



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

HANNY CRISTINA BRAGA PEREIRA

**ÁCIDO HIALURÔNICO DE *Streptococcus zooepidemicus*
ATCC 39920: PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUAS
ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE**

Londrina
2017



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



HANNY CRISTINA BRAGA PEREIRA

**ÁCIDO HIALURÔNICO DE *Streptococcus zooepidemicus*
ATCC 39920: PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUAS
ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE**

Londrina
2017

HANNY CRISTINA BRAGA PEREIRA

**ÁCIDO HIALURÔNICO DE *Streptococcus zooepidemicus*
ATCC 39920: PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUAS
ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, em nível de mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial ao título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Londrina
2017

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

Pereira, Hanny Cristina Braga Pereira.

Ácido Hialurônico de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920: Produção e Avaliação de suas Atividades Antimicrobiana e Antioxidante / Hanny Cristina Braga Pereira. - Londrina, 2017.

102 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

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

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia microbiana - Tese. 2. Ácido hialurônico - Tese. 3. *Streptococcus zooepidemicus* - Tese. 4. Potencial farmacológico - Tese. I. Celligoi, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

HANNY CRISTINA BRAGA PEREIRA

**ÁCIDO HIALURÔNICO DE *Streptococcus zooepidemicus* ATCC
39920: PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, em nível de mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial ao título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone
Celligoi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Maria de Lourdes Corradi da Silva
Universidade Estadual Paulista – USP

Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 10 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dr^a. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, pelo aceite em minha orientação desde os projetos de iniciação científica, por permanecer contribuindo cientificamente durante esses anos, pelo seu profissionalismo e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha, por permitir a realização dos experimentos no laboratório de bacteriologia, pelo aceite na participação da banca de qualificação e defesa e por todas as contribuições. À Profa. Dra. Josiane Alessandra Vignoli, pelo auxílio como professora de graduação, pelas contribuições realizadas na qualificação deste trabalho e pela amizade. À Profa. Dra. Maria de Lourdes Corradi da Silva, pelas correções e sugestões como banca examinadora.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas e do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, cujas contribuições acadêmicas foram de extrema importância para a conclusão deste trabalho, em especial à Profa. Dra. Cristiani Baldo da Rocha.

Ao aluno de pós-graduação em microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, Gustavo Saikawa, por todas as contribuições nos experimentos e à estagiária Ana Paula, pelo auxílio no decorrer deste trabalho. Às colegas de laboratório Gabrielly, Isadora, Janaína, Mayara, Andressa, Sabrina e Melissa, pelas conversas descontraídas e pela convivência, tornando o ambiente de trabalho mais prazeroso e, em especial, à Nicole, por me acolher no projeto de pesquisa, por dividir suas experiências, pela sua amizade, carinho e por todas as contribuições, que foram essenciais para este trabalho.

Ao técnico de laboratório Nelson Janeiro Rodriguez, pela sua dedicação e disposição em ajudar a qualquer momento e aos demais funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – UEL, Sandra, Edivaldo, Elda e Sérgio.

Aos meus pais, Amarildo e Márcia, pelo suporte financeiro, pelo incentivo moral e por acreditarem na minha capacidade de concluir este trabalho e aos meus irmãos, que nunca deixaram de dar apoio e torcer pela conclusão dos meus objetivos. Aos meus familiares, pelo incentivo, ainda que distante.

Ao meu companheiro, Carlos Eduardo, com quem tenho dividido a vida durante os últimos 6 anos, pela paciência e compreensão nos momentos difíceis,

pelas palavras de carinho, suporte e incentivo nos momentos de desânimo e pelo amor, que, de tão grande, deu origem ao nosso filho (a), cuja chegada aguardamos ansiosamente.

Aos meus amigos, que mesmo distantes sempre se fizeram presentes, Brayan, Maria Eduarda, Danúbia e Karyne, e aos amigos que a graduação me trouxe, em especial à Gabriela, Aline e Camila, com quem também tive o prazer de dividir as experiências que o mestrado proporcionou.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela contribuição financeira e à Universidade Estadual de Londrina, pela infraestrutura para a realização deste trabalho e pela oportunidade de uma formação acadêmica de qualidade.

PEREIRA, Hanny Cristina Braga. **Ácido Hialurônico de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920: Produção e Avaliação de suas Atividades Antimicrobiana e Antioxidante**. 2017. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2017.

RESUMO

O ácido hialurônico é um polissacarídeo linear com características hidrofílicas e viscoelásticas, que permitem inúmeras aplicações industriais. Também se destaca pelas suas propriedades farmacológicas, que o torna aplicável em formulações, agregando valor ao produto final. O objetivo deste trabalho foi produzir ácido hialurônico de *Streptococcus zooepidemicus*, variando os componentes do meio (acetato de sódio, glutamina, niacina, ácido oxálico, iodoacetato de sódio, extrato de levedura) em glicose e melão de cana-de-açúcar e verificar suas propriedades antioxidante e antimicrobiana. Foram realizadas cinco fermentações, 4 em frascos de Erlenmeyer e uma em biorreator. As fermentações 1 e 3 foram variando as concentrações de acetato de sódio, glutamina, niacina, ácido oxálico e iodoacetato de sódio em glicose e melão, respectivamente; a fermentação 2 em meio de glicose com extrato de levedura e glutamina; a fermentação 4 em meio de melão e glutamina em diferentes concentrações e a fermentação 5 correspondeu a melhor condição obtida, transferida para biorreator (variando a agitação em 100 e 300 rpm). O ácido hialurônico obtido na fermentação 5 foi caracterizado por absorção no UV-Vis e FT-IR e avaliado quanto às atividades antioxidante e antimicrobiana, verificadas pelo percentual de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil e pela determinação da concentração mínima inibitória e difusão em ágar, respectivamente. A produção de ácido hialurônico nas fermentações 1 e 3 foram 0,469 g.L⁻¹ e 0,710 g.L⁻¹ e na fermentação 4 atingiu 0,843 g.L⁻¹ com a adição de 12,0 g.L⁻¹ de glutamina, porém não diferindo significativamente de 8,0 g.L⁻¹. Para a fermentação 5 (biorreator) foi utilizado melão acrescido de 8,0 g.L⁻¹ de glutamina, resultando na produção de 2,55 g.L⁻¹ (3 vezes maior que em frascos) em 100 rpm e a agitação não influenciou na produção. O polímero produzido em melão de cana-de-açúcar foi caracterizado por absorção no UV-Vis e FT-IR e demonstrou correspondência ao padrão de hialuronato de sódio. Quanto as atividades farmacológicas avaliadas, o ácido hialurônico apresentou atividade antioxidante de 38,41 % em 1,0 g.L⁻¹ e não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas, assim, o ácido hialurônico de *S. zooepidemicus* obtido em melão pode ser viável para aplicações em formulações cosméticas como antioxidante.

Palavras-chave: Ácido hialurônico. Fermentação. Biorreator. Melão de cana-de-açúcar. Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana.

PEREIRA, Hanny Cristina Braga. **Hyaluronic Acid from *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920: Production and Avaliation of its Antimicrobial and Antioxidant Activities**. 2017. 102 pp. Dissertation (Master's on Biotechnology) –Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2017.

ABSTRACT

Hyaluronic acid is a linear polysaccharide with hydrophilic and viscoelastic properties with many industrial applications. It is also knowed in pharmacological practices, in which has been used in formulations. The objective of this work was to produce hyaluronic acid from *Streptococcus zooepidemicus* varying the components of the medium (sodium acetate, glutamine, niacin, oxalic acid, sodium iodoacetate, yeast extract) in glucose and sugarcane molasses and to verify their antioxidant and antimicrobial properties. Five fermentations were carried out, 4 in Erlenmeyer flasks and one in bioreactor. Fermentations 1 and 3 were varying as concentrations of sodium acetate, glutamine, niacin, oxalic acid and sodium iodoacetate in glucose and molasses, respectively; fermentation 2 in glucose medium with yeast extract and glutamine; fermentation 4 in molasses and glutamine medium at different concentrations and fermentation 5, transferred to bioreactor, corresponded to the best condition obtained (varying the agitation speed at 100 and 300 rpm). The hyaluronic acid obtained in fermentation 5 was characterized by absorption in the UV-Vis and FT-IR and evaluated for antioxidant and antimicrobial activities, verified by the reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical in percentage and by determination of the minimum concentration of innhibition and agar diffusion, respectively. The production of hyaluronic acid in fermentations 1 and 3 were 0.469 gL⁻¹ and 0.710 gL⁻¹ and in fermentation 4 reached 0.843 gL⁻¹ with the addition of 12.0 gL⁻¹ of glutamine, but not significantly differing from 8.0 GL⁻¹. For fermentation 5 (bioreactor) molasses added 8.0 g.L⁻¹ glutamine was used, resulting in the production of 2.55 g.L⁻¹ (3-fold greater than in flasks) at 100 rpm and agitation did not influence the production. The polymer produced in sugarcane molasses was characterized by absorption in the UV-Vis and FT-IR and showed correspondence to the sodium hyaluronate standard. Regarding the pharmacological activities evaluated, hyaluronic acid had antioxidant activity of 38.41% in 1.0 gL⁻¹ and did not present antimicrobial activity in the concentrations tested. The hyaluronic acid of *S. zooepidemicus* obtained in molasses may be feasible for applications in cosmetic formulations as an antioxidant.

Key-words: Hyaluronic acid. Fermentation. Bioreactor. Sugar cane molasses. antioxidant activity. Antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da unidade dissacarídica [β -1,4-ácido glicurônico- β -1,3-N-acetilglicosamina] _n	4
Figura 2 - Relação espacial entre a β -D-glicose (A) e a unidade dissacarídica β -1,4-ácido glicurônico- β -1,3-N-acetilglicosamina (B)	5
Figura 3 - Conformação helicoidal do ácido hialurônico simples (a) e em dupla hélice (b)	6
Figura 4 - Micrografia Eletrônica de Transmissão de <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> obtida a partir de células em fase exponencial tardia cultivadas em biorreator	9
Figura 5 - Via metabólica da produção de ácido hialurônico em <i>Streptococcus</i>	11

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Áreas básicas de aplicações do ácido hialurônico	18
Tabela 1 - Produção de ácido hialurônico (AH) por <i>Streptococcus zooepidemicus</i> em diferentes condições de cultivo e meios de fermentação	16
Tabela 2 - Composição do meio BHI (HIMEDIA M-210)	25
Tabela 3 - Composição do caldo triptona de soja (Acumedia 7614 A)	25
Tabela 4 - Composição do meio Ágar Müller-Hinton (Acumedia 7101 A)	26
Tabela 5 - Composição do meio seletivo Ágar MacConkey (Acumedia 7102 A).....	26
Tabela 6 - Composição do caldo Müller-Hinton (DIFCO 275730)	27
Tabela 7 - Planejamento fatorial Box Hunter x Hunter 2^{5-1} para avaliar a produção de ácido hialurônico em meio de glicose ou melaço por <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	30
Tabela 8 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com 5 repetições no ponto central variando as concentrações de extrato de levedura e glutamina na produção de ácido hialurônico por <i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920.....	31

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion (Infusão de Cérebro e Coração)
CBMAI	Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Da	Dáltons
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada em Fourier
GlcNAc	N-acetilglicosamina
GlcUA	Ácido glicurônico
HasA	Hialuronan-sintase
<i>hasA</i>	Gene Codificador da Hialuronan-sintase
HasB	UDP-glicose Desidrogenase
<i>hasB</i>	Gene Codificador da UDP-glicose Desidrogenase
HasC	UDP-glicose Pirofosforilase
<i>hasC</i>	Gene Codificador da UDP-glicose Pirofosforilase
K	Constante de Equilíbrio
MHB	Müeller-Hinton Broth (Caldo Müeller-Hinton)
MHz	Megahertz
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
NADP ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
pH	Potencial Hidrogeniônico
PID	Controlador Proporcional Integral Derivativo
pKa	Constante de Dissociação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por Minuto
TSB	Tryptic Soy Broth (Caldo de Triptona de Soja)
UDP	Uridina Difosfato

UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTP	Uridina Trifosfato
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
vvm	Volume de Ar por Volume de Meio por Minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	Estrutura e Conformação do Ácido Hialurônico	4
3.2	Propriedades e Funções do Ácido Hialurônico	6
3.3	Métodos de Obtenção de Ácido Hialurônico.....	8
3.3.1	Produção de Ácido Hialurônico por Streptococcus.....	10
3.3.2	Fatores Físicos que Afetam a Produção de Ácido Hialurônico por Fermentação.....	12
3.3.3	Fatores Químicos que Afetam a Produção de Ácido Hialurônico por Fermentação.....	14
3.4	Aplicações do Ácido Hialurônico.....	17
3.4.1	Atividade Antioxidante do Ácido Hialurônico.....	19
3.4.2	Atividade Antimicrobiana do Ácido Hialurônico.....	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Material.....	24
4.1.1	Microrganismos	24
4.1.2	Melaço de Cana-de-Açúcar	24
4.1.3	Meios de Cultura.....	24
4.1.4	Reagentes	28
4.2	Métodos	28
4.2.1	Preservação dos Microrganismos.....	28
4.2.2	Inóculo	28
4.2.3	Produção de Ácido Hialurônico.....	29
4.2.4	Acompanhamento das Fermentações	32
4.2.5	Purificação do Ácido Hialurônico	34

4.2.6	Caracterização do Ácido Hialurônico.....	34
4.2.7	Atividade Farmacológica do Ácido Hialurônico.....	35
4.2.8	Análises Estatísticas.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	ARTIGO.....	39
6	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXOS.....	71
	Anexo 1: Produção de Ácido Hialurônico através de Delineamento Composto Central Rotacional.....	72
	Anexo 2: Análises Estatísticas para Ácido Hialurônico Produzido em Glicose através do Planejamento Fatorial Box Hunter x Hunter $2^{5(-1)}$	74
	Anexo 3: Análises Estatísticas para Ácido Hialurônico Produzido em Melaço de Cana-de-Açúcar através do Planejamento Fatorial Box Hunter x Hunter $2^{5(-1)}$	75
	Anexo 4: Biomassa, Consumo de Açúcares e pH dos Ensaios dos Planejamento Fatorial Box Hunter x Hunter $2^{5(-1)}$ em Glicose e Melaço de Cana-de-Açúcar.....	76
	Anexo 5: Análises Estatísticas para o pH dos Ensaios do Planejamento Fatorial Box Hunter x Hunter $2^{5(-1)}$ em Glicose.....	77
	Anexo 6: Análise de Variância do pH dos Ensaios do Planejamento Fatorial Box Hunter x Hunter $2^{5(-1)}$ em Melaço de Cana-de-Açúcar.....	78
	Anexo 7: Análise de Variância dos Ácidos Orgânicos Produzidos por Streptococcus zooepidemicus Através do Planejamento Fatorial Box Hunter x Hunter $2^{5(-1)}$ em Glicose.....	79
	Anexo 8: Análise de Variância dos Ácidos Orgânicos Produzidos por Streptococcus zooepidemicus Através do Planejamento Fatorial Box Hunter x Hunter $2^{5(-1)}$ em Melaço de Cana-de-Açúcar.....	80

Anexo 9: Biomassa, Consumo de Açúcares, Produção de Ácido Hialurônico e de Ácidos Orgânicos e pH dos Cultivos em Melaço de Cana-de-Açúcar com Variação da Concentração de Glutamina	81
Anexo 10: Curvas de Calibração para Quantificação de Ácido Hialurônico, Ácidos Orgânicos e Etanol por CLAE	82
Anexo 11: Normas do Periódico International Journal of Biological Macromolecules.....	84

1. INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico é um polissacarídeo linear de alto valor comercial, que, devido à elevada hidrofiliabilidade e viscoelasticidade, apresenta inúmeras aplicações na área da saúde e cosmética. Em 1934, Karl Meyer e John Palmer o isolaram do humor vítreo bovino e nomearam ácido hialurônico, considerando sua composição (ácido urônico e amino açúcar) e origem. Posteriormente, Meyer e colaboradores, ao estudarem extensivamente a molécula, foram capazes de determinar sua estrutura química como um polímero composto por unidades dissacarídicas de ácido glicurônico e N-acetilglicosamina.

Por estar presente em uma grande variedade de tecidos de vertebrados, a extração de ácido hialurônico a partir de resíduos animais foi extensivamente realizada, mais frequentemente de cristas de galinha. Porém, nos últimos anos, o desenvolvimento da produção de ácido hialurônico por microrganismos foi impulsionado pela indústria, que não permite ingredientes de origem animal em seus produtos. *Streptococcus* dos tipos A e C de Lancefield são reconhecidos pela capacidade de produção de ácido hialurônico como um componente capsular idêntico ao de origem animal, porém não imunogênico, o que permite a sua utilização nas mais diversas aplicações.

A possibilidade de aumentar a produção microbiana do ácido hialurônico pela otimização de parâmetros físicos e composição do meio de cultivo é uma vantagem sobre a extração animal, no entanto, o preço do meio de cultivo diminuiu a competitividade da produção microbiana e, portanto, a busca por substratos baratos, como o melado de cana-de-açúcar (subproduto da indústria sucroalcooleira) para produção do polímero é uma alternativa viável. Além disso, estudar o fluxo de carbono através da via de síntese do ácido hialurônico, seja pela adição de inibidores enzimáticos ou de precursores do polímero, pode resultar num produto com maior rendimento.

O ácido hialurônico é utilizado na formulação de diversos biomateriais usados na oftalmologia, na cicatrização da pele e de feridas na membrana timpânica, na re-epitalização do ouvido, bem como em filmes usados no tratamento de queimaduras, aplicações nas quais infecções por microrganismos devem ser evitadas e, desta forma, a possibilidade de o próprio polímero agir como agente

antimicrobiano e antioxidante nas formulações em que já é aplicado (além exercer a função principal) pode agregar valor ao produto.

Considerando as amplas aplicações e propriedades do ácido hialurônico como um biomaterial, o objetivo principal deste trabalho foi produzir o polímero por *S. zooepidemicus*, variando os diferentes componentes ao meio de cultivo e testar suas atividades farmacológicas (antimicrobiana e antioxidante), para potencial aplicação na cosmetologia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de cultivo para a produção do ácido hialurônico por *Streptococcus equi*.subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 e verificar seu potencial farmacológico através da atividade antioxidante e antimicrobiana.

2.2. Objetivos Específicos

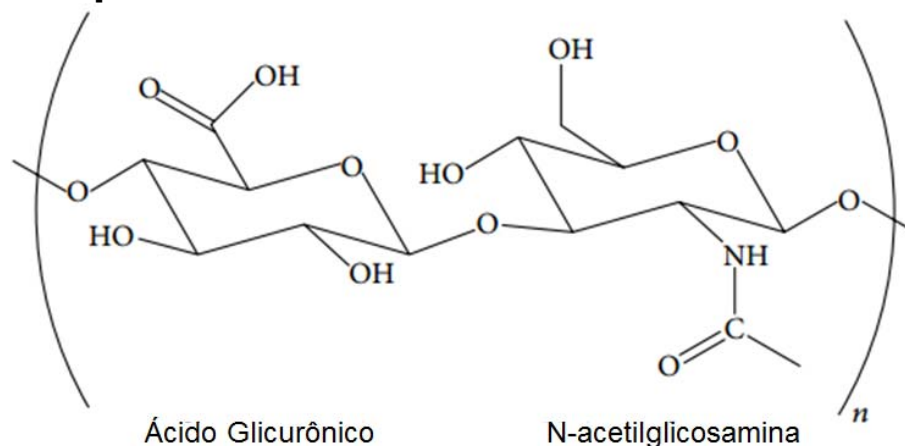
- Avaliar o efeito da composição do meio (acetato de sódio, glutamina, niacina, ácido oxálico, iodoacetato e extrato de levedura) na produção de ácido hialurônico em glicose e melação de cana-de-açúcar;
- Verificar o efeito da agitação na produção de ácido hialurônico em biorreator;
- Purificar e caracterizar o ácido hialurônico produzido na melhor condição;
- Testar a atividade antioxidante do ácido hialurônico;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e a concentração mínima inibitória (MIC) do ácido hialurônico em bactérias patógenas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Estrutura e Conformação do Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico é um polissacarídeo linear de estrutura em espiral, que apresenta regiões flexíveis (KOGAN et al., 2007). Sua estrutura é determinada pela conformação estável entre as cadeiras dos resíduos de carboidratos que o compõe, ácido glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamina (GlcNAc) (BOERIU et al., 2013). A união destes açúcares se dá por ligações alternadas β -1,3 e β -1,4, formando a unidade dissacarídica repetida $[\beta$ -1,4-ácido glicurônico- β -1,3-N-acetilglicosamina] $_n$ (CHONG et al., 2005) (Figura 1).

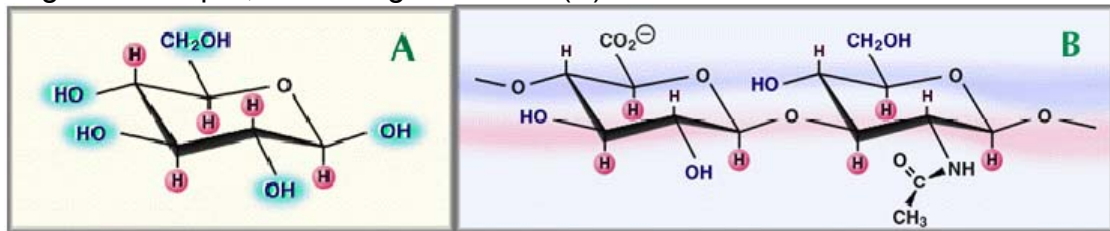
Figura 1. Estrutura da unidade dissacarídica $[\beta$ -1,4-ácido glicurônico- β -1,3-N-acetilglicosamina] $_n$.



Fonte: BOERIU et al., 2013.

Ambos resíduos estão espacialmente relacionados à glicose, como demonstrado na Figura 2, que, na configuração β , permite que os grupos volumosos (hidroxilas, porções carboxiladas e o carbono anomérico do açúcar adjacente) estejam em posições equatoriais estericamente favoráveis, enquanto os átomos de hidrogênio ocupam as posições axiais menos favoráveis, de forma que a estrutura do dissacarídeo é energeticamente muito estável (HASCALL; LAURENT, 1997). Nesta conformação, os átomos axiais de hidrogênio formam uma face hidrofóbica, enquanto a parte equatorial da cadeia forma uma face mais hidrofílica, resultando numa estrutura contorcida que ocupa um amplo domínio (BENEDINI, 2013).

Figura 2. Relação espacial entre a β -D-glicose (A) e a unidade dissacarídica β -1,4-ácido-glicurônico- β -1,3-N-acetilglicosamina (B).



Fonte: HASCALL; LAURENT, 1997.

O ácido hialurônico é o glicosaminoglicano mais simples, sendo o único não associado a um núcleo proteico, além de não ser sulfatado nem sintetizado no complexo de Golgi (KOGAN et al., 2007). Outros glicosaminoglicanos quimicamente relacionados, como a condroitina sulfato ou queratina sulfato, possuem massa molecular muito menor e existem como várias formas isoméricas devido ao número e posição variável dos grupos sulfatados. O ácido hialurônico isolado das diversas fontes biológicas, por sua vez, é quimicamente idêntico, diferindo apenas quanto à massa molecular (TSEPILOV; BELODED, 2015).

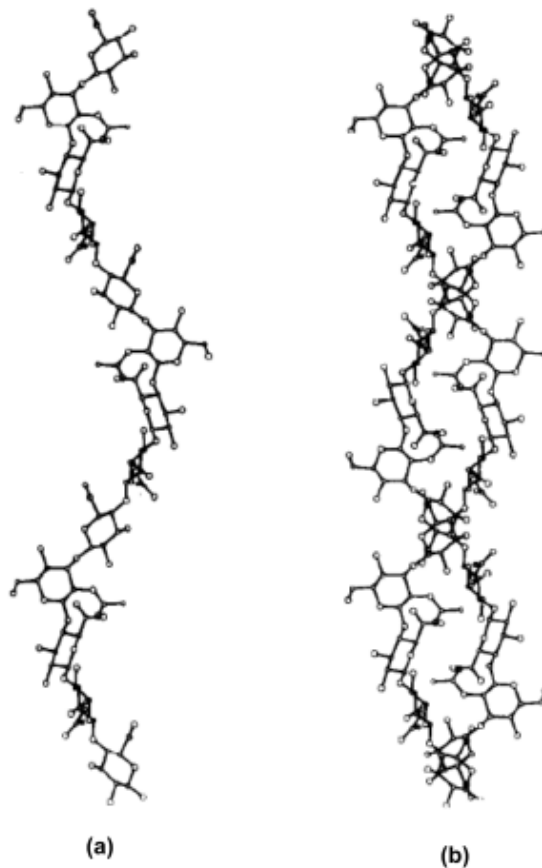
O número de dissacarídeos em uma molécula de ácido hialurônico pode variar de 2.000 a 25.000 (CHONG et al., 2005), possuindo cada unidade dissacarídica cerca de 400 Da (HASCALL; LAURENT, 1997). A massa molecular do polímero é dependente da fonte e técnica de isolamento, variando, geralmente, de 10^4 a 10^7 Da (ARMSTRONG; JOHNS, 1997).

A constante de dissociação (pKa) dos grupos carboxila dos resíduos do ácido glicurônico é de 3 a 4 e, portanto, em pH 7 estes grupos estão predominantemente ionizados e a molécula é um poliânion que se associa a cátions para manter a neutralidade de carga (HASCALL; LAURENT, 1997). O pKa do polímero, obtida por extrapolação, foi estimado em 2,9, sendo a diferença de pKa atribuída aos efeitos de substituição no carbono 4 (LAPCIK et al., 1998).

Em solução fisiológica, a estrutura da molécula de ácido hialurônico é reforçada por uma combinação da composição química do dissacarídeo, ligações de hidrogênio internas e interações com o solvente. Na presença de sais, a constante de equilíbrio (K) do ácido glicurônico aumenta linearmente como uma função do grau de ionização e a conformação do polímero varia com pH e concentração de sais, tal como espera-se de polieletrólito flexível (LAPCIK et al., 1998).

Na década de 1970, conformações helicoidais do ácido hialurônico contendo 2, 3 ou 4 dissacarídeos por volta foram descobertas através de difração de raios-X (Figura 3), sendo demonstrado também que a forma helicoidal do polímero no estado sólido depende do tipo de contra-íon, pH, temperatura e grau de hidratação (SHEEHAN; GARDNER; ATKINS, 1977).

Figura 3. Conformação helicoidal do ácido hialurônico simples (a) e em dupla hélice (b).



Fonte: SHEEHAN; GARDNER; ATKINS, 1977.

3.2. Propriedades e Funções do Ácido Hialurônico

Em solução, o ácido hialurônico se comporta como uma estrutura enovelada em espiral, capaz de expandir o volume de água circundante cerca de 1.000 vezes (STERN; ASARI; SUGAHARA, 2006). A interação com a água se dá por pontes de hidrogênio, o que confere ao polímero rigidez conformacional (CHONG; BLANK, 1998), e sua capacidade de ligação com a água está diretamente ligada à sua massa molecular (MACEDO, 2006).

Em soluções semidiluídas ou concentradas os domínios hidrodinâmicos do polímero se sobrepõem, formando uma rede emaranhada de cadeias que apresenta propriedades elásticas e viscosas (HASCALL; LAURENT, 1997).

Em fluidos biológicos, o ácido hialurônico apresenta elevada viscoelasticidade, sendo tal propriedade observada *in vitro* de forma extrema em soluções diluídas (menores que 0,1 % m/v) de polímero de elevada massa molecular (maiores que 10^6 Da) com concentração de cátions menor que 0,1 M e em pH 2,5 (BALAZS, 2004). A viscoelasticidade e pseudoplasticidade das soluções de ácido hialurônico estão relacionadas a sua massa molecular e concentração, o que determina sua função biológica e distribuição celular (MARCELLIN; STEEN; NIELSEN, 2014).

As propriedades viscoelásticas e hidrofílicas garantem ao polímero uma variedade de aplicações na indústria. Suas funções biológicas naturais nos animais se destacam na alta concentração encontrada no fluido sinovial, cordão umbilical e humor vítreo do olho, onde o polímero apresenta essencialmente funções estruturais e de proteção (TSEPILOV; BELODED, 2015).

No fluido sinovial, ácido hialurônico de elevada massa molecular está presente em altas concentrações, proporcionando a lubrificação necessária para as articulações, distribuindo a tensão nas juntas, servindo como amortecedor de choque e protegendo contra o desgaste. Embora as causas da artrite reumatoide ainda não estejam totalmente definidas, sabe-se que existe correlação entre o aparecimento da doença e a degradação progressiva de carboidratos poliméricos no fluido sinovial, principalmente de ácido hialurônico. Desta forma, outra utilização do polissacarídeo que reflete suas propriedades e funções naturais é na viscosuplementação (KOGAN et al., 2007).

Em mamíferos, cerca de 50 % de todo ácido hialurônico presente é encontrado na pele (STERN, 2003; ERICKSON; STERN, 2012), onde, além de possuir função estrutural na construção da matriz de células, também retém água e preserva o volume e propriedades elásticas e flexíveis (TSEPILOV; BELODED, 2015).

Além das funções biológicas nos tecidos, o ácido hialurônico também age como mediador em várias atividades. Polímeros de alta massa molecular ($> 10^5$ Da) são antiangiogênicos e imunossupressores, enquanto que cadeias de ácido hialurônico de tamanho médio (entre 2×10^4 e 2×10^5 Da) estão envolvidas nos processos de

ovulação, embriogênese e reparação de feridas. Oligossacarídeos (6×10^3 e 2×10^4 Da), por sua vez, são inflamatórios, imunoestimulantes e angiogênicos e pequenos oligômeros (de 400 a 4000 Da) são antiapoptóticos e indutores de proteínas de choque térmico (STERN; ASARI; SUGAHARA, 2006; BOERIU et al., 2013).

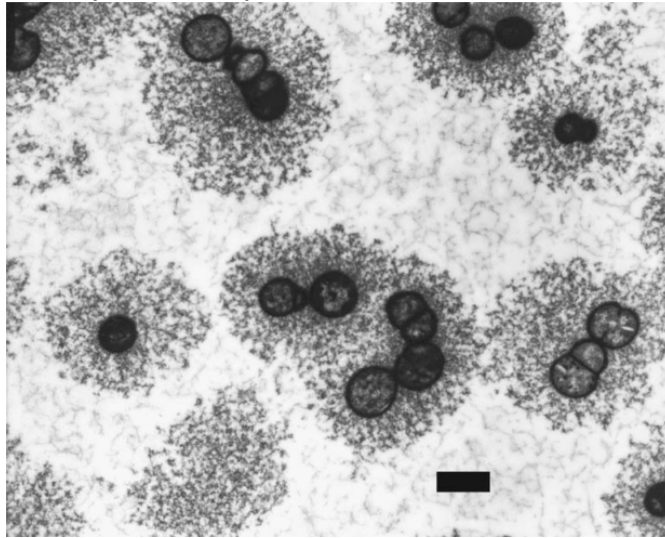
3.3. Métodos de Obtenção de Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico está distribuído nos tecidos de todos os vertebrados, estando presente em altas concentrações no cordão umbilical, fluido sinovial, pele e humor vítreo do olho. As cristas de galo contém a concentração mais alta já relatada para tecidos animais, $7,5 \text{ g/L}^{-1}$ (LAURENT; FRASER, 1992).

Devido à alta concentração de ácido hialurônico em certos tecidos, a extração de animais foi amplamente realizada, sendo obtido principalmente do cordão umbilical e da crista de galo (KOGAN et al., 2007). No entanto, a pressão das indústrias por um produto mais seguro impulsionou, nos últimos anos, a obtenção de ácido hialurônico por vias alternativas, como a produção por microrganismos e enzimas isoladas.

Streptococcus patogênicos dos grupos A e C de Lancefield e *Pasteurella multocida*, bactéria patógena de aves, produzem ácido hialurônico como um exopolissacarídeo capsular. Sob microscópio eletrônico, estas bactérias não esporulantes e sem motilidade são visualizadas como células esféricas (ou ovoides), tipicamente dispostas em pares ou em cadeias rodeadas por uma extensa cápsula extracelular (Figura 4). As cápsulas são conhecidas como fatores de virulência que protegem a bactéria de ser atacada pelo sistema complemento e ou fagocitada por macrófagos (MARCELLIN; STEEN; NIELSEN, 2014) e, uma vez que o polímero procariótico é idêntico ao eucariótico, acredita-se que a maquinaria de síntese nesses microrganismos foi provavelmente assimilada de seus hospedeiros por transferência horizontal, podendo ter evoluído como meio de escapar do sistema imunológico destes (BOERIU et al., 2013).

Figura 4. Micrografia Eletrônica de Transmissão de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* obtida a partir de células em fase exponencial tardia cultivadas em biorreator. A barra corresponde à 1 µm.



Fonte: CHONG et al., 2005.

Devido à correspondência na estrutura e resíduos de carboidratos do ácido hialurônico de origem microbiana com o animal, existe a possibilidade de sua obtenção através do cultivo de microrganismos. Na produção microbiana, é possível controlar características e o rendimento do polímero (PIRES, 2009) pela otimização da composição do meio de cultivo, pelas condições de processo e pela seleção de cepas empregadas.

Na produção comercial do biopolímero as cepas mais empregadas são *S. equi* subsp. *equi* e *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. O polímero produzido por *S. equi* possui menor massa molar do que o produzido por *S. zooepidemicus*, que apresenta cerca de $1,8$ a 2×10^6 Da (LAPCIK et al., 1998).

Com o advento da engenharia genética, cepas recombinantes também estão sendo utilizadas para a produção de ácido hialurônico, como *S. equisimilis* mutante (CHEN et al., 2012), *Escherichia coli* (YU; STEPHANOPOULOS, 2008), *Agrobacterium* sp. (MAO; CHEN, 2007), além de microrganismos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS), como *Bacillus subtilis* (WIDNER et al., 2005) e *Lactococcus lactis* (CHIEN; LEE, 2007; CHAUHAN et al., 2014; SHENG; LING; WANG, 2015).

Embora as cepas recombinantes possibilitem a produção de ácido hialurônico sem o uso de microrganismos patogênicos para animais, o polímero assim produzido tem menor rendimento se comparado ao produzido por *S.*

zooepidemicus (MARCELLIN; STEEN; NIELSEN, 2014; SHAH; BADLE; RAMACHANDRAN, 2013).

3.3.1. Produção de Ácido Hialurônico por *Streptococcus*

As enzimas envolvidas na produção do ácido hialurônico: HasA (hialuronan-sintase), HasB (UDP-glicose desidrogenase) e HasC (UDP-glicose pirofosforilase) são codificadas pelos genes *hasA*, *hasB* e *hasC*, respectivamente, que estão arranjados num único operon (YAMADA; KAWASAKI, 2005). Para a síntese do polímero, os resíduos de ácido glicurônico e N-acetilglicosamina são derivados da glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, respectivamente, como está representado na via biossintética para *Streptococcus* na Figura 5.

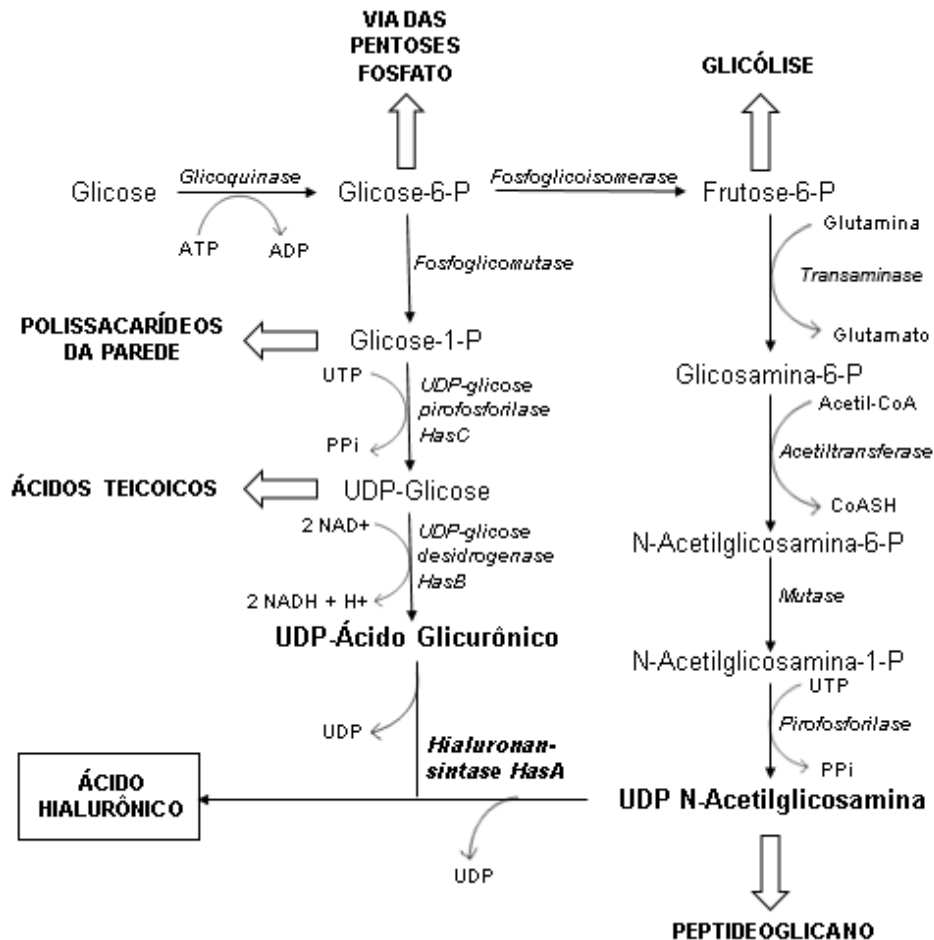
A primeira reação para a formação do ácido UDP-glicurônico é catalisada pela α -Fosfoglucomutase, que converte a glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato. Esta reação é um passo comum na produção de polissacarídeos de armazenamento em muitos organismos. A UDP-glicose pirofosforilase produz o açúcar nucleotídeo UDP-glicose a partir de UTP e da glicose-1-fosfato formada na reação anterior (CHONG et al., 2005). Finalmente, a oxidação do álcool primário da UDP-glicose pela ação da UDP-glicose desidrogenase produz o primeiro precursor do ácido hialurônico, o ácido UDP-glicurônico (LIU et al., 2011).

A via proveniente da frutose-6-fosfato está envolvida na produção de açúcares aminados. A transferência do grupo amino da glutamina para a frutose-6-fosfato pela transaminase (glutamina-frutose-6-fosfato-transaminase) produz glucosamina-6-fosfato. A partir deste produto é formado N-acetil-glucosamina-6-fosfato pela transferência de um grupo acetil pela acetiltransferase. Posteriormente, o rearranjo do grupo fosfato pela mutase gera N-acetil-glucosamina-1-fosfato que é finalmente convertida em UDP-N-acetilglicosamina, o segundo precursor do ácido hialurônico, pela pirofosforilase. Os doadores de glicosil ativados (ácido UDP-glicurônico e UDP-N-acetilglicosamina) podem, então, ser polimerizados em ácido hialurônico pela ação da hialuronan-sintase (CHONG et al., 2005).

A hialuronan-sintase é uma enzima associada à membrana celular, que polimeriza as unidades de ácido glicurônico e N-acetilglicosamina resultando na alongação do polímero (WEIGEL; HASCALL; TAMMI, 1997). Enquanto um sítio ativo da enzima recebe a unidade UDP-N-acetilglicosamina, o outro recebe o UDP- ácido

glicurônico. A unidade dissacarídica é então ligada a um terceiro sítio. Esse processo pode ocorrer repetidas vezes, podendo ser formada uma molécula de 20.000 unidades dissacarídica ou mais, até que, enfim, o polissacarídeo é excretado através da membrana para o espaço extracelular para formar a cápsula bacteriana (TLAPAK-SIMMONS et al., 1999).

Figura 5. Via metabólica da produção de ácido hialurônico em *Streptococcus*.



Fonte: CHONG et al., 2005.

Em *Streptococcus zooepidemicus*, a síntese de ácido hialurônico é responsável pelo consumo de 5 a 10 % do carbono metabolizado (CHONG; NIELSEN, 2003). No balanço energético geral são consumidos 4 moles de ATP por mol de dissacarídeo de polímero produzido, sendo 2 moles de ATP utilizados nas reações para fornecer as duas hexoses fosforiladas precursoras (glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato) e os outros 2 moles para regenerar o doador UTP. Embora sejam produzidos 2 moles de NADH por mol de dissacarídeo de ácido hialurônico, estes

equivalentes redutores não podem ser utilizados para gerar energia (YAMADA; KAWASAKI, 2005).

Além de fornecer os precursores para a síntese de ácido hialurônico, estas vias também fornecem os componentes estruturais da parede celular bacteriana do peptidoglicano, como foi comprovado pelos experimentos de (ZHANG et al., 2016), nos quais mutantes com deleção de genes codificadores das enzimas responsáveis pela síntese de ácido hialurônico tiveram a produção do polímero e o crescimento celular diminuídos. Desta maneira, existe uma competição pelos precursores entre o crescimento celular e produção de ácido hialurônico (BOERIU et al., 2013).

3.3.2. Fatores Físicos que Afetam a Produção de Ácido Hialurônico por Fermentação

Na otimização da produção microbiana tanto fatores físicos como pH, temperatura, aeração e agitação, quanto a composição do meio podem influenciar na concentração e massa molar do ácido hialurônico produzido. De acordo com Liu et al. (2008) o processo em batelada é mais adequado para produzir ácido hialurônico se comparado à batelada alimentada. Apesar da vantagem da redução da polidispersidade do polímero, devido às mudanças na taxa de crescimento com o emprego de processos contínuos, a baixa produtividade volumétrica nestes casos justifica o amplo emprego de cultivo em batelada na produção industrial (CHONG et al., 2005).

Na maioria dos estudos com *Streptococcus* para a produção de ácido hialurônico são realizadas fermentações submersas, no entanto, existem relatos de cultivo em estado sólido, como o desempenhado por Ferrari et al. (2013), que utilizaram colunas de leite em espuma de poliuretano.

Armstrong e Johns (1997) avaliaram o efeito do pH, temperatura, aeração e agitação sobre a concentração e massa molar do polímero produzido por *S. zooepidemicus* em cultivo em batelada e verificaram que os três primeiros fatores apresentaram influência na concentração, enquanto que apenas a temperatura e a aeração apresentaram efeito sobre a massa molar. Para os autores, o pH ótimo para a produção de ácido hialurônico foi de 6,7, como previamente relatado por Johns, Goh e Oeggerli (1994), e que as temperaturas no intervalo de 32 a 35 °C

foram favoráveis para a produção de polímero com massa molar mais elevada, mas que o crescimento do microrganismo foi mais lento nesta gama se comparada às temperaturas mais elevadas.

Kim et al. (1996), no entanto, observaram que em temperaturas inferiores a 37 °C a massa molar do polímero produzido por *S. equi* KFCC 10830 diminuiu, o que indica haver divergência na influência dos fatores físicos sobre o tamanho do polímero produzido por espécies diferentes de *Streptococcus*.

Segundo Aroskar, Kamat e Kamat (2012b) o pH ótimo para a produção de ácido hialurônico foi 7,0, correlacionando com a enzima hialuronan-sintase que possui atividade ótima em pH 7,1. Para os autores, o pH neutro também é o ótimo para o crescimento do microrganismo e, uma vez que a produção do polímero é inibida em pH ácido (JAGANNATH; RAMACHANDRAN, 2010), a adição de um agente tamponante, como o carbonato de cálcio, pode ser benéfica. Para Pan et al. (2015), no entanto, as melhores condições para a produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* ATCC 39920 são em pH 8,0 e temperatura de 37 °C.

A produção de ácido hialurônico ocorre tanto em anaerobiose quanto em aerobiose. Espécies de *Streptococcus* exigem concentração crítica mínima de oxigênio dissolvido no meio para crescer bem e produzir ácido hialurônico (SWANN et al., 1990), o que foi comprovado por Huang et al. (2006) e Aroskar, Kamat e Kamat (2012b), onde a produção de ácido hialurônico sob condições anaeróbicas foi menor.

Em concentrações de oxigênio dissolvido maiores que 5 vvm, no entanto, o rendimento do polímero é constante (HUANG et al., 2006). Devido à isso e ao fato de que níveis elevados de aeração podem induzir vias indesejáveis e acarretar na produção de metabólitos tóxicos (além de suprimir as vias metabólicas secundárias em geral) (AROSKAR; KAMAT; KAMAT, 2012a), fermentações com aeração em níveis ≤ 5 vvm são mais favoráveis.

Sob condições anaeróbicas, o ácido hialurônico produzido também apresenta massa molar menor ($\leq 7 \times 10^5$ Da) que em aeróbicas ($\geq 2 \times 10^6$ Da), considerando rendimento equivalente citado por Pires (2009).

Para Armstrong e Johns (1997) a agitação no intervalo de 300 a 1000 rpm não apresentou efeito sobre a massa molar do ácido hialurônico nem sobre sua polidispersidade, sugerindo que as moléculas de ácido hialurônico são muito resistentes às forças de cisalhamento induzida pelo impulsor e, como neste trabalho

taxas de agitação elevadas melhoraram a taxa de produção de ácido hialurônico, os autores concluíram que estas podem ser utilizadas sem danificar o biopolímero.

3.3.3. Fatores Químicos que Afetam a Produção de Ácido Hialurônico por Fermentação

A composição do meio também pode apresentar influência importante nas propriedades do ácido hialurônico produzido. Im et al. (2009) testaram o efeito de diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, galactose, manose, lactose, maltose, sacarose e xilose) na produção de ácido hialurônico. Para ele, a glicose na concentração de 40 g.L⁻¹ foi a melhor fonte testada para *Streptococcus* sp. ID9102. Neste trabalho também foram testadas diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, soro do leite e caseína), com a maior produção do polímero ocorrendo em uma mistura de 7,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g.L⁻¹ de caseína.

As fontes de nitrogênio mais comumente utilizadas são extrato de levedura, caseína hidrolisada ou peptonas. No entanto, alguns trabalhos têm buscado a substituição destas fontes por alternativas que diminuam a quantidade de proteínas e peptídeos totais, facilitando a purificação, como Benedini (2013), que usou peptonas vegetais.

Na otimização do meio de cultura, deve-se considerar que *Streptococcus*, sendo microrganismos fastidiosos, requerem um meio muito rico para o crescimento, sendo dependentes de alguns aminoácidos e vitaminas (PAN et al., 2013), além de íons bivalentes para permitir a síntese do polímero (ARMSTRONG, D. C.; COONEY; JOHNS, 1997; CHONG; NIELSEN, 2003; SCHIRALDI; GATTA; ROSA, 2010).

A adição de Na⁺ ao meio de fermentação de *S. zooepidemicus* foi relatada como prejudicial para a produção de ácido hialurônico (PIRES et al., 2010), o que pode ocorrer tanto pelo desvio de energia metabólica para manter os prótons no interior das células, quanto pela inibição que cátions monovalentes, como K⁺ e Na⁺, apresentam sobre a hialuronan-sintase (TLAPAK-SIMMONS et al., 2004).

Im et al. (2009) avaliaram o efeito da adição de diferentes íons e aminoácidos ao meio de cultivo, sendo que os que apresentaram maiores efeitos sobre a produção de ácido hialurônico foram magnésio e manganês, ambos cofatores das glicosamiltransferases responsáveis pela síntese de ácido hialurônico, e glutamina e glutamato.

Armstrong, Cooney e Johns (1997) também adicionaram glutamina ao meio de fermentação, obtendo como concentração ótima $5,6 \text{ g.L}^{-1}$. Arokar, Kamat e Kamat (2012a), por sua vez, fizeram adição conjunta de glutamina e arginina ao meio de fermentação e obtiveram resultados significativos na concentração de 2 g.L^{-1} de cada aminoácido. Segundo os autores, como a glutamina está envolvida na formação de glicosamina-6-fosfato, sendo um precursor essencial para a síntese de ácido hialurônico, e como o fornecimento de arginina pode ter contribuído para diminuir o consumo de ATP pelo microrganismo (a arginina é um aminoácido essencial para a síntese de purinas e pirimidinas), um aumento significativo da produção de ácido hialurônico foi alcançado nesta condição.

A adição ao meio de cultura de vitamina B₃ (niacinamida), precursora das coenzimas NAD⁺ e NADP⁺, também já foi relatada como importante para produção de ácido hialurônico (ARMSTRONG; COONEY; JOHNS, 1997; AROSKAR; KAMAT; KAMAT, 2012a), assim como a adição de antioxidantes para obtenção ácido hialurônico de alto peso molecular (LIU et al., 2011).

Devido à competição entre a biossíntese de ácido hialurônico e o crescimento celular pelo *pool* de precursores (BOERIU et al., 2013), uma técnica utilizada para aumentar a produção de ácido hialurônico é balancear o fluxo de UDP-N-acetilglicosamina para a síntese do polímero, uma vez que este é o precursor limitante se comparado ao UDP-ácido glicurônico. Isto pode ser alcançado inibindo a via glicolítica pela adição de piruvato ou iodoacetato ao meio de cultivo, por exemplo (SHAH; BADLE; RAMACHANDRAN, 2013). Desta maneira, tanto a adição de glutamina quanto a de um inibidor parcial da glicólise podem contribuir para o redirecionamento de UDP-N-acetilglicosamina para a via de síntese de ácido hialurônico, aumentando sua produção.

Uma vez que as diferentes aplicações do ácido hialurônico são dependentes do tamanho da molécula, a possibilidade do controle da massa molecular do ácido hialurônico pela obtenção microbiana é uma vantagem considerável. Espécies reativas de oxigênio (ERO), formadas quando a fermentação é submetida à altos níveis de agitação e aeração, despolimerizam as cadeias de ácido hialurônico, reduzindo a massa molar do polímero. Desta maneira, a adição de antioxidantes ao meio de cultivo pode resultar em um polímero com massa molar mais elevada devido à inibição da formação de ERO (IM et al., 2009; SHAH; BADLE; RAMACHANDRAN, 2013; ZHANG, X.; DUAN; TAN, 2010). Na Tabela 1 estão organizados trabalhos que

avaliaram diferentes variáveis na produção de ácido hialurônico, sendo apresentadas as melhores condições obtidas para cada um.

Tabela 1. Produção de ácido hialurônico (AH) por *Streptococcus zooepidemicus* em diferentes condições de cultivo e meios de fermentação.

<i>S. zooepidemicus</i>	Meio (g.L ⁻¹)	Cultivo	AH (g.L ⁻¹)	Bibliografia
ATCC 39920	60 glicose; 60 extrato de levedura (E.L.)	pH 7,5; 37 °C; 2 vvm; 150 rpm	3,29	Ogrodowski (2006)
ATCC 39920	25 glicose; 60 E.L.	pH 7,5; 37 °C; 2 vvm; 250 rpm	1,21	Pires; Santana (2010)
ATCC 39920	Suco de caju; 45 glicose; 54 E.L.	pH 7,5; 37 °C; 150 rpm	0,89	Pires et al. (2010)
ATCC 35246	80 peptona; água do processamento de mexilhões;	pH 6,7; 37 °C; 500 rpm	2,46	Vázquez et al. (2010)
ATCC 39920	45 glicose; 45 peptona de soja;	pH 7,0; 37 °C; 90 rpm;*	0,798	Aroskar; Kamat; Kamat (2012b)
ATCC 39920	30 glicose; 5 glutamina; 5,2x10 ⁻³ de iodoacetato de sódio; 4,6x10 ⁻³ de iodoacetato	pH 7,0; 37 °C; 1 vvm; 400 rpm	5,0	Shah; Badle; Ramachandran (2013)
ATCC 35246	50 glicose ou lactose; 5 E.L. ; 8,5 soro de queijo	pH 6,7; 37 °C; 1 vvm; 500 rpm	2,38	Amado et al. (2015)
ATCC 39920	30 glicose; 30E.L.	pH 8,0; 37 °C; 100 rpm	0,787	Pan et al. (2015)

*Baixos níveis de aeração.
Fonte: o próprio autor.

3.3.3.1. Uso de Subprodutos Agroindustriais para Produção de Ácido Hialurônico

De acordo com (VÁZQUEZ *et al.*, 2010) mais de 80 % dos custos da produção de ácido hialurônico microbiano são devido ao meio de fermentação. Alguns trabalhos recentes têm substituído as fontes tradicionais por subprodutos industriais com a finalidade de baratear a produção, além de agregar valor aos subprodutos, que de outra maneira poderiam ser descartados como resíduos, como suco de caju (MACEDO, 2006; PIRES *et al.*, 2010), soro de queijo (AMADO *et al.*, 2015), soro de leite (MOHAN *et al.*, 2015; PIRES, *et al.*, 2010), milhocina (AMADO *et al.*, 2017; PAN,

2014), melaço de cana de açúcar bruto (AMADO et al., 2017) e pré-tratado (PAN et al., 2017).

Considerando que *Streptococcus* são microrganismos fastidiosos que requerem um meio muito rico para o crescimento (ARMSTRONG; COONEY; JOHNS, 1997), o aumento contínuo do custo dessas matérias-primas reduz a competitividade comercial da produção do polímero microbiano (AMADO et al., 2017) e, deste modo, o uso de recursos renováveis de baixo custo e subprodutos agroindustriais como meio de cultura contribuem para tornar a produção através de fermentação mais econômica.

O melaço é rico em nutrientes necessários para fermentação microbiana, como sacarose, glicose, frutose, aminoácidos e íons metálicos. O Brasil é o maior produtor e exportador de açúcar no mundo (UNICA, 2016) e, uma vez que, estima-se que 10 milhões de toneladas de melaço de cana-de-açúcar sejam descartadas por ano, Pan et al. (2017) utilizaram este subproduto da indústria do processamento do açúcar como substrato para a produção de ácido hialurônico, alcançando uma produção de 2,835 g.L⁻¹ do polímero após o tratamento do melaço com carvão ativado. O tratamento pode ter alterado o melaço em uma fonte com menos fatores inibitórios para a síntese de ácido hialurônico, como K⁺ e Na⁺, que podem desviar energia metabólica para manutenção de prótons no interior das células e, principalmente, pela inibição que esses cátions monovalentes apresentam sobre a hialuronan-sintase (PIRES et al., 2010; TLAPAK-SIMMONS et al., 2004).

3.4. Aplicações do Ácido Hialurônico

A elevada capacidade de retenção de água e a propriedade de viscoelasticidade, além do fato do polímero não ser imunogênico, permitem que o ácido hialurônico seja apropriado para várias aplicações médicas e farmacêuticas. As áreas básicas de aplicações do ácido hialurônico foram classificadas por Balazs (2004), como apresentado no Quadro 1, de acordo com suas funções.

Sendo o componente natural mais abundante do humor vítreo do olho e devido as suas propriedades viscoelásticas, o ácido hialurônico é amplamente utilizado na oftalmologia. As preparações do polímero protegem tecidos oculares delicados e proporcionam espaço durante manipulações cirúrgicas, além de servir como substituto para o fluido vítreo perdido durante procedimentos de cirurgia de catarata ou implante de lentes, por exemplo (KOGAN et al., 2007), além de ser

utilizado no transplante de córnea, cirurgia de fixação de retina, entre outras aplicações (GOA; BENFIELD, 1994).

Quadro 1. Áreas básicas de aplicações do ácido hialurônico.

Área	Aplicação
Viscocirurgia	Proteger tecidos delicados e proporcionar espaço durante manipulações cirúrgicas, como em cirurgias oftalmológicas
Viscoaumento	Preencher e aumentar espaços teciduais, na pele, músculos do esfíncter e tecidos da faringe e cordas vocais
Viscosseparação	Separar superfícies do tecido conjuntivo traumatizadas por procedimentos cirúrgicos ou lesão, a fim de evitar adesões e formação de cicatriz excessiva
Viscossuplementação	Substituir ou complementar os fluidos teciduais, como a substituição de fluido sinovial na artrite, e para aliviar a dor
Viscoproteção	Proteger superfícies de tecidos saudáveis, feridos e lesionados por desidratação ou agentes ambientais nocivos, e para promover a cura de tais superfícies

Fonte: BALAZS, 2004; KOGAN et al., 2007.

Na cirurgia de catarata, os materiais viscoelásticos são empregados para manter o espaço operativo e proteger a camada endotelial da córnea ou outros tecidos dos danos físicos (KRETZ et al., 2014), assim, o uso do ácido hialurônico nesses procedimentos cirúrgicos protegem a camada endotelial e evitam que se formem áreas feridas e futuro edema (MACEDO, 2006).

O ácido hialurônico está presente no fluido sinovial, lubrificando e distribuindo a tensão nas juntas. Quando comparadas às articulações normais (2,5 a 3,5 g.L⁻¹), articulações artrósicas contêm concentrações menores de ácido hialurônico (0,8 a 2 g.L⁻¹). Devido à isso, injeções do polímero são um meio de tratamento para pacientes com osteoartrite, de forma a aliviar a dor, atrasar a progressão da doença (MARCELLIN et al., 2014) e diminuir a utilização de anti-inflamatórios pelos pacientes (PAN et al., 2013).

Com o passar dos anos, o ácido hialurônico da pele é gradualmente perdido, sendo uma das principais causas do ressecamento e perda da elasticidade

associadas ao envelhecimento intrínseco da pele (PAPAKONSTANTINO et al., 2012). Neste sentido, a utilização de ácido hialurônico em formulações é uma forma de combater a desidratação da pele e diminuir as marcas da idade (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009).

Na terapia de distúrbios da audição, filmes de ésteres de ácido hialurônico são utilizados na cirurgia da orelha, de forma a promover a cicatrização de feridas da membrana timpânica, facilitar a re-epitelização, além de evitar a aderência entre as camadas de tecidos mucosos (KOGAN et al., 2007).

Ainda destaca-se o uso do ácido hialurônico na cicatrização de ferimentos (SU et al., 2014; TOLG et al., 2014; TOLG; TELMER; TURLEY, 2014; ZHAO et al., 2013), no tratamento de queimaduras (FRIEDRICH et al., 2014), no preenchimento de espaço no reparo tecidual, na prevenção da adesão tecidual pós-cirúrgica (HOARE et al., 2014), no preparo de colírios (LAFFLEUR; DACHS, 2015), na fabricação de hidrogéis (LOEBEL et al., 2015; WILLIAMS; MANN, 2014), no tratamento do pé diabético (CHEN et al., 2014) e na liberação de fármacos (CHEN, et al. 2014; NATH et al., 2015), inclusive de medicamentos vaginais (NOWAK et al., 2014).

Embora se pensasse inicialmente que o principal papel do ácido hialurônico era servir como um enchimento molecular inerte dos tecidos, o estudo de proteínas vinculadas ao polímero e de receptores específicos revelou que o mesmo medeia muitas outras atividades funcionais, sendo nos dias atuais reconhecido pela sua atividade antioxidante e por desempenhar papéis importantes na embriogênese, transdução de sinal, motilidade celular, dependendo do tamanho da molécula, além de estar relacionado à capacidade de invasão de cancro e metástases (KOGAN et al., 2007).

3.4.1. Atividade Antioxidante do Ácido Hialurônico

A produção de radicais livres como superóxido, radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e de óxido nítrico (designados como ERO) é conhecida por causar danos nos tecidos, resultando na perda de função destes e de alguns órgãos. Na maioria dos organismos, sistemas antioxidantes e de reparação evoluíram para fornecer proteção contra os danos oxidativos, mas tais sistemas são insuficientes para a completa prevenção dos danos. Portanto, muita atenção tem sido voltada aos antioxidantes, que podem agir tanto indiretamente (através do aumento das defesas

naturais da célula) quanto diretamente (pela eliminação das espécies de radicais livres) contra os danos oxidativos (KE et al., 2011).

Vários relatos têm mostrado que o ácido hialurônico tem propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, sendo os métodos de estudo mais usados a inibição da peroxidação lipídica (CAMPO et al., 2004; EL-SAFORY; LEE, 2010) e a redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (KE et al., 2011; KIM et al., 2008).

Uma vez que a fibrose hepática envolve a interação de muitos fatores que incluem ERO, Campo et al. (2004) avaliaram a atividade antioxidante do ácido hialurônico em um modelo *in vivo* de lesão hepática. Os autores conseguiram mostrar que o tratamento com ácido hialurônico em combinação com condroitina-4-sulfato, reduziu a peroxidação lipídica, além de aumentar a atividade das enzimas superóxido desmutase e glutatona peroxidase.

Kim et al. (2008) mostraram que a atividade antioxidante de moléculas de ácido hialurônico de baixa massa molar obtidas por irradiação gama são significativamente maiores do que as não irradiadas e El-Safory e Lee (2010) relataram que o ácido hialurônico digerido enzimaticamente possui maior atividade antioxidante do que moléculas intactas.

Ke et al. (2011), por sua vez, analisaram moléculas de baixa massa molar do ácido hialurônico ($1,45 \times 10^5$ e $4,52 \times 10^4$ Da) obtidas pelo tratamento com o radical sulfato ($\text{SO}_4^{\cdot-}$). Ambas moléculas apresentaram forte inibição da peroxidação lipídica e elevada atividade eliminadora do radical hidroxila, e moderada atividade eliminadora dos radicais DPPH e ânion superóxido. No entanto, as moléculas de tamanho maior exibiram maior atividade antioxidante no estudo *in vivo*.

3.4.2. Atividade Antimicrobiana do Ácido Hialurônico

A atividade antimicrobiana do ácido hialurônico isolado (ARDIZZONI et al., 2011; DI CERBO et al., 2013; CERMELLI et al., 2011; COSTAGLIOLA et al., 1996; PIRNAZAR et al., 1999), acoplado a outras moléculas (AHIRE; DICKS, 2016; HERNÁNDEZ-MONTELONGO et al., 2016; DEL HOYO-GALLEGO et al., 2016; LEQUEUX et al., 2014; ZHAN et al., 2015) ou mesmo ligado a nanopartículas de prata (ABDEL-MOHSEN et al., 2013; KEMP et al., 2009) tem sido verificada contra bactérias, fungos e vírus. Em geral, existe uma tendência de que quanto maior a

massa molecular, maior a atividade antimicrobiana do polímero (PIRNAZAR et al., 1999).

A possibilidade do ácido hialurônico agir isoladamente como agente antimicrobiano nas diversas formulações em que já é utilizado, em substituição à adição de compostos tradicionais com efeito antibiótico, pode trazer inúmeras vantagens, como redução do custo do produto e prevenção de seleção de cepas resistentes à antimicrobianos, além de resolver o problema da infecção associada ao biomaterial.

O estudo de Cermelli et al. (2011) demonstrou que o ácido hialurônico exibiu atividade antiviral, porém não virucida. Neste trabalho, os autores evidenciaram que o polímero inibiu a replicação viral, impedindo a infecção, sem, no entanto, inativar a partícula viral.

Estudos da atividade antifúngica são escassos e apresentam bastante controvérsia. Por exemplo, cepas de *Candida* sp. foram diferentemente afetadas no estudo realizado por (ARDIZZONI et al., 2011). Para as cepas de *C. albicans* testadas (90029 e 90028) não foi possível destacar diferenças significativas no crescimento entre os grupos tratados e controle. Já para os grupos tratados de *C. parapsilosis*, os valores de densidade ótica foram muito inferiores que o controle, exibindo sensibilidade dose-dependente muito significativa, exceto para a menor concentração (0,25 mg.mL⁻¹). *C. glabrata*, por sua vez, foi afetada negativamente pelo polímero apenas nas menores concentrações (0,25 a 2,0 mg.mL⁻¹), tendo o crescimento favorecido em 4 mg.mL⁻¹.

Em bactérias, alguns estudos têm demonstrado a atividade antimicrobiana como bacteriostática, a qual depende, além da massa molecular do polímero, da cepa exposta, que pode muitas vezes ser indiferente ao polímero, sensível ou ter o crescimento favorecido na sua presença. Como demonstrado por (COSTAGLIOLA et al., 1996), as cepas de *Streptococcus* (*S. pyogenes* e *S. viridans*) e *Staphylococcus* (*S. aureus* e *S. epidermidis*) testadas foram capazes de aumentar seu crescimento em até 50 % quando cresceram em meio suplementado com 0,7 % de hialuronato de sódio. Os autores relacionaram tal crescimento ao fato de tais bactérias produzirem hialuronidases e, portanto, serem capazes de degradar o polímero, liberando açúcar menores que puderam ser utilizados como nutrientes, o que ocasionou tanto a diminuição da viscosidade quanto a disponibilidade de carboidratos no meio de cultivo com o passar do tempo.

No entanto, um estudo feito por (ARDIZZONI *et al.*, 2011) demonstrou que o crescimento de *Staphylococcus aureus* em meio suplementado com ácido hialurônico foi dose-dependente, tendo seu crescimento diminuído gradativamente com o aumento da concentração do polímero de 0,5 a 4 mg/mL, de forma significativa. Neste trabalho, os autores também demonstraram uma queda contínua de UFC viáveis (de $1,2 \times 10^9$ a $0,1 \times 10^9$ UFC) de acordo a concentração aplicada de ácido hialurônico (de 0,5 a 4,0 mg.mL⁻¹) em *Streptococcus epidermidis*, quando comparadas ao controle ($2,4 \times 10^9$ UFC) após 72 horas de exposição. Os autores também encontraram resultado similar para cepas de *S. mutans*, demonstrando que os dados disponíveis para Gram-positivas ainda são muito controversos.

Com relação a cepas Gram-negativas, o cenário controverso não é muito diferente. Ardizzoni *et al.* (2011) testaram 3 cepas diferentes de *E. coli* e obtiveram resultados contrastantes. Para a *E. coli* 10536, foi observada inibição do crescimento dose-dependente e significativa; para *E. coli* 25922 apenas nas maiores concentrações testadas (1,0; 2,0; e 4,0 mg.mL⁻¹) foi observada tal relação; enquanto que *E. coli* 13768 apresentou indiferença ao ácido hialurônico mesmo nas maiores concentrações testadas.

Os estudos têm demonstrado que em cepas diferentes, mesmo para a mesma espécie, o ácido hialurônico pode apresentar resultados contrastantes sobre o crescimento celular e, portanto, mais estudos se fazem necessários para entender os mecanismos envolvidos na ação bacteriostática, antiviral e antifúngica do polímero.

O ácido hialurônico ligado à nisina (peptídeo antimicrobiano) foi usado para a produção de hidrogéis (LEQUEUX *et al.*, 2014), tendo tal revestimento antimicrobiano potencial aplicação em lentes de contato, soluções de limpeza para lentes, formulações de cosméticos, para evitar contaminação bacteriana, ampliando a gama de aplicações do polímero.

Em particular, algumas bactérias podem agravar o problema de infecção pela produção de biofilmes, organizações complexas de microrganismos ligados à uma superfície e embebidos numa matriz. Nos biofilmes, os microrganismos apresentam menor sensibilidade aos mecanismos de defesa do hospedeiro, além de estarem protegidas contra estresse (desidratação, toxinas, temperatura, choque osmótico, etc.) e diversos agentes microbicidas, uma vez que existe maior

dificuldade de penetração do antimicrobiano, o que pode acarretar na maior resistência dos microrganismos (MAH; O'TOOLE, 2001).

Em um estudo conduzido por (DRAGO *et al.*, 2014), a ação antimicrobiana do ácido hialurônico foi testada em bactérias Gram-negativas e positivas responsáveis por infecções no trato respiratório. As cepas Gram-positivas apresentaram menor sensibilidade ao ácido hialurônico (*S. pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*), mesmo quando formaram biofilme. Neste estudo o ácido hialurônico demonstrou interferência na adesão bacteriana ao substrato celular contra todas as espécies testadas, porém com menor ou maior grau dependendo da cepa, o que foi justificado pela diferença na composição da matriz do biofilme produzido pelas diferentes cepas.

Porém, devido à pequena parcela de estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana do ácido hialurônico, ainda não é possível prever com exatidão quais as bactérias são efetivamente afetadas pelo polímero, necessitando de mais pesquisas nesta área.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Microrganismos

4.1.1.1. Produção de Ácido Hialurônico

Foi utilizada a cepa de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920, obtida da Coleção Brasileira de Microrganismos de Meio Ambiente e Indústria (CBMAI).

4.1.1.2. Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Ácido Hialurônico

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do ácido hialurônico foram utilizadas 6 cepas bacterianas, sendo 3 Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028; e 3 Gram-positivas: *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Staphylococcus aureus* ATCC 6336 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

4.1.2. Melaço de Cana-de-Açúcar

O melaço foi adquirido do grupo Altech (São João do Ivaí – PR) e apresentou a composição (g.L^{-1}): sacarose (53,0), glicose (4,0) frutose (5,0), teor de cinzas (6,6), aminoácidos (glutamato, aspartato e alanina) (1,2) e íons metálicos como sódio, alumínio, ferro, nitrito, fosfito e potássio (0,17).

4.1.3. Meios de Cultura

4.1.3.1. Meio de Preservação

4.1.3.1.1. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

O microrganismo foi preservado em meio composto por 37 g.L^{-1} de BHI (Brain Heart Infusion- Infusão de Cérebro e Coração) (HIMEDIA M-210) (Tabela 2)

com 50 % (v/v) de glicerol.

Tabela 2. Composição do meio BHI (HIMEDIA M-210).

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Infusão de Cérebro de Bezerro	200,00
Infusão de Coração Bovino	250,00
Protease peptona	10,00
NaCl	5,00
Dextrose	2,00
Na ₂ HPO ₄	2,50

4.1.3.1.2. Cepas Bacterianas

As cepas mencionadas no item 4.1.1.2 foram preservadas em 37 g.L⁻¹ de meio BHI (HIMEDIA M-210) com 25 - 30 % de glicerol.

4.1.3.2. Meios de Propagação

4.1.3.2.1. Cultivo das Cepas Bacterianas

As culturas em estoque foram transferidas para 30,0 g.L⁻¹ de caldo triptona de soja (TSB) (Acumedia 7614 A) (Tabela 3), sendo, posteriormente, as Gram-positivas semeadas em placas de Petri contendo 38,0 g.L⁻¹ de meio não seletivo Müeller-Hinton (Acumedia 7101 A) (Tabela 4), enquanto que as Gram-negativas foram semeadas em 50,0 g.L⁻¹ de meio seletivo Ágar MacConkey (Acumedia 7102 A) (Tabela 5).

Tabela 3. Composição do caldo triptona de soja (Acumedia 7614 A).

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Digestão enzimática de caseína	17,000
Digestão enzimática de grãos de soja	3,000
Cloreto de sódio	5,000
Fosfato dipotássico	2,500
Dextrose	2,500

Tabela 4. Composição do meio Ágar Müller-Hinton (Acumedia 7101 A).

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Extrato de carne	2,0
Hidrolisado Ácido de Caseína	17,5
Amido	1,5
Ágar	17,0

Tabela 5. Composição do meio seletivo Ágar MacConkey (Acumedia 7102 A).

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Digestão enzimática de gelatina	17,000
Digestão enzimática de caseína	1,500
Digestão enzimática de tecido animal	1,500
Lactose	10,000
Sais biliares	1,500
Cloreto de sódio	5,000
Cristal violeta	0,001
Vermelho neutro	0,030
Ágar	13,500

4.1.3.2.2. Meio de Inóculo para *S. zooepidemicus*

Meio BHI, na concentração de 37 g.L⁻¹.

4.1.3.3. Meios de Fermentação para *S. zooepidemicus*

Foram utilizados meios de fermentação de glicose e melão de cana-de-açúcar, testando os diferentes componentes acetato de sódio, glutamina, niacina, ácido oxálico e iodoacetato de sódio, além de extrato de levedura, conforme descrito no item 4.2.3.

4.1.3.3.1. Meio de Fermentação com Glicose

O meio de fermentação foi (g.L⁻¹): glicose (30,0); extrato de levedura (30,0); K₂HPO₄ (2,5); NaCl (2,0); MgSO₄ (1,5); e acetato de sódio, glutamina, niacina, ácido oxálico e iodoacetato de sódio com as respectivas concentrações variadas de acordo com um planejamento fatorial fracionado Box Hunter x Hunter 2⁵⁻¹ (Tabela 7). Posteriormente, variou-se a concentração de glutamina e extrato de levedura no meio (g.L⁻¹): glicose (30,0); K₂HPO₄ (2,5); NaCl (2,0); MgSO₄ (1,5); segundo um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (Tabela 8).

4.1.3.3.2. Meio de Fermentação com Melaço de Cana-de-Açúcar

O meio de fermentação foi (g.L^{-1}): melaço de cana-de-açúcar (30,0 de açúcares totais); extrato de levedura (30,0); K_2HPO_4 (2,5); NaCl (2,0); MgSO_4 (1,5); e acetato de sódio, glutamina, niacina, ácido oxálico e iodoacetato de sódio com as respectivas concentrações variadas de acordo com um planejamento fatorial fracionado Box Hunter x Hunter 2^{5-1} (Tabela 7). Posteriormente, variou-se a concentração de glutamina no meio contendo (g.L^{-1}): melaço de cana (30,0 de açúcares totais); extrato de levedura (30,0); K_2HPO_4 (2,5); NaCl (2,0); e MgSO_4 (1,5), conforme descrito no item 4.2.3.4.

4.1.3.4. Meios para os Ensaio de Atividade Antimicrobiana

4.1.3.4.1. Microdiluição em Caldo

Após a padronização das unidades formadoras de colônias (UFC) em 5×10^8 , usando padrão MacFarland, as cepas foram transferidas para 21 g.L^{-1} de caldo Müller-Hinton (MHB) (DIFCO 275730) (Tabela 6), seguindo as normas do Instituto de Padronizações Clínicas e Laboratoriais (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI).

Tabela 6. Composição do caldo Müller-Hinton (DIFCO 275730).

Componentes	Concentração (g.L^{-1})
Extrato de carne	2,0
Hidrolisado Caseína	17,5
Amido	1,5

4.1.3.4.2. Difusão em Ágar

Para o ensaio de difusão em ágar, foram utilizadas placas de Petri contendo 21 g.L^{-1} de MHB e 1,5 % de ágar (CLSI).

4.1.4. Reagentes

4.1.4.1. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

O radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Sigma Chemical CO.) foi utilizado para a avaliação da atividade antioxidante do ácido hialurônico.

4.1.4.2. Hialuronato de Sódio

Padrão de hialuronato de sódio (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.).

4.2. Métodos

4.2.1. Preservação dos Microrganismos

4.2.1.1. *Streptococcus zooepidemicus*

S. zooepidemicus foi cultivado em placas de Petri contendo 37 g.L⁻¹ de BHI e 20 g.L⁻¹ de ágar a 37 °C por 24 horas. O microrganismo foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de BHI (Tabela 2) e incubado a 37 °C, 150 rpm por 48 horas. A interrupção do cultivo foi realizada por centrifugação a 9956 × g e 4 °C por 15 min e a biomassa foi ressolubilizada em 10 mL de salina 0,9 %. Posteriormente, 0,5 mL da solução de biomassa foi transferida para microtubos de 2 mL contendo 50 % (v/v) de glicerol, que foram mantidos a -80 °C. O repique do microrganismo foi realizado a cada seis meses.

4.2.1.2. Cepas Bacterianas

As cepas cultivadas em 37 g.L⁻¹ de meio BHI foram mantidas em meio BHI com 25-30 % de glicerol a -20 °C.

4.2.2. Inóculo

O microrganismo foi cultivado em placas de Petri em meio BHI, 20 g.L⁻¹

de ágar e incubadas a 37 °C. Após 24 horas, colônias foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio BHI mantidos a 37 °C, 150 rpm por 24 horas. Posteriormente, 10 % (v/v) do cultivo foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio de inóculo, composto por (g.L⁻¹): glicose (30,0), extrato de levedura (30,0), K₂HPO₄ (2,5), NaCl (2,0) e MgSO₄.7H₂O (1,5).

O cultivo foi conduzido a 150 rpm, 37 °C por 6 horas, sendo então interrompido por centrifugação a 9956 × g e 4 °C por 15 min. A biomassa ressolubilizada em solução salina 0,9 % teve a concentração determinada por turbidimetria a $\lambda = 600$ nm, sendo correlacionada a curva de calibração de biomassa (g.L⁻¹) (4.2.5.2.). Todas as fermentações tiveram o inóculo padronizado em 0,2 g.L⁻¹.

4.2.3. Produção de Ácido Hialurônico

Para o estudo da produção foram realizadas cinco (5) fermentações, descritas nos tópicos de 4.2.3.1. a 4.2.3.5. As fermentações de 1 a 4 foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, com 25 mL dos respectivos meios, e a fermentação 5 em biorreator. Todas as fermentações foram interrompidas por centrifugação a 9956 × g por 15 min a 4 °C. A biomassa foi quantificada e do sobrenadante foram avaliados o consumo de açúcares, produção de ácidos hialurônico, láctico, fórmico, acético e etanol.

4.2.3.1. Fermentação 1: Efeito do Acetato de Sódio (X1), Glutamina (X2), Niacina (X3), Ácido Oxálico (X4) e Iodoacetato (X5) em Glicose

Foram avaliadas as variáveis acetato de sódio (X1), glutamina (X2) niacina (X3), ácido ascórbico (X4) e piruvato (X5), acrescidas ao meio de fermentação (4.1.2.3.1) nos níveis -1 e 1, com 3 repetições do ponto central, através de um planejamento fatorial fracionado Box Hunter x Hunter 2⁵⁻¹, totalizando 19 ensaios (Tabela 7). A variável resposta (Y) foi a produção de ácido hialurônico em g.L⁻¹.

Tabela 7. Planejamento fatorial Box Hunter x Hunter 2^{5-1} para avaliar a produção de ácido hialurônico em meio de glicose ou melaço por *Streptococcus zooepidemicus*.

Ensaio	Variáveis Codificadas					Variável Resposta
	x1	x2	x3	x4	x5	Ácido Hialurônico (Y)
1	-1	-1	-1	-1	1	
2	1	-1	-1	-1	-1	
3	-1	1	-1	-1	-1	
4	1	1	-1	-1	1	
5	-1	-1	1	-1	-1	
6	1	-1	1	-1	1	
7	-1	1	1	-1	1	
8	1	1	1	-1	-1	
9	-1	-1	-1	1	-1	
10	1	-1	-1	1	1	
11	-1	1	-1	1	1	
12	1	1	-1	1	-1	
13	-1	-1	1	1	1	
14	1	-1	1	1	-1	
15	-1	1	1	1	-1	
16	1	1	1	1	1	
17	0	0	0	0	0	
18	0	0	0	0	0	
19	0	0	0	0	0	
Fatores (g.L ⁻¹)	Níveis					
	-1	0	1			
Acetato de Sódio (X1)	0	10	20			
Glutamina (X2)	0	2	4			
Niacina (X3)	0	2	4			
Ácido oxálico (X4)	0	0,2	0,4			
Iodoacetato (X5)	0	0,005	0,010			

4.2.3.2. Fermentação 2: Efeito do Extrato de Levedura (X1) e da Glutamina (X2) em Meio de Glicose

Para avaliar o efeito da glutamina e extrato de levedura sobre a produção de ácido hialurônico, diferentes concentrações destes componentes foram testadas de acordo com um DCCR 3^2 , com 4 pontos axiais e 4 pontos centrais, como apresentado na Tabela 8. As variáveis foram testadas nos níveis -1,414; -1; 0; 1; e 1,414 e um total de 12 ensaios foram realizados.

Tabela 8. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com 5 repetições no ponto central variando as concentrações de extrato de levedura e glutamina na produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variável Resposta		
	x1	x2	Ácido Hialurônico (Y)		
1	-1	-1			
2	-1	1			
3	1	-1			
4	1	1			
5	-1,414	0			
6	1,414	0			
7	0	-1,414			
8	0	1,414			
9	0	0			
10	0	0			
11	0	0			
12	0	0			
13	0	0			
Fatores (g.L ⁻¹)	Níveis				
	-1,414	-1	0	1	1,414
Extrato de Levedura (X1)	11,72	20	40	60	68,28
Glutamina (X2)	3,76	5	8	11	12,24

4.2.3.3. Fermentação 3: Efeito do Acetato de Sódio (X1), Glutamina (X2), Niacina (X3), Ácido Oxálico (X4) e Iodoacetato (X5) em Melaço de Cana-de-Açúcar

Para o uso nos meios de fermentação, uma solução de melaço a 150 g.L⁻¹ de açúcares totais foi centrifugada a 9956 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi tratado com 12 % (m/v) de carvão ativado em banho-maria a 60 °C por 1 h e novamente centrifugado a 9956 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado com papel filtro Whatmann e quantificado para açúcares totais. Para a correção da concentração, quando necessário, sacarose comercial foi utilizada para obter a concentração desejada de 150 g.L⁻¹.

As variáveis avaliadas foram acetato de sódio (X1), glutamina (X2) niacina (X3), ácido ascórbico (X4) e piruvato (X5), acrescidas ao meio de fermentação com melaço de cana-de-açúcar (4.1.3.3.2) nos níveis -1 e 1, com 3 repetições do ponto central, através de um planejamento fatorial fracionado Box Hunter x Hunter 2⁵⁻¹, totalizando 19 ensaios (Tabela 7). A variável resposta (Y) foi a produção de ácido

hialurônico em g.L^{-1} .

4.2.3.4. Fermentação 4: Efeito da Concentração de Glutamina em Melaço de Cana-de-Açúcar

Foi realizada uma fermentação para verificar o efeito da glutamina sobre a produção variando a concentração do aminoácido de 0,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; e 12,0 g.L^{-1} no meio 4.1.3.3.2.

4.2.3.5. Fermentação 5: Produção em Biorreator

A melhor condição obtida das diferentes fermentações foi transferida para o biorreator modelo FerMac 320 (Electrolab Biotech Ltda.) com capacidade de 5,0 L, com volume operacional de 3,5 L, equipado com sensores de pH (BJC K9) e temperatura (Wrap-around). Foram fixadas a temperatura de 37 °C e o pH 8,0 segundo Pan et al. (2015) e aeração foi de 0,5 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) (AROSKAR et al., 2012), com ar foi fornecido por bomba compressora conectada a um controlador PID. A formação de espuma, quando necessário, foi contida pela adição de óleo de canola.

Foram avaliadas duas velocidades de agitação: 100 e 300 rpm. Amostras de 10 mL foram retiradas a cada 2 horas, foram quantificadas a biomassa, consumo de açúcares, produção dos ácidos hialurônico, láctico, fórmico, acético e etanol.

4.2.4. Acompanhamento das Fermentações

4.2.4.1. Determinação do pH

O pH inicial e final dos cultivos foram acompanhados por análise potenciométrica.

4.2.4.2. Curva de Biomassa de *Streptococcus zooepidemicus*

Para determinação da biomassa, inicialmente foi confeccionada uma curva de biomassa pelo cultivo de *S. zooepidemicus* em BHI por 48 h. A biomassa

obtida foi separada por centrifugação a $9.956 \times g$, 4°C por 15 min e ressuspensa em salina 0,9 %. Quatro (4) alíquotas de 1 mL foram separadas. Uma alíquota foi submetida a diferentes diluições para a obtenção de leituras de 0,1 a 0,9 de absorbância em $\lambda = 600 \text{ nm}$ e 3 alíquotas foram distribuídas em recipientes previamente tarados, mantidos em estufa (70°C) até peso constante. Um gráfico foi plotado relacionando absorbância *versus* peso seco (g.L^{-1}) e esta curva foi utilizada para todas as determinações de biomassa.

4.2.4.3. Determinação da Biomassa

A biomassa das fermentações foi estimada por leitura da densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro a $\lambda = 600 \text{ nm}$, correlacionada a curva de calibração de biomassa. A biomassa foi ressuspensa em salina 0,9 %, diluída quando necessário e realizadas as leituras.

4.2.4.4. Determinação de Açúcares Totais e Redutores

Os açúcares redutores dos cultivos em glicose foram quantificados pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944) em espectrofotômetro à $\lambda = 540 \text{ nm}$, correlacionada a curva padrão de glicose ($20 \text{ a } 100 \text{ ug.mL}^{-1}$).

Para quantificar os açúcares totais presentes no melaço de cana-de-açúcar foi realizado o método de Fenol Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) à $\lambda = 490 \text{ nm}$. Foi utilizado padrão de sacarose ($20 \text{ a } 100 \text{ ug.mL}^{-1}$) para a confecção da curva de calibração.

4.2.4.5. Determinação dos Ácidos Orgânicos e Etanol

A produção de ácido láctico, fórmico, acético e de etanol foi avaliada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de índice de refração (Shimadzu RID – 10A). Foi utilizada a coluna para ácidos orgânicos foi Aminex HPX – 87H $300 \times 7,8 \text{ mm}$, a 60°C , e uma solução de H_2SO_4 $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ como fase móvel, com vazão de $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$. As amostras dos sobrenadantes das fermentações foram filtradas em membranas de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore) e $20 \text{ }\mu\text{L}$ foram injetados.

Para cada analito um curva de calibração foi confeccionada, utilizando padrões de 50 a 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.2.4.6. Determinação do Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico foi quantificado por CLAE por partição em fase reversa, usando detector de índice de refração (Shimadzu RID – 10A) e coluna Shimadzu CLC-ODS(M) de 25 cm com octadecilsilano (sílica modificada com hidrocarboneto linear C18) como fase estacionária. A temperatura de 40 °C e a fase móvel NaNO_3 0,1 M, na vazão de 1mL.min^{-1} (ARMSTRONG; JOHNS, 1995). A curva foi realizada com o padrão de hialuronato de sódio (Sigma-Aldrich), nas concentrações de 15 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.2.5. Purificação do Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico produzido em reator foi precipitado, purificado e caracterizado para aplicação na atividade antioxidante e antimicrobiana. Nesta etapa foi utilizado o método de purificação segundo Reddy e Karunakaran (2013).

O sobrenadante livre de células foi precipitado com etanol na proporção 1:1,5 (amostra/ etanol) a 4 °C e após 1 h, foi centrifugado a 1259 x g, 4 °C por 20 min. O precipitado foi redissolvido em 0,15 M de NaCl, sendo tal procedimento repetido 3 vezes. Ao precipitado obtido redissolvido em NaCl 0,15 M, foi acrescentado ácido tricloroacético (0,1 %) até atingir pH 2,0 e, após 1 h a 4 °C, a solução foi centrifugada a 6023 x g, 4 °C por 30 min. O sobrenadante final foi dialisado por 72 horas e liofilizado.

4.2.6. Caracterização do Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico foi caracterizado por espectroscopia no ultravioleta e visível (UV-Vis), espectroscopia de infravermelho com transformada em Fourier (FT-IR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

4.2.6.1. Espectroscopia no Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

O ácido hialurônico foi diluído em água deionizada ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) e analisado por espectroscopia de absorção molecular (UV-Vis) realizada a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ variando λ de 180 a 450 nm e usando água destilada como referência (CHOI et al., 2010).

4.2.6.2. Espectroscopia de Infravermelho com transformada em Fourier (FT-IR)

Um miligrama (mg) de ácido hialurônico foi incorporado a 100 mg de KBr, submetidas a alta pressão para produção de pastilhas. As pastilhas de KBr foram utilizadas como referência e a amostra foi submetida a trinta e duas varreduras. Os resultados foram integrados pelo programa Shimadzu Hyper IR. A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier foi conduzida em aparelho Shimadzu FTIR-8300 com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando-se escala de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.2.7. Atividade Farmacológica do Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico produzido em reator foi analisado quanto as atividades farmacológicas de antioxidante e antimicrobiana.

4.2.7.1. Determinação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante do ácido hialurônico foi determinada através da redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). O radical DPPH possui coloração púrpura, absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente λ 517 nm e, na presença de um antioxidante, o DPPH é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, um composto de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância.

A atividade antioxidante do ácido hialurônico liofilizado dos cultivos em reator e do padrão de hialuronato de sódio foi determinada pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.), como descrito por Ke et al. (2011b). 300 μL de uma solução de DPPH 0,1 mM em etanol foram adicionados a tubos contendo previamente 1 mL das amostras de ácido hialurônico

nas concentrações de 0,2 a 1,0 mg.mL⁻¹. Após 30 min a temperatura ambiente e mantidas no escuro, as absorbâncias das amostras (A1) foram lidas em espectrofotômetro a $\lambda = 517$ nm contra um branco (água no lugar da amostra (A2) e etanol no lugar do radical (A0)). O poder antioxidante foi calculado pela porcentagem de inibição da atividade do DPPH através da fórmula [%] = $[1 - (A1 - A2) / A0] \times 100$. Ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) 0,2 a 1,0 mg.mL⁻¹ foi utilizado como padrão.

4.2.7.2. Determinação da Atividade Antimicrobiana

4.2.7.2.1. Cultivo das Cepas Bacterianas

As cepas (4.1.1.2.) foram inicialmente ativadas no caldo triptona de soja (Tabela 3), por 18 a 24 h a 37°C. As Gram-negativas foram cultivadas em meio seletivo ágar MacConkey (Tabela 5) e as Gram-positivas em meio ágar Müeller-Hinton (Tabela 4) em placas de Petri a 37 °C por 18 a 24 h segundo as normas do Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (do inglês, Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) (COCKERILL et al., 2012).

Os inóculos foram preparados por suspensão direta das colônias em NaCl 0,9 % e ajustadas para turbidez referente a escala 0,5 MacFarland, correspondente à cerca de 5×10^8 UFC. Em seguida, as soluções celulares foram diluídas em 21 g.L⁻¹ de meio Müeller-Hinton (Tabela 6) para conter 5×10^6 UFC.

4.2.7.2.2. Ensaio de Microdiluição em Caldo

Para determinar a concentração mínima inibitória (MIC), alíquotas de 50 uL de hialuronato de sódio (10,0 a 0,25 g.L⁻¹) e do ácido hialurônico produzido em biorreator (80,0 a 0,25 g.L⁻¹) obtidas por diluições seriadas em meio Müeller-Hinton foram transferidas para placas de 96 poços contendo 50 uL das soluções celulares, que passaram a conter 5×10^5 UFC e metade das concentrações de ácido hialurônico.

Para cada cepa bacteriana foi utilizada uma placa, sendo realizados controles negativo (50 uL da solução de células 5×10^6 UFC e 50 uL de meio

Müeller-Hinton) e positivo (50 uL de ácido hialurônico 8 g.L⁻¹ e 50 uL de meio Müeller-Hinton) e cada ensaio foi realizado em triplicata.

Segundo o CLSI, a MIC é a menor concentração testada do agente na qual há inibição do crescimento detectada visualmente (presença de turbidez), no entanto, devido à turbidez das soluções com ácido hialurônico produzido em biorreator, foi realizada adaptação das normas preconizadas: após incubação das placas a 37 °C por 18 a 24 h, 10 uL dos poços foram diluídos em NaCl 0,9 % (1:1000) e, em seguida, 100 uL foram plaqueados por esgotamento em placas de Petri contendo 38 g.L⁻¹ de Ágar Müeller-Hinton; após 18-24 h, as UFC foram determinadas, de forma que o intervalo entre 10-100 UFC era correspondente à quantidade inoculada (5×10^5 UFC).

4.2.7.2.3. Ensaio de Difusão em Ágar

Os ensaios de difusão em ágar foi realizado seguindo as normas preconizadas pelo CLSI. Para tanto, soluções bacterianas (4.1.1.2.) contendo 5×10^8 UFC foram semeadas em placas de Petri contendo meio Müeller-Hinton (Tabela 6) e discos contendo 20 uL de soluções de ácido hialurônico 8,0; 4,0; 2,0 e 0,5 g.L⁻¹ foram dispostos nas placas. Após incubação a 37 °C por 18 a 24 h, foi observado a formação de halos ao redor dos discos e, quando presentes, os diâmetros foram medidos (mm).

4.2.8. Análises Estatísticas

A variável resposta, concentração de ácido hialurônico (Y) em g.L⁻¹, obtida dos planejamentos estatísticos foi analisada no programa Statistica 7.0 através de análise de variância (ANOVA), com $\alpha = 5 \%$ (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

As diferenças estatísticas entre o tamanho dos halos no ensaio de difusão em ágar foram verificadas por teste t, com $\alpha = 5\%$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão apresentados em um artigo científico e resultados complementares.

5.1. O artigo “Potencial Antioxidante e Antimicrobiano do Ácido Hialurônico de *Streptococcus zooepidemicus* Produzido em Melaço de Cana-de-Açúcar” será submetido à revista International Journal of Biological Macromolecules.

5.2. Os Resultados Complementares estão apresentados nos Anexos 1 a 10.

5.1. ARTIGO

Potencial Antioxidante e Antimicrobiano do Ácido Hialurônico de *Streptococcus zooepidemicus* Produzido em Melaço de Cana-de-Açúcar

Pereira, H. C. B., Pan, N. C., Saikawa, G. I. A., Rocha, S. P. D., Rocha, C. B.,
Celligoi, M. A. P. C.

Resumo

O ácido hialurônico é um polissacarídeo com elevada hidrofiliabilidade e viscoelasticidade, aplicado em várias formulações como biomaterial e a possibilidade de agir como agente antimicrobiano e antioxidante nestas formulações, além de exercer a função principal, pode agregar mais valor ao polímero. O objetivo deste trabalho foi produzir ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* em meio de glicose ou melaço de cana-de-açúcar suplementado com acetato de sódio, glutamina, niacina, ácido oxálico e iodoacetato de sódio em frascos de Erlenmeyer de em biorreator e testar suas atividades antioxidante e antimicrobiana. A produção de ácido hialurônico em Erlenmeyer foi de 0,710 g.L⁻¹ em melaço e 0,469 g.L⁻¹ em glicose e a glutamina adicionada apresentou efeito positivo sobre a produção do polímero, atingindo 0,843 g.L⁻¹. A fermentação em biorreator a 100 rpm foi de 2,55 g.L⁻¹, 3 x maior que em frascos, porém não apresentou diferença quando agitação maior (300 rpm) foi empregada. O ácido hialurônico de *S. zooepidemicus* produzido em melaço apresentou atividade antioxidante de 40 % em 1 g.L⁻¹, porém não apresentou atividade antimicrobiana. O melaço pode ser aplicado para produção de ácido hialurônico e este ser empregado em formulações como agente antioxidante.

Palavras-chave: ácido hialurônico, antioxidante, antimicrobiano, biorreator, biomaterial, melaço de cana-de-açúcar.

1. Introdução

O ácido hialurônico é um polissacarídeo formado por unidades de ácido glicurônico e N-acetilglicosamina [1], que, por apresentar elevada capacidade de retenção de água e viscoelasticidade, tem sido aplicado em vários produtos como biomaterial. Formulações contendo o polímero tem contribuído para melhorar a cicatrização [2–5], no tratamento de queimaduras [6], hidratação, rejuvenescimento da pele e fornecimento de espaço durante a manipulação cirúrgica [7], prevenção da adesão tecidual pós-operatória [8], tratamento do olho seco [9] e do pé diabético [10], além de inúmeras outras aplicações nas quais uma infecção secundária pode vir a se tornar um grande problema.

A atividade antimicrobiana do ácido hialurônico acoplado a outras moléculas [11–15], dentre elas, nanopartículas de prata [16,17] tem sido verificada. No entanto, a ação isolada do polímero como agente antimicrobiano [18–22] ainda é muito controversa. A possibilidade de ação antimicrobiana nas diversas formulações em que já é utilizado, em substituição à adição de compostos tradicionais com efeito antibiótico, pode trazer inúmeras vantagens, como redução do custo do produto e prevenção de seleção de cepas resistentes à antimicrobianos, além de resolver o problema da infecção associada ao biomaterial. No entanto, nenhum estudo ainda foi capaz de determinar o mecanismo de ação do polímero sobre os microrganismos testados.

Visando o uso em formulações, vários estudos têm mostrado que o ácido hialurônico tem propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo* [23,24], nas quais o polímero age sobre as enzimas superóxido desmutase e glutathione peroxidase [25], inibe fortemente a peroxidação lipídica e eleva a atividade de eliminar o radical hidroxila [26]. A produção de radicais livres como superóxido, radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e de óxido nítrico é conhecida por causar danos nos tecidos, que podem resultar até mesmo na perda de função. Desta maneira, a possibilidade do ácido hialurônico agir tanto como antimicrobiano quanto como antioxidante (além exercer a função principal) pode exercer efeitos sinérgicos e agregar valor ao polímero.

Embora a extração de ácido hialurônico de tecidos animais seja possível, a pressão das indústrias por um produto seguro impulsionou, nos últimos anos, a obtenção de ácido hialurônico por microrganismos. No entanto, de acordo com Vazquez et al. [27], mais de 80 % dos custos da produção de ácido hialurônico microbiano são devido ao meio de fermentação, o que reduz a competitividade comercial desta alternativa e, desta maneira, se faz necessário a utilização de substratos de baixo custo para reduzir o custo de produção [28]. Alguns trabalhos recentes têm substituído as fontes tradicionais por subprodutos industriais com a finalidade de baratear a produção, além de agregar valor aos produtos, que de outra maneira poderiam ser descartados como resíduos, como soro de queijo [29], de leite [30,31], milhocina [32,33], melação de cana-de-açúcar bruto e pré-tratado [32,34].

Dentre os microrganismos produtores de ácido hialurônico, destacam-se os do gênero *Streptococcus*, bactérias ácido lácticas fastidiosas que requerem suplementação do meio, além das fontes de carbono e nitrogênio, tanto para o

crescimento, quanto para a síntese do polímero. Dentre estes nutrientes, destacam-se as vitaminas, aminoácidos, agentes antioxidantes (que evitam a depolimerização da cadeia de ácido hialurônico), agentes tamponantes e inibidores da via glicolítica como a niacina, glutamina, ácido oxálico, acetato de sódio e iodoacetato de sódio, respectivamente.

Considerando a ampla aplicação do ácido hialurônico e seus altos custos de produção, o objetivo deste trabalho foi produzir o polímero por *Streptococcus zooepidemicus*, comparando a produção em glicose e em melaço de cana-de-açúcar (subproduto agroindustrial), variando nutrientes do meio, e verificar o seu potencial farmacológico através de suas atividades antimicrobiana e antioxidante, visando a possibilidade de utilização em formulações, agregando, assim, valor ao polímero como biomaterial.

2. Material e Métodos

2.1. Linhagens celulares e inóculo

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 mantido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em Brain Heart Infusion (BHI) (HIMEDIA M-210) a 37 g.L^{-1} com 50 % de glicerol foi ativado em 37 g.L^{-1} de BHI a 2 % de ágar, 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. O pré-inóculo foi em 25 mL de meio BHI 37 g.L^{-1} em frascos de Erlenmeyer (125 mL), 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 150 rpm. Deste, 10 % foi transferido para o meio de inóculo (g.L^{-1}): glicose (30,0); extrato de levedura (30,0); K_2HPO_4 (2,5); NaCl (2,0); MgSO_4 (1,5) por 6 h, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 150 rpm. Após centrifugação (9956 x g , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min), os inóculos foram padronizados em $0,2\text{ g.L}^{-1}$ para todas as fermentações.

As cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Staphylococcus aureus* ATCC 6336 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175 foram utilizadas para a avaliação da atividade antimicrobiana do ácido hialurônico, seguindo as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute [35]. As cepas ativadas em 30 g.L^{-1} de caldo triptona de soja (TSB) (Acumedia 7614 A) de 18 a 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram transferidas para 50 g.L^{-1} de Ágar MacConkey (Acumedia 7102 A) (Gram-negativas) ou 38 g.L^{-1} de Ágar Müeller-Hinton (Acumedia 7101 A) (Gram-positivas) em placas de Petri a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 h. Os inóculos foram

preparados em NaCl 0,9 %, turbidez equivalente a escala 0,5 MacFarland (5×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC)). As soluções foram diluídas para atingir 5×10^6 UFC em 21 g.L^{-1} de meio Müller-Hinton.

2.2. Produção de Ácido Hialurônico

2.2.1. Efeito de acetato de sódio, glutamina, niacina, ácido oxálico e iodoacetato suplementados em meios de glicose ou melaço de cana-de-açúcar

Os efeitos de acetato de sódio (X1), glutamina (X2), niacina (X3), ácido oxálico (X4) e iodoacetato de sódio (X5) na produção de ácido hialurônico foram verificados por planejamento fatorial Box Hunter x Hunter $2^{(5-1)}$ (Tabela 1) em meio de glicose ou melaço. O melaço, adquirido do grupo Altech, foi clarificado com carvão ativado conforme descrito por Pan et al. [34]. Frascos de Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio de (g.L^{-1}): glicose ou melaço (30,0 de açúcares totais) acrescidos de extrato de levedura (30,0); K_2HPO_4 (2,5); NaCl (2,0); MgSO_4 (1,5) foram mantidos a 37°C e 100 rpm por 24 h, pH inicial 8,0. Posteriormente, uma fermentação foi desenvolvida variando a glutamina (0 a 12 g.L^{-1}) em meio de melaço de cana-de-açúcar.

2.2.2. Produção de ácido hialurônico em biorreator: efeito da agitação

As velocidades de agitação (100 e 300 rpm) foram avaliadas em biorreator (FerMac 320 - Electrolab Biotech Ltda.) com capacidade de 5,0 L e volume operacional de 3,5 L. As fermentações a 37°C , 0,5 vvm e pH 8,0 em meio de (g.L^{-1}): melaço de cana-de-açúcar (30,0 de açúcares totais); extrato de levedura (30,0); K_2HPO_4 (2,5); NaCl (2,0); MgSO_4 (1,5); glutamina (8,0); tiveram duração de 24 h, com alíquotas retiradas a cada 2 h.

2.3. Determinação de biomassa, ácido hialurônico, ácidos orgânicos, etanol e consumo de açúcares

Os cultivos interrompidos por centrifugação ($9.056 \times g$, 4°C , 15 min) tiveram biomassa determinada por densidade óptica (D.O.) a $\lambda = 600 \text{ nm}$,

correlacionada a uma curva em g.L^{-1} . A determinação de açúcares redutores foi realizada por Somogyi [36] e Nelson [37] a $\lambda = 540 \text{ nm}$, com padrão de glicose (20 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a de açúcares totais por Fenol Sulfúrico [38] a $\lambda = 490 \text{ nm}$.

As determinações de ácido láctico, fórmico, acético e etanol foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detector de índice de refração (Shimadzu RID – 10A), coluna Aminex HPX – 87H ($300 \times 7,8 \text{ mm}$) a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, fase móvel de $0,005 \text{ mol.L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ a $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$. Padrões (SigmaAldrich) de 50 a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram utilizados para as curvas de calibração. O ácido hialurônico foi quantificado por CLAE com detector de índice de refração (Shimadzu RID – 10A), coluna Shimadzu CLC-ODS(M) (25 cm) com octadecilsilano a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e fase móvel de NaNO_3 $0,1 \text{ M}$ a 1 mL.min^{-1} . Hialuronato de sódio (Sigma-Aldrich) (15 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi utilizado para a curva de calibração.

2.4. Caracterização do ácido hialurônico

O ácido hialurônico produzido em biorreator foi precipitado com etanol (1:1,5) (amostra/etanol) a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h, centrifugado ($1.259 \times \text{g}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 min) e redissolvido em NaCl $0,15 \text{ M}$ por 3 vezes. A solução resultante foi tratada por 1 h com ácido tricloroacético até atingir pH 2,0 [39], centrifugada ($6.023 \times \text{g}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min) e o sobrenadante dialisado por 72 h e liofilizado.

O ácido hialurônico liofilizado foi diluído em água destilada (1 mg.mL^{-1}) e submetido a espectroscopia de absorção molecular (UV-Vis) variando λ de 190 a 450 nm. A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi conduzida em espectrômetro IR PRESTIGE-21 (Shimadzu, Japão), resolução de 4 cm^{-1} , em comprimento de onda de 4000 a 400 cm^{-1} , usando pastilhas de KBr como referência. Para a análise, 1 mg de ácido hialurônico foi incorporado a 100 mg de KBr e submetidos a alta pressão para produção de pastilhas, sendo realizadas trinta e duas varreduras de cada amostra.

2.5. Avaliação do potencial farmacológico

2.5.1. Atividade antioxidante

300 μL do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich) $0,1 \text{ mM}$ em etanol foram adicionados a 1 mL de ácido hialurônico ($0,2$ a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$). A

mistura foi mantida em repouso à temperatura ambiente e na ausência de luz por 30 min. As absorvâncias foram lidas a 517 nm, sendo o percentual de atividade antioxidante calculado como (%) = $[1 - (A1 - A2) / A0] \times 100$, no qual A0 é a absorvância do branco (água no lugar da amostra), A1 é a absorvância da amostra e A2 é a absorvância da amostra em condições idênticas às de A1 (etanol no lugar de DPPH). Utilizou-se ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) como padrão para o ensaio.

2.5.2. Atividade Antimicrobiana

A Concentração Mínima Inibitória (MIC), seguiu as normas do CLSI [35], 50 uL de hialuronato de sódio (10,0 a 0,25 g.L⁻¹) e do ácido hialurônico produzido em biorreator (80,0 a 0,25 g.L⁻¹) em meio Müller-Hinton foram transferidas para placas de 96 poços contendo 50 uL das cepas bacterianas a 5×10^6 . Controles negativo (50 uL da solução de células 5×10^6 UFC e 50 uL de meio Müller-Hinton) e positivo (50 uL de ácido hialurônico 8 g.L⁻¹ e 50 uL de meio Müller-Hinton) foram realizados, incubadas a 37 °C de 18 a 24 h. Para o hialuronato de sódio, as placas foram analisadas quanto a turbidez [35]. Para o ácido hialurônico produzido, as soluções com as cepas foram diluídas em NaCl 0,9 % (1:1000) e 100 uL plaqueadas em placas de Petri contendo 38 g.L⁻¹ de Ágar Müller-Hinton. Após 18 a 24 h as UFC foram contadas.

Para o ensaio de difusão em ágar, as cepas bacterianas a 5×10^8 UFC foram plaqueadas em 38 g.L⁻¹ de Ágar Müller-Hinton e discos contendo 20 uL de soluções de ácido hialurônico (8,0; 4,0; 2,0 e 0,5 g.L⁻¹) foram dispostos nas placas e incubadas a 37 °C. Após 18 a 24 h foi observado a formação de halos ao redor dos discos para medição (mm).

2.6. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) com comparação de médias por Tukey e test t para validação dos modelos, com $\alpha = 5 \%$.

3. Resultados e Discussão

3.1. Efeito de acetato de sódio, glutamina, niacina, ácido oxálico e iodoacetato em glicose e melaço de cana-de-açúcar

As maiores produções de ácido hialurônico foram 0,469 g.L⁻¹ em glicose e 0,710 g.L⁻¹ em melaço, ambos no ensaio 3 (Tabela 1), na presença de apenas glutamina (4 g.L⁻¹). A produção em melaço foi 51,38 % que em glicose, uma vez que esse subproduto se caracteriza como uma fonte rica em açúcares fermentescíveis, aminoácidos e íons metálicos, como Fe²⁺, cuja adição ao meio de cultivo por Choi et al. [40] levou ao aumento na produção de ácido hialurônico. Além disso, o tratamento do melaço com carvão ativado possivelmente resultou em uma fonte com menos fatores inibitórios para a síntese de ácido hialurônico, como K⁺ e Na⁺, que podem desviar energia metabólica para manutenção de prótons no interior das células e inibir a hialuronan-sintase [41,42], uma vez que foi observado por Pan et. al [34] que o tratamento do melaço com carvão resultou na maior produção do polímero se comparado ao melaço sem tratamento.

Acetato de sódio (p= 0,000078), ácido oxálico (p= 0,012785) e iodoacetato (p= 0,000044) foram significativos na produção do polímero em glicose, assim como as interações entre glutamina e acetato de sódio (p= 0,00126), glutamina e niacina e glutamina (p= 0,003356) e iodoacetato (p= 0,024672) porém todos com efeito negativo (Fig. 1-a). Em melaço, as variáveis acetato de sódio (p= 0,048647), niacina (p= 0,001423) e iodoacetato (p= 0,000516) apresentaram efeito negativo significativo sobre a produção de ácido hialurônico.

Trabalhos têm demonstrado a necessidade de suplementação do meio de cultivo com vitaminas para a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus* [43–46]. A niacina (vitamina B3) é precursora das coenzimas NAD⁺ e NADP⁺ e já foi descrita como suplemento integrante do meio quimicamente definido (CDM) para microrganismos do grupo A de estreptococos em suas formas amidas [47]. Neste trabalho, porém, a niacina não apresentou efeito positivo sobre a produção de ácido hialurônico.

Tabela 1. Produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* em glicose e melão de cana-de-açúcar em frascos de Erlenmeyer a 37 °C, 100 rpm, 24 h, pH inicial 8,0 (Box Hunter x Hunter 2⁽⁵⁻¹⁾).

Ensaio	Variáveis Codificadas					Variável Resposta	
	x1	x2	x3	x4	x5	Ácido Hialurônico (Y)	
						Glicose	Melão
1	-1	-1	-1	-1	1	0,312	0,589
2	1	-1	-1	-1	-1	0,326	0,639
3	-1	1	-1	-1	-1	0,469	0,708
4	1	1	-1	-1	1	0,220	0,480
5	-1	-1	1	-1	-1	0,338	0,568
6	1	-1	1	-1	1	0,286	0,494
7	-1	1	1	-1	1	0,315	0,473
8	1	1	1	-1	-1	0,312	0,518
9	-1	-1	-1	1	-1	0,298	0,675
10	1	-1	-1	1	1	0,240	0,558
11	-1	1	-1	1	1	0,329	0,563
12	1	1	-1	1	-1	0,344	0,690
13	-1	-1	1	1	1	0,313	0,510
14	1	-1	1	1	-1	0,312	0,546
15	-1	1	1	1	-1	0,361	0,620
16	1	1	1	1	1	0,164	0,365
17	0	0	0	0	0	0,345	0,647
18	0	0	0	0	0	0,325	0,654
19	0	0	0	0	0	0,299	0,640
Fatores (g.L ⁻¹)	Níveis						
	-1	0	1				
Acetato de Sódio (X1)	0	10	20				
Glutamina (X2)	0	2	4				
Niacina (X3)	0	2	4				
Ácido oxálico (X4)	0	0,2	0,4				
Iodoacetato (X5)	0	0,005	0,010				

Durante a produção de ácido hialurônico, a ação de espécies reativas de oxigênio (ERO) podem despolimerizar sua cadeia, diminuindo seu tamanho e, conseqüentemente, sua massa molecular, parâmetro de extrema importância ao considerar as diferentes aplicações do polímero. Uma vez que o ácido oxálico pode agir como composto antioxidante [48], foi testado sua adição ao meio de cultivo. No entanto, o composto não apresentou efeito no meio de melão e exibiu efeito negativo em glicose sobre a produção do polímero.

Tanto em glicose quanto em melão, a glutamina apresentou efeito positivo, embora não significativo (Fig. 1), o que se deve ao fato de ser o aminoácido doador do grupamento amino para a formação de UDP-N-acetilglicosamina [1], precursor limitante na produção [48].

Figura 1

Pela análise de variância do planejamento em melaço, o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,84852, explicando 84,85 % da variabilidade da resposta. O modelo linear ajustado previu a produção de $0,712 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido hialurônico em 4 g.L^{-1} de glutamina, e a observada foi, em média, $0,723 \text{ g.L}^{-1}$ garantindo a validação do mesmo ($p = 0,302453$).

O controle do pH nos cultivos em frascos de Erlenmeyer é dificultado, e, portanto, a adição de compostos tamponantes pode ser vantajosa para a produção do composto de interesse. A síntese de ácido hialurônico é inibida em pH ácido [49], porém a fermentação microbiana pode produzir ácido lático e acético, o que diminui o pH dos cultivos. O acetato de sódio pode reagir com o ácido acético produzido, formando um tampão e, assim, a adição deste composto ao meio de cultivo pode favorecer a produção de ácido hialurônico por manter o pH dos cultivos mais próximos ao ótimo da enzima hialuronan-sintase (7,1) [50]. Nas fermentações realizadas, o pH inicial foi 8,0, conforme otimizado por nosso grupo de trabalho [51]. Os valores de pH após 24 h de cultivo variaram de 4,85 a 6,40 em glicose e de 4,85 a 6,63 em melaço mostrando houve declínio do pH provocado pelo excesso de lactato e acetato. Pela análise de variância, acetato de sódio, glutamina e iodoacetato apresentaram efeitos significativos ($p < 0,04$) e positivos sobre o pH nos cultivos de glicose e em melaço apenas iodoacetato exibiu o mesmo efeito ($p = 0,000228$).

Os microrganismos do gênero *Streptococcus* fazem parte das bactérias ácido lácticas, convertendo a maior parte da glicose em lactato via glicólise e, portanto, a diminuição na produção deste ácido é um indicador da diminuição da via glicolítica [48]. Como inibidor da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, o iodoacetato diminuiu o fluxo de carbono da via glicolítica, o que pode ter prejudicado a formação de biomassa (ensaios 16, 4 e 10).

O iodoacetato apresentou efeito significativo sobre a produção de ácidos orgânicos. Além de inibir parcialmente a via glicolítica, este composto também pode exercer ação inibitória sobre a lactato desidrogenase [52], o que pode ter favorecido o redirecionamento do piruvato para a produção de etanol ($0,273 \text{ g.L}^{-1}$, ensaio 1 em glicose), em detrimento de lactato (Tabela 2). Na presença de iodoacetato pode ocorrer produção de ácido hialurônico com maior massa molecular [48], ocasionando

maior aglomeração e, portanto, criação de zonas anóxicas nas quais pode se favorecer a fermentação alcoólica [43]. Em melação não foi detectada produção de etanol.

Tabela 2. Produção de ácidos orgânicos por *S. zooepidemicus* em glicose e melação de cana-de-açúcar em frascos de Erlenmeyer a 37 °C, 100 rpm, 24 h, pH inicial 8,0 (Box Hunter x Hunter 2⁽⁵⁻¹⁾).

Ensaio	Glicose		Melaço	
	Acetato (g.L ⁻¹)	Lactato (g.L ⁻¹)	Acetato (g.L ⁻¹)	Lactato (g.L ⁻¹)
1	1,046	4,197	1,130	1,968
2	0,743	2,479	10,147	11,583
3	0,779	5,750	0,933	7,477
4	9,561	1,705	9,156	2,014
5	0,524	5,714	1,538	8,641
6	9,874	3,434	8,862	5,059
7	0,543	2,341	0,815	2,106
8	9,213	6,242	8,282	12,235
9	0,479	5,088	0,565	7,629
10	13,159	2,719	9,724	2,358
11	0,547	1,975	0,828	2,210
12	9,632	5,916	9,172	12,420
13	0,437	4,963	1,025	2,298
14	9,287	6,847	9,719	13,082
15	0,326	4,586	0,990	7,794
16	9,114	1,839	9,410	2,655
17	4,560	3,319	4,432	5,517
18	4,355	2,853	4,350	5,355
19	4,018	3,389	4,308	5,561

Ácido acético foi produzido em grandes quantidades na presença de acetato de sódio (X1) (ensaio 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16) em glicose e melação. A variável a que exibiu o maior efeito sobre a produção do mesmo. Nos cultivos em melação, acetato de sódio também exerceu efeito positivo significativo ($p= 0,000368$) sobre a produção de ácido láctico, porém, este último foi afetado negativamente por iodoacetato ($p= 0,00002$), o que pode ser resultado da ação inibitória do composto sobre a enzima lactato desidrogenase.

3.3. Produção de Ácido Hialurônico Variando a Concentração de Glutamina

A glutamina destacou-se pelo efeito positivo na produção de ácido hialurônico em melação de cana-de-açúcar e, assim, esta fonte foi selecionada para

as fermentações posteriores, variando as concentrações do aminoácido de 0 a 12 g.L⁻¹. O aumento da concentração de glutamina de 0 a 12 g.L⁻¹ elevou a produção do polímero de 0,716 ± 0,025 para 0,843 ± 0,012 g.L⁻¹.

A concentração de glutamina foi significativa sobre o crescimento microbiano ($p = 0,021$), que foi maior em 8, 10 e 12 g.L⁻¹ quando comparado ao crescimento em 0 e 4 g.L⁻¹ de glutamina. O consumo de açúcar não diferiu estatisticamente entre os tratamentos ($p > 0,1$). O pH dos cultivos foi semelhante, variando de 4,87 a 4,91, o que pode ser um resultado da produção de lactato e acetato, que não foram diferentes entre os cultivos ($p = 0,187$ e 0,052, respectivamente).

A produção de ácido hialurônico apresentou diferenças estatísticas dependentes da concentração de glutamina ($p = 4 \times 10^{-7}$) (Fig. 2), possivelmente devido à uma maior produção de UDP-N-acetilglicosamina a partir de glutamina e frutose-6-P [1], precursor limitante para a produção de ácido hialurônico. A maior produção do polímero observada foi estatisticamente semelhante à produção obtida em 8 g.L⁻¹ de glutamina (0,826 g.L⁻¹ ± 0,014) ($p = 0,245$). Assim, esta concentração foi selecionada para a produção de ácido hialurônico em biorreator.

Figura 2

3.4. Produção de ácido hialurônico em biorreator: efeito da agitação

A produção de ácido hialurônico foi testada em biorreator de 4,5 L, com melaço de cana-de-açúcar clarificado (30,0 g.L⁻¹ de açúcares totais) e acrescido de glutamina a 8,0 g.L⁻¹. Armstrong e Johns [44] demonstraram que a agitação no intervalo de 300 a 1000 rpm não apresentou efeito sobre a massa molar e polidispersidade do ácido hialurônico. Amado et. al [32] verificaram que em condições controladas de pH e aeração, a produção do polímero ficou dependente da velocidade de agitação. Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foi verificado que o pH 8,0 foi ótimo em fermentações em frascos de Erlenmeyer [51] e que o controle do pH aumentou a produção de ácido hialurônico em 2,86 vezes em biorreator [34]. No presente estudo, foi testado o pH 8,0, aeração de 0,5 vvm, velocidade de agitação de 100 e 300 rpm em biorreator de bancada.

A produção de ácido hialurônico aumentou cerca de 3 vezes em biorreator comparado ao Erlenmeyer. Embora a velocidade de agitação tenha afetado o crescimento microbiano, a produção de ácido hialurônico em 100 e 300 rpm foi semelhante (Fig. 3). Em 100 rpm, a taxa de crescimento específico foi equivalente a $0,171 \text{ h}^{-1}$ com produção máxima de $2,55 \text{ g.L}^{-1}$ de polímero em 24 h. Com 300 rpm, a taxa de crescimento específico foi de $0,225 \text{ h}^{-1}$ e a produção de ácido hialurônico alcançou $2,43 \text{ g.L}^{-1}$ em 24 h. As produtividades volumétrica e específica de ácido hialurônico foram equivalentes a $0,106 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,0039 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (grama de produto por grama de substrato consumido por hora) e $0,101 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,0036 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 100 e 300 rpm, respectivamente.

Figura 3

As produções de lactato e acetato foram significativamente maiores em biorreator ($p < 0,002$). A concentração de lactato produzido em 24 h chegou a $24,6 \text{ g.L}^{-1}$ em 100 rpm e a $16,8 \text{ g.L}^{-1}$ em 300 rpm, sendo 3 e 2 vezes maior que em frascos, respectivamente (Figura 3-a e -b). As produções de acetato em ambas velocidades de agitação em reator foram semelhantes, alcançando $5,72$ e $5,27 \text{ g.L}^{-1}$ em 100 e 300 rpm, respectivamente, sendo 5 vezes maiores que a produção em menor escala. Acompanhando a produção de lactato, o consumo de açúcares em biorreator a 100 rpm foi 3 vezes maior que em frascos, alcançando $27,24 \text{ g.L}^{-1}$ em 24 h. O consumo de açúcar em 300 rpm em 24 h foi de $28,187 \text{ g.L}^{-1}$. A maior transferência de massa em agitação mais elevada pode ter favorecido o crescimento microbiano, em detrimento da produção de lactato, porém não exerceu efeito sobre a produção de ácido hialurônico.

3.5. Caracterização do Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico produzido em biorreator com 100 e 300 rpm de velocidade de agitação foram submetidos, juntamente a um padrão de hialuronato de sódio, à varredura no UV-Vis e análises por FT-IR. O espectro de absorção no UV-Vis mostrou similaridade no perfil de absorbância com o padrão, nas duas condições (Fig. 4).

Figura 4

A comparação dos espectros de FT-IR confirmou a presença de grupos funcionais característicos do ácido hialurônico, sendo o polímero produzido similar ao padrão de hialuronato (Fig. 5). O pico acentuado na região de $\approx 3440 \text{ cm}^{-1}$ está relacionada com a presença de ligações H-O e às vibrações de estiramento em N-H da cadeia lateral N-acetil [53]. As bandas em ≈ 1650 e 1617 cm^{-1} indicam alongamento da ligação C=O, correspondendo aos grupos amida e ácido, respectivamente. O pico a 2929 cm^{-1} está de acordo com o alongamento de C-H responsável pelo ácido glicurônico, enquanto o pico a 1029 cm^{-1} foi observado para o estiramento de C-O de álcool primário. Também foi possível correlacionar o grupo NH em 1560 e 1320 cm^{-1} às amidas II e III, o grupo C-O em 1410 cm^{-1} , o C-O a 1411 cm^{-1} (ácido), grupo CO-C a 1150 cm^{-1} (ponte de O), C-O (exocíclico) e os grupos C-C a 1079 e C-OH a 1042 cm^{-1} as bandas correspondentes observadas no padrão [54].

Figura 5

3.6. Atividade Antioxidante

A produção de radicais livres é conhecida por causar danos nos tecidos, podendo resultar na perda de função e, para fornecer proteção contra os danos oxidativos, sistemas antioxidante e de reparação foram selecionados pela evolução ao longo dos anos em muitos organismos. No entanto, tais sistemas não são suficientes para a completa prevenção dos danos e, desta maneira, muita atenção tem sido voltada a compostos antioxidantes [26]. Vários relatos têm mostrado que o ácido hialurônico tem propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo* [23–26].

O ácido hialurônico produzido foi comparado ao padrão de hialuronato de sódio e a uma referência de ácido ascórbico, para verificar a capacidade de redução do radical DPPH. Na Figura 6, observa-se que o polímero produzido em biorreator em 100 e 300 rpm não diferiu quanto a atividade antioxidante, porém, em relação ao padrão de hialuronato e ao ácido ascórbico, ambos apresentaram menor porcentagem de inibição dos radicais. A atividade máxima observada para o ácido hialurônico produzido foi 38,4 % (1 g.L^{-1} do polímero produzido em 100 rpm) e

correspondeu a cerca de 58 % da atividade do padrão na mesma concentração, o que pode ter ocorrido pela eficiência da técnica de purificação (70 - 80 %) e/ou pela diferença na massa molecular do ácido hialurônico produzido e padrão, como já relatado por ElSafory e Lee [24] e Kim et al. [23].

Figura 6

3.7. Atividade Antimicrobiana

Nas concentrações testadas, não foi possível determinar a concentração mínima inibitória do polímero produzido e do comercial. Os resultados obtidos são diferentes do descrito por Ardizzoni et. al. [18], que obtiveram atividade quando comparada ao controle positivo, utilizando inóculo de 5×10^3 UFC e tempo de exposição de até 72 h, diferentemente do preconizado pelo CLSI [35].

Até o valor testado de 40 g.L^{-1} não foi possível determinar o MIC e o uso do polímero em altas concentrações, torna-se um problema por não ser viável economicamente e, principalmente, pela possibilidade de efeito citotóxico. Como descrito por Cermelli et al. [20] ácido hialurônico a 4 g.L^{-1} apresentou 20 % de citotoxicidade em linhagens celulares epiteliais, e um aumento de 10 x da concentração do polímero, pode resultar em um aumento significativo em seu efeito tóxico sobre as células.

O teste de difusão em ágar também demonstrou a falta de atividade antimicrobiana do ácido hialurônico, não sendo observados halos em nenhuma das concentrações testadas (8,0; 4,0; 2,0; 0,5 g.L^{-1}). Concentrações mais altas, sendo mais viscosas, não difundiriam sobre o ágar.

Costagliola et. al. [21] testaram a ação do ácido hialurônico sobre cepas de *Streptococcus* e *Staphylococcus* e estas foram capazes de aumentar o crescimento em até 50 %, quando o meio foi suplementado com $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ de hialuronato de sódio. Os autores relacionaram o crescimento probiótico ao fato de bactérias Gram-positivas produzirem hialuronidases o que possibilitaria a degradação do polímero, liberando açúcares menores que puderam ser utilizados como nutrientes. No entanto, para Ardizzoni et. al [18] algumas que cepas de *Staphylococcus aureus* e em *Streptococcus epidermidis* e *S. mutans* tiveram crescimento significativamente menor com o aumento da concentração do polímero.

Os dados de Drago et al. [55] foram semelhantes ao obtido no presente trabalho, onde o ácido hialurônico não apresentou efeito significativo sobre o crescimento de cepas Gram-positivas e negativas. Os autores também verificaram que o polímero impediu a adesão de bactérias formadoras de biofilme ao substrato celular de forma dose-dependente.

O presente trabalho demonstrou que o ácido hialurônico produzido em melaço não apresentou atividade antimicrobiana e Di Cerbo et al. [19] demonstraram que o polímero, pode ser utilizado no crescimento probiótico de determinadas cepas. Desta maneira, se o objetivo de uso do polímero em formulações estiver visando a ação antimicrobiana, além da antioxidante, o ácido hialurônico deve estar acoplado a um agente com essa atividade, como nisina [14], cefoxitina [11], quitosana [12,13] ou nanopartículas de prata [16,17].

4. Conclusão

A produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* foi maior em melaço de cana-de-açúcar do que em glicose. A glutamina adicionada ao meio apresentou efeito positivo sobre a produção. A fermentação em biorreator (melaço 30,0 g.L⁻¹ de açúcares totais e 8 g.L⁻¹ de glutamina) aumentou a produção em 3 vezes (2,55 g.L⁻¹) e a agitação não apresentou influência. O ácido hialurônico produzido em melaço de cana-de-açúcar apresentou 40 % de atividade antioxidante em 1,0 g.L⁻¹ e não apresentou atividade antimicrobiana nas condições testadas. Por ser o primeiro estudo que avaliou a atividade antimicrobiana em melaço, existe necessidade de estudos complementares.

REFERÊNCIAS

- [1] B.F. Chong, L.M. Blank, R. Mclaughlin, L.K. Nielsen, Microbial hyaluronic acid production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66 (2005) 341–351. doi:10.1007/s00253-004-1774-4.
- [2] Z. Su, H. Ma, Z. Wu, H. Zeng, Z. Li, Y. Wang, G. Liu, B. Xu, Y. Lin, P. Zhang, X. Wei, Enhancement of skin wound healing with decellularized scaffolds loaded with hyaluronic acid and epidermal growth factor, *Mater. Sci. Eng. C.* 44 (2014) 440–448. doi:10.1016/j.msec.2014.07.039.
- [3] C. Tolg, J.B. McCarthy, A. Yazdani, E.A. Turley, Hyaluronan and RHAMM in wound repair and the “cancerization” of stromal tissues., *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 103923. doi:10.1155/2014/103923.

- [4] C. Tolg, P. Telmer, E. Turley, Specific Sizes of Hyaluronan Oligosaccharides Stimulate Fibroblast Migration and Excisional Wound Repair, *PLoS One*. 9 (2014) e88479. doi:10.1371/journal.pone.0088479.
- [5] J.-Y. Zhao, J.-K. Chai, H.-F. Song, J. Zhang, M.-H. Xu, Y.-D. Liang, Influence of hyaluronic acid on wound healing using composite porcine acellular dermal matrix grafts and autologous skin in rabbits, *Int. Wound J.* 10 (2013) 562–572. doi:10.1111/j.1742-481X.2012.01023.x.
- [6] E.E. Friedrich, L.T. Sun, S. Natesan, D.O. Zamora, R.J. Christy, N.R. Washburn, Effects of hyaluronic acid conjugation on anti-TNF- α inhibition of inflammation in burns, *J. Biomed. Mater. Res. A*. 102A (2014) 1527–36. doi:10.1002/jbm.a.34829.
- [7] F.T. a Kretz, I.-J. Limberger, G.U. Auffarth, Corneal endothelial cell coating during phacoemulsification using a new dispersive hyaluronic acid ophthalmic viscosurgical device., *J. Cataract Refract. Surg.* 40 (2014) 1879–1884. doi:10.1016/j.jcrs.2014.04.025.
- [8] T. Hoare, Y. Yeo, E. Bellas, J.P. Bruggeman, D.S. Kohane, Prevention of Peritoneal Adhesions Using Polymeric Rheological Blends, *Acta Biomater.* 10 (2014) 1197–1193. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
- [9] F. Laffleur, S. Dachs, Development of novel mucoadhesive hyaluronic acid derivated as lubricant for the treatment of dry eye syndrome, *Ther. Deliv.* 6 (2015) 1211–1219.
- [10] C.-P. Chen, W. Hung, S.-H. Lin, Effectiveness of hyaluronic acid for treating diabetic foot: a systematic review and meta-analysis, *Dermatol. Ther.* 27 (2014) 331–336. doi:10.1111/dth.12153.
- [11] J.J. Ahire, L.M.T. Dicks, Antimicrobial Hyaluronic Acid–Cefoxitin Sodium Thin Films Produced by Electro spraying, *Curr. Microbiol.* 73 (2016) 236–241. doi:10.1007/s00284-016-1057-1.
- [12] J. Hernández-Montelongo, V.F. Nascimento, D. Murillo, T.B. Taketa, P. Sahoo, A.A. de Souza, M.M. Beppu, M.A. Cotta, Nanofilms of hyaluronan/chitosan assembled layer-by-layer: An antibacterial surface for *Xylella fastidiosa*, *Carbohydr. Polym.* 136 (2016) 1–11. doi:10.1016/j.carbpol.2015.08.076.
- [13] S. del Hoyo-Gallego, L. Pérez-Álvarez, F. Gómez-Galván, E. Lizundia, I. Kuritka, V. Sedlarik, J.M. Laza, J.L. Vila-Vilela, Construction of antibacterial poly(ethylene terephthalate) films via layer by layer assembly of chitosan and hyaluronic acid, *Carbohydr. Polym.* 143 (2016) 35–43. doi:10.1016/j.carbpol.2016.02.008.
- [14] I. Lequeux, E. Ducasse, T. Jouenne, P. Thebault, Addition of antimicrobial properties to hyaluronic acid by grafting of antimicrobial peptide, *Eur. Polym. J.* 51 (2014) 182–190. doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.11.012.
- [15] J. Zhan, L. Wang, S. Liu, J. Chen, L. Ren, Y. Wang, Antimicrobial Hyaluronic Acid/Poly(amidoamine) Dendrimer Multilayer on Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) Prepared by a Layer-by-Layer Self-Assembly Method, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 7 (2015) 13876–13881. doi:10.1021/acsami.5b02262.
- [16] A.M. Abdel-Mohsen, R. Hrdina, L. Burgert, R.M. Abdel-Rahman, M. Hašová, D. Šmejkalová, M. Kolář, M. Pekar, A.S. Aly, Antibacterial activity and cell viability of hyaluronan fiber with silver nanoparticles, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 1177–1187. doi:10.1016/j.carbpol.2012.08.098.
- [17] M.M. Kemp, A. Kumar, D. Clement, P. Ajayan, S. Mousa, R.J. Linhardt, Hyaluronan- and heparin-reduced silver nanoparticles with antimicrobial properties, *Nanomedicine*. 4 (2009) 421–429. doi:10.2217/nnm.09.24.

- [18] A. Ardizzoni, R.G. Neglia, M.C. Baschieri, C. Cermelli, M. Caratozzolo, E. Righi, B. Palmieri, E. Blasi, Influence of hyaluronic acid on bacterial and fungal species, including clinically relevant opportunistic pathogens, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (2011) 2329–38. doi:10.1007/s10856-011-4408-2.
- [19] A. Di Cerbo, M. Aponte, R. Esposito, M. Bondi, B. Palmieri, Comparison of the effects of hyaluronidase and hyaluronic acid on probiotics growth, *BMC Microbiol.* 13 (2013) 243. doi:10.1186/1471-2180-13-243.
- [20] C. Cermelli, A. Cuoghi, M. Scuri, C. Bettua, R.G. Neglia, A. Ardizzoni, E. Blasi, T. Iannitti, B. Palmieri, In vitro evaluation of antiviral and virucidal activity of a high molecular weight hyaluronic acid., *Viol. J.* 8 (2011) 141. doi:10.1186/1743-422X-8-141.
- [21] C. Costagliola, A. Del Prete, N.R. Winkler, P. Carpineto, M. Ciancaglini, R. Piccolomini, L. Mastropasqua, The ability of bacteria to use Nahyaluronate as a nutrient, *Acta Ophthalmol. Scand.* (1996) 566–568.
- [22] P. Pirnazar, L. Wolinsky, S. Nachnani, S. Haake, A. Pilloni, G.W. Bernard, Bacteriostatic Effects of Hyaluronic Acid, *J Periodontol.* 70 (1999) 370–374.
- [23] J.K. Kim, P. Srinivasan, J.H. Kim, J. Choi, H.J. Park, M.W. Byun, J.W. Lee, Structural and antioxidant properties of gamma irradiated hyaluronic acid, *Food Chem.* 109 (2008) 763–770. doi:10.1016/j.foodchem.2008.01.038.
- [24] N.S. El-Safory, C.K. Lee, Cytotoxic and antioxidant effects of unsaturated hyaluronic acid oligomers, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 1116–1123. doi:10.1016/j.carbpol.2010.06.042.
- [25] G.M. Campo, A. Avenoso, S. Campo, A. D’Ascola, A.M. Ferlazzo, A. Calatroni, The antioxidant and antifibrogenic effects of the glycosaminoglycans hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in a subchronic rat model of carbon tetrachloride-induced liver fibrogenesis, *Chem. Biol. Interact.* 148 (2004) 125–38. doi:10.1016/j.cbi.2004.05.004.
- [26] C. Ke, L. Sun, D. Qiao, D. Wang, X. Zeng, Antioxidant activity of low molecular weight hyaluronic acid, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 2670–2675. doi:10.1016/j.fct.2011.07.020.
- [27] J. a Vázquez, M.I. Montemayor, J. Fraguas, M. a Murado, Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera, *Microb. Cell Fact.* 9 (2010) 46. doi:10.1186/1475-2859-9-46.
- [28] L. Liu, Y. Liu, J. Li, G. Du, J. Chen, Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives., *Microb. Cell Fact.* 10 (2011) 99. doi:10.1186/1475-2859-10-99.
- [29] I.R. Amado, J.A. Vázquez, L. Pastrana, J.A. Teixeira, Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*, *Food Chem.* (2015). doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.062.
- [30] N. Mohan, R. Balakrishnan, S. Sivaprakasam, Optimization and effect of dairy industrial waste as media components in the production of hyaluronic acid by *Streptococcus thermophilus*, *Prep. Biochem. Biotechnol.* (2015). doi:10.1080/10826068.2015.1128446.
- [31] a. M. Pires, A.C. Macedo, S.Y. Eguchi, M.H. Santana, Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 6506–6509. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.074.
- [32] I.R. Amado, J.A. Vázquez, L. Pastrana, J.A. Teixeira, Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: Molasses and corn steep liquor, *Biochem. Eng. J.* 117 (2017) 181–187. doi:10.1016/j.bej.2016.09.017.

- [33] N. Pan, R. Marques, H. Pereira, J. Vignoli, M. Celligoi, Effects of different nitrogen sources on the production of Hyaluronic acid by *Streptococcus*, BMC Proc. 8 (2014) P204. doi:10.1186/1753-6561-8-S4-P204.
- [34] N.C. Pan, M. de L.C. Pereira, Hanny Cristina Braga Silva, A.F.D. Vasconcelos, M.A.P.C. Celligoi, Improvement production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* in sugarcane molasses, Appl. Biochem. Biotechnol. (2017). doi:10.1007/s12010-016-2326-y.
- [35] F.R. Cockerill, M.A. Wilker, J. Alder, M.N. Dudley, G.M., Eliopoulos, M.J. Ferraro, D.J. Hardy, D.W. Hecht, J.A. Hindler, J.B. Patel, M. Power, J.M. Swenson, R.B. Thomson, M.M. Traczewski, J.D. Turnidge, M.P. Weinstein, B.L. Zimmer, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standart. Clinical and Laboratory Standarts Institute. 32 (2012) 1-63.
- [36] M.A. Somogyi, A new reagent for determination of sugar, J. Biol. Chem. 160 (1945) 61–68.
- [37] N.A. Nelson, A fotometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose, J. Biol. Chem. 153 (1944) 375–380.
- [38] M. DuBois, K. a. Gilles, J.K. Hamilton, P. a. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Anal. Chem. 28 (1956) 350–356. doi:10.1021/ac60111a017.
- [39] K.J. Reddy, K.T. Karunakaran, Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*, J. BioSci. Biotech. 2 (2013) 173–179.
- [40] S.-B. Choi, L.-C. Lew, K.-C. Hor, M.-T. Liong, Fe²⁺ and Cu²⁺ Increase the Production of Hyaluronic Acid by *Lactobacilli* via Affecting Different Stages of the Pentose Phosphate Pathway, Appl. Biochem. Biotechnol. 173 (2014) 129–142. doi:10.1007/s12010-014-0822-5.
- [41] A.M.B. Pires, S.Y. Eguchi, M.H.A. Santana, The influence of mineral ions on the microbial production and molecular weight of hyaluronic acid, Appl. Biochem. Biotechnol. 162 (2010) 2125–2135. doi:10.1007/s12010-010-8987-z.
- [42] V.L. Tlapak-Simmons, C.A. Baron, P.H. Weigel, Characterization of the purified hyaluronan synthase from *Streptococcus equisimilis**, Biochemistry. 43 (2004) 9234–9242. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate.
- [43] B.F. Chong, L.K. Nielsen, Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase, Biochem. Eng. J. 16 (2003) 153–162. doi:10.1016/S1369-703X(03)00031-7.
- [44] D.C. Armstrong, M.R. Johns, Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*, Appl. Environ. Microbiol. 63 (1997) 2759–2764.
- [45] N.C. Pan, J.A. Vignoli, C. Baldo, M.A. Pedrine Colabone Celligoi, Ácido Hialurônico: Características, Produção Microbiana e Aplicações Industriais, BBR - Biochem. Biotechnol. Reports. 2 (2013) 42–58. doi:10.5433/2316-5200.2013v2n4p42.
- [46] C. Schiraldi, A. La Gatta, M. De Rosa, Biotechnological Production and Application of Hyaluronan, Biopolymers. (2010) 387–412. doi:978-953-307-109-1.
- [47] J.-H. Kim, S.-J. Yoo, D.-K. Oh, Y.-G. Kweon, D.-W. Park, C.-H. Lee, G.-H. Gil, Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid, Enzyme Microb. Technol. 19 (1996) 440–445. doi:10.1016/S0141-0229(96)00019-1.

- [48] M. V. Shah, S.S. Badle, K.B. Ramachandran, Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway, *Biochem. Eng. J.* 80 (2013) 53–60. doi:10.1016/j.bej.2013.09.013.
- [49] S. Jagannath, K.B. Ramachandran, Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*, *Biochem. Eng. J.* 48 (2010) 148–158. doi:10.1016/j.bej.2009.09.003.
- [50] V.J. Aroskar, S.D. Kamat, D. V Kamat, Effect of Various Nutritional Supplements on Hyaluronic Acid Production, *Inst. Integr. Omi. Appl. Biotechnol. Lett.* 2 (2012) 16–24. doi:10.5195/iioablett.2012.18.
- [51] N.C. Pan, J.A. Vignoli, C. Baldo, H.C.B. Pereira, R.S. dos S.F. Silva, M.A.P.C. Celligoi, Effect of fermentation conditions on the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, *Acta Sci. Biol. Sci.* 37 (2015) 411–417. doi:10.4025/actascibiolsoci.v37i4.28176.
- [52] B. Poolman, B. Bosman, J. Kiers, W.N. Konings, Control of glycolysis by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis*, *J. Bacteriol.* 169 (1987) 5887–5890.
- [53] S. Kanchana, M. Arumugam, S. Giji, T. Balasubramanian, Isolation, characterization and antioxidant activity of hyaluronic acid from marine bivalve mollusc *Amusium pleuronectus* (Linnaeus, 1758), *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre.* 2 (2013) 1–7. doi:10.1016/j.bcdf.2013.06.001.
- [54] J. Choi, J.-K. Kim, J.-H. Kim, D.-K. Kweon, J.-W. Lee, Degradation of hyaluronic acid powder by electron beam irradiation, gamma ray irradiation, microwave irradiation and thermal treatment: A comparative study, *Carbohydr. Polym.* 79 (2010) 1080–1085. doi:10.1016/j.carbpol.2009.10.041.
- [55] L. Drago, L. Cappelletti, E. Vecci, L. Pignataro, S. Torreta, R. Mattina, Antiadhesive and antibiofilm activity of hyaluronic acid against bacteria responsible for respiratory tract infections, *APMIS.* 122 (2014) 1013-1019.

Lista de Figuras

Figura 1. Perfis para valores preditos de produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* em glicose (a) e melação de cana-de-açúcar (b).

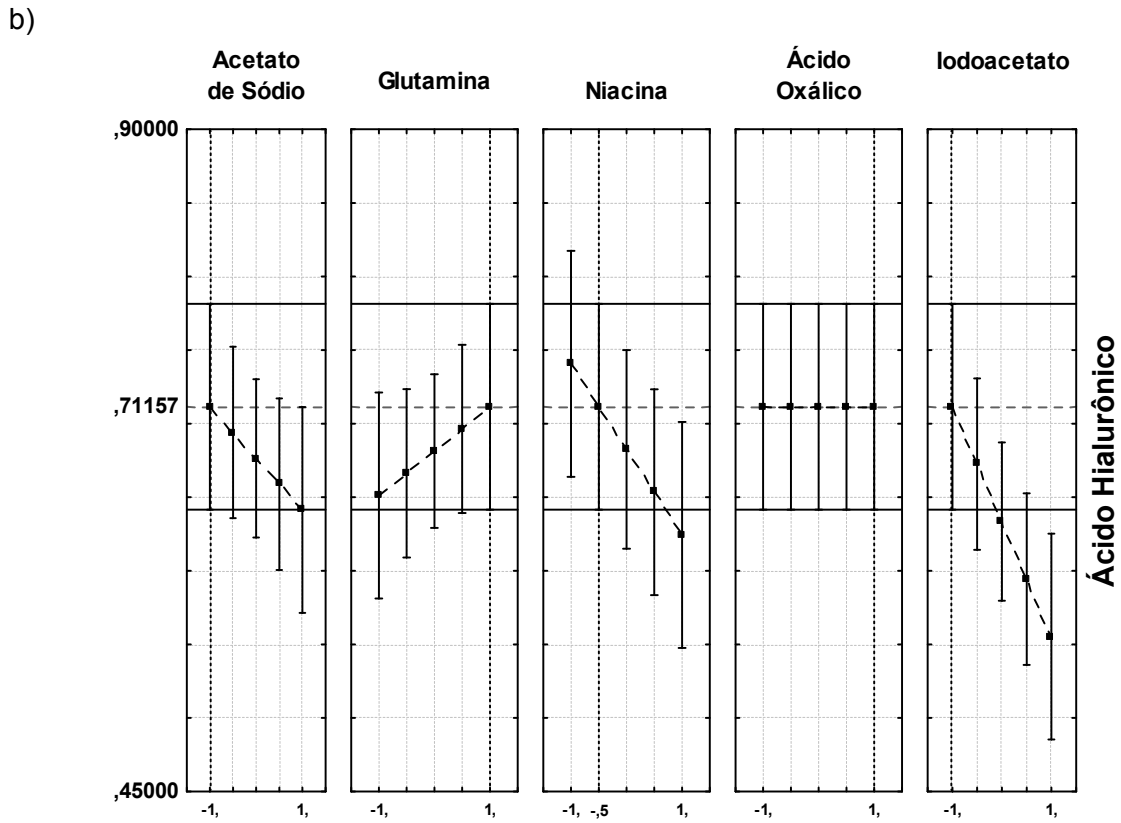
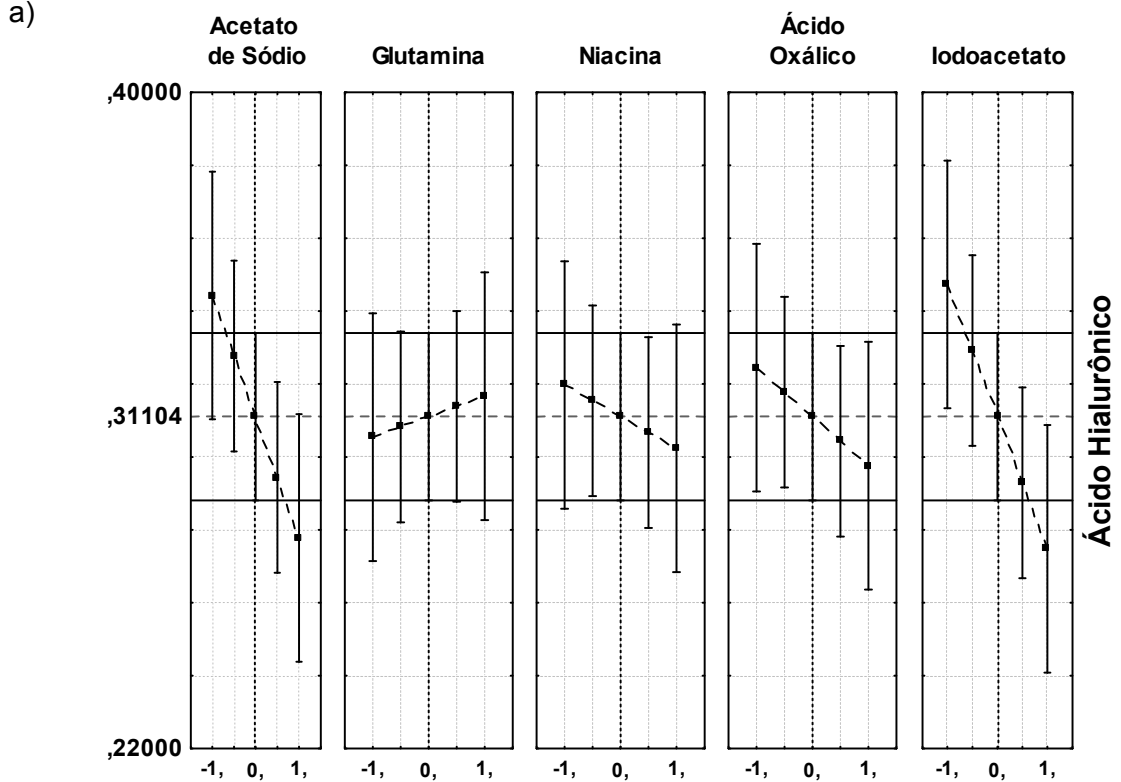


Figura 2. Diferenças entre a produção de ácido hialurônico por *S. zoepidemicus* de acordo com a concentração de glutamina em melão de cana-de-açúcar.

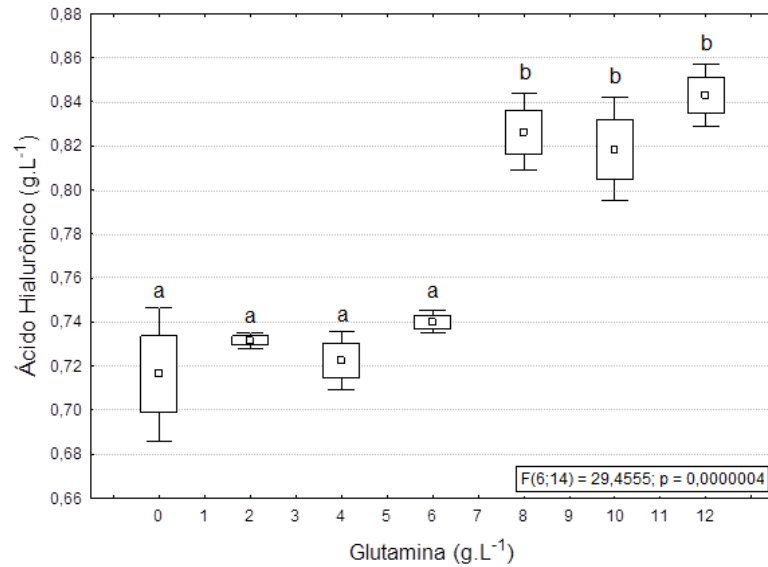
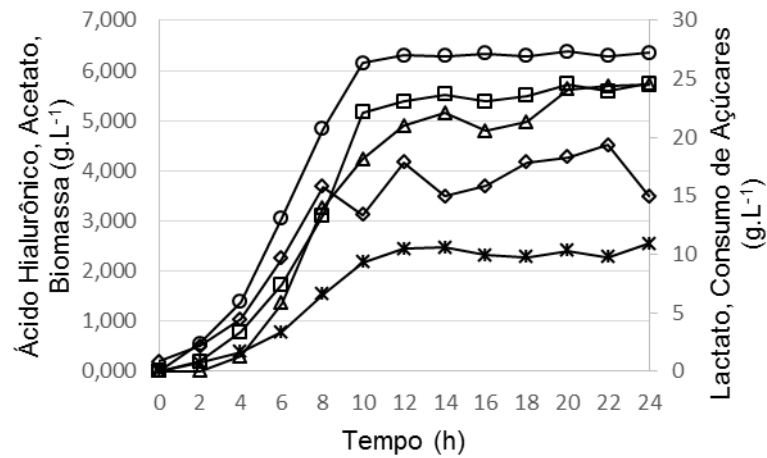


Figura 3. Produção de ácido hialurônico e orgânicos, crescimento microbiano e consumo de açúcar em agitação de 100 (a) e 300 rpm (b). ○ – Consumo de açúcares; □ – lactato produzido; △ - acetato; ◇ - biomassa; * - ácido hialurônico.

a)



b)

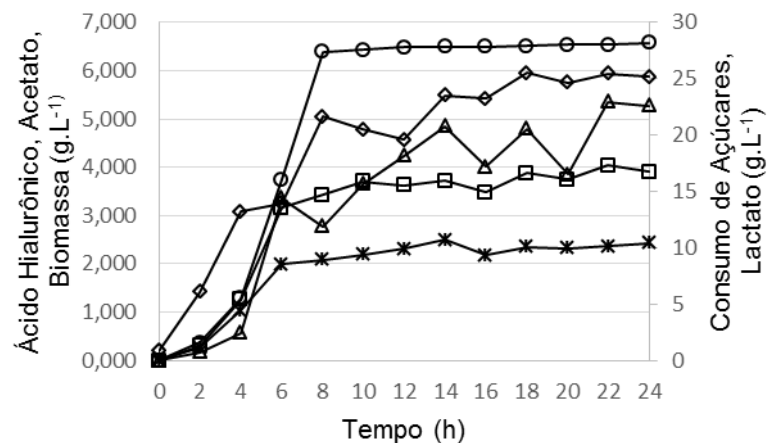


Figura 4. Espectro de absorção no UV-Vis do ácido hialurônico padrão e produzido por *S. zooepidemicus* em reator com agitação de 100 e 300 rpm.

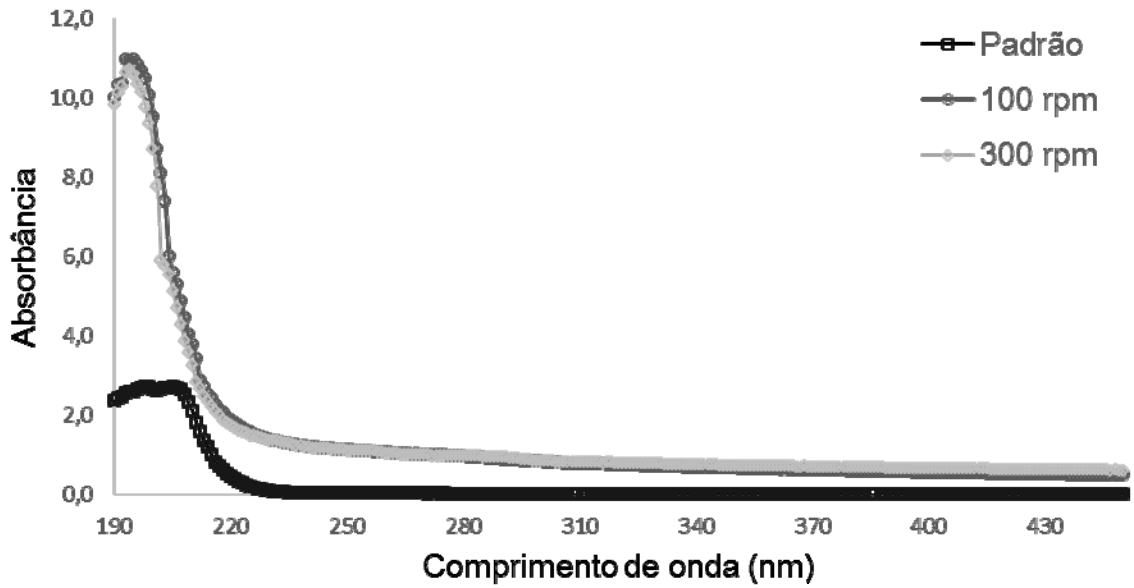


Figura 5. Espectro de FT-IR do ácido hialurônico padrão e produzido por *S. zooepidemicus* em reator com agitação de 100 e 300 rpm.

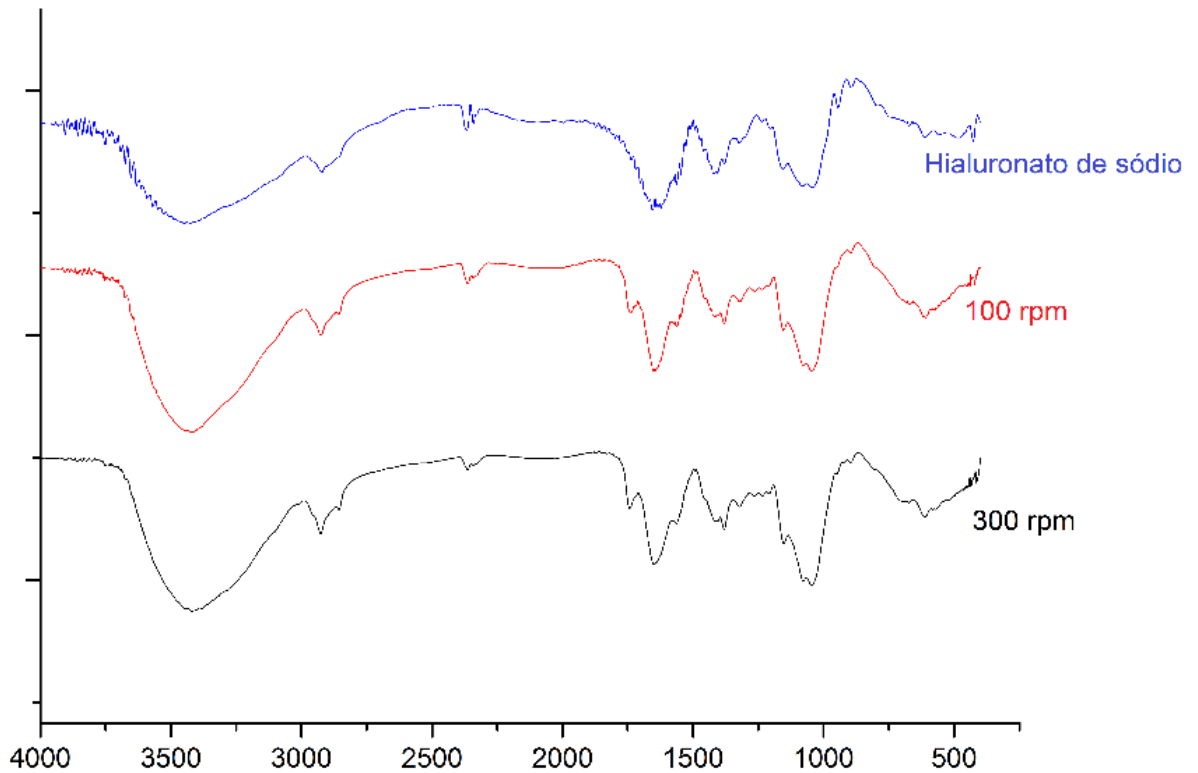
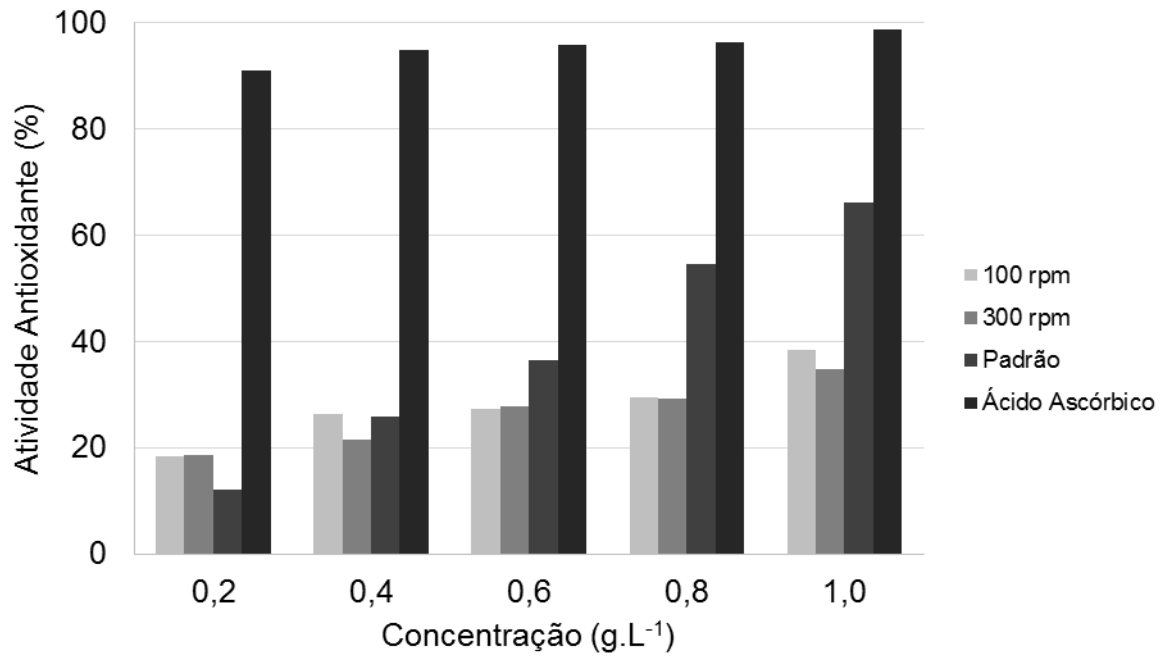


Figura 6. Atividade antioxidante (%) pela redução do radical DPPH do ácido hialurônico padrão, produzido por *S. zooepidemicus* em reator com agitação de 100 e 300 rpm e do ácido ascórbico.



6. CONCLUSÕES

- A produção de ácido hialurônico foi maior em melão de cana-de-açúcar, se comparada com a produção em glicose, independentemente do composto adicionado ao meio (acetato de sódio, glutamina, niacina, ácido oxálico, iodoacetato);
- O melão é uma fonte viável para a produção de ácido hialurônico e, por ser uma matéria-prima barata, pode reduzir os custos da produção do polímero, aumentando sua competitividade em relação ao obtido por extração animal;
- Embora o aumento da concentração de glutamina de 0 a 4 g.L⁻¹ não tenha sido significativo, a produção em 8 a 12 g.L⁻¹ do aminoácido foi significativamente maior, alcançando 0,843 g.L⁻¹ de ácido hialurônico, enfatizando o papel essencial da glutamina na via biossintética do polímero;
- A velocidade de agitação em biorreator não resultou em produção diferencial de ácido hialurônico, embora tenha sido, aproximadamente, 3 x maior do que a obtida em frascos Erlenmeyer em condições correspondentes;
- O polímero produzido apresentou atividade antioxidante, podendo ser utilizado para este fim em formulações;
- Apesar de reportado na literatura, não verificou-se atividade antimicrobiana do polímero produzido de acordo com a metodologia empregada, de forma que, para uso em formulações com a finalidade de ação antimicrobiana, o ácido hialurônico deve estar acoplado a alguma molécula conhecidamente antibiótica.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOHSEN, A. M. et al. Antibacterial activity and cell viability of hyaluronan fiber with silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1177–1187, fev. 2013.
- AHIRE, J. J.; DICKS, L. M. T. Antimicrobial Hyaluronic Acid–Cefoxitin Sodium Thin Films Produced by Electrospraying. **Current Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 236–241, 5 ago. 2016.
- AMADO, I. R. et al. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Food Chemistry**, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615302077>>.
- AMADO, I. R. et al. Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial byproducts: Molasses and corn steep liquor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 181–187, 2017.
- ARDIZZONI, A. et al. Influence of hyaluronic acid on bacterial and fungal species, including clinically relevant opportunistic pathogens. **Journal of materials science**, v. 22, n. 10, p. 2329–38, 2011.
- ARMSTRONG, D. C.; COONEY, M. J.; JOHNS, M. R. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 3, p. 309–312, 1997.
- ARMSTRONG, D. C.; JOHNS, M. R. 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.
- ARMSTRONG, D. C.; JOHNS, M. R. Improved Molecular Weight Analysis of Streptococcal Hyaluronic Acid by Size Exclusion Chromatography. **Biotechnology Techniques**, v. 9, n. 7, p. 491–496, 1995.
- AROSKAR, V. J.; KAMAT, S. D.; KAMAT, D. V. Effect of Various Physical Parameters and Statistical Medium Optimization on Production of Hyaluronic Acid Using *S. equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920. **Applied Biotechnology Letters**, v. 2, n. 1, 2012a.
- AROSKAR, V. J.; KAMAT, S. D.; KAMAT, D. V. Effect of Various Nutritional Supplements on Hyaluronic Acid Production. Institute of Integrative Omics and **Applied Biotechnology Letters**, v. 2, n. 1, p. 16–24, 2012b.
- BALAZS, E. A. Viscoelastic properties of hyaluronan and its therapeutic use. In: GARG, H. G.; HALES, C. A. **Chemistry and biology of hyaluronan**. 1. Ed. Oxford: Elsevier, p. 415-455, 2004.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. BRUNS, E. R. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Editora Unicamp, 1996.

- BENEDINI, L. J. **Influência de Peptonas Vegetais no Cultivo de Streptococcus zooepidemicus para a Produção de Ácido Hialurônico**. 2013. 86 f. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas, Campinas - São Paulo, 2013.
- BOERIU, C. G. et al. Production Methods for Hyaluronan. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2013, p. 1–14, 2013.
- CAMPO, G. M. et al. The antioxidant and antifibrogenic effects of the glycosaminoglycans hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in a subchronic rat model of carbon tetrachloride-induced liver fibrogenesis. **Chemico-biological interactions**, v. 148, n. 3, p. 125–38, 2004.
- CERMELLI, C. et al. In vitro evaluation of antiviral and virucidal activity of a high molecular weight hyaluronic acid. **Virology journal**, v. 8, n. 1, p. 141, 2011.
- CHAUHAN, A. S. et al. The P170 expression system enhances hyaluronan molecular weight and production in metabolically-engineered *Lactococcus lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p. 73–78, 2014.
- CHEN, C.-P.; HUNG, W.; LIN, S.-H. Effectiveness of hyaluronic acid for treating diabetic foot: a systematic review and meta-analysis. **Dermatologic therapy**, v. 27, p. 331–336, 2014.
- CHEN, M. et al. Topical delivery of hyaluronic acid into skin using SPACE-peptide carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 173, p. 67–74, jan. 2014.
- CHEN, Y. H. et al. Optimization of flask culture medium and conditions for hyaluronic acid production by a *Streptococcus equisimilis* mutant NC2168. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1553–1561, 2012.
- CHIEN, L.-J.; LEE, C.-K. Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 77, n. 2, p. 339–346, 2007.
- CHOI, J. et al. Degradation of hyaluronic acid powder by electron beam irradiation, gamma ray irradiation, microwave irradiation and thermal treatment: A comparative study. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 1080–1085, 2010.
- CHONG, B. F.; BLANK, L. **Metabolic engineering of hyaluronic acid production**. The Department of Chemical Engineering, University of Queensland, St. Lucia, Australia, 1998. Disponível em: <<http://web.aibn.uq.edu.au/cssb/Projects/HA.html>>. Acesso em: julho de 2016.
- CHONG, B. F. et al. Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 341–351, 2005.
- CHONG, B. F.; NIELSEN, L. K. Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 2, p. 153–162, 2003.

COCKERILL, F. R. et al. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standart. **Clinical and Laboratory Standarts Institute**. v. 32, n. 2, 2012.

COSTAGLIOLA, C. et al. The ability of bacteria to use Na-hyaluronate as a nutrient. **Acta Ophthalmologica**, p. 566–568, 1996.

DEL HOYO-GALLEGO, S. et al. Construction of antibacterial poly(ethylene terephthalate) films via layer by layer assembly of chitosan and hyaluronic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 35–43, jun. 2016.

DI CERBO, A. et al. Comparison of the effects of hyaluronidase and hyaluronic acid on probiotics growth. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 243, 2013.

DRAGO, L. et al. Antiadhesive and antibiofilm activity of hyaluronic acid against bacteria responsible for respiratory tract infections. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica**, v. 122, n. 10, p. 1013–1019, 2014.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EL-SAFORY, N. S.; LEE, C. K. Cytotoxic and antioxidant effects of unsaturated hyaluronic acid oligomers. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 4, p. 1116–1123, 2010.

ERICKSON, M.; STERN, R. Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism, **Biochemistry Research International**, v. 2012, 2012.

FERRARI, F. A. et al. The solid-state cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in polyurethane foam as a strategy for the production of hyaluronic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 6, p. 1491–1502, 2013.

FRIEDRICH, E. E. et al. Effects of hyaluronic acid conjugation on anti-TNF- α inhibition of inflammation in burns. **Journal of Biomedical Materials Research.**, v. 102A, n. 5, p. 1527–36, 2014.

GOA, K. L.; BENFIELD, P. Hyaluronic Acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. **Drugs**, v. 47, n. 3, p. 536-566, 1994.

HASCALL, V. C.; LAURENT, T. C. **Hyaluronan: Structure and Physical Properties**. In: HASCALL, V. C.; YANAGISHITA, M. (Eds) *Hyaluronan Today*. 1997. Disponível em: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>. Acesso em julho de 2016.

HERNÁNDEZ-MONTELONGO, J. et al. Nanofilms of hyaluronan/chitosan assembled layer-by-layer: An antibacterial surface for *Xylella fastidiosa*. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 1–11, jan. 2016.

HOARE, T. et al. Prevention of Peritoneal Adhesions Using Polymeric Rheological Blends. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 3, p. 1197–1193, 2014.

HUANG, W.-C.; CHEN, S.-J.; CHEN, T.-L. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, n. 3, p. 239–243, 2006.

IM, J. H. et al. Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1337–1344, 2009.

JAGANNATH, S.; RAMACHANDRAN, K. B. Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 2, p. 148–158, 2010.

JOHNS, M. R.; GOH, L.; OEGGERLI, A. Effect of pH, Agitation and Aeration on Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 5, p. 507–512, 1994.

KE, C. et al. Antioxidant activity of low molecular weight hyaluronic acid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2670–2675, 2011.

KEMP, M. M. et al. Hyaluronan- and heparin-reduced silver nanoparticles with antimicrobial properties. **Nanomedicine**, v. 4, n. 4, p. 421–429, jun. 2009.

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

KIM, J.-H. et al. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 6, p. 440–445, 1996.

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, 2007.

KRETZ, F. T. A; LIMBERGER, I.-J.; AUFFARTH, G. U. Corneal endothelial cell coating during phacoemulsification using a new dispersive hyaluronic acid ophthalmic viscosurgical device. **Journal of Cataract and Refractive surgery**, v. 40, n. 11, p. 1879–1884, 2014.

LAFFLEUR, F.; DACHS, S. Development of novel mucoadhesive hyaluronic acid derivated as lubricant for the treatment of dry eye syndrome. **Therapeutic Delivery**, v. 6, n. 10, p. 1211–1219, 2015.

LAPCIK, L. J. et al. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 8, p. 2663–2684, 1998.

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

LEQUEUX, I. et al. Addition of antimicrobial properties to hyaluronic acid by grafting of antimicrobial peptide. **European Polymer Journal**, v. 51, p. 182–190, 2014.

LIU, L. et al. Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8532–8536, 2008.

LIU, L. et al. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. **Microbial cell factories**, v. 10, p. 99, 2011.

LOEBEL, C. et al. Microfabrication of Photo-crosslinked Hyaluronan Hydrogels by Single- and Two-photon Tyramine Oxidation. **Biomacromolecules**, p. 1–25, 2015.

MACEDO, A. C. DE. **Estudo da Produção de Ácido Hialurônico por Fermentação de *Streptococcus zooepidemicus* em Substrato de Caju (*Anacardium occidentale* L.)**. 2006. 232 f. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas, Campinas - São Paulo, 2006.

MAH, T. F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34–39, 2001.

MAO, Z., CHEN, R.R. Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp. **Biotechnol. Prog.** V. 23, n. 5, p. 1038–1042, 2007.

MARCELLIN, E.; CHEN, W.; NIELSEN, L. K. **Microbial hyaluronic acid biosynthesis. In: Microbial Production of Biopolymers**. Edited by: Rehm BHA. Caister Academic Press; p. 163-180, 2009.

MARCELLIN, E.; STEEN, J. A.; NIELSEN, L. K. Insight into hyaluronic acid molecular weight control. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 16, p. 6947–6956, 2014.

MOHAN, N.; BALAKRISHNAN, R.; SIVAPRAKASAM, S. Optimization and effect of dairy industrial waste as media components in the production of hyaluronic acid by *Streptococcus thermophilus*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 2015.

NATH, S. D. et al. Chitosan-hyaluronic acid polyelectrolyte complex scaffold crosslinked with genipin for immobilization and controlled release of BMP-2. **Carbohydrate polymers**, v. 115, p. 160–9, 2015.

NELSON, N. A. A fotometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, n. 2, p. 375–380, 1944.

NOWAK, J.; LAFFLEUR, F.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Preactivated hyaluronic acid: A potential mucoadhesive polymer for vaginal delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 478, n. 1, p. 383–389, 2014.

OGRODOWSKI, C. S. **Produção de Ácido Hialurônico por Streptococcus: Estudo da Fermentação e Caracterização do Produto**. 2006. 121 f. Tese – Universidade Estadual de Campinas, Campinas - São Paulo, 2006.

PAN, N. C. et al. Ácido Hialurônico: Características, Produção Microbiana e Aplicações Industriais. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 4, p. 42–58, 2013.

PAN, N. C. et al. Effect of fermentation conditions on the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 4, p. 411–417, 2015.

PAN, N. C. et al. Improvement production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* in sugarcane molasses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-016-2326-y>> Acesso em dezembro de 2016.

PAN, N. C. **Produção de ácido hialurônico por Streptococcus zooepidemicus ATCC 39920 em diferentes condições de cultivo utilizando metodologias estatísticas**. 2014. 159 f. Dissertação – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

PAPAKONSTANTINO, E.; ROTH, M.; KARAKIULAKIS, G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. **Dermato-Endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 253–258, 2012.

PIRES, A. M. B. **Estudos Metabólicos para Otimização de Condições Nutricionais e de Cultivo para Produção Microbiana de Ácido Hialurônico**. 2009. 196 f. Tese – Universidade Estadual de Campinas, Campinas - São Paulo, 2009.

PIRES, A. M. B.; EGUCHI, S. Y.; SANTANA, M. H. A. The influence of mineral ions on the microbial production and molecular weight of hyaluronic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 8, p. 2125–2135, 2010.

PIRES, A. M. B.; SANTANA, M. H. A. Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, n. 6, p. 1751–1761, 2010.

PIRES, A. M. et al. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6506–6509, 2010.

PIRNAZAR, P. et al. Bacteriostatic Effects of Hyaluronic Acid. **J Periodontol, antimicrobiano**, v. 70, n. 4, p. 370–374, 1999.

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.

SCHIRALDI, C.; GATTA, A. LA; ROSA, M. DE. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. **Biopolymers**, p. 387–412, 2010.

SHAH, M. V.; BADLE, S. S.; RAMACHANDRAN, K. B. Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. **Biochemical Engineering Journal**, v. 80, n. December, p. 53–60, 2013.

SHEEHAN, J. K.; GARDNER, K. H.; ATKINS, E. D. 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. 113–35, 1977.

SHENG, J.; LING, P.; WANG, F. Constructing a recombinant hyaluronic acid biosynthesis operon and producing food-grade hyaluronic acid in *Lactococcus lactis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 197–206, 2015.

SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugar. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61–68, 1945.

STERN, R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: Are we there yet? **Glycobiology**, v. 13, n. 12, p. 105–115, 2003.

STERN, R.; ASARI, A.; SUGAHARA, K. Hyaluronan fragments: An information-rich system. **European Journal of Cell Biology**, v. 85, n. 8, p. 699–715, 2006.

SU, Z. et al. Enhancement of skin wound healing with decellularized scaffolds loaded with hyaluronic acid and epidermal growth factor. **Materials Science and Engineering: C**, v. 44, p. 440–448, 2014.

SWANN, D. A.; SULLIVAN, B.P.; JAMIESON, G.; RICHARDSON, K. S. T. **Biosynthesis of hyaluronic acid**. US Patent No. 4897349, 1990.

TLAPAK-SIMMONS, V. L. et al. Kinetic Characterization of the Recombinant Hyaluronan Synthases from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis* **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 7, p. 4246–4253, 1999.

TLAPAK-SIMMONS, V. L.; BARON, C. A.; WEIGEL, P. H. Characterization of the purified hyaluronan synthase from *Streptococcus equisimilis**. **Biochemistry**, v. 43, n. 28, p. 9234–9242, 2004.

TOLG, C. et al. Hyaluronan and RHAMM in wound repair and the “cancerization” of stromal tissues. **BioMed research international**, v. 2014, p. 103923, 2014.

TOLG, C.; TELMER, P.; TURLEY, E. Specific Sizes of Hyaluronan Oligosaccharides Stimulate Fibroblast Migration and Excisional Wound Repair. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88479, 2014.

TSEPILOV, R. N.; BELODED, A. V. Hyaluronic Acid – an “ Old ” Molecule with “ New ” Functions : Biosynthesis and Depolymerization of Hyaluronic Acid in Bacteria and Vertebrate Tissues Including during Carcinogenesis. **Biochemistry**, v. 80, n. 9, 2015.

UNICA. **Produção de cana-de-açúcar, etanol e açúcar – Safra 2015/2016. União da Indústria de Cana-de-Açúcar** - UNICA. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br>. Acesso em nov. 2016>.

VÁZQUEZ, J. A et al. Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. **Microbial cell factories**, v. 9, p. 46, 2010.

WEIGEL, P. H.; HASCALL, V. C.; TAMMI, M. Hyaluronan synthases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 22, p. 13997–14000, 1997.

WIDNER, B. et al. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.71, n.7, p.3747-3752, 2005.

WILLIAMS, D. L.; MANN, B. K. Efficacy of a crosslinked hyaluronic acid-based hydrogel as a tear film supplement: A masked controlled study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–6, 2014.

YAMADA, T.; KAWASAKI, T. Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: New approaches. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 6, p. 521–528, 2005.

YU, H.; STEPHANOPOULOS, G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. **Metab. Eng.**, 10, 24-32, 2008.

ZHAN, J. et al. Antimicrobial Hyaluronic Acid/Poly(amidoamine) Dendrimer Multilayer on Poly(3-hydroxybutyrate- co -4-hydroxybutyrate) Prepared by a Layer-by-Layer Self-Assembly Method. **ACS Applied Materials & Interfaces**, antimicrobiano, v. 7, n. 25, p. 13876–13881, jul. 2015.

ZHANG, X.; DUAN, X. J.; TAN, W. S. Mechanism for the effect of agitation on the molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1643–1646, 2010.

ZHANG, Y. et al. Genetic and biochemical characterization of genes involved in hyaluronic acid synthesis in *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 13 jan. 2016.

ZHAO, J.-Y. et al. Influence of hyaluronic acid on wound healing using composite porcine acellular dermal matrix grafts and autologous skin in rabbits. **International Wound Journal**, v. 10, n. 5, p. 562–572, 2013.

ANEXOS

Anexo 1: Produção de Ácido Hialurônico através de Delineamento Composto Central Rotacional

A produção de ácido hialurônico em glicose, através de DCCR, foi realizada para verificar o efeito da concentração de extrato de levedura e glutamina. A produção variou de 0,291 a 0,524 g.L⁻¹ (Tabela 1) e a análise de variância mostrou que a glutamina (quadrático) ($p = 0,019387$) e a interação X1 x X2 ($p = 0,029616$) exibiu efeito significativo sobre a produção.

Tabela 1. Produção de ácido hialurônico (AH), lactato, acetato, biomassa, consumo de açúcares e pH do meio de *Streptococcus zooepidemicus* em glicose, variando a concentração de extrato de levedura (X1) e glutamina (X2) em frascos de Erlenmeyer a 37 °C, 100 rpm, 24 h, pH inicial 8,0 (DCCR).

Ensaio	Variáveis Decodificadas		Variáveis Resposta					
	X1 (g.L ⁻¹)	X2 (g.L ⁻¹)	pH	Biomassa (g.L ⁻¹)	Consumo de Açúcar (g.L ⁻¹)	Lactato (g.L ⁻¹)	Acetato (g.L ⁻¹)	AH (g.L ⁻¹)
1	20,00	5,00	5,02	2,158	10,814	3,876	0,447	0,524
2	20,00	11,00	4,98	1,932	6,745	3,776	0,492	0,429
3	60,00	5,00	5,07	2,685	6,008	6,297	0,521	0,342
4	60,00	11,00	5,09	2,591	5,698	6,066	0,427	0,514
5	11,72	8,00	4,97	1,688	3,411	3,519	0,401	0,451
6	68,28	8,00	5,11	2,718	6,706	6,880	0,402	0,505
7	40,00	3,76	5,04	2,603	7,733	5,193	0,399	0,532
8	40,00	12,24	4,94	1,808	3,334	3,634	0,255	0,291
9	40,00	8,00	5,03	2,257	5,427	4,980	0,347	0,519
10	40,00	8,00	5,03	2,245	6,745	4,951	0,358	0,504
11	40,00	8,00	5,03	2,339	7,500	4,918	0,383	0,550
12	40,00	8,00	5,03	2,381	5,291	4,870	0,348	0,500

Apesar do modelo quadrático explicar apenas 70,49 % da resposta observada, a falta de ajuste do modelo não foi significativa ($p = 0,083631$). A produção de ácido hialurônico em função da concentração de extrato de levedura e glutamina pode ser explicada pela equação (1):

$$Y = 0,495418 - 0,06611(-x_2) - 0,084709(-x_2)^2 + 0,133472(x_1.x_2)$$

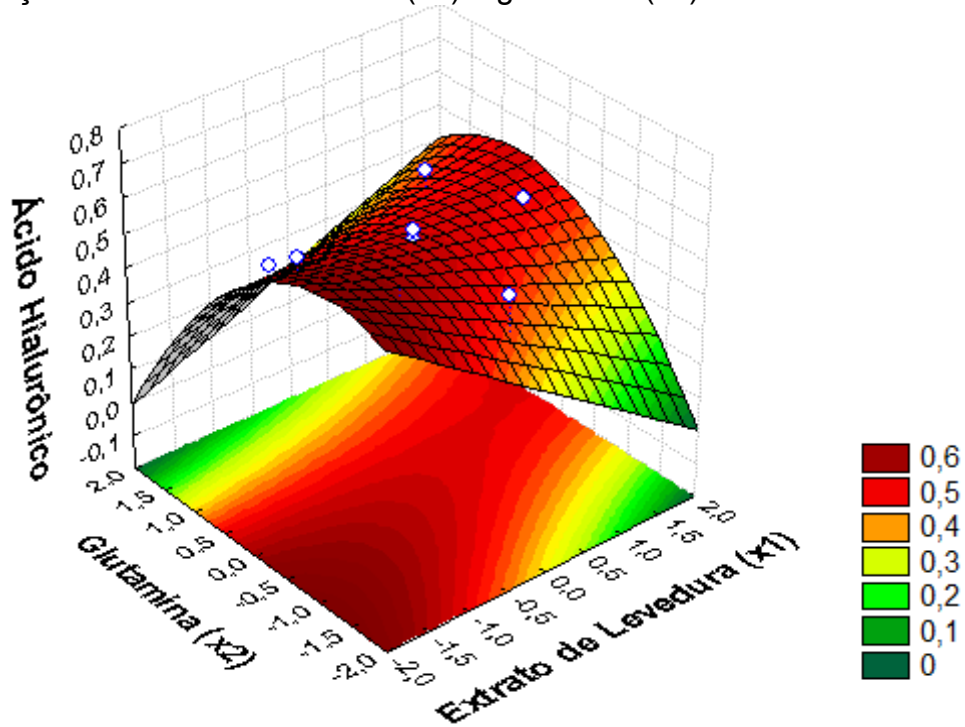
Eq. 1

na qual a Y é a produção de ácido hialurônico e x_1 e x_2 são os valores codificados para extrato de levedura e glutamina, respectivamente.

Uma vez que o extrato de levedura não exerceu efeito sobre a produção tanto no modelo linear ($p = 0,066168$) quanto no quadrático ($p = 0,057736$), seus efeitos foram retirados da equação.

A superfície de resposta (Figura 1) demonstrou produção ótima de ácido hialurônico em $11,72 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato e $5,88 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina, porém não foi possível validar o modelo ($p = 0,011624$).

Figura 1. Superfície de resposta para a produção de ácido hialurônico em função da concentração de extrato de levedura (x_1) e glutamina (x_2).



Anexo 2: Análises Estatísticas para Ácido Hialurônico Produzido em Glicose através do Planejamento Fatorial Box Hunter x Hunter 2⁵⁽⁻¹⁾

Tabela 1. Análise de Variância para o modelo linear da produção de ácido hialurônico pelo planejamento Box Hunter x Hunter 2⁵⁽⁻¹⁾ em glicose.

	S.Q.	g. L.	Q. M.	F	p
Ac. Sódio (1)	0,017699	1	0,017699	67,28596	0,000078*
Glutamina (2)	0,000504	1	0,000504	1,91456	0,208972
Niacina (3)	0,001208	1	0,001208	4,59385	0,0692993
Ác. Oxálico (4)	0,002897	1	0,002897	11,01471	0,012785*
Iodoacetato (5)	0,021041	1	0,021041	79,98765	0,000044*
1 x 2	0,007098	1	0,007098	26,98454	0,001260*
1 x 5	0,002137	1	0,002137	8,12509	0,024672*
2 x 3	0,004977	1	0,004977	18,92031	0,003356*
2 x 5	0,007081	1	0,007081	26,91844	0,001269*
3 x 5	0,000522	1	0,000522	1,98440	0,201763
4 x 5	0,000107	1	0,000107	0,40807	0,543279
Erro	0,001841	7	0,000263	-	-
Total	0,067113	18	-	-	-

*valor de p significativo para α : 5 %. R^2 : 0,97256; R^2 Ajustado: 0,92945; Falta de ajuste: p: 0,891068.

Tabela 2. Efeitos estimados para modelo linear da produção de ácido hialurônico pelo planejamento Box Hunter x Hunter 2⁵⁽⁻¹⁾ em glicose.

	Efeito	Erro Padrão	t	p
Média/ Intercepto	0,311040	0,003721	83,59415	0,000000*
Acetato de Sódio (1)	-0,03326	0,004055	-8,20280	0,000078*
Glutamina (2)	0,005610	0,004055	1,38368	0,208972
Niacina (3)	-0,008691	0,004055	-2,14333	0,069293
Ác. Oxálico (4)	-0,013457	0,004055	-3,31884	0,012785
Iodoacetato (5)	-0,036263	0,004055	-8,94358	0,000044*
1 x 2	-0,021063	0,004055	-5,19466	0,001260*
1 x 5	-0,011558	0,004055	-2,85045	0,024672
2 x 3	-0,017637	0,004055	-4,34975	0,003356*
2 x 5	-0,021037	0,004055	-5,18830	0,001269*
3 x 5	0,005712	0,004055	1,40869	0,201763
4 x 5	0,002590	0,004055	0,63880	0,543279

*valor de p significativo para α : 5 %. R^2 : 0,97256; R^2 Ajustado: 0,92945.

Anexo 3: Análises Estatísticas para Ácido Hialurônico Produzido em Melaço de Cana-de-Açúcar através do Planejamento Fatorial Box Hunter x Hunter 2⁵⁽⁻¹⁾

Tabela 1. Análise de Variância para regressão para produção de ácido hialurônico pelo planejamento Box Hunter x Hunter 2⁵⁽⁻¹⁾ em melaço de cana-de-açúcar.

	S.Q.	g. L.	Q. M.	F	p
Regressão	0,120287	8	0,0150358	7,003202	<0,05
Ac. Sódio (1)	0,010816	1	0,010816	5,03692	0,048647*
Glutamina (2)	0,001640	1	0,001640	0,76385	0,402627
Niacina (3)	0,040804	1	0,040804	19,00210	0,001423*
Iodoacetato (5)	0,054289	1	0,054289	25,28195	0,000516*
1 x 2	0,002652	1	0,002652	1,23513	0,292417
1 x 5	0,000225	1	0,000225	0,10478	0,752834
2 x 3	0,000930	1	0,000930	0,43321	0,525280
2 x 5	0,008930	1	0,008930	4,15875	0,068728
Erro	0,021743	10	0,002147	-	-
Total	0,141760	18	-	-	-

*valor de p significativo para α : 5 %. R²: 0,84852; R² Ajustado: 0,72734.

**Anexo 4: Biomassa, Consumo de Açúcares e pH dos Ensaios dos
Planejamento Fatorial Box Hunter x Hunter 2⁵⁽⁻¹⁾ em Glicose e Melaço de Cana-
de-Açúcar**

Tabela 1. Biomassa, consumo de açúcares e pH dos ensaios dos Planejamento Fatorial Box Hunter x Hunter 2⁵⁽⁻¹⁾.

Ensaios	Glicose			Melaço		
	Biomassa (g.L ⁻¹)	Consumo de Açúcar (g.L ⁻¹)	pH	Biomassa (g.L ⁻¹)	Consumo de Açúcar (g.L ⁻¹)	pH
1	1,754	10,155	6,08	0,589	7,116	6,52
2	1,759	16,589	5,18	0,639	13,539	5,13
3	2,166	13,256	4,91	0,708	9,026	4,91
4	1,083	5,542	6,46	0,480	6,217	6,60
5	2,224	11,589	4,85	0,568	11,311	4,90
6	1,466	8,604	6,01	0,494	7,753	6,19
7	1,499	7,403	6,24	0,473	5,992	6,40
8	1,767	11,783	5,22	0,518	13,371	5,16
9	2,265	9,728	4,79	0,675	12,172	4,85
10	1,338	8,062	6,12	0,558	11,985	6,63
11	1,182	4,263	6,29	0,563	4,026	6,42
12	1,717	10,387	5,16	0,690	11,498	5,10
13	1,701	6,008	6,00	0,510	7,734	6,54
14	1,709	11,356	5,16	0,546	11,011	5,11
15	1,862	6,744	4,85	0,620	8,024	4,95
16	0,873	3,488	6,40	0,635	4,766	6,52
17	1,602	11,434	5,78	0,647	6,901	6,04
18	1,594	9,186	5,77	0,654	5,637	6,06
19	1,627	5,232	5,77	0,674	5,468	6,01

**Anexo 5: Análises Estatísticas para o pH dos Ensaios do Planejamento Fatorial
Box Hunter x Hunter 2⁵⁽⁻¹⁾ em Glicose**

Tabela 1. Análise de Variância para o modelo linear do pH dos cultivos em glicose.

	S.Q.	g. L.	Q. M.	F	p
Ac. Sódio (1)	0,180625	1	0,180625	11,7421	0,011035*
Glutamina (2)	0,112225	1	0,112225	7,2955	0,030594*
Niacina (3)	0,004225	1	0,004225	0,2747	0,616403
Ác. Oxálico (4)	0,002025	1	0,002025	0,1316	0,727444
Iodoacetato (5)	5,616900	1	5,616900	365,1438	0,000000*
1 x 2	0,002500	1	0,002500	0,1625	0,698876
1 x 5	0,055225	1	0,055225	3,5901	0,099975
2 x 5	0,065025	1	0,065025	4,2271	0,078829
3 x 4	0,008100	1	0,008100	0,5266	0,491596
3 x 5	0,007225	1	0,007225	0,4697	0,515179
4 x 5	0,003025	1	0,003025	0,1966	0,670821
Erro	0,107679	7	0,015383	-	-
Total	6,164779	18	-	-	-

*valor de p significativo para α : 5 %. R^2 : 0,98253; R^2 Ajustado: 0,95509; Falta de ajuste: p: 0,134955.

Tabela 2. Efeitos estimados para modelo linear do pH dos cultivos em glicose.

	Efeito	Erro Padrão	t	p
Média/ Intercepto	5,638947	0,028454	198,1794	0,000000*
Acetato de Sódio (1)	0,212500	0,062014	3,4267	0,011035*
Glutamina (2)	0,167500	0,062014	2,7010	0,030594*
Niacina (3)	-0,03250	0,062014	-0,5241	0,616403
Ác. Oxálico (4)	-0,02250	0,062014	-0,3628	0,727444
Iodoacetato (5)	1,185000	0,062014	19,1087	0,000000*
1 x 2	0,025000	0,062014	0,4031	0,698876
1 x 5	-0,11750	0,062014	-1,8947	0,099975
2 x 5	0,127500	0,062014	2,0560	0,078829
3 x 4	0,045000	0,062014	0,7256	0,491596
3 x 5	-0,04500	0,062014	-0,6853	0,515179
4 x 5	0,027500	0,062014	0,4435	0,670821

*valor de p significativo para α : 5 %. R^2 : 0,98253; R^2 Ajustado: 0,95509.

**Anexo 6: Análise de Variância do pH dos Ensaios do Planejamento Fatorial
Box Hunter x Hunter 2⁵⁽⁻¹⁾ em Melão de Cana-de-Açúcar**

Tabela 1. Análise de Variância para o modelo linear do pH dos cultivos em melão.

	S.Q.	g.L.	Q.M.	F	p
Acetato de Sódio (1)	0,056406	1	0,056406	2,3265	0,149455
Iodoacetato (5)	8,570256	1	8,570256	353,4880	0,000000*
1 x 3	0,020306	1	0,020306	0,8375	0,375593
1 x 5	0,043056	1	0,043056	1,7759	0,203938
Erro	0,339428	14	0,024245		
Total	9,029453	18			

*valor de p significativo para α : 5 %. R^2 : 0,96241; R^2 Ajustado: 0,95167; Falta de ajuste: p: 0,02947.

Tabela 2. Efeitos estimados para modelo linear do pH dos cultivos em melão.

	Efeito	Erro Padrão	t	p
Média/Intercepto	5,791579	0,053258	108,7463	0,000000*
Acetato de Sódio (1)	0,118750	0,116072	1,0231	0,364111
Iodoacetato (5)	1,463750	0,116072	12,6107	0,000228*
1 x 3	-0,071250	0,116072	-0,6138	0,572513
1 x 5	-0,103750	0,116072	-0,8938	0,421928

*valor de p significativo para α : 5 %. R^2 : 0,96241; R^2 Ajustado: 0,95167.

Anexo 7: Análise de Variância dos Ácidos Orgânicos Produzidos por *Streptococcus zooepidemicus* Através do Planejamento Fatorial Box Hunter x Hunter 2⁵⁽⁻¹⁾ em Glicose

Tabela 1. Análises de Variância para o modelo linear dos ácidos orgânicos produzidos em glicose.

Lactato					
R ²	0,95046				
R ² ajust	0,77708				
Falta de ajuste	0,070736				
	S.Q.	g. L.	Q. M.	F	p
Ac. Sódio (1)	0,73662	1	0,73662	1,22669	0,330166
Glutamina (2)	1,61673	1	1,61673	2,69233	0,176176
Niacina (3)	2,35430	1	2,35430	3,92061	0,118794
Ác. Oxálico (4)	0,26782	1	0,26782	0,44599	0,540802
Iodoacetato (5)	23,63996	1	23,63996	39,36756	0,003294*
1 x 2	1,91279	1	1,91279	3,18537	0,148856
1 x 3	1,53075	1	1,53075	2,54916	0,185589
1 x 4	1,47143	1	1,47143	2,45037	0,192552
1 x 5	1,06454	1	1,06454	1,77278	0,253850
2 x 3	2,90046	1	2,90046	4,83012	0,092885
2 x 4	1,90177	1	1,90177	3,16702	0,149752
2 x 5	6,02434	1	6,02434	10,03232	0,033943*
3 x 5	0,29585	1	0,29585	0,49267	0,521430
4 x 5	0,36920	1	0,36920	0,61483	0,476806
Erro	2,40197	4	0,60049	-	-
Total	48,48853	18	-	-	-
Acetato					
R ²	0,9985				
R ² ajust	0,99098				
Falta de ajuste	0,149797				
	S.Q.	g. L.	Q. M.	F	p
Ac. Sódio (1)	271,4446	1	271,4446	1507,920	0,000038*
Glutamina (2)	1,0855	1	1,0855	6,030	0,0912117
Niacina (3)	0,7100	1	0,7100	3,944	0,141225
Ác. Oxálico (4)	7,1536	1	7,1536	39,739	0,008066*
Iodoacetato (5)	11,0526	1	11,0526	61,399	0,004328*
1 x 2	1,4084	1	1,4084	7,824	0,068017
1 x 3	1,8315	1	1,8315	10,175	0,049721*
1 x 4	10,4055	1	10,4055	57,804	0,004722*
1 x 5	9,5605	1	9,5605	53,110	0,005334*
2 x 3	2,2627	1	2,2627	12,570	0,038217*
2 x 4	8,4869	1	8,4869	47,146	0,006325*
2 x 5	11,6757	1	11,6757	64,860	0,003999*
3 x 4	10,0438	1	10,0438	55,795	0,004969*
3 x 5	9,0926	1	9,0926	50,511	0,005732*
4 x 5	2,4256	1	2,4256	13,474	0,034982*
Erro	0,5400	3	0,1800	-	-
Total	359,1794	18	-	-	-

*valor de p significativo para α : 5 %.

Anexo 8: Análise de Variância dos Ácidos Orgânicos Produzidos por *Streptococcus zooepidemicus* Através do Planejamento Fatorial Box Hunter x Hunter 2⁵⁽⁻¹⁾ em Melaço de Cana-de-Açúcar

Tabela 1. Análises de Variância para os ácidos orgânicos produzidos em melaço.

Lactato					
R ²	0,99295				
R ² ajust	0,97463				
Falta de ajuste	0,01797				
	S.Q.	g. L.	Q. M.	F	p
Ac. Sódio (1)	28,3118	1	28,3118	72,4893	0,000368*
Glutamina (2)	0,8587	1	0,8587	2,1986	0,198245
Niacina (3)	2,4107	1	2,4107	6,1722	0,055541
Iodoacetato (5)	226,4289	1	226,4289	579,7463	0,000002*
1 x 2	0,2045	1	0,2045	0,5236	0,501720
1 x 3	0,6009	1	0,6009	1,5386	0,269856
1 x 5	12,7345	1	12,7345	32,6052	0,002301*
2 x 3	1,4831	1	1,4831	3,7972	0,108859
2 x 4	0,6129	1	0,6129	1,5692	0,265717
2 x 5	0,1786	1	0,1786	0,4572	0,528923
3 x 4	0,8969	1	0,8969	2,2964	0,190104
3 x 5	0,0535	1	0,0535	0,1370	0,726457
4 x 5	0,4277	1	0,4277	1,0952	0,343262
Erro	1,9528	5	0,3906	-	-
Total	277,1554	18	-	-	-
Acetato					
R ²	0,99436				
R ² ajust	0,98732				
Falta de ajuste	0,015061				
	S.Q.	g. L.	Q. M.	F	p
Ac. Sódio (1)	277,6251	1	277,6251	1396,675	0,000000*
Glutamina (2)	0,6102	1	0,6102	3,070	0,117858
Niacina (3)	0,0642	1	0,0642	0,323	0,585282
1 x 2	0,1889	1	0,1889	0,950	0,358198
1 x 3	0,5034	1	0,5034	2,533	0,150183
1 x 4	0,4183	1	0,4183	2,105	0,184914
2 x 4	0,2153	1	0,2153	1,083	0,328403
2 x 5	0,2651	1	0,2651	1,334	0,281503
3 x 4	0,4633	1	0,4633	2,331	0,165371
4 x 5	0,1364	1	0,1364	0,686	0,431501
Erro	1,5902	8	0,1988	-	-
Total	282,0805	18	-	-	-

*valor de p significativo para α : 5 %.

Anexo 9: Biomassa, Consumo de Açúcares, Produção de Ácido Hialurônico e de Ácidos Orgânicos e pH dos Cultivos em Melaço de Cana-de-Açúcar com Variação da Concentração de Glutamina

Tabela 1. Biomassa, Consumo de Açúcar, Produção de Ácido Hialurônico e de Ácidos Orgânicos e pH dos Cultivos em Melaço de Cana-de-Açúcar com Variação da Concentração de Glutamina.

Glutamina (g.L⁻¹)	Biomassa (g.L⁻¹)	Consumo de Açúcar (g.L⁻¹)	Ácido Hialurônico (g.L⁻¹)	Lactato (g.L⁻¹)	Acetato (g.L⁻¹)	pH
0	2,639	8,646	0,716	7,377	0,989	4,90
2	2,735	9,601	0,732	7,717	0,777	4,89
4	2,665	8,908	0,723	7,593	0,952	4,87
6	2,732	8,714	0,740	8,038	1,046	4,88
8	2,832	8,883	0,826	8,253	1,064	4,89
10	2,838	10,100	0,819	8,103	1,045	4,89
12	2,861	10,119	0,843	8,989	1,193	4,89

Anexo 10: Curvas de Calibração para Quantificação de Ácido Hialurônico, Ácidos Orgânicos e Etanol por CLAE

Figura 1. Curva de calibração para de determinação de lactato por CLAE.

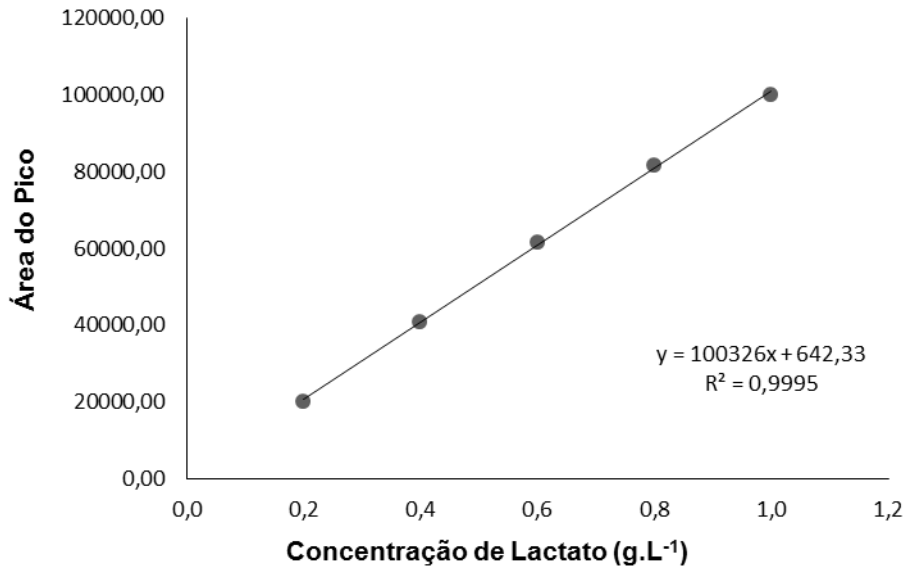


Figura 2. Curva de calibração para de determinação de acetato por CLAE.

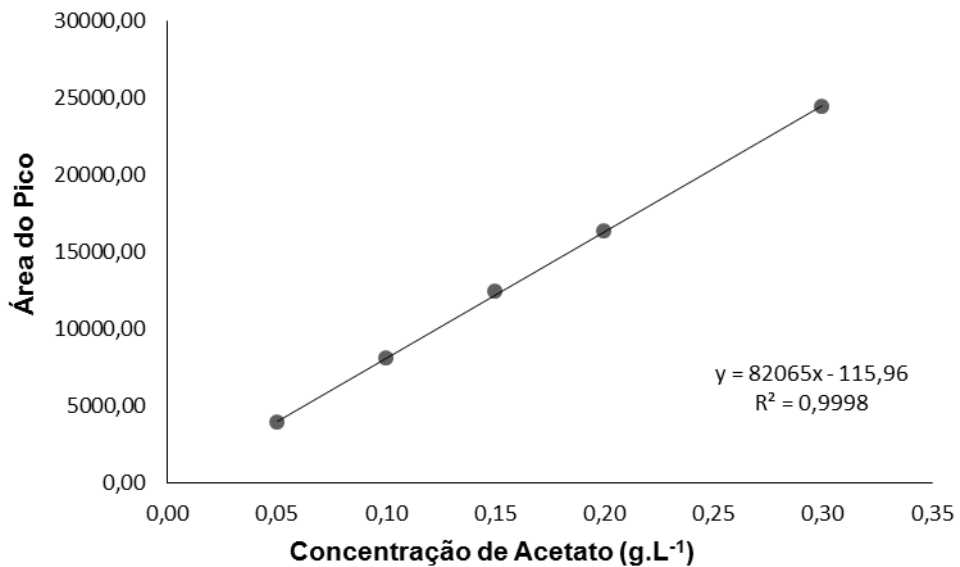


Figura 3. Curva de calibração para de determinação de etanol por CLAE.

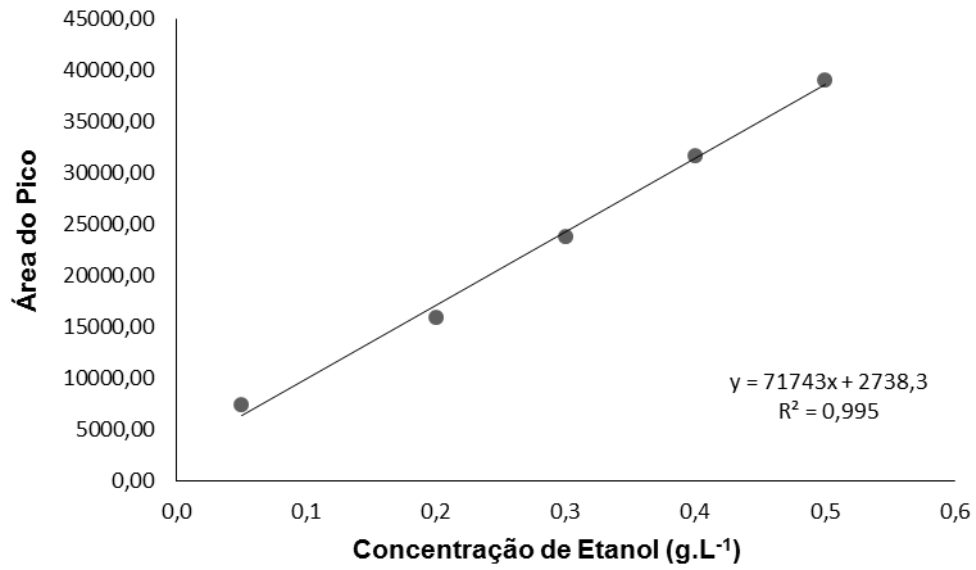
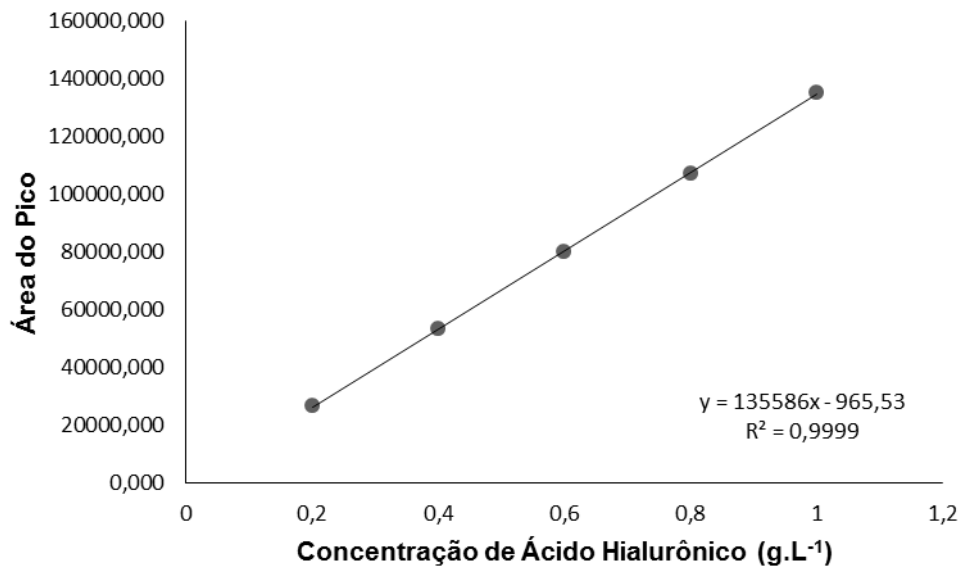


Figura 4. Curva de calibração para de determinação de ácido hialurônico por CLAE.



Anexo 11: Normas do Periódico International Journal of Biological Macromolecules



INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES

Structure, Function and Interactions

AUTHOR INFORMATION PACK

IMPACT FACTOR

2015: 3.138 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

EDITORIAL BOARD

Editors in Chief

A. Dong, University of Northern Colorado, Greeley, Colorado, USA

J.F. Kennedy, Chembiotech Laboratories, Worcester, England, UK



ISSN: 0141-8130

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

AIMS AND SCOPE. International Journal of Biological Macromolecules is an established international journal of research into chemical and biological aspects of all natural macromolecules. It presents the latest findings of studies on the molecular structure and properties of proteins, macromolecular carbohydrates, glycoproteins, proteoglycans, lignins, biological poly-acids, and nucleic acids. These findings must be new and novel rather than a repeat of earlier or analogous published work. The scope includes biological activities and interactions, molecular associations, chemical and biological modifications, and functional properties. Papers on related model systems, structural conformational studies, theoretical developments and new analytical techniques are also welcome. All papers are required to focus primarily on at least one named biological macromolecule. This naming should appear in the title, the abstract and the text of the paper. Examples of papers which are not appropriate for International Journal of Biological Macromolecules include: papers where the biological macromolecule has not been characterized by modern analytical techniques (including molecular weight) rather than historical methods. e.g.

colorimetric assays. papers which focus on biological, physiological and pharmacological aspects of non-macromolecules attached to, or mixed with, biological macromolecules. papers on the materials science of biocomposites where there is no mention of any specific biological macromolecule. papers where the structure or role of the biological macromolecule is not the major proportion of the study. routine studies of extraction of macromolecules without purification and characterization of the extracted molecule. applications of macromolecules where the structure of the macromolecule is completely unknown. Papers where the molecular weight of the biological molecule is less than five thousand. Paper which are majorly about clinical studies and animal trials, where a biological macromolecule is not the biologically active agent, and/or the biological macromolecule is not the major focus of the study.

Introductory information

Please follow the Guide For Authors instructions carefully to ensure that the review and publication of your paper is as swift and efficient as possible. These notes may be copied freely. All contributions are read by two or more referees to ensure both accuracy and relevance, and revisions to the script may thus be required. On acceptance, contributions are subject to editorial amendment to suit house style. When a manuscript is returned for revision prior to final acceptance, the revised version must be submitted as soon as possible after the author's receipt of the referee's reports. Revised manuscripts returned after four months will be considered as new submissions subject to full re-review.

Types of paper

Contributions falling into the following categories will be considered for publication:

- Original high-quality research papers (preferably no more than 20 double-line-spaced manuscript pages, including tables and illustrations)
- Short communications, for rapid publication (no more than 10 double-line-spaced manuscript pages including tables and figures)

International Journal of Biological Macromolecules also publishes book reviews, conference reports and a calendar of forthcoming events.

Contact details for submission

Articles should be submitted to <http://ees.elsevier.com/ijbiomac/>. For queries, please refer to our support page at service.elsevier.com.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed. All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

Results submitted for publication should refer to their previous findings in the same way as they would refer to results from a different group. This applies not only to figures or tables, or parts of them, but has to be understood in a wider sense.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent

publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Each author should have participated sufficiently in the work to justify authorship. This participation must include: (a) critically important intellectual contribution to the conception, design, and/or analysis and interpretation; (b) drafting the manuscript or critically reading it; and (c) thorough reading and final approval of the version to be published. Participation solely in the collection of data or provision of funds, space or equipment does not justify authorship. All authors take public responsibility for the paper as a whole, i.e., conception and design, data, analysis, and interpretation. The acknowledgement section should list (a) other contributors for whom authorship is not justified, e.g. technical help; (b) financial and material support.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement'. Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work.

Elsevier supports responsible sharing.

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY) Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works

of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND) For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is USD 3000, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

Authors are required to submit with their articles, the names, complete affiliations (spelled out), country and contact details (including current and valid (preferably business) e-mail address) of six potential reviewers. Email addresses and reviewer names will be checked for validity. Please ensure that the e-mail addresses are current. Reviewers who do not have an institutional e-mail address will only be

considered if their affiliations are given and can be verified. When compiling this list of potential reviewers please consider the following important criteria: they must be knowledgeable about the manuscript subject area; must not be from your own institution; at least two of the suggested reviewers must be from another country than the authors'; and they should not have recent (less than four years) joint publications with any of the authors. However, the final choice of reviewers is at the editors' discretion.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article Structure

You should arrange your contribution in the following order:

1. The paper title should be short, specific and informative. All author's names and affiliations should be clearly indicated. Please also indicate which author will deal with correspondence and supply full postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address.
2. Self contained abstract of approximately 200 words, outlining in a single paragraph the aims, scope and conclusions of the paper.
3. Three keywords, for indexing purposes;

4. The text suitably divided under headings.
5. Acknowledgments (if any).
6. References (double spaced, and following the journal style).
7. Appendices (if any).
8. Tables (each on a separate sheet).
9. Captions to illustrations (grouped on a separate sheet or sheets).
10. Illustrations, each on a separate sheet containing no text, and clearly labelled with the journal title, author's name and illustration number.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be

presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by \exp . Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Figures (to be uploaded as separate file(s), see below) and tables should be numbered in Arabic numerals. In the text they should be referred to as Fig. 1, Table 2, e.g. 3 etc. (not as fig. 1, figure 1; tab. 2, table 2). A calibration bar should be given on all micrographs.

Artwork

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the

reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. This identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset: [dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used

instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages.

RESEARCH DATA

Data in Brief

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, Data in Brief. Please note an open access fee is payable for publication in Data in Brief. Full

details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for

proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.