de OH da água adsorvida;  $1428\text{ cm}^{-1}$  deformação de CH<sub>2</sub>;  $1371\text{ cm}^{-1}$  deformação de CH<sub>3</sub>;  $1060\text{ cm}^{-1}$  deformação de C-O-C (ERBAS KIZILTAS et al., 2015; SUGIYAMA; PERSSON; CHANZY, 1991; ZHANG et al., 2016).

A cel I é o padrão da celulose nativa, a qual possui duas formas cristalina distintas: I $\alpha$  (triclínica) e I $\beta$  (monocíclica) (ATALLA; VANDERHART, 1984; FARIA-TISCHER et al., 2015). Através da técnica de FT-IR é possível verificar a forma cristalina da celulose bacteriana produzida. Banda em  $750\text{ cm}^{-1}$  caracteriza-se a BC

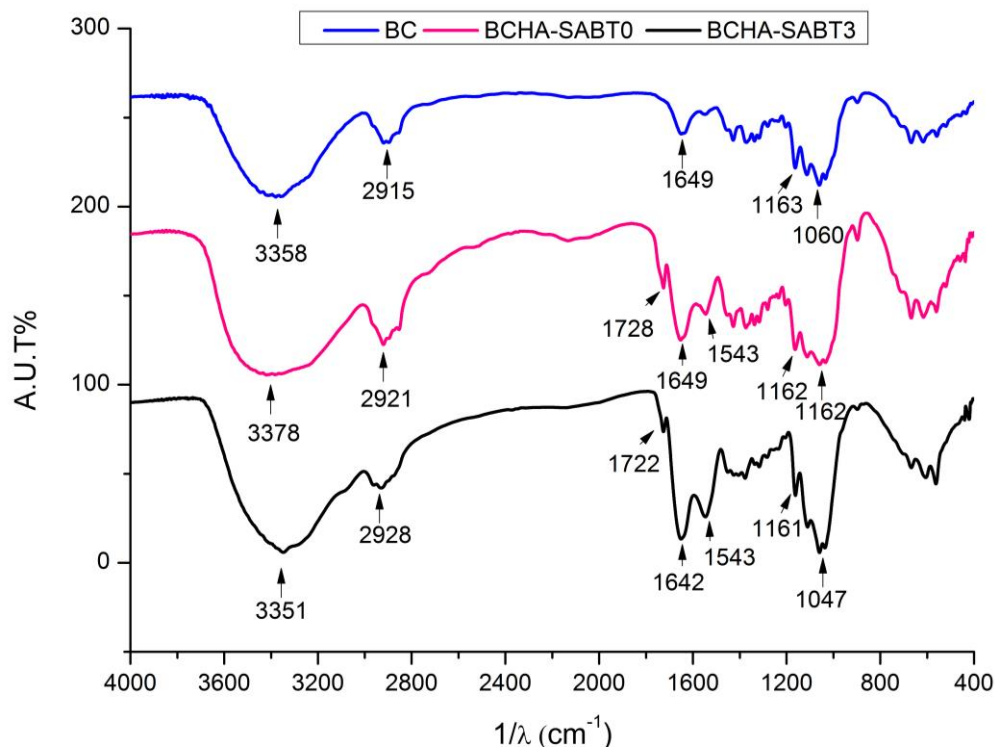
l $\alpha$  e banda em 710 cm<sup>-1</sup> a BC l $\beta$  (RUKA; SIMON; DEAN, 2013; SUGIYAMA; PERSSON; CHANZY, 1991).

A banda de absorção predominante de celulose é na região de 3348 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento da ligação de O-H. A incorporação de HA-SAB nas membranas de celulose foi primeiramente verificada pelo aparecimento de uma banda mais ampla nessa região, exatamente em 3378 cm<sup>-1</sup> (BCHA-SABT0) e 3351 cm<sup>-1</sup> (BCHA-SABT3), a qual está atribuída ao estiramento das ligações de OH e NH. A intensidade da banda dos compósitos poliméricos na região de OH está relacionada a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias das macromoléculas estudadas (LEWANDOWSKA et al., 2016b). Banda de absorção de C-H foi verificada em 2915 cm<sup>-1</sup> (BC), 2921 cm<sup>-1</sup> (BCHA-SABT0) e 2928 cm<sup>-1</sup> (BCHA-SABT3).

Fortes características da presença de HA são evidenciadas nas bandas de maior intensidade em 1649 e 1642 cm<sup>-1</sup>, que são atribuídas aos grupos C=O da amida, e em 1424 cm<sup>-1</sup> que confere ao estiramento das vibrações da ligação C-O, a qual se refere ao grupamento ácido da molécula de HA. Vale ressaltar que a banda na região de aproximadamente em 1649 cm<sup>-1</sup>, o que também pode ser observada na celulose bacteriana nativa, refere-se a absorção de água adsorvida na molécula. No entanto, com a incorporação de HA-SAB na celulose essa banda ficou mais intensa podendo refletir na água adsorvida, bem como na presença de HA-SAB devido ao grupo C=O da amida presente na molécula. Para confirmação e efetivação da incorporação realizou-se análise de <sup>13</sup>C RMN (Figura 16), o que evidenciou a presença de HA devido a sinais característicos dessa molécula em aproximadamente 23 ppm do grupo metila da acetamida e 55 ppm o C2 N-acetilado. As bandas de absorção em 1060 cm<sup>-1</sup> (BC), 1041 cm<sup>-1</sup> (BCHA-SABT0) e 1047 cm<sup>-1</sup> (BCHA-SABT3) referem-se ao grupo C-OH.

A intensidade da banda em aproximadamente 1162 cm<sup>-1</sup> diminuiu após a formação das membranas híbridas. Essa modificação também foi verificada em nanocompósito de BC e sulfato de condroitina (CS), indicando uma alteração na ligação de hidrogênio após a adição do glicosaminoglicano no meio. Assim acredita-se que a possível interação entre o BC e CS ocorre pelas hidroxila e carbonila (EL-HOSENY et al., 2015).

**Figura 15** - Espectro de FT-IR da membrana de celulose bacteriana (BC) e dos compósitos poliméricos (BCHA-SABT0 e BCHA-SABT3)



Haxaire et al. (2002) utilizaram FT-IR para caracterizar bandas do grupo carboxilato na estrutura do ácido hialurônico, comparando o espectro de ácido hialurônico padrão com o ácido hialurônico contendo o  $\text{Na}^+$  substituído pelo  $\text{H}^+$  em sua estrutura. O espectro de ácido hialurônico apresentou bandas de carbonila  $\text{C}=\text{O}$  em  $1745\text{ cm}^{-1}$  e banda  $\text{C}-\text{O}$  do mesmo grupo  $\text{COOH}$  em  $1220\text{ cm}^{-1}$  (HAXAIRE et al., 2003; LOPES et al., 2014).

As bandas em  $1728\text{ cm}^{-1}$  (BCHA-SABT0) e  $1722\text{ cm}^{-1}$  (BCHA-SABT3) observadas nos compósitos poliméricos não foram encontradas nos espectros de FT-IR que caracterizam o ácido hialurônico (Figura 9). Esta diferença pode estar relacionada com a interação do grupo hidroxilo da celulose com o grupo carboxilo do HA-SAB durante o processo de fermentação. O que evidencia que o HA está na forma de sal, enquanto na interação com a membrana encontra-se protonado (LOPES et al., 2014).

Na Figura 16 contém espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da celulose bacteriana nativa e dos compósitos poliméricos com HA. Em relação a celulose bacteriana nativa pode-se verificar sinais referente aos C6 das unidades de glicose na região entre  $\sim 60 - 65$  ppm, entre  $\sim 84 - 88,70$  ppm o C4, sendo o sinal de maior intensidade representando a região cristalina, entre  $\sim 71 - 75$  ppm o C2, C3 e C5 e em aproximadamente  $104,85$

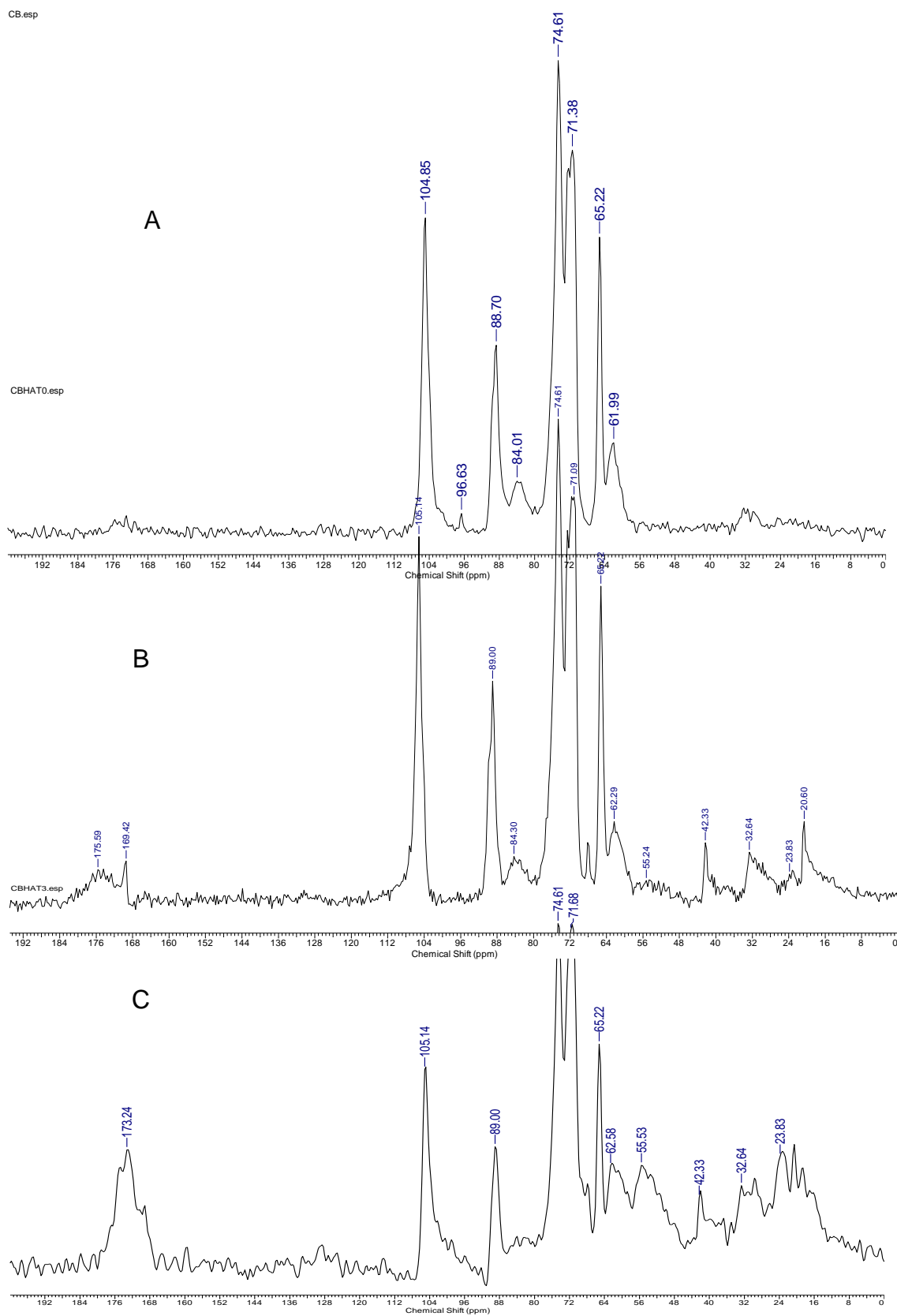
ppm o C1. A celulose bacteriana produzida é considerada do tipo I com duas formas cristalinas I $\alpha$  e I $\beta$  (FARIA-TISCHER et al., 2015; LARSSON et al., 1999).

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  dos compósitos BCHA-SABT0 e BCHA-SABT3 (Figura 16) além dos sinais da celulose apresentaram sinais característicos da molécula de HA-SAB. Em aproximadamente 23 ppm refere-se ao grupo metila da acetamida, 55 ppm o C2 N-acetilado e em aproximadamente 175 ppm as carbonilas. Sinais que podem ser atribuídos as proteínas também foram detectados no espectro em aproximadamente 20 ppm, 30 ppm e 40 ppm que se referem as cadeias de carbono alifáticos e em aproximadamente 175 ppm que está relacionado com as carbonilas de peptídeos.

Após a produção das membranas de celulose nativa e dos compósitos poliméricos (BC, BCHA-SABT0 e BCHA-SABT3) foi realizado um processo de limpeza para remover alguns resíduos, tais como proteínas e células. Os dez dias de fermentação são considerados como o tempo suficiente para o microrganismo consumir toda a proteína a partir do extrato de levedura, no entanto, a presença de peptídeos residuais, mesmo após a limpeza, é evidente pela análise de RMN, a qual indica que estes são peptídeos fortemente associados à membrana de HA.

A natureza das interações entre HA e BC pode ser interpretada pela incorporação do HA dentro da rede de celulose. Considerando que o índice de cristalinidade ( $I_c$ ) dos compósitos poliméricos apresentaram uma diminuição na organização das nanofibrilas das membranas quando comparado com a celulose bacteriana nativa com  $I_c = 67,83\%$ , BCHA-SABT0 com  $63,29\%$  e BCHA-SABT3 com  $58,92\%$ .

**Figura 16** - Espectro de  $^{13}\text{C}$  CP MAS RMN da celulose bacteriana nativa (BC) (A) e dos compósitos poliméricos (BCHA-SABT0 (B) e BCHA-SABT3 (C))



### **6.2.2 Disposição cristalina da celulose bacteriana nativa e dos compósitos poliméricos**

A membrana de celulose bacteriana é conhecida por sua organização cristalina. A difração de raios X e a RMN de estado sólido são ferramentas que contemporaneamente esclarecem o tipo e o arranjo cristalino da membrana, através do índice de cristalinidade ( $I_c$ ).

Além da técnica de RMN o índice de cristalinidade também foi verificado pela técnica de raio-X. O índice de cristalinidade determinados para BC, BCHA-SABT3 e BCHA-SABT3 foram de 66%, 64,1% e 57,6% respectivamente. Os valores obtidos aqui foram similares com os valores encontrados pela integração dos sinais da região amorfa e cristalina do  $^{13}\text{C}$  obtidos pela técnica de RMN, conforme dados na Tabela 5. Assim, verifica-se que em ambas as técnicas os valores do  $I_c$  diminuíram conforme a adição de HA-SAB nos diferentes momentos da fermentação e com a quantidade de HA incorporado à membrana. Esse comportamento pode estar relacionado com a redução da força de ligações de hidrogênio nas regiões cristalinas, resultando em regiões desordenadas (amorfas) ou pela quebra de ligações de hidrogênio nas cadeias de celulose, fortalecendo a interação intermolecular HA-SAB e BC e dificultando a orientação das cadeias de celulose (GAO et al., 2010).

Este efeito é devido a interferência do HA-SAB na polimerização e cristalização das microfibrilas de celulose durante a síntese da celulose. Observação semelhante foi verificada em diferentes compósitos de celulose bacteriana produzidos a partir da imersão de diferentes compostos durante a produção de celulose, como o colágeno (ZHIJIANG; GUANG, 2011), nanocomposito grafeno (FENG et al., 2012) e polietilenoglicol (CAI; KIM, 2010). No entanto, houve um aumento de 0,72 nm do diâmetro dos cristalitos dos compósitos na presença de HA-SAB, passando de 4,64 nm (BC) para 5,36 (BCHA-SABT0 e BCHA-SABT3).

A celulose nativa pode apresentar duas formas cristalina alomórficas: celulose  $I\alpha$  (célula unitária triclinica) e celulose  $I\beta$  (célula unitária monocíclica). A predominância de cada forma cristalina irá depender da origem da celulose, ou seja, na celulose bacteriana prevalece a estrutura  $I\alpha$ , enquanto que em celulose vegetal se predomina a estrutura  $I\beta$  (SUGIYAMA; PERSSON; CHANZY, 1991). Na Figura 17 contém os padrões de raios-X da celulose bacteriana nativa (BC) e dos compósitos poliméricos (BCHA-SABT0 e BCHA-SABT3). A celulose bacteriana nativa apresentou

três picos característicos da célula unitária triclinica (celulose I $\alpha$ ), que correspondem aos ângulos de difração de 14,7°, 16,2° e 22,5° indexados em 100, 010 e 110 respectivamente (CASTRO et al., 2011; LOPES et al., 2014; SUGIYAMA; PERSSON; CHANZY, 1991).

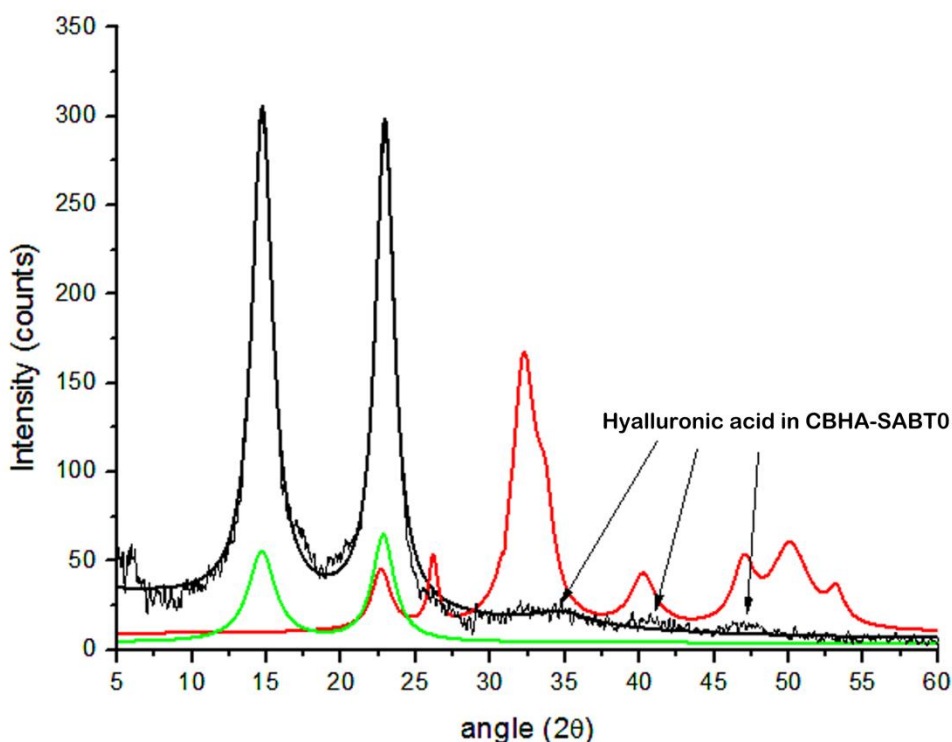
**Tabela 5** – Índice de cristalinidade ( $I_c$ ) a partir de DRX e CP-MAS RMN, conteúdo de HA nas membranas por CP-MAS RMN, largura das fitas de celulose e rugosidade dos compósitos poliméricos e nativa.

Amostras	$I_c$ CP MAS RMN (%)	$I_c$ DRX (%)	Largura Média das fitas (nm)	Rugosidade (nm)
BC	67,83	66,00	115	22,20
BCHA-SABT0	63,29	64,10	143	15,46
BCHA-SABT3	58,92	57,60	-	34,80

O compósitos poliméricos apresentaram um perfil de DRX similar ao da celulose bacteriana nativa, com distinções apenas na intensidade dos picos referente a celulose I $\alpha$ . A uniplanaridade das fitas de celulose está relacionada com a intensidade do pico indexado como 100. A BCHA-SABT0 apresentou uma intensidade relativa alta em 100 resultando em uma baixa uniplanaridade das fitas de celulose (LOPES et al., 2014).

O difratograma da membrana BCHA-SABT3 apresenta picos que correspondem ao ácido hialurônico cristalino, o que não é claramente observado para BCHA-SABT0, sendo esse resultado compatível com os resultados discutidos no item anterior que mostram mais ácido hialurônico em T3 do que T0. Além disso, a cristalinidade da celulose é afetada e estes resultados são diferentes daqueles observados por Lopes e colaboradores (LOPES et al., 2014), que não observam vestígios de ácido hialurônico cristalino nos difratogramas. Adicionalmente, o  $I_c$  para a amostra BCHA-SABT3 (70%) foi maior do que o nosso resultado, o qual está correlacionado com a quantidade de HA incorporada na membrana.

**Figura 17** - DRX da celulose bacteriana nativa (BC) (verde) e dos compósitos poliméricos (BCHA-SABT0 (preto) e BCHA-SABT3 (vermelho))



Fatores tais como a solubilidade ou a massa molar HA-SAB podem influenciar na cristalinidade dos compósitos poliméricos e na quantidade HA-SAB que foi incorporado na rede da BC nos diferentes momentos de fermentação. A menor cristalinidade de BCHA-SABT3 está relacionado com a melhor incorporação do glicosaminoglicano nas cadeias de celulose no terceiro dia de fermentação, pois nesse momento já havia a formação de um fina película de celulose, fazendo com que o HA-SAB ficasse na superfície dessa membrana e conforme ocorria a síntese das cadeias lineares de celulose e organização da rede da BC, durante os dez dias, esse HA de baixa massa ficava inserido e alojado. A cristalinidade não foi tão afetada em BCHA-SABT0 quando comparada com os dados da membrana de celulose nativa, pois para formação desse compósito polimérico o HA-SAB foi adicionado no primeiro dia de fermentação, onde não havia a formação de uma película de celulose, deixando esse mais disperso no meio, o que gerou uma menor incorporação de HA de baixa massa e conseqüentemente uma cristalinidade similar da BC nativa.

### 6.2.3 Análise termogravimétrica das membranas

Através da termogravimetria (TGA) pode-se monitorar as alterações físicas e químicas dos compósitos poliméricos e da membrana de celulose bacteriana em relação a mudança da temperatura. Essas alterações são estruturais caracterizadas pelas rupturas das ligações químicas presente nas moléculas em estudo.

O comportamento da degradação térmica da celulose bacteriana nativa e dos compósitos poliméricos pode ser observado nas curvas termogravimétricas (Figura 18 e Figura 19) e na tabela 6. A degradação térmica de uma membrana BC típica envolve alguns passos de perda de massa, como desidratação e despolimerização da rede principal polímero (GEORGE et al., 2011).

Durante o primeiro evento, referente à faixa de 26 -140 °C (Figura 18), refere-se a degradação de compostos de baixa massa molar, como as moléculas de água que estão associados com as fibrilas de celulose (FARIA-TISCHER et al., 2016; LI et al., 2010). A maior porcentagem de perda de massa dos materiais foi observada na faixa de 140 – 400 °C. Em torno de 270 °C inicia-se a degradação das cadeias celulose em todos os compósitos (LI et al., 2010; ZHANG et al., 2016).

A temperatura em que os materiais perdem 10% em peso da massa ( $T_{10\%}$ ) foi avaliado através da curva de TG. Na Figura 18 foi possível observar que  $T_{10\%}$  para BC é superior a  $T_{10\%}$  dos compósitos poliméricos (BC = 293,6 °C, BCHA-SABT0 = 269,6 °C e BCHA-SABT3 = 275,9 °C). Esse resultado pode estar relacionado com a maior cristalinidade da BC quando comparado com os valores encontrados para os compósitos poliméricos. A BC apresentou uma maior organização estrutural, o que requer mais energia, ou seja, maior temperatura para perder 10% da sua massa.

Outro ponto para se considerar é a respeito da menor temperatura que pode ser detectado o início da variação de perda de massa ( $T_{onset}$ ). Para efeito de comparação a BC nativa apresentou um  $T_{onset}$  inferior aos compósitos poliméricos. Esse deslocamento para  $T_{onset}$  maiores nos compósitos poliméricos (BC-HA) está relacionado com a liberação de compostos orgânicos que estão dispostos na rede de celulose.

O principal evento de perda de massa, correspondente à maior porcentagem de perda de massa, foi observado de 250 a 400°C para todas as amostras. Relata-se que a aproximadamente 350°C ocorre a degradação da rede de celulose (LI et al., 2010; ZHANG et al., 2016).

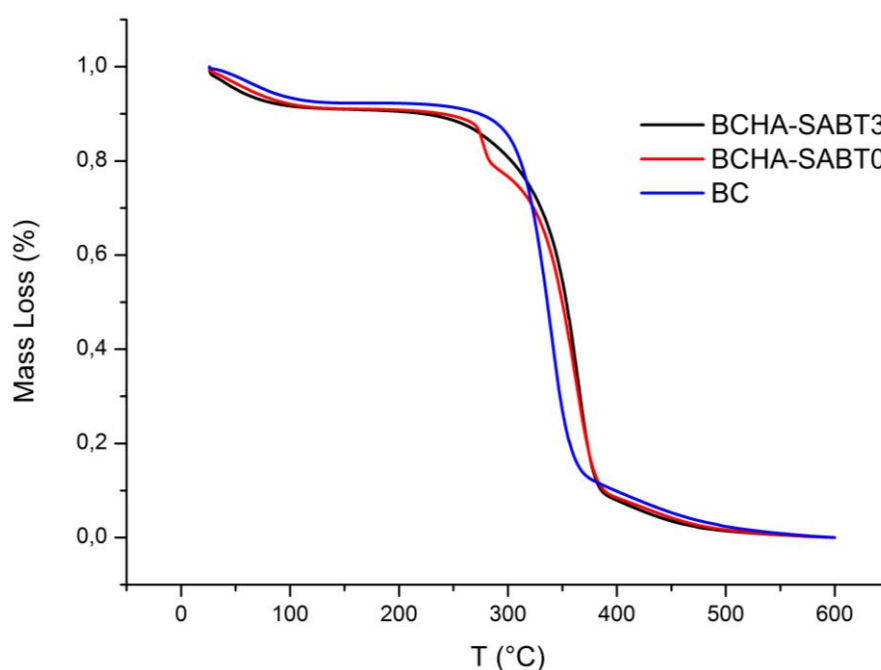
Em relação a massa residual (%) a BCHA-SABT3 apresentou um resíduo de 30,17%, sendo esse superior ao da BC nativa e BCHA-SABT0. Essa massa residual (%) maior da BCHA-SABT3 está relacionada a melhor incorporação de HA-SAB na membrana, o que gerou maior quantidade de resíduo carbonáceo, ou também pela formação de ligações cruzadas na cadeia polimérica dos compósitos.

**Tabela 6** – Resultados da análise termogravimétrica.  $T_{10\%}$  é a temperatura correspondente a 10% de perda de massa.  $T_{máx}$  é a temperatura de máxima taxa de perda de massa.

Amostras	HA-P	HA-SAB	BC	BCHA-SABT0	BCHA-SABT3
$T_{onset}$ (°C)	225,5	225,0	303,7	323,8	321,9
$T_{10\%}$ (°C)	61,2	190,1	293,6	269,6	275,9
$T_{máx}$ (°C)	237,3	254,8	340,6	362,6	365,5
Perda de massa (%)*	28,1	15,8	43,8	54,1	46,9
Resíduo a 600 °C (%)	33,7	63,6	22,6	19,1	30,2

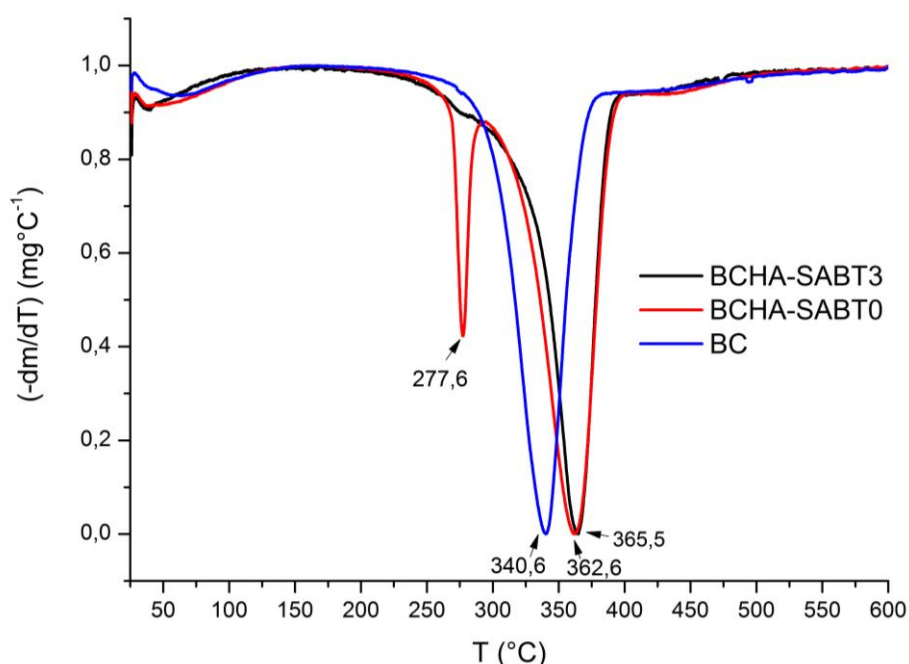
\*Em relação a  $T_{máx}$ .

**Figura 18** - Termograma da celulose bacteriana nativa (BC) e dos compósitos poliméricos (BCHA-SABT0 e BCHA-SABT3)



De acordo com as curvas DTG (Figura 19), a temperatura correspondente a velocidade máxima de perda de massa ( $T_{m\acute{a}x}$ ) aumenta na ordem  $BC < BCHA-SABT0 < BCHA-SABT3$ . Isso indica que a BCHA-SABT3, que aparentemente possui maior conteúdo de HA-SAB, apresentou um aumento na estabilidade térmica, necessitando de temperatura mais alta para degradação da estrutura BC-HA. Para a amostra BCHA-SABT0, um evento precoce é observado a aproximadamente 278°C, possivelmente correspondendo a HA adsorvido sobre as fibrilas de celulose. Este resultado também confirmam a presença de HA-SAB nas membranas, que são mais susceptíveis à degradação térmica (LOPES et al., 2014). De acordo com Chen e Cheng (2009), a temperatura de degradação de HA puro ocorre em torno de 270°C (CHEN; CHENG, 2009). Esta temperatura corresponde à temperatura de degradação de HA-SAB, como mostrado na Figura 12.

**Figura 19** - DTG da celulose bacteriana nativa (BC) e dos compósitos poliméricos (BCHA-SABT0 e BCHA-SABT3)



#### **6.2.4 Propriedades das superfícies das membranas de celulose determinadas por MEV e AFM**

O efeito do HA-SAB na morfologia da rede da celulose foi analisado através da técnica de microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de

varredura (MEV). As imagens de AFM da membrana de celulose bacteriana e das membranas com HA são mostradas na Figura 20.

Quando comparado a imagem da celulose bacteriana nativa com os compósitos poliméricos (BCHA-SABT0 e BCHA-SABT3), Figura 20, pode-se verificar diferença na textura e rugosidade da superfície dos materiais pela adição de HA-SAB nos diferentes momentos de fermentação. Na imagem da BC é possível observar uma nanoestrutura fibrilar como feixes de fitas bem delimitadas. No entanto, quando houve a adição do HA-SAB as fitas de celulose estavam com aglomerados na superfície, como um algodão.

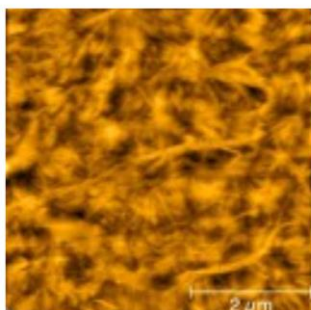
A interação interfacial entre os biopolímeros (BC/HA) é refletida pela mudança na rugosidade. A celulose bacteriana nativa e a BCHA-SABT0 apresentaram superfície mais suaves com valores de rugosidade de 22,2 nm e 15,46 nm, respectivamente. O compósito BCHA-SABT3 apresentou uma superfície mais irregular, com valor de rugosidade de 34,8 nm, que está relacionado com uma melhor incorporação de HASAB nas nanofibrilas de celulose (LOPES et al., 2014). O ácido hialurônico de diferentes massa molares apresentam estruturas distintas. O HA de baixa massa molar possui em sua estrutura pequenas redes que tendem em se autoagregar, formando aglomerados (JACOBONI et al., 1999).

As eletromicrografias (Figura 21) foram obtidas em MEV. A superfície dos compósitos poliméricos foi diferente da BC. A BC apresentou um arranjo de nanofibrilas finas organizadas aleatoriamente, resultando em uma estrutura tridimensional com a presença de pequenos poros. A adição de HA-SAB em diferentes momentos da fermentação proporcionou diferenças na superfície das membranas, principalmente em BCHA-SABT3, resultando em fibrilas de celulose mais espessas.

Essas informações foram confirmadas quando verificado a média dos tamanhos das nanofibrilas dos compósitos de celulose bacteriana pelo software ImageJ. A celulose bacteriana nativa apresentou nanofibrilas de 115 nm e a BCHA-SABT0 de 143 nm. Não foi possível fazer as medições das nanofibrilas da BCHA-SABT3, pois o HA-SAB encontra-se na superfície, preenchendo toda a rede de nanofibrila de celulose.

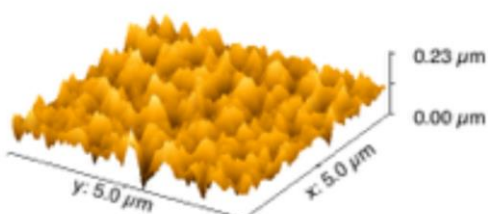
**Figura 20** - Imagens de AFM da celulose bacteriana nativa (BC) e dos compósitos poliméricos (BCHA-SABT0 e BCHA-SABT3)

Topography

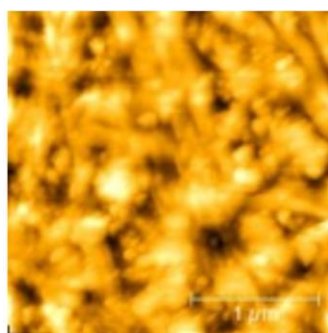
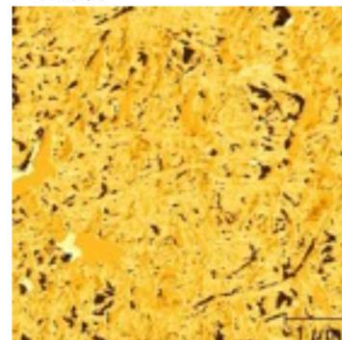


CB  
RMS = 22,2 nm

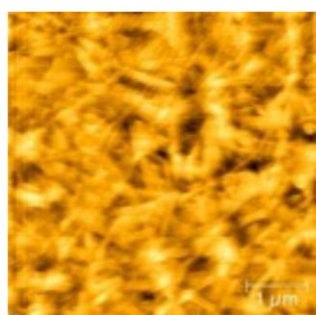
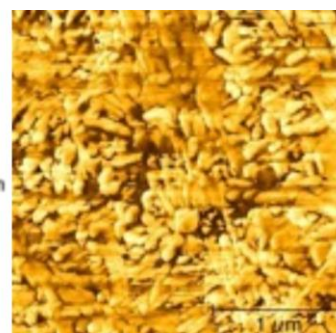
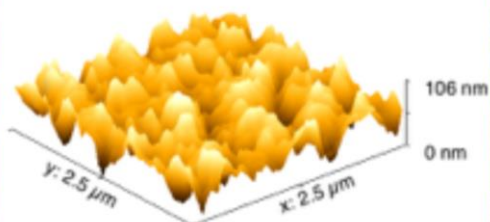
Topography 3D



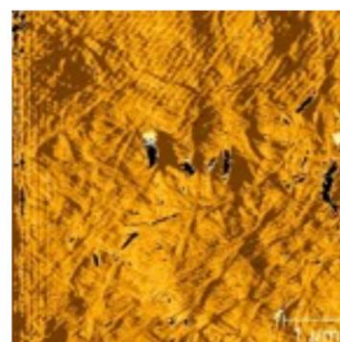
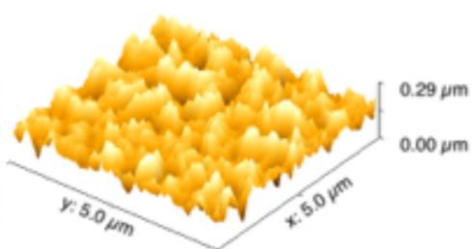
Phase



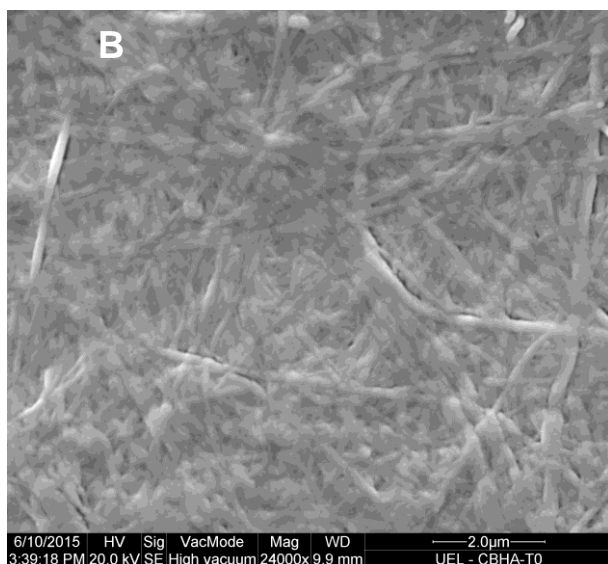
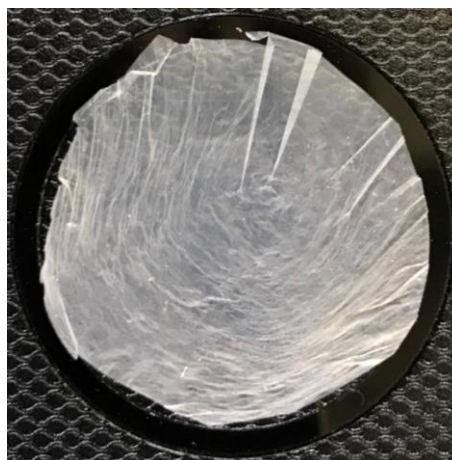
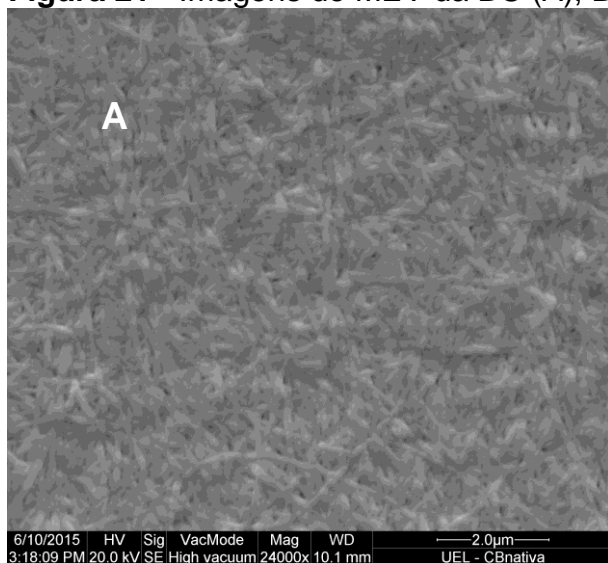
T0  
RMS = 15,46 nm



T3  
RMS = 34,8 nm



**Figura 21** - Imagens de MEV da BC (A), BCHA-SABT0 (B) e BCHA-SABT3 (C)



## 7 CONCLUSÃO

Portanto, conclui-se que as cristas de frango descartadas durante o abate podem ser reaproveitadas como matéria-prima para produção do HA.

A união das enzimas comerciais (lipase e protease) em umas das etapas da produção de HA trouxe vantagens quanto ao desmembramento do material orgânico do subproduto animal se comparado ao processo de deslipidificação com solvente orgânico que gera um passivo ambiental que representa danos ao meio ambiente.

O uso de resina aniônica no processo permite agir de forma mais seletiva sobre o material de interesse, com a importante qualidade de ser reutilizadas em novas extrações. E o tratamento com sais permitiu eliminar resquícios de proteínas no material, deixando o material mais puro.

O processo de produção de HA estabelecido nesse trabalho envolve etapas simples, com a utilização de poucos reagentes e materiais, que pode ser considerado uma vantagem para produção em escala industrial.

O processo desenvolvido foi capaz de obter HA da crista de frango, com massa molecular menor do que a observada em HA produzido por *Streptococcus equi*, e pequena polidispersidade

O ácido hialurônico é uma molécula chave para a estruturação do tecido conjuntivo, a qual auxilia na formação e manutenção do colágeno. A membrana de celulose com HA poderia ser potencialmente aceita pelos tecidos agindo como suporte para a adesão e regeneração das células. Com este intuito primeiramente se procedeu o isolamento de HA de cristas de frango seguido de fermentação contendo este material usando a cepa *G. hansenii*.

As técnicas (RMN, FT-IR, DRX e TGA) utilizadas na etapa de caracterização confirmaram a presença do ácido hialurônico isolado na rede da celulose bacteriana.

A difração de raios-X mostra claramente os espectros de HA-SAB incorporados na estrutura da celulose (Cel I), comprovando que as forças das microfibrilas de celulose sobre as cadeias de HA não foram suficientes para quebrar o arranjo cristalino dele, possivelmente isso seja atribuído a baixa massa molar.

Os compósitos poliméricos produzidos apresentam potencial para futuras aplicações biomédicas, como na regeneração e cicatrização de feridas pela presença do ácido hialurônico, um glicosaminoglicano com alta afinidade biológica.

## REFERÊNCIAS

- ALKAYALI, A. **Preparation of low molecular weight Hyaluronic Acid as a food supplement. United States Patent N°. US 2006/0183709 A1**, 2006.
- ALKRAD, J. A. et al. Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, n. 3, p. 545–550, 2003.
- ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N.; ARAKAWA S.N., T. T. Mechanism of Protein Salting In and Salting Out by Divalent Cation Salts: Balance between Hydration and Salt Binding. **Biochemistry**, v. 23, n. 25, p. 5912–5923, 1984.
- ARMSTRONG, D. C.; JOHNS, M. R. Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*. Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2759–2764, 1997.
- ASHAMMAKHI, N. et al. Nanofiber-based scaffolds for tissue engineering. **European Journal of Plastic Surgery**, v. 35, n. 2, p. 135–149, 2012.
- ATALLA, R. H. .; VANDERHART, D. L. Native Cellulose: A composite of two distinct crystalline forms. **Science**, v. 223, p. 283–285, 1984.
- AUTRET, J. M. Production methods : Chondroitin sulfate , hyaluronic acid and glucosamine. **Bulletin International du Mouvement**, v. 2, p. 8–9, 2004.
- BAE, S.; SUGANO, Y.; SHODA, M. Improvement of Bacterial Cellulose Production by Addition of Agar in a Jar Fermentor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, n. 1, p. 33–38, 2004.
- BALAZS, E. A.; SZIRMAI, J. A.; BERGENDAHL, G. C14 Assays and Autoradiographic Studies on the Rooster Comb. **The Journal of Cell Biology**, v. 5, n. 2, p. 319–326, 1959.
- BECKER, L. C. et al. Final Report of the Safety Assessment of Hyaluronic Acid, Potassium Hyaluronate, and Sodium Hyaluronate. **International Journal of Toxicology**, v. 28, n. 4 Suppl, p. 5–67, 1 jul. 2009.
- BERMAN, E. R. Studies on Mucopolysaccharides in Ocular Tissues. I. Distribution and Localization of Various Molecular Species of Hyaluronic Acid in the Bovine Vitreous Body. **Experimental Eye Research**, n. 2, p. 1–11, 1963.
- BOAS, N. F. Isolation of Hyaluronic Acid from the cock's comb. **The Journal of biological chemistry**, v. 181, p. 573–575, 1949.
- BOERIU, C. G. et al. Production Methods for Hyaluronan. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, p. 1–14, 2013.
- BROWN, M. B.; JONES, S. A. Hyaluronic acid: A unique topical vehicle for the

localized delivery of drugs to the skin. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, n. 3, p. 308–318, 2005.

CAI, Z.; KIM, J. Bacterial cellulose/poly(ethylene glycol) composite: Characterization and first evaluation of biocompatibility. **Cellulose**, v. 17, n. 1, p. 83–91, 2010.

CASTRO, C. et al. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 96–102, 2011.

CHANG, K. H.; LIAO, H. T.; CHEN, J. P. Preparation and characterization of gelatin/hyaluronic acid cryogels for adipose tissue engineering: In vitro and in vivo studies. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 11, p. 9012–9026, 2013.

CHÁVEZ-PACHECO, J. L. et al. Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: Biosíntesis y aplicaciones. **Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 7, p. 18–25, 2004.

CHAWLA, P. R. et al. Microbial cellulose: Fermentative production and applications (Review). **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.

CHEN, J. et al. Lyophilization as a novel approach for preparation of water resistant HA fiber membranes by crosslinked with EDC. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 8–11, 2014.

CHEN, J. P.; CHENG, T. H. Preparation and evaluation of thermo-reversible copolymer hydrogels containing chitosan and hyaluronic acid as injectable cell carriers. **Polymer**, v. 50, n. 1, p. 107–116, 2009.

CHONG, B. F. et al. Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 341–351, 13 jan. 2005.

COLLINS, M. N.; BIRKINSHAW, C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1262–1279, 2013.

COWMAN, M. K.; MATSUOKA, S. Experimental approaches to hyaluronan structure. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 5, p. 791–809, abr. 2005.

CZAJA, W. et al. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145–151, jan. 2006.

CZAJA, W. K. et al. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2007.

CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN, R. M. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose**, v. 11, p. 403–411, 2004.

DAVIES, J. A. Extracellular Matrix. p. 1–7, 2001.

DE OLYVEIRA, G. M. et al. Physically Modified Bacterial Cellulose Biocomposites for Guided Tissue Regeneration. **Science of Advanced Materials**, v. 7, n. 8, p. 1657–

1664, 2015.

EL-HOSEN, S. M. et al. Natural ECM-Bacterial Cellulose Wound Healing — Dubai Study. **Journal of biomaterials and nanobiotechnology**, v. 6, n. October, p. 237–246, 2015.

ENDLER, A.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, C.; PERSSON, S. Cellulose squeezes through. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 11, p. 785–785, 2010.

ERBAS KIZILTAS, E. et al. Biosynthesis of bacterial cellulose in the presence of different nanoparticles to create novel hybrid materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 148–155, 2015.

ESSENDOUBI, M. et al. Human skin penetration of hyaluronic acid of different molecular weights as probed by Raman spectroscopy. **Skin Research and Technology**, v. 22, p. 55–62, 2015.

FARIA-TISCHER, P. C. S. et al. Preparation of cellulose II and III films by allomorphic conversion of bacterial cellulose I pellicles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 51, p. 167–173, 2015.

FARIA-TISCHER, P. C. S. et al. Structure and effects of gold nanoparticles in bacterial cellulose–polyaniline conductive membranes. **RSC Adv.**, v. 6, n. 12, p. 9571–9580, 2016.

FARWICK, M.; LERSCH, P.; STRUTZ, G. Low Molecular Weight Hyaluronic Acid : Its Effects on Epidermal Gene Low Molecular Weight Hyaluronic Acid : **SOFW Journal**, v. 11, 2008.

FENG, Y. et al. A mechanically strong, flexible and conductive film based on bacterial cellulose/graphene nanocomposite. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 644–649, 2012.

FRASER, J. R. E. ; LAURENT, T. C. ; LAURENT, U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **Journal of internal Medicine**, v. 242, p. 27–33, 1997.

GAO, C. et al. Dynamic interaction between the growing Ca-P minerals and bacterial cellulose nanofibers during early biomineralization process. **Cellulose**, v. 17, n. 2, p. 365–373, 2010.

GEORGE, J. et al. Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 50–57, jan. 2011.

GERECHT, S. et al. Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 27, p. 11298–11303, 3 jul. 2007.

GILLI, R. et al. FTIR studies of sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solution. **Carbohydrate research**, v. 263, p. 315–326, 1994.

GOELZER, F. D. E. et al. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 546–551, mar. 2009.

GOLD, M. H. Use of hyaluronic acid fillers for the treatment of the aging face. **Clinical interventions in aging**, v. 2, n. 3, p. 369–76, 2007.

GONZÁLEZ, Á. et al. Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 853–860, 2004.

GRANDE, C. J. et al. Development of self-assembled bacterial cellulose–starch nanocomposites. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 4, p. 1098–1104, maio 2009.

HAXAIRE, K. et al. Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments. **Biopolymers**, v. 72, n. 1, p. 10–20, 2003.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose\*. **Biochemical Journal**, v. 58, p. 345–352, 1954.

HUANG, Y. et al. Recent advances in bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 21, n. 1, p. 1–30, 2014.

IGNATOVA, E. Y.; GUROV, A. N. Principles of extraction and purification of Hyaluronic. **Plenum Publishing Corporation**, v. 24, n. 3, p. 42–46, 1990.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, v. 35, p. 261–270, 2000.

ISOGAI, A. et al. Solid-state CP/MAS carbon-13 NMR study of cellulose polymorphs. **Macromolecules**, v. 22, n. 7, p. 3168–3172, jul. 1989.

JACOBONI, I. et al. Hyaluronic acid by atomic force microscopy. **Journal of Structural Biology**, v. 126, n. 1, p. 52–58, 1999.

KANG, D. Y. et al. Extraction of hyaluronic acid (HA) from rooster comb and characterization using flow field-flow fractionation (FIFFF) coupled with multiangle light scattering (MALS). **Journal of separation science**, v. 33, n. 22, p. 3530–6, 2010.

KESHK, S. M. Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 4, n. 2, p. 1–10, 2014.

KESHK, S. M. A. S.; SAMESHIMA, K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. June, p. 478–482, 2005.

KHANMOHAMMADI, M. et al. Sequential optimization strategy for hyaluronic acid extraction from eggshell and its partial characterization. **Journal of Industrial and**

**Engineering Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 4371–4376, 2014.

KIM, J. K. H. et al. Structural and antioxidant properties of gamma irradiated hyaluronic acid. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 763–770, 2008.

KIM, T.-H. et al. **Method for purifying hyaluronic acid using calcium salt and phosphate salt , or calcium**, 2007. Disponível em:  
<<https://www.google.com/patents/EP1766038A1?cl=en&dq=Method+for+purifying+hyaluronic+acid+ionic+exchange&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwjXq8qkqbDQAhUGIJAKHQWqAuMQ6AEIPzAE>>

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, p. 3358–3393, 2005.

KOGAN, G. et al. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 1, p. 17–25, 8 dez. 2007.

KOLPAK, F. J.; BLACKWELL, J. Determination of the structure of cellulose II. **Macromolecules**, v. 9, n. 2, p. 273–278, 1976.

KOSTANSKI, L. K.; KELLER, D. M.; HAMIELEC, A. E. Size-exclusion chromatography - A review of calibration methodologies. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 58, n. 2, p. 159–186, 2004.

KWAK, M. H. et al. Bacterial cellulose membrane produced by *Acetobacter* sp. A10 for burn wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 387–398, 2015.

LAI, H.-J.; LIN, C.-C.; LIN, S.-M. **Method for producing hyaluronic acid** United States Patent N°. **US 8,288,129 B2**, 2012. Disponível em:  
<<http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?patentnumber=4,801,539>>

LAPCÍK L JR AND, L. et al. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. **Chemical reviews**, v. 98, n. 8, p. 2663–2684, 1998.

LARSSON, P. T. et al. CP/MAS -NMR spectroscopy applied to structure and interaction studies on cellulose I. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 15, n. 1, p. 31–40, out. 1999.

LAURENT, T. C.; FRASER, J. R. Hyaluronan. **FASEB J.**, v. 6, p. 2397–2404, jul. 1992.

LEE, K. Y. et al. More than meets the eye in bacterial cellulose: Biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 1, p. 10–32, 2014.

LEWANDOWSKA, K. et al. International Journal of Biological Macromolecules Surface and thermal properties of collagen / hyaluronic acid blends containing chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 371–376, 2016a.

LEWANDOWSKA, K. et al. The miscibility of collagen/hyaluronic acid/chitosan blends investigated in dilute solutions and solids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 220, p. 726–730, 2016b.

LI, S. M. et al. Synthesis of cellulose-calcium silicate nanocomposites in ethanol/water mixed solvents and their characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 1, p. 270–275, 2010.

LI, Y. et al. Evaluation of bacterial cellulose/hyaluronan nanocomposite biomaterials. **Carbohydrate polymers**, v. 103, p. 496–501, 2014.

LI, Y. et al. Bacterial cellulose–hyaluronan nanocomposite biomaterials as wound dressings for severe skin injury repair. **J. Mater. Chem. B**, v. 3, n. 17, p. 3498–3507, 2015.

LIN, S. P. et al. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 20, n. 5, p. 2191–2219, 2013.

LISDIYANTI, P. et al. Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 56, n. 9, p. 2101–2111, 1 set. 2006.

LIU, L. et al. Microbial production of hyaluronic acid : current state , challenges , and perspectives. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 99, 2011.

LOPES, T. D. et al. Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: Production and characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 67, p. 401–8, 2014.

LUAN, J. et al. Impregnation of silver sulfadiazine into bacterial cellulose for antimicrobial and biocompatible wound dressing. **Biomedical materials (Bristol, England)**, v. 7, n. 6, p. 65006, 2012.

MASAOKA, S.; OHE, T.; SAKOTA, N. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 1, p. 18–22, 1993.

MERCI, A. et al. Properties of microcrystalline cellulose extracted from soybean hulls by reactive extrusion. **Food Research International**, v. 73, p. 38–43, 2015.

MEYER, K.; PALMER, J. W. The Polysaccharide of the Vitreous Humor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 629–634, 1934.

MOON, R. J. et al. **Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites**. [s.l: s.n.]. v. 40

MOOSAVI-NASAB, M.; YOUSEFI, A. R. Investigation of Physicochemical Properties of the Bacterial. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 44, n. 8, p. 1258–1263, 2010.

MÜLLER, E.; FAUDE, A. Investigation of salt properties with electro-acoustic

measurements and their effect on dynamic binding capacity in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1177, n. 2, p. 215–225, 2008.

MURADO, M. A. et al. Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 491–498, jul. 2012.

NAKANO, T.; NAKANO, K.; SIM, J. S. A Simple Rapid Method To Estimate Hyaluronic Acid Concentrations in Rooster Comb and Wattle Using Cellulose Acetate Electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 2766–2768, dez. 1994.

NECAS, J. et al. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. **Veterinarni Medicina**, v. 53, n. 8, p. 397–411, 2008.

OLIVEIRA BARUD, H. G. et al. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 41–51, 2015.

OLIVEIRA, Sabrina Alves de. **Isolamento e purificação de ácido hialurônico do subproduto cristas de frango**. 2015. 46 f. Monografia (Especialização em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

POLETTO, M.; PISTOR, V.; J., A. Structural Characteristics and Thermal Properties of Native Cellulose. In: **Cellulose - Fundamental Aspects**. [s.l.] InTech, 2013. p. 45–68.

PRICE, R. D.; BERRY, M. G.; NAVSARIA, H. A. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, v. 60, p. 1110–1119, 2007.

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 6, p. 2491–511, 2015.

REDDY, K. J.; KARUNAKARAN, K. T. Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. **J. BioSci. Biotech**, v. 2, n. 3, p. 173–179, 2013.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological reviews**, v. 55, n. 1, p. 35–58, 1991.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1717–1723, 2013.

SARKO, A.; MUGGLILB, R. Vulonia Cellulose and Cellulose IIIa. **Macromolecules**, v. 7, n. 4, p. 486–494, 1973.

SCHERNER, M. et al. In vivo application of tissue-engineered blood vessels of bacterial cellulose as small arterial substitutes: proof of concept? **Journal of**

**Surgical Research**, v. 189, n. 2, p. 340–347, 2014.

SCHIRALDI, C.; GATTA, A. LA; ROSA, M. DE. Biopolymers. **Biopolymers**, 28 set. 2010.

SCHNEPP, Z. Biopolymers as a flexible resource for nanochemistry. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, p. 1096–1108, 2013.

SCOTT, J. E.; HEATLEY, F. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: A <sup>13</sup>C NMR study. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 9, p. 4850–4855, 27 abr. 1999.

SHEEHAN, J. K.; GARDNER, K. H.; ATKINS, E. D. T. Hyaluronic acid: a double-helical structure in the presence of potassium at low pH and found also with the cations ammonium, rubidium and caesium. **Journal of Molecular Biology**, v. 117, n. 1, p. 113–135, 1977.

SHI, Z. et al. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 539–545, 2014.

SHIMADA, E.; MATSUMURA, G. Molecular weight of Hyaluronic Acid from Rabbit Skin. **THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY**, v. 81, p. 79–91, 1977.

SOLWAY, D. R.; CLARK, W. A.; LEVINSON, D. J. A parallel open-label trial to evaluate microbial cellulose wound dressing in the treatment of diabetic foot ulcers. **International Wound Journal**, v. 8, n. 1, p. 69–73, 2011.

SUGIYAMA, J.; PERSSON, J.; CHANZY, H. Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native celluloses. **Macromolecules**, v. 24, n. 9, p. 2461–2466, 1991.

SWANN, D. Studies on hyaluronic acid II. The protein component (s) of rooster comb hyaluronic acid. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 160, n. 1968, p. 96–105, 1968.

SWANN, D. A. Studies on Hyaluronic Acid. I. The preparation and properties of rooster comb hyaluronic acid. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 156, n. 1968, p. 17–30, 1967.

SZIRMAI, J. A. Effect of steroid hormones on the glycosaminoglycans of target connective tissue. In: BALAZS, E. A. ; JEANLOZ, R. W. (Eds.). . **The amino sugars**. New York: [s.n.]. v. IIBp. 129–154.

TSIGANOS, C. P.; VYNIOS, D. H.; KALPAXIS, D. L. Rooster comb hyaluronate-protein, a non-covalently linked complex \*. v. 235, p. 117–123, 1986.

VASI, A. M. et al. Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 38, n. 1, p. 177–185, 2014.

VÁZQUEZ, J. et al. Chondroitin Sulfate, Hyaluronic Acid and Chitin/Chitosan Production Using Marine Waste Sources: Characteristics, Applications and Eco-Friendly Processes: A Review. **Marine Drugs**, v. 11, n. 3, p. 747–774, 11 mar. 2013.

VITTA, S.; THIRUVENGADAM, V. Multifunctional bacterial cellulose and nanoparticle-embedded composites. **Current Science**, v. 102, n. 10, 2012.

WARD, P. D.; THIBEAULT, S. L.; GRAY, S. D. Hyaluronic acid: Its role in voice. **Journal of Voice**, v. 16, n. 3, p. 303–309, 2002.

WILLIAMS, W. S.; CANNON, R. E. Alternative Environmental Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2448–2452, 1989.

WU, Y. Preparation of low-molecular-weight hyaluronic acid by ozone treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 709–712, 2012.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. The Phylogeny of Acetic Acid Bacteria Based on the Partial Sequences of 16S Ribosomal RNA: The Elevation of the Subgenus *Gluconoacetobacter* to the Generic Level. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 8, p. 1244–1251, 12 jan. 1997.

YEUNG, B.; MARECAK, D. Molecular weight determination of hyaluronic acid by gel filtration chromatography coupled to matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 852, n. 2, p. 573–581, 1999.

YUAN, H. et al. Determination of hyaluronan molecular mass distribution in human breast milk. **Analytical Biochemistry**, v. 474, p. 78–88, 2015.

ZHANG, H. et al. Synthesis and characterization of quaternized bacterial cellulose prepared in homogeneous aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 171–176, 2016.

ZHANG, Y.; CREMER, P. S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 658–663, 2006.

ZHIJIANG, C.; GUANG, Y. Bacterial cellulose/collagen composite: Characterization and first evaluation of cytocompatibility. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, n. 5, p. 2938–2944, 5 jun. 2011.

ZHU, W. et al. In-situ biopreparation of biocompatible bacterial cellulose/graphene oxide composites pellets. **Applied Surface Science**, v. 338, p. 22–26, 2015.

**ANEXO**

**ANEXO A** - Artigo publicado no periódico International Journal Biological  
Macromolecules.



## Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb



Sabrina Alves de Oliveira<sup>a</sup>, Bruno Campos da Silva<sup>b</sup>, Izabel Cristina Riegel-Vidotti<sup>b</sup>, Alexandre Urbano<sup>c</sup>, Paula Cristina de Sousa Faria-Tischer<sup>a</sup>, Cesar Augusto Tischer<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Biotechnology, Londrina State University—UEL, CEP 86051-980, Londrina, PR, Brazil

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Federal University of Parana—UFPR, CEP 81531-980, Curitiba, PR, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Physics, Londrina State University—UEL, CEP 86051-980, Londrina, PR, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 October 2016

Received in revised form 10 January 2017

Accepted 16 January 2017

Available online 18 January 2017

#### Keywords:

Chicken comb

Hyaluronic acid

Bacterial cellulose

Polymeric composites

### ABSTRACT

The bacterial cellulose (BC), from *Gluconacetobacter hansenii*, is a biofilm with a high degree of crystallinity that can be used for therapeutic purposes and as a candidate for healing wounds. Hyaluronic acid (HA) is a constitutive polysaccharide found in the extracellular matrix and is a material used in tissue engineering and scaffolding for tissue regeneration. In this study, polymeric composites were produced in presence of hyaluronic acid isolated from chicken comb on different days of fermentation, specifically on the first (BCHA-SABT0) and third day (BCHA-SABT3) of fermentation. The structural characteristics, thermal stability and molar mass of hyaluronic acid from chicken comb were evaluated. Native membrane and polymeric composites were characterized with respect to their morphology and crystallinity. The optimized process of extraction and purification of hyaluronic acid resulted in low molar mass hyaluronic acid with structural characteristics similar to the standard commercial hyaluronic acid. The results demonstrate that the polymeric composites (BC/HA-SAB) can be produced *in situ*. The membranes produced on the third day presented better incorporation of HA-SAB between cellulose microfiber, resulting in membranes with higher thermal stability, higher roughness and lower crystallinity. The biocompatibility of bacterial cellulose and the importance of hyaluronic acid as a component of extracellular matrix qualify the polymeric composites as promising biomaterials for tissue engineering.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The bacterial cellulose (BC) structure is chemically identical to vegetal cellulose, a linked  $\beta$ -glucan (1 $\rightarrow$ 4), but varies in crystalline arrangement and in the absence of hemicellulosic and lignin biopolymers. The glucan chains are synthesized individually and the highly organized microfibrils from the bacterial cell wall are synthesized individually by the cellulose synthase. The synthesis process of cellulose by gram-negative bacteria involves such stages like the polymerization of glucose monomers in linear polymeric chains of  $\beta$ -1,4-glucan that is catalyzed and regulated by AxCESA and AxCESB with the extrusion of linear chains and ribbon crystallization of microfiber cellulose [1].

The bacterial cellulose is a biocompatible material of high degree crystallinity, hydrophilicity, flexibility, formability, and high mechanical strength with a porous nanostructure, which facilitates

its application in the biomedical field [2,3]. Among the most important applications are its use in regeneration, healing burns and chronic wounds [4,5], in tissue-engineered blood vessels [6], and it is used as artificial skin or as a scaffold for tissue engineering [7,8].

Different materials may be joined to make polymeric composites with distinctive properties in order to expand the field of applications. Current scientific knowledge includes different composites based in bacterial cellulose, like BC/Hyaluronic Acid from *Streptococcus* [9,10], BC/graphene oxide [11], BC/poly-3-hydroxybutyrate (PHB) [12], BC/chondroitin sulfate [13], and BC/starch [14], that interact with the microfibrillar network of bacterial cellulose produced by bacteria [3].

The Hyaluronic Acid (HA) is a linear polysaccharide that belongs to the group of non sulfated glycosaminoglycan (GAGs), and it contains units of  $\beta$ -1,4-D-glucuronic (GlcUA) and  $\beta$ -1,3-N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) within its structure that are repeated alternately [15]. The HA is the main compound of the extracellular matrix; it can be found in the connective tissue of vertebrates, umbilical cord, synovial fluid, the eye's vitreous humor [15,16], and

\* Corresponding author.

E-mail address: [cesar.tischer@me.com](mailto:cesar.tischer@me.com) (C.A. Tischer).

specifically in rooster comb, where the highest content of HA can be found, about 7.5 mg/mL [15,17].

The mixture of natural biopolymer, known as Hyaluronic Acid, combined with the bacterial cellulose result in hybrid membranes with distinct properties [10]. The hybrid membranes of HA has many applications in tissue engineering and scaffolding for tissue regeneration by helping in the proliferation, differentiation and migration of cells during the regeneration and healing of tissues [18].

In our work, we optimized a process of isolating HA from a by-product of the poultry industry, the chicken comb. The isolated HA was characterized and added to the culture medium with bacterial cellulose production at different moments in order to check the influence of this compound in membrane synthesis, structure, morphology and thermal stability. The polymeric composite produced can be a potential material in the biomedical field, with its main application in regenerating tissue.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The Hyaluronic Acid was isolated from chicken comb, obtained from an industrial slaughterhouse, through an enzymatic process. Lipolase (Lipolase 100L, batch LAP40080) and Novo Pro-D (Novo Pro-D Enzyme, batch PBVD1001) enzymes were supplied by Novozymes Latin America (Araucaria, Parana, Brazil). The Hyaluronic Acid (Hyaluronic Acid sodium salt, from *Streptococcus equi*; batch BCBB0912) was purchased from Sigma-Aldrich, and designed as HA-P for experimental purposes. The bacterial strain used in this study was *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769, obtained from the André Tosello Foundation from Campinas, São Paulo, and was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in glycerol. *G. hansenii* was grown in a 4% glucose medium based on the Hestrin-Scharamm's medium culture [19]. Hestrin-Scharamm's medium is composed of  $3.2\text{ g L}^{-1}$  glucose,  $0.4\text{ g L}^{-1}$  yeast extract,  $0.4\text{ g L}^{-1}$  peptone,  $0.4\text{ g L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , and  $0.092\text{ g L}^{-1}$  citric acid. All growth media were sterilized at  $121^{\circ}\text{C}$  and 1.02 atm for 20 min.

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Extraction of hyaluronic acid from chicken comb

The 5.788 kg of chicken comb were defrosted and crushed for enzymatic digestion with lipase (9 mL) and protease (9 mL), under agitation, under pH  $\sim 7.8$  and temperature, at  $\sim 58^{\circ}\text{C}$ . The liquid phase of the resulting solution was used for the addition of anionic resin, temperature at  $50^{\circ}\text{C}$ , reacting for the 14 h, under agitation. The resin was transferred to the column and eluted with 12% sodium chloride solution. The eluate was treated with calcium chloride (10 g/L) and disodium phosphate (10 g/L), filtered and precipitated with ethanol 1:1 (v/v). The solution, which is called HA-SAB, was vacuum filtered and the product was dried at  $50^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.2.2. Production of bacterial cellulose and bacterial cellulose/Hyaluronic acid membranes

The bacterial cellulose membranes were produced by inoculating 720 mL of Hestrin-Schramm's medium with 80 mL of pre-inoculum, which were then mixed and distributed onto 55 mL petri plates. The production was performed statically for 10 days at  $28^{\circ}\text{C}$ , independent of the presence or absence of hyaluronic acid. The bacterial cellulose/Hyaluronic acid membranes (BCHA-SAB) were obtained by the addition of a previously prepared solution with 11% (m/v) of the hyaluronic acid isolated from chicken comb, resulting in 1% (m/v) of HA to the final volume of medium at different times: on the first fermentation day (BCHA-SABT0 membranes) and on the 3rd day (BCHA-SABT3). After 10 days the membranes

were removed from the medium with tweezers, cleaned, and then immersed in NaOH 2% solution for 24 h. The cellulose pellicles were rinsed with distilled water for several times until the alkali solution with neutral pH was removed completely, and then was dried in the oven at  $40^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.2.3. Characterization of hyaluronic acid from chicken comb and polymer composite

**2.2.3.1. Fourier transform infrared spectroscopy analysis (FT-IR).** The FT-IR spectra were recorded in a Shimadzu FT-IR 8300 (Shimadzu, Japan) in transmission mode in the range of  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  at a resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$ . The standard

HA-P and chicken comb HA-SAB powder were analyzed as KBr pellets, and bacterial cellulose and bacterial cellulose/hyaluronic acid membranes were analyzed directly on the sample support.

**2.2.3.2. Solid-state CP-MAS  $^{13}\text{C}$  NMR.** The NMR experiments were performed at  $24^{\circ}\text{C}$  using an ADVANCE 400 (Bruker Spectrometer) operated at a  $^{13}\text{C}$  frequency of 100.6 MHz, using the technique of cross polarization (CP) at the magic angle (MAS) from finely comminuted or particulate samples. The crystallinity index was calculated from the integrated peaks  $I_c/(I_a+I_c)$  ( $\times 100$ ) of the crystalline/amorphous C4 regions of the spectra obtained by peak fitting using 1D NMR Processor software [20]. The powder samples (HA-P and HA-SAB) were analyzed and the films of bacterial cellulose and bacterial cellulose/hyaluronic acid were analyzed directly on the sample support.

**2.2.3.3. X-ray diffraction (XRD).** The film samples were analyzed by  $\theta$ - $2\theta$  X-ray diffractometry using a Panalytical XiPERT PRO MPD equipment. The incident monochromatic  $\text{Cu}(\text{K}_2)$  X-ray beam was excited by 40 kV and 30 mA and recorded from 5 to  $60^{\circ}$  ( $2\theta$ ), with a scan rate of  $0.002^{\circ}/\text{s}$ . The crystallite size was measured by the Scherrer equation (equation 1) where form factor is  $k=0.90$ , the wavelength is  $\lambda=1.54\text{ \AA}$ ,  $\theta$  is the diffraction angle from sample in degree and  $\beta$  is the full width at half maximum (FWHM) in  $2\theta$  radians. For X-ray diffraction peaks fitted with the lorentzian function,  $\beta$  should be corrected by subtracting the instrumental FWHM ( $\beta_{\text{inst}}$ ) from measured one ( $\beta_{\text{meas}}$ ) (equation 2) [21].

$$D = \frac{k \times \lambda}{\beta_{2\theta} \cdot \cos\theta} \quad (1)$$

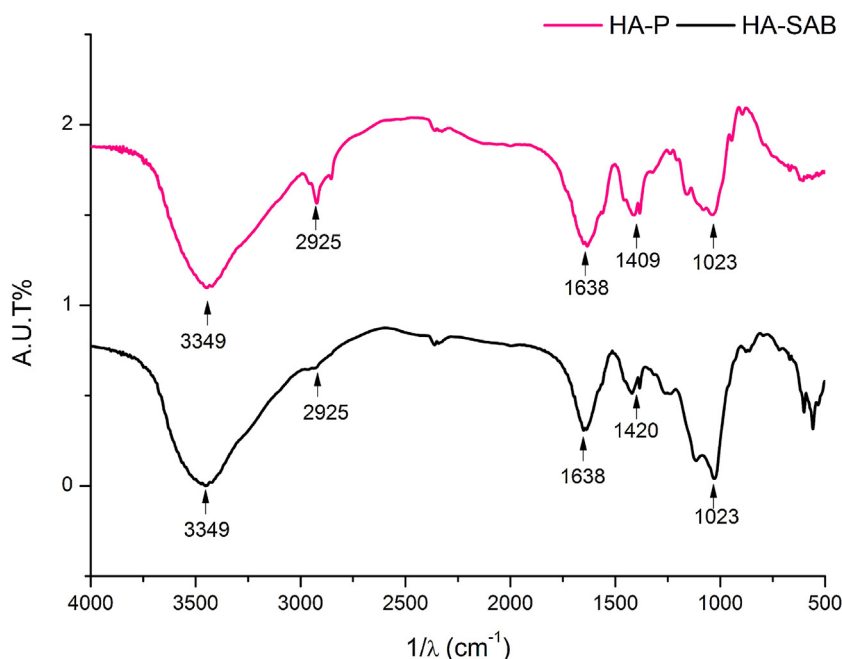
$$\beta_{2\theta} = \beta_{\text{measured}} - \beta_{\text{instrumental}} \quad (2)$$

The crystallinity index was determined by the Segal method in equation 3, where  $I_{\text{am}}$  is the intensity of amorphous halo in  $18.05^{\circ}$  ( $2\theta$ ) and  $I_{002}$  is the intensity of 002 diffraction peak of cellulose.

$$I_{\text{cr}=1} = \frac{I_{\text{am}}}{I_{002}} \times 100 \quad (3)$$

**2.2.3.4. Molar mass profile and homogeneity determination of HA-P and HA-SAB.** HPSEC (high-performance size-exclusion chromatography) coupled with multidetector analyses were performed to determine the weight, average molar mass  $\bar{M}_w$ , and polydispersity ( $\text{PD} = \bar{M}_w/\bar{M}_n$ ) of the samples, on a Waters model 2410, equipped with four columns (Ultrahydrogel 2000, 500, 250, and 120 molecular weight ranged from  $7 \times 10^6$  to  $1 \times 10^2\text{ g mol}^{-1}$ ; Milford, MA, USA) was serially connected and coupled to the multidetection system consisting of a Waters 2410 differential refractometer (RI) detector (Milford, MA, USA), and a DSP-F Wyatt Technology multiangle laser light scattering (MALLS) detector (Santa Barbara, CA, USA).

$\text{NaNO}_2$  ( $0.1\text{ mol L}^{-1}$ ) containing  $\text{NaN}_3$  ( $0.5\text{ g L}^{-1}$ ) was used as the eluent at a flow rate of  $0.6\text{ mL min}^{-1}$ . Samples HA-P and HA-SAB were dispersed in the eluent at concentrations of  $1.0\text{ mg mL}^{-1}$  and  $2.5\text{ mg mL}^{-1}$ , respectively, and filtered ( $0.22\text{ }\mu\text{m}$ , cellulose acetate



**Fig. 1.** Infrared spectra (FT-IR) of Standard Hyaluronic Acid (HA-P) and Hyaluronic Acid from chicken comb (HA-SAB).

filters, Millipore). After the extraction, the resulting power corresponding to sample HA-SAB was dialyzed prior to the preparation of the HPSEC experiments. The experiments were conducted at 25 °C. The  $dn/dc$  value was obtained from the literature [22] and was assumed to be  $0.185 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . Data were analyzed using ASTRA 4.70.07 software.

**2.2.3.5. Thermal gravimetric analysis (TG).** Samples HA-P and HA-SAB were analyzed with respect to their thermal degradation behavior. A simultaneous thermal analyzer, fabricated by Netzsch, model STA 449 F3 Jupiter, was used employing  $\text{N}_2$  as the purge gas, at a flow rate of  $50 \text{ mL min}^{-1}$ . The experiments were conducted from 25 to 900 °C at a heating rate of  $10 \text{ K min}^{-1}$ . Approximately 5 mg of the sample were put into an alumina crucible. An empty crucible was used as reference.

Thermogravimetric analysis (TG) of native and bacterial cellulose/Hyaluronic acid membranes were conducted under an air atmosphere with a heating rate of 30 °C per min in the temperature range from 25 to 600 °C, fabricated by Shimadzu, model TGA 50

**2.2.3.6. Scanning electron microscopy (SEM).** The morphology of the membranes was performed using a FEI Quanta 200 microscope (Oregon, USA). Pieces of dry cellulose membranes were mounted onto the bronze (Stubs) using double-sided tape and then coated with a layer of gold (40–50 nm), allowing for surface visualization. The average width of the microfibrils was estimated from measurements performed on 10 microfibrils using ImageJ software.

**2.2.3.7. Atomic force microscopy (AFM).** Tapping mode AFM images were recorded in air using a commercial Nanosurf Flex AFM microscope (Nanosurf, Switzerland) at room temperature (~24 °C). Height mode images ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  and  $512 \times 512 \text{ pixels}^2$ ) were collected with a scan speed between 1 and 3 Hz. Image treatment was performed using Gwyddion software and the topography and the roughness were analyzed on the native and modified films.

### 3. Results and discussion

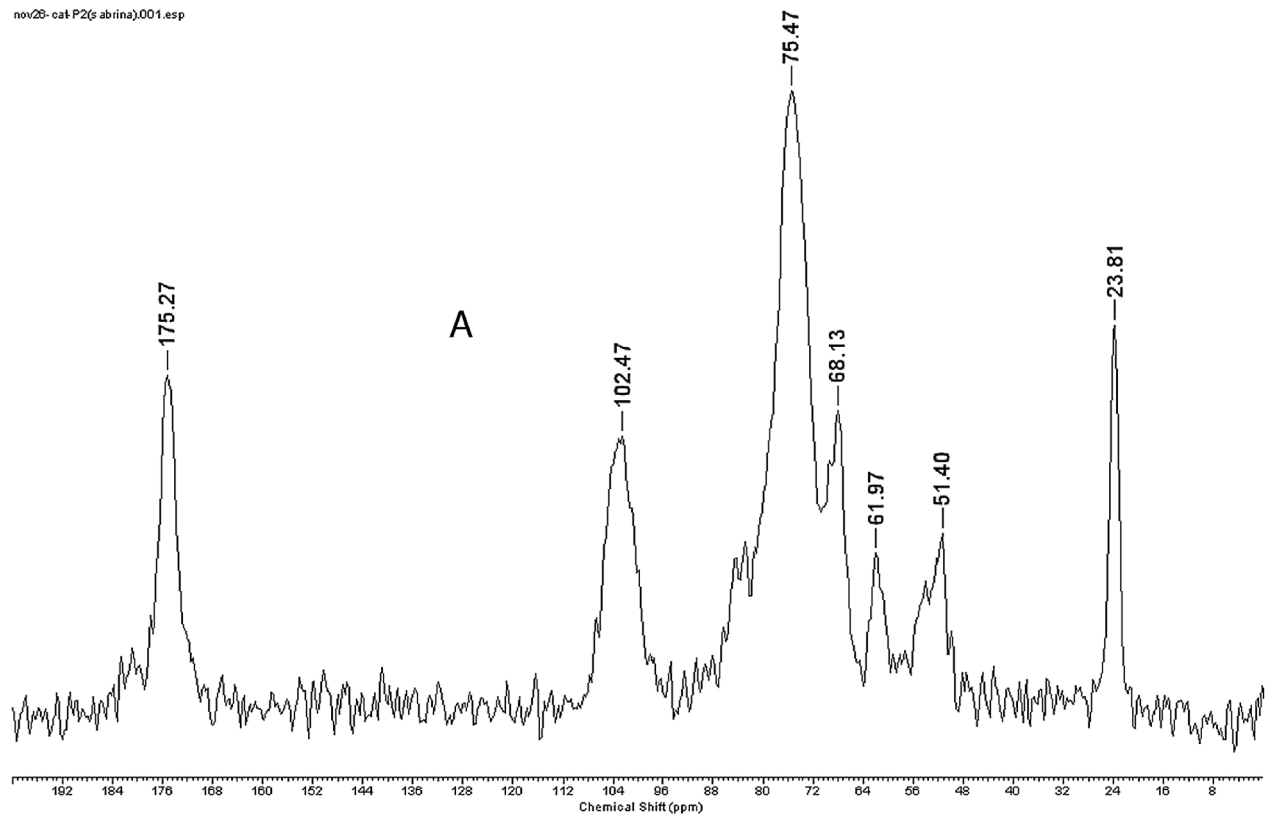
#### 3.1. Process to isolate hyaluronic acid from chicken comb

To obtain hyaluronic acid (HA) from chicken comb, preliminary tests were carried out to define the main steps for the production of HA according with the previously related on literature. The first test involves stages of grind, dehydration with acetone, delipidation with chloroform (on Soxhlet), enzymatic digestion with a protease, ethanol precipitation and drying, than was analyzed by solid state NMR, and was possible observe a large amount of peptides and lipids. Through these results, the chicken comb was subject to a new process involving steps of enzymatic digestion with protease, dialysis, centrifugation followed by washing with ethanol several times and drying, however, it shows a large amount of protein in the isolated material.

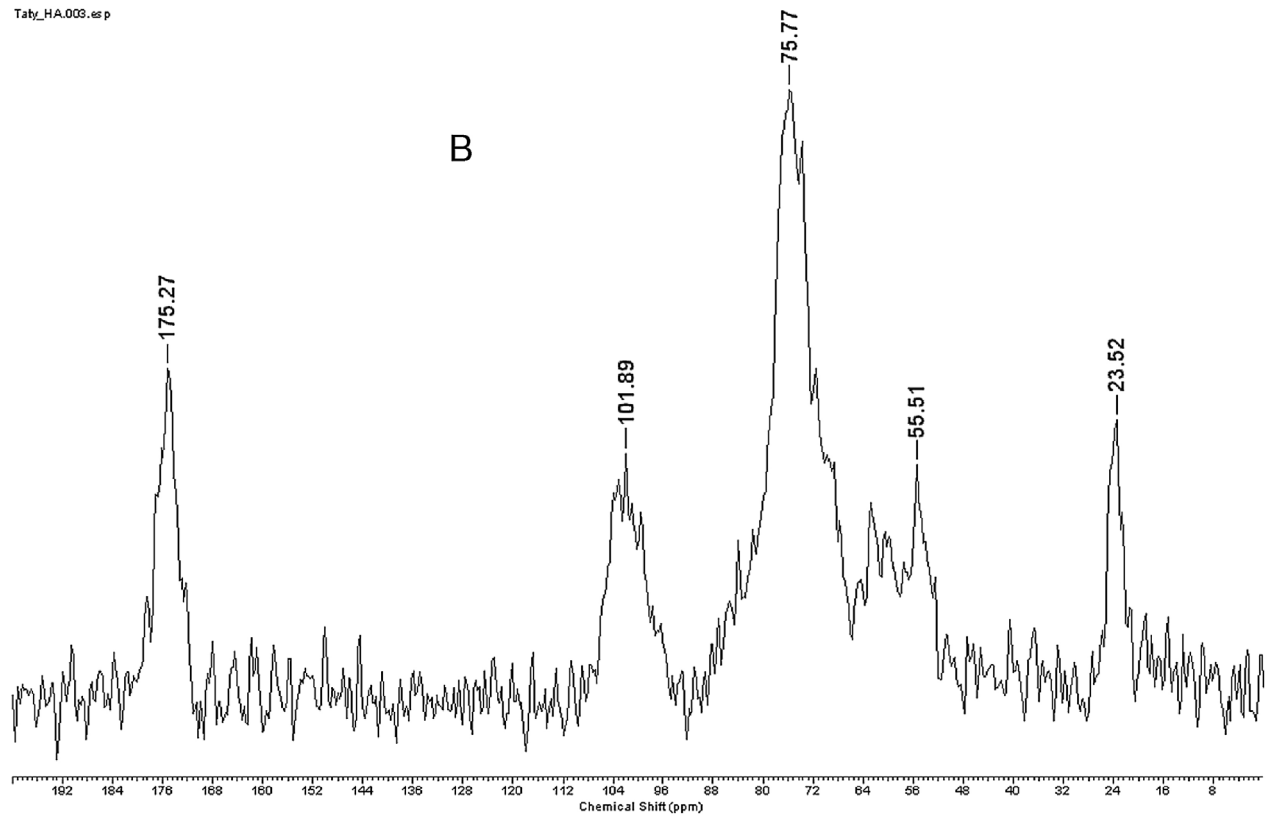
After unsatisfactory results, the new methodology for isolation of HA could be defined. This methodology involves steps of grinding and homogenization, enzymatic digestion with protease and lipase, ion exchange chromatography using the eluent sodium chloride solution, precipitation with salts, vacuum filtration, ethanol precipitation and drying.

The new process involved the two commercial enzymes, due some advantages, about the dismemberment of organic material (chicken comb) and the fact of providing the greater elimination of protein and lipids from the chicken comb when compared to the delipidation process with organic solvent, which still generates organic solvent as residue. Another change was the use of an anionic resin, that generally act selectively in the product of interest and can be reused in new extractions. With the new methodology could be observed that the step grinding and homogenization of the tissue increase the contact surface of the material facilitating the extraction process and the enzymatic action on the cellular structures resulting in the disintegration of the material and the release of glycosaminoglycan. The precipitation with salts was based on the salting out effect [23]. When the extract of hyaluronic acid is treated with salts, the precipitation of nucleic acids and proteins occurs. This method of purification is effective and reduces the use

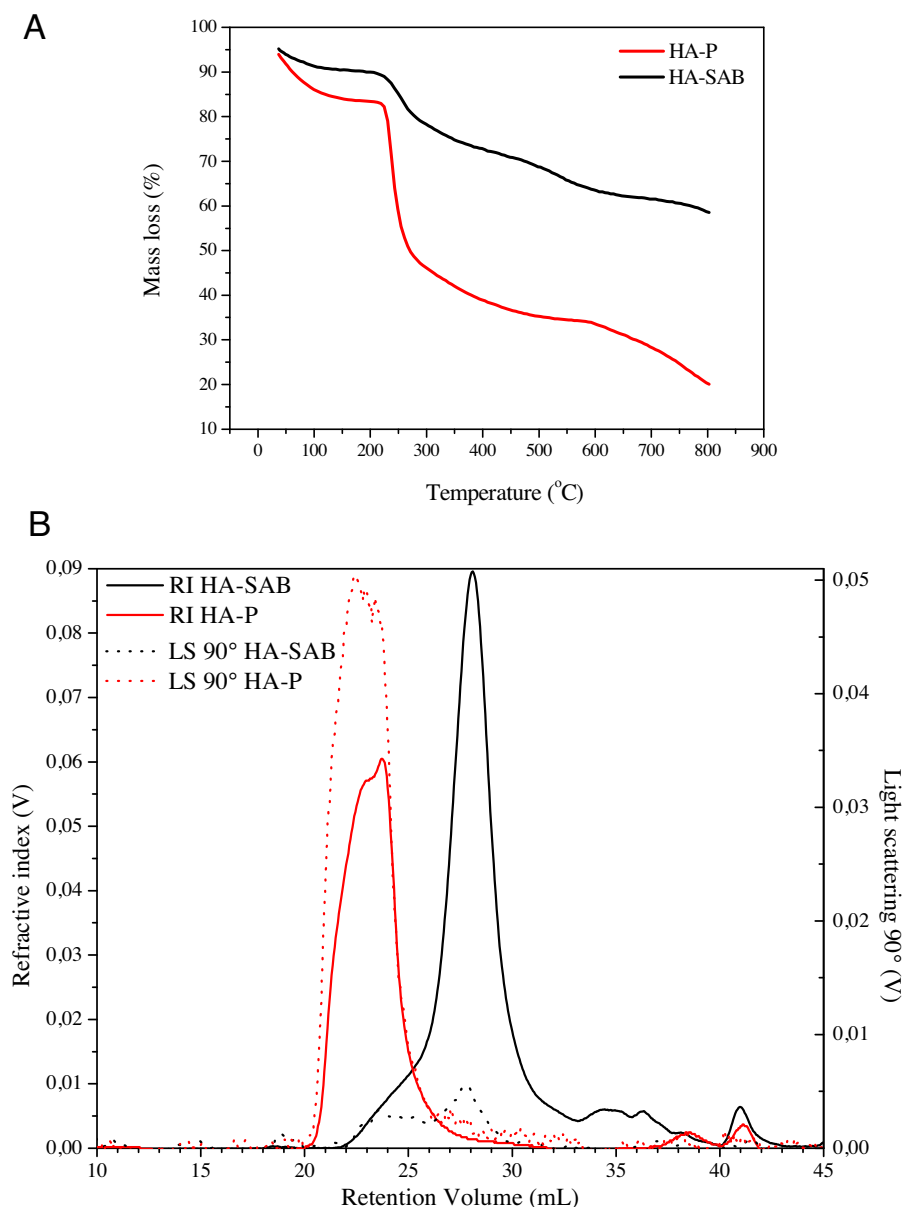
nov28-cat P2(s abrina).001.esp



Tab\_HA.009.esp



**Fig. 2.** Spectra of the Solid State NMR ( $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR) of the HA-SAB isolated from chicken comb (A) and hyaluronic acid standard (HA-P) (B).



**Fig. 3.** TG curves of HA-P and HA-SAB ( $N_2$  atmosphere, at  $50\text{ mL min}^{-1}$ ) (A) and HPSEC elution profile of HA-P and HA-SAB (B).

of toxic organic materials and further reduces additional steps for purification [24].

### 3.2. Characterization of hyaluronic acid from chicken comb

#### 3.2.1. Spectroscopic characterization

Infrared (FT-IR) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy analyses were used in order to confirm the hyaluronic acid identity.

Through analyses of the FT-IR (Fig. 1), it was possible to confirm the structure of Hyaluronic Acid from chicken comb (HA-SAB) when comparing with the Hyaluronic Acid Standard (HA-P), through the presence of bands found in both spectra of FT-IR. The presence of a band at  $3447\text{ cm}^{-1}$  is attributed to OH and NH stretching region. The band at  $2925\text{ cm}^{-1}$  can be attributed to stretching vibration of C–H. The band at about  $1638\text{ cm}^{-1}$  corresponds to the amide carbonyl and the band at  $1420\text{ cm}^{-1}$  can be attributed to the stretching of  $\text{COO}^-$ , which refers to the acid group of molecule HA. The absorption band at  $1023\text{ cm}^{-1}$  is attributed to the linkage stretching of

C–OH. The stretching region of group protonated COOH is observed at  $1735$  and  $1255\text{ cm}^{-1}$  [25,26].

The comparison of  $^{13}\text{C}$  spectrum (CP-MAS NMR) spectra, Fig. 2, of the Hyaluronic Acid from chicken comb (HA-SAB) with Hyaluronic Acid Standard (HA-P) shows the same peaks in both spectrum: the carbonyl peak at  $175.3\text{ ppm}$ ; at  $101.9\text{ ppm}$  is attributed to the C1 which is linked with two oxygen atoms; at  $75.8\text{ ppm}$  refers to the secondary carbons linked hydroxyls (C–OH); at  $55.5\text{ ppm}$  can be attributed to C2 *N*-acetylated and  $23.5\text{ ppm}$  refers to the methyl group of acetamide.

#### 3.2.2. Thermal analysis (TG)

The thermal behavior of HA-P and HA-SAB can be comparatively studied by the observation of Fig. 3A. Both samples have three mass loss events. The loss of water occurs up to  $120^\circ\text{C}$ , whereas the main mass loss event can be observed starting at approximately  $220^\circ\text{C}$  for both samples. The corresponding mass loss is more pronounced for HA-P. From approximately  $280^\circ\text{C}$  until the end of the experiment, a continuous mass loss is observed for both samples. The

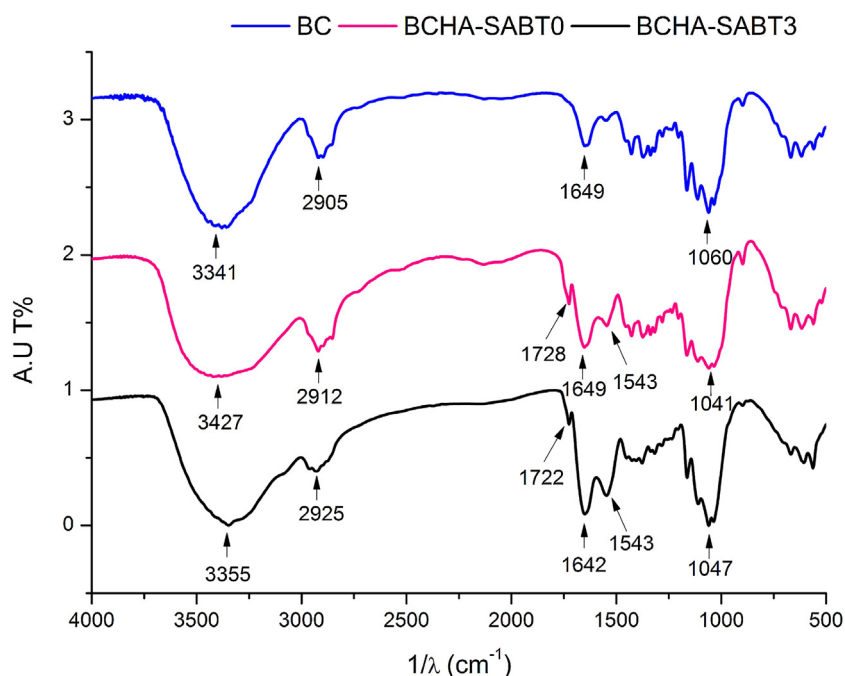


Fig. 4. Infrared spectra (FT-IR) of native bacterial cellulose membrane (CB) and polymeric composites (BCHA-SABT0 and BCHA-SABT3).

remarkable difference between them is the mass residue (in wt%) at 800 °C; 20% and 59% for HA-P and HA-SAB, respectively. High mass residues have been normally found for HA [27].

### 3.2.3. Molar mass profile (HPSEC)

The HPSEC elution profiles of samples HA-P and HA-SAB, using the light scattering (LS 90°) and refractive index (RI) detectors, are shown in Fig. 3B. The light scattering signal is sensitive to the concentration and to the molar mass, while the refractive index detector depends on concentration only. The chromatograms are composed by a major peak, starting at retention volume of around 20 mL, and present responses in both RI and LS detectors.

For HA-P a shoulder peak to the right (24 mL) and two minor signals at retention times of 35 and 40 mL can be observed that did not generate a signal corresponding to the LS detector. The profile observed for HA-P evidences a homogeneous distribution with a dispersity  $\bar{D}$  = 1.06 and an average molar mass weight of  $6.87 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ , and is characterized as a medium molar mass hyaluronic acid [22].

For HA-SAB, the chromatogram is composed of a major signal starting at the retention volume of ~22 mL, with a response in both RI and LS detectors, presenting a large shoulder peak to the left (centered at ~24 mL) with low intensity on the RI detector. Two minor signals to the right were also observed, with a poorly resolved and wide RI peak (~33 and 40 mL). These minor peaks did not generate any signals on the LS detector. The homogeneity observed for HA-SAB ( $PD = 1.07$ ) is similar to what was observed for HA-P, however, average molar mass weight for HA-SAB is  $2.56 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ , one order of magnitude lower.

In general, HA has a molar mass of  $10^6$ – $10^7 \text{ g mol}^{-1}$  and broad molar mass distribution. Both parameters have impacts on its application, especially in the biomedical field. Usually, the molar mass of HA extracted from chicken comb is lower than  $1.0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$  that is highly disperse when a proper method of preparation is adopted (like filtration) [28].

In this study, the process utilized to obtain HA from chicken combs was able to extract low molar mass HA molecules with very low dispersity (~1.0), which is interesting once there is no need

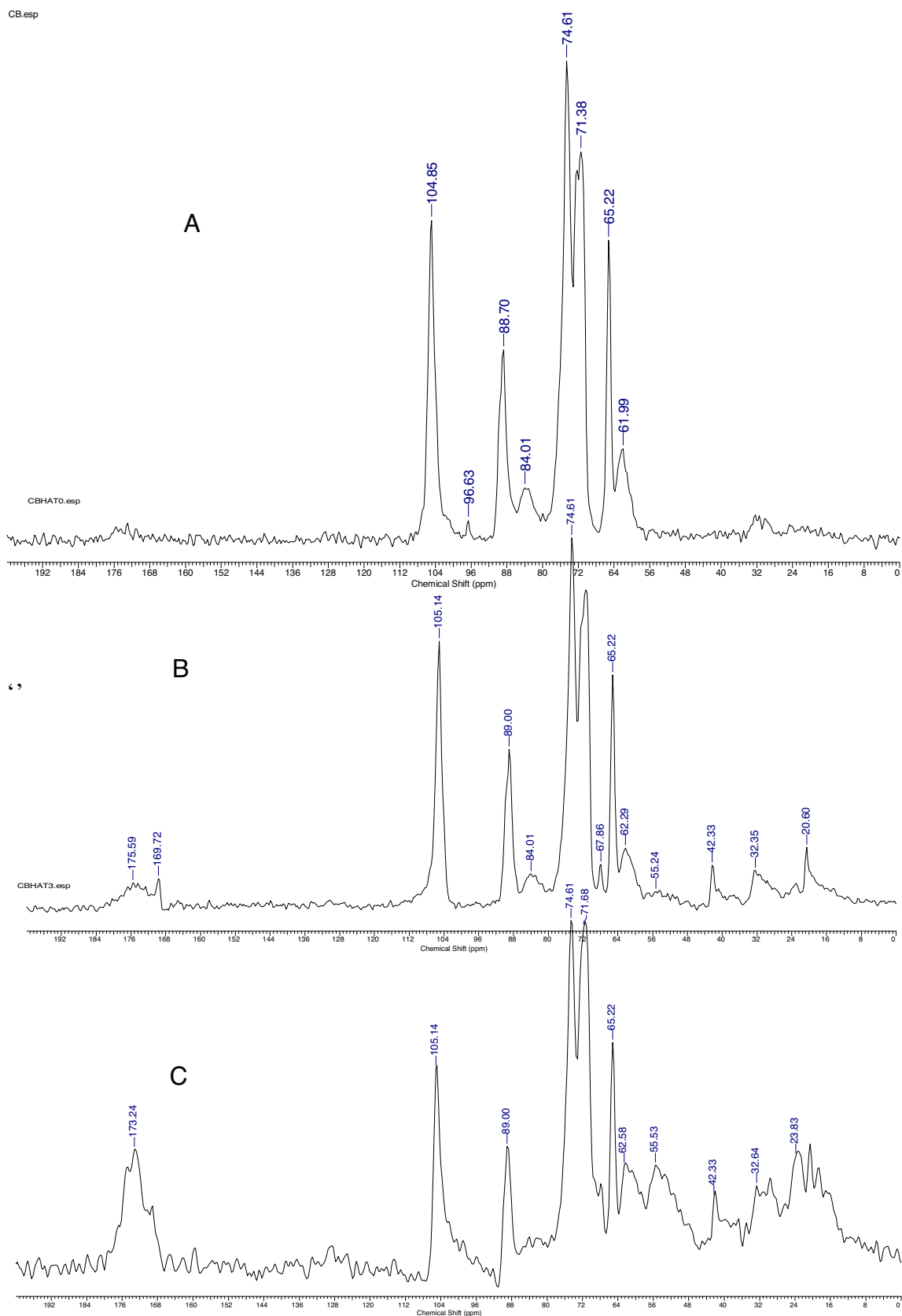
to follow additional steps to produce low molar mass and highly homogeneous HA. Moreover, taking into account that the group of animals were all slaughtered strictly within 45 days, under the same diet and management conditions, it implies that the structural profiles were similar and infers the low variability in molar mass of the isolated HA.

### 3.3. Characterization of bacterial cellulose/hyaluronic acid membrane

#### 3.3.1. Spectroscopic characterization (FT-IR and $^{13}\text{C}$ NMR)

The incorporation of HA-SAB in the cellulose membranes can be studied by evaluating the FT-IR spectrum. The absorption bands observed in Fig. 4 possessed HA characteristics found in the spectrum of polymeric composites. The predominant absorption band of cellulose was observed in the region at  $3341 \text{ cm}^{-1}$ , which refers to the stretching vibration of O–H. The presence of a large band exactly at  $3427 \text{ cm}^{-1}$  in BCHA-SABT0 and  $3355 \text{ cm}^{-1}$  in BCHA-SABT3 corresponds to the stretching vibration of OH and NH. The absorption band of C–H was verified at  $2905 \text{ cm}^{-1}$  in BC, at  $2912 \text{ cm}^{-1}$  in BCHA-SABT0 and at  $2925 \text{ cm}^{-1}$  in BCHA-SABT3. Besides the data described above, the higher intensity band at  $1649$  and  $1642 \text{ cm}^{-1}$  can be attributed to C=O and group amide of HA structure and the band at  $1424 \text{ cm}^{-1}$  refers to the stretching vibration to C–O, which features the HA molecule acid group, indicating the presence of HA-SAB in the cellulose membranes. The absorption bands at  $1060 \text{ cm}^{-1}$  in BC, at  $1041 \text{ cm}^{-1}$  in BCHA-SABT0, and at  $1047 \text{ cm}^{-1}$  in BCHA-SABT3 are attributed to C–OH.

Haxaire et al. (2002) used FT-IR to check bands of carboxylate groups in the hyaluronic acid structure, where they compared the spectrum of hyaluronic acid with the hyaluronic acid containing  $\text{Na}^+$  changed by  $\text{H}^+$ . The spectrum of hyaluronic acid indicated the carboxyl band C=O at  $1745 \text{ cm}^{-1}$  and the band C–O of the same group COOH at  $1220 \text{ cm}^{-1}$  [10,29]. The bands observed in the spectrum of polymeric composites, exactly at  $1728 \text{ cm}^{-1}$  in BCHA-SABT0 and  $1722 \text{ cm}^{-1}$  in BCHA-SABT3, were not found in the spectrum that featured the hyaluronic acid (Fig. 1). This difference can be related with the interaction of the cellulose hydroxyl



**Fig. 5.**  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR spectra of the native bacterial cellulose (BC) (A) and produced under the presence of HA-SAB added in first day BCHA-SABT0 (B), and third day BCHA-SABT3 (C) of fermentation.

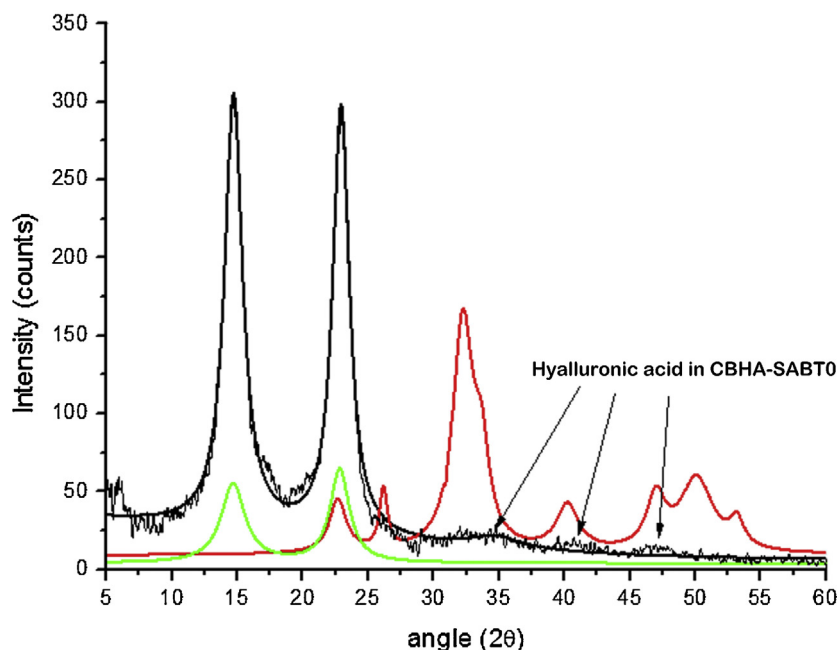


Fig. 6. XRD of the Bacterial cellulose (BC), BCHA-SABT0 and BCHA-SABT3.

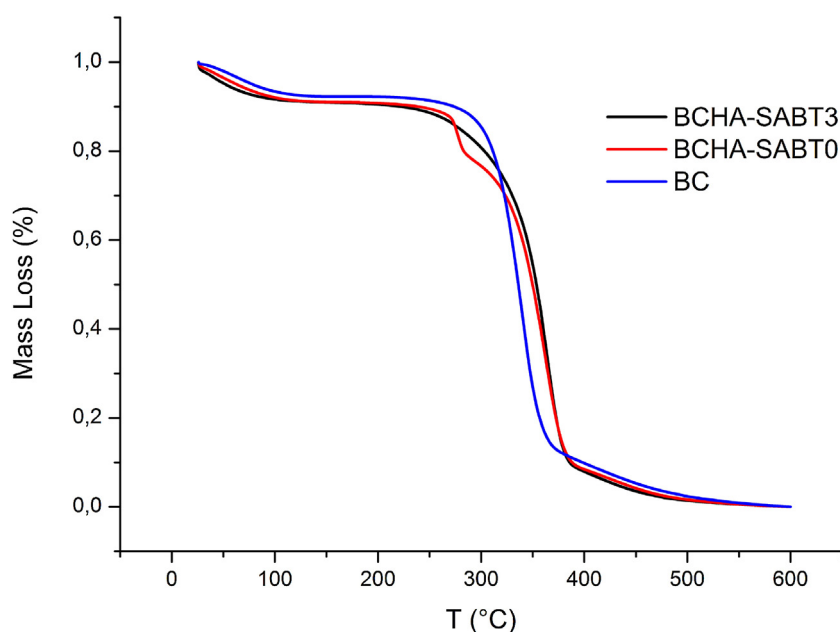


Fig. 7. TG (A) and DTG (B) curves of native bacterial cellulose (BC) and the polymeric composites BCHA-SABT0 and BCHA-SABT3.

group with carboxyl group of HA-SAB during the fermentation process, therefore, when the hyaluronic acid is alone, it is in salt form (sodium hyaluronate), and when the hyaluronic acid interacted with the cellulose, it is protonated [10].

The  $^{13}\text{C}$  spectrum (CP-MAS NMR) of BCHA-SABT0 and BCHA-SABT3 (Fig. 5) also confirm the success of the HA-SAB incorporation in the cellulose membranes through peaks featuring molecule HA. The peak at about 23 ppm refers to the methyl group of acetamide, the peak observed at 55 ppm refers to C2 N-acetylated and at about 175 ppm there is a carbonyl peak. Besides those of cellulose and HA, a wide number peaks around 20 ppm, 30 ppm e 40 ppm were observed, referring to aliphatic carbon chains. Additionally, at about 175 ppm the carbonyl peak was observed, which can be attributed to some peptides.

After cellulose production, a cleaning process was implemented to remove some residues such as proteins from the membranes (BC, BCHA-SABT0 e BCHA-SABT3). The ten days of fermentation were enough time to consume all protein from the yeast extract, however, the presence of residue peptides even after cleaning indicates that these are peptides strongly associated to the membrane of with HA. The nature of these interactions could be interpreted as electrostatic interactions [30] or trapped inside the cellulose net considering that the crystalline index ( $I_c$ ) shows a decrease in the organization of microfibrils in the membranes containing HA compared with the native bacterial cellulose with  $I_c=67.83\%$ , the BCHA-SABT0 with 63.29%, and BCHA-SABT3 with 58.92%.

## Topography

## Topography 3D

## Phase

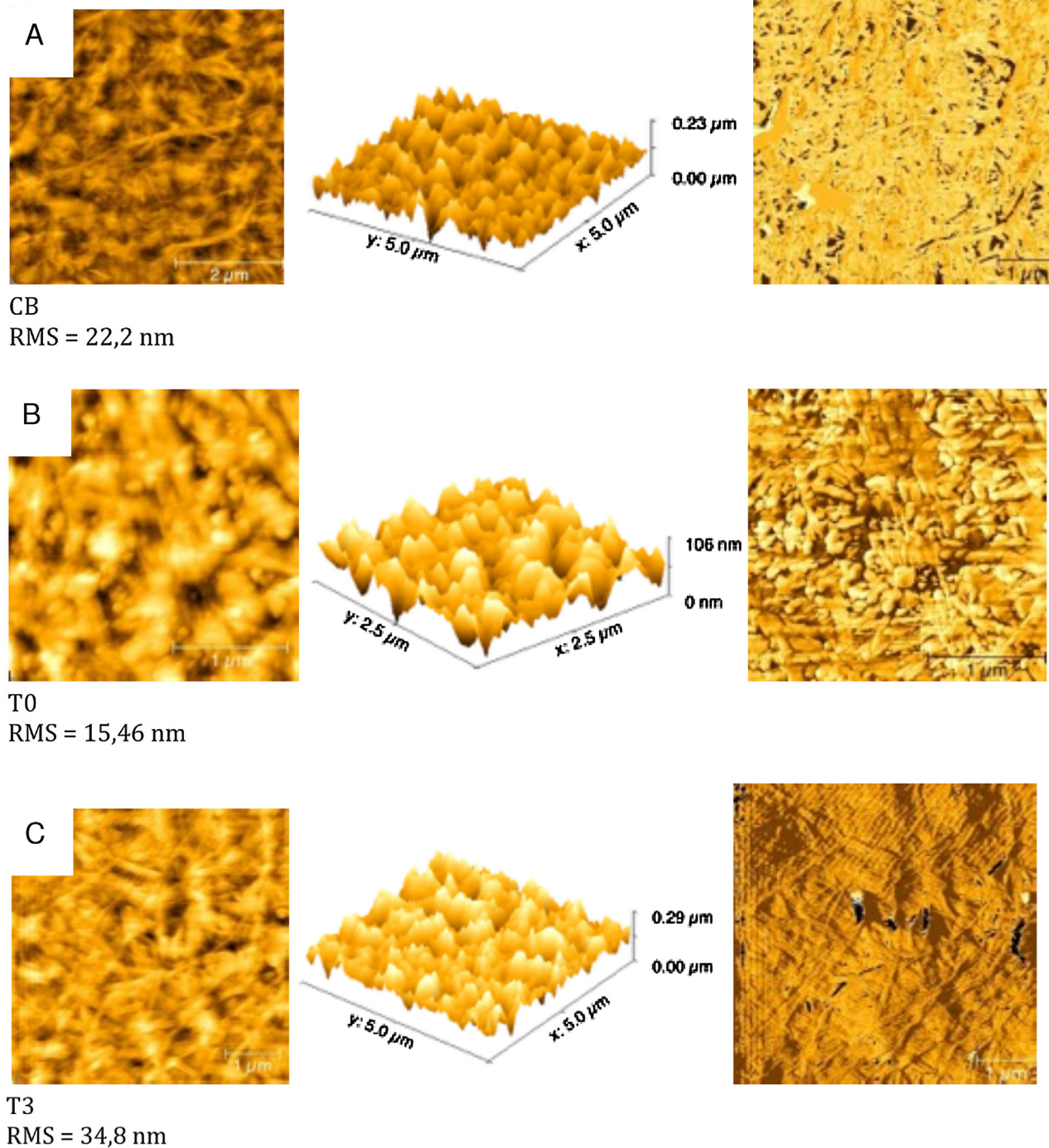


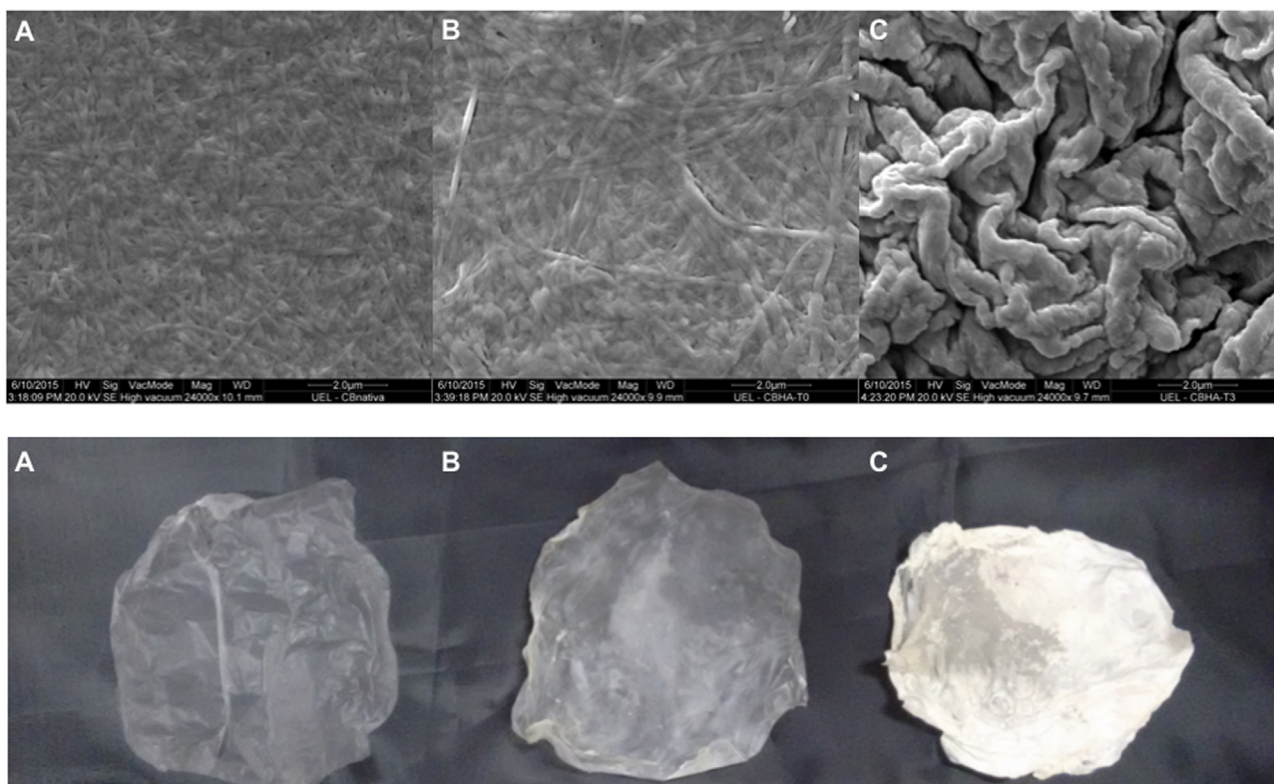
Fig. 8. AFM images of the bacterial cellulose (BC), BCHA-SABT0 and BCHA-SABT0.

### 3.3.2. Crystalline arrangement of the native bacterial cellulose and bacterial cellulose/hyaluronic acid membranes

The bacterial cellulose membrane is known by its crystalline structure and its influence on membrane properties. The X-ray diffraction and solid state NMR are tools that contemporaneously clarify the type and the amount of whole membrane that has crystal arrangements, mainly identified by diffraction peak angle and profile.

Additionally, the X-Ray diffraction was used to check the crystalline index. The crystalline index determined for BC, BCHA-SABT0

and BCHA-SABT3 were 66.0%, 64.1% and 57.6% respectively, which are in agreement with the crystallinity values obtained by NMR. Therefore, it appears that in both techniques the values of  $I_c$  decreased due to HA-SAB added on the first and third day of fermentation. This effect is due to the interference of HA-SAB in the polymerization and crystallization of cellulose microfibrils. This observation was checked in different composites of bacterial cellulose produced from the immersion of cellulose in different compounds, such as collagen [31], graphene nanocomposite [32] and polyethylene glycol [33]. However, an increase of 0.72 nm in



**Fig. 9.** SEM images of the BC (A), BCHA-SABT0 (B) and BCHA-SABT3 (C).

the diameter of the crystallite from the polymeric composites was observed.

The native cellulose can present two forms of polymorphs: cellulose I $\alpha$  (triclinic unit cell) and cellulose I $\beta$  (monoclinic unit cell). The predominance of each crystal form depends on the cellulose source whether that be the bacterial cellulose predominate in the I $\alpha$  structure, or the vegetal cellulose predominate in the I $\beta$  structure [34]. The diffractogram (Fig. 6) obtained from X-Ray analysis showed standard peaks featuring triclinic unit cells (cellulose I $\alpha$ ), with reflections at 14.7°, 16.2° and 22.5° indexed at 100, 010 and 110 respectively [10,34,35]. The polymeric composites showed a XRD profile similar to the native bacterial cellulose, with the only distinction being the reflections intensity of cellulose I $\alpha$ . The uniplanarity of the cellulose ribbons is relative to the reflection indexed as 100. The BCHA-SABT0 showed relative high intensity of the 100 reflection resulting in the reduction of uniplanarity of cellulose ribbons [10].

The BCHA-SABT3 membrane diffractogram presents peaks that correspond to the crystalline hyaluronic acid, which is not clearly observed for CBHA-SABT0, and is compatible with the previous results that show more hyaluronic acid on T3 than T0. Moreover, the cellulose crystallinity is affected and these results are different from those observed by Lopes and cols [10], that do not observe crystalline hyaluronic acid traces on the diffractograms. Additionally, the  $I_c$  for the equivalent third day sample T3 (70%) was higher than our result, which is correlated with the amount of HA incorporated into the membrane. Factors such as the solubility or the molecular mass could play a role on the amount of HA-SAB on BC, nevertheless, the crystallinity of HA-SAB on CBHA-SABT3 remains beside the exerted forces through cellulose chains that constrain the inserted glycosaminoglycan that could be nested on the cellulose network, and this has a molecular mass dependence.

### 3.3.3. Thermal gravimetric analysis (TG)

The thermal degradation behavior of native bacterial cellulose and polymeric composites can be observed in the thermogravimetric curves (Fig. 7). The thermal degradation of a typical BC membrane involves some mass loss steps, such as dehydration and depolymerization of the main polymer network [36]. The first step, which occurs in the temperature range from 26 to 140 °C (Fig. 7A), corresponds to the loss of water molecules that are associated with the cellulose fibrils [37,38].

The beginning of the structural disruption is defined as the temperature where 10 wt% of the mass is lost,  $T_{10\%}$ . In Fig. 7A, it is possible to observe that  $T_{10\%}$  for BC is higher than  $T_{10\%}$  for the polymeric composites (BC = 293.6 °C; BCHA-SABT0 = 269.6 °C; BCHA-SABT3 = 275.9 °C). Therefore it can be inferred that native bacterial cellulose is more thermally stable than the polymeric composites. These results also confirm the presence of HA-SAB in the membranes, that are more susceptible to thermal degradation [10].

The main mass loss step, corresponding to the higher percentage of mass loss, was observed from 250 to 400 °C for all samples. It is reported that at approximately 350 °C the degradation of the cellulose network occurs [37,39]. According to the DTG curves (Fig. 7B), the temperature corresponding to the maximum rate of weight loss ( $T_{max}$ ) increases in the order BC < BCHA-SABT0 < BCHA-SABT3. For the sample CBHA-SABT0, an early event is observed at approximately 278 °C, possibly corresponding to loosely bounded or superficially disposed HA on the cellulose fibrils. According to Chen and Cheng [40], the temperature of degradation of pure HA occurs at 270 °C. This temperature corresponds to the temperature of degradation of HA-SAB, as shown in Fig. 3.

### 3.3.4. Surface physical properties of bacterial cellulose/hyaluronic acid membrane determined by SEM and AFM

The effect of HA-SAB in the morphology of the cellulose network was analyzed by atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM). The AFM images of BC and polymeric composites are shown in Fig. 8. It is possible to visualize the difference in the texture and roughness of the membrane by the addition of HA-SAB during the fermentation. In the BC image it is observed the microfibrillar structure of ribbon bundles. With the addition of HA-SAB, it is possible to observe the ribbons with agglomerates covering the fibrils, such as cotton. The interfacial interaction between the biopolymers (BC/HA) is reflected by the change in roughness. The native bacterial cellulose and BCHA-SABT0 showed a smoother surface with roughness at 22.2 nm and 15.46 nm, respectively. The sample polymeric composites BCHA-SABT3 showed a rougher surface with roughness of 34.8 nm, due to the better incorporation of HA-SAB in the cellulose microfibrils [10]. The Hyaluronic Acid of different molar masses showed differentiated structures. The structure of lower molar mass Hyaluronic Acid has a small network and is rounded, which tends to self-aggregate [41].

Fig. 9 shows the images of BC and polymeric composites obtained by SEM. The surface of polymeric composites is different from native BC. The addition of HA-SAB in different stages of fermentation provided differences on the surface membranes, mainly in BCHA-SABT3, resulting in thicker fibrils. The ribbons of the native cellulose presented thicknesses at 115 nm. With the addition of HA-SAB on the first day of fermentation (CBHA-SABT0) the thicknesses increased to 143 nm. It was not possible to determine the thicknesses of CBHA-SABT3 because of the HA-SAB interaction with the cellulose microfibrils.

## 4. Conclusion

Hyaluronic acid is a key molecule for connective tissue structuration, and supports collagen formation and maintenance. In this article the bacterial cellulose membranes with HA were well formed and characterized by producing a biomaterial potentially well accepted by tissues for regeneration as scaffolding for cell adhesion.

The FT-IR and solid state NMR spectra shows that our process was able to obtain HA from rooster comb, that gives smaller chains than the HA from *Streptococcus equi*, with a small dispersity, resulting in a very restrict range of mass, which was expected considering the same age and the same supply of nutrients.

The bacterial cellulose membranes with the HA isolated show FT-IR and NMR spectra that confirm the presence and identity of HA. The most interesting result was from the moment that HA was added on the *Jc*, and its influence both in NMR and x-ray diffraction, by showing a lower value of BCHA-SABT0 than the BCHA-SABT3. The X-ray diffraction clearly shows the spectra of HA-SAB mixed with the Cel I cellulose, proving that the constraints that the cellulose microfibrils could apply to the HA chains were not enough to disrupt the crystal arrangement, possibly as a result of the small molar mass and the great amount of glycosaminoglycan incorporated.

## Acknowledgements

The authors thank the Spectroscopy Facility Laboratory (SPEC-UEL) for AFM, FT-IR, TG and NMR analysis, Laboratory of Microscopy and Microanalysis (LMEM) for MEV images, X-ray Facility Laboratory (LARX-UEL) for X-ray analysis at the Universidade Estadual de Londrina and the HPSEC facility of the Department of Biochemistry and Molecular Biology (UFPR). The authors would also like to acknowledge the financial support from CNPq-Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (447861/2014-0, and 479992/2013-4).

## References

- [1] A. Endler, C. Sanchez-Rodriguez, S. Persson, Cellulose squeezes through, *Nat. Chem. Biol.* 6 (2010) 785, <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.460>.
- [2] W.K. Czaja, D.J. Young, M. Kawecki, R.M. Brown, The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications, *Biomacromolecules* 8 (2007) 1–12, <http://dx.doi.org/10.1021/bm060620d>.
- [3] J.M. Rajwade, K.M. Paknikar, J.V. Kumbhar, Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 2491–2511, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6426-3>.
- [4] M.H. Kwak, J.E. Kim, J. Go, E.K. Koh, S.H. Song, H.J. Son, et al., Bacterial cellulose membrane produced by *Acetobacter* sp. A10 for burn wound dressing applications, *Carbohydr. Polym.* 122 (2015) 387–398, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.049>.
- [5] D.R. Solway, W.A. Clark, D.J. Levinson, A parallel open-label trial to evaluate microbial cellulose wound dressing in the treatment of diabetic foot ulcers, *Int. Wound J.* 8 (2011) 69–73, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-481X.2010.00750.x>.
- [6] M. Scherner, S. Reutter, D. Klemm, A. Sterner-Kock, M. Guschlbauer, T. Richter, et al., In vivo application of tissue-engineered blood vessels of bacterial cellulose as small arterial substitutes: proof of concept? *J. Surg. Res.* 189 (2014) 340–347, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2014.02.011>.
- [7] S.M. Keshk, Bacterial cellulose production and its industrial applications, *J. Bioprocess. Biotech.* 4 (2014) 1–10, <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9821.1000150>.
- [8] W. Czaja, A. Krystynowicz, S. Bielecki, R. Brown Jr., Microbial cellulose—the natural power to heal wounds, *Biomaterials* 27 (2006) 145–151, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.035>.
- [9] G.M. de Olyveira, M.L. dos Santos, C. dos Santos Riccardi, L.M.M. Costa, P.B. Daltro, P. Basmaji, et al., Physically modified bacterial cellulose biocomposites for guided tissue regeneration, *Sci. Adv. Mater.* 7 (2015) 1657–1664, <http://dx.doi.org/10.1166/sam.2015.2283>.
- [10] T.D. Lopes, I.C. Riegel-Vidotti, A. Grein, C.A. Tischer, P.C.D.S. Faria-Tischer, Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: production and characterization, *Int. J. Biol. Macromol.* 67 (2014) 401–408, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.047>.
- [11] W. Zhu, W. Li, Y. He, T. Duan, In-situ biopreparation of biocompatible bacterial cellulose/graphene oxide composites pellets, *Appl. Surf. Sci.* 338 (2015) 22–26, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.02.030>.
- [12] D.R. Ruka, G.P. Simon, K.M. Dean, In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 1717–1723, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.007>.
- [13] S.M. El-hoseny, P. Basmaji, G.M. De Olyveira, L. Maria, M. Costa, A.M. Alwahedi, et al., Natural ECM-Bacterial Cellulose Wound Healing—Dubai Study, (2015) 237–246.
- [14] C.J. Grande, F.G. Torres, C.M. Gomez, O.P. Troncoso, J. Canet-Ferrer, J. Martínez-Pastor, Development of self-assembled bacterial cellulose-starch nanocomposites, *Mater. Sci. Eng. C* 29 (2009) 1098–1104, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2008.09.024>.
- [15] G. Kogan, L. Soltés, R. Stern, P. Gemeiner, Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications, *Biotechnol. Lett.* 29 (2007) 17–25, <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-006-9219-z>.
- [16] J.R.E. Fraser, T.C. Laurent, U.B.G. Laurent, Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover, *J. Intern. Med.* 242 (1997) 27–33.
- [17] M.N. Collins, C. Birkinshaw, Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—a review, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 1262–1279, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>.
- [18] S. Gerecht, J. a Burdick, L.S. Ferreira, S. a Townsend, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 11298–11303, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0703723104>.
- [19] S. Hestrin, M. Schramm, Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose, *Biochem. J.* 58 (1954) 345–352.
- [20] P.C.S. Faria-Tischer, C.A. Tischer, L. Heux, S. Le Denmat, C. Picart, M.-R. Sierakowski, et al., Preparation of cellulose II and III films by allomorphic conversion of bacterial cellulose I pellicles, *Mater. Sci. Eng. C* 51 (2015) 167–173, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.02.025>.
- [21] A. Merci, A. Urbano, M.V.E. Grossmann, C.A. Tischer, S. Mali, Properties of microcrystalline cellulose extracted from soybean hulls by reactive extrusion, *Food Res. Int.* 73 (2015) 38–43, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.020>.
- [22] D.Y. Kang, W.-S. Kim, I.S. Heo, Y.H. Park, S. Lee, Extraction of hyaluronic acid (HA) from rooster comb and characterization using flow field-flow fractionation (FIFFF) coupled with multiangle light scattering (MALS), *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3530–3536, <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201000478>.
- [23] T. Arakawa, S.N. Timasheff, T.T. Arakawa, Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding, *Biochemistry* 23 (1984) 5912–5923, <http://dx.doi.org/10.1021/bi00320a004>.

- [24] T.-H. Kim, H.-L. Kim, S.-Y. Park, D.-K. Jang, Method for purifying hyaluronic acid using calcium salt and phosphate salt, or calcium, EP1766038A1, 2007. <https://www.google.com/patents/EP1766038A1?cl=en&dq=Method+for+purifying+hyaluronic+acid+ionic+exchange&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKewjXq8qkobDQAhUGIjAKHQWqAuMQ6AEIPzAE>.
- [25] R. Gilli, M. Kacuráková, M. Mathlouthi, L. Navarini, S. Paoletti, FTIR studies of sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solution, *Carbohydr. Res.* 263 (1994) 315–326, [http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)00147-2](http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(94)00147-2).
- [26] Y. Wu, Preparation of low-molecular-weight hyaluronic acid by ozone treatment, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 709–712, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.081>.
- [27] J. Chen, C. Peng, J. Nie, J.F. Kennedy, G. Ma, Lyophilization as a novel approach for preparation of water resistant HA fiber membranes by crosslinked with EDC, *Carbohydr. Polym.* 102 (2014) 8–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.063>.
- [28] M. Khanmohammadi, A.B. Khoshfetrat, S. Eskandarnezhad, N.F. Sani, S. Ebrahimi, Sequential optimization strategy for hyaluronic acid extraction from eggshell and its partial characterization, *J. Ind. Eng. Chem.* 20 (2014) 4371–4376, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2014.02.001>.
- [29] K. Haxaire, Y. Maréchal, M. Milas, M. Rinaudo, Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments, *Biopolymers* 72 (2003) 10–20, <http://dx.doi.org/10.1002/bip.10245>.
- [30] K.R. Grymonpre, B.A. Staggemeier, P.L. Dubin, K.W. Mattison, Identification by integrated computer modeling and light scattering studies of an electrostatic serum albumin-hyaluronic acid binding site, *Biomacromolecules* 2 (2001) 422–429, <http://dx.doi.org/10.1021/bm005656z>.
- [31] C. Zhijiang, Y. Guang, Bacterial cellulose/collagen composite: characterization and first evaluation of cytocompatibility, *J. Appl. Polym. Sci.* 120 (2011) 2938–2944, <http://dx.doi.org/10.1002/app.33318>.
- [32] Y. Feng, X. Zhang, Y. Shen, K. Yoshino, W. Feng, A mechanically strong, flexible and conductive film based on bacterial cellulose/graphene nanocomposite, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 644–649, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.039>.
- [33] Z. Cai, J. Kim, Bacterial cellulose/poly(ethylene glycol) composite: characterization and first evaluation of biocompatibility, *Cellulose* 17 (2010) 83–91, <http://dx.doi.org/10.1007/s10570-009-9362-5>.
- [34] J. Sugiyama, J. Persson, H. Chanzy, Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native celluloses, *Macromolecules* 24 (1991) 2461–2466, <http://dx.doi.org/10.1021/ma00009a050>.
- [35] C. Castro, R. Zuluaga, J.L. Putaux, G. Caro, I. Mondragon, P. Gañána, Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes, *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) 96–102, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.072>.
- [36] J. George, K.V. Ramana, A.S. Bawa, Siddaramaiah, Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites, *Int. J. Biol. Macromol.* 48 (2011) 50–57, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.09.013>.
- [37] S.M. Li, N. Jia, J.F. Zhu, M.G. Ma, R.C. Sun, Synthesis of cellulose-calcium silicate nanocomposites in ethanol/water mixed solvents and their characterization, *Carbohydr. Polym.* 80 (2010) 270–275, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.024>.
- [38] P.C.S. Faria-Tischer, C.A.R. Costa, I. Tozetti, L.H. Dall'Antonia, M. Vidotti, Structure and effects of gold nanoparticles in bacterial cellulose–polyaniline conductive membranes, *RSC Adv.* 6 (2016) 9571–9580, <http://dx.doi.org/10.1039/C5RA25332B>.
- [39] H. Zhang, H. Guo, B. Wang, S. Shi, L. Xiong, X. Chen, Synthesis and characterization of quaternized bacterial cellulose prepared in homogeneous aqueous solution, *Carbohydr. Polym.* 136 (2016) 171–176, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.029>.
- [40] J.P. Chen, T.H. Cheng, Preparation and evaluation of thermo-reversible copolymer hydrogels containing chitosan and hyaluronic acid as injectable cell carriers, *Polymer (Guildf.)* 50 (2009) 107–116, <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2008.10.045>.
- [41] I. Jacoboni, U. Valdre, G. Mori, D.J. Quaglino, I. Pasquali-Ronchetti, Hyaluronic acid by atomic force microscopy, *J. Struct. Biol.* 126 (1999) 52–58.