



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NICOLE CALDAS PAN

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO ÁCIDO
HIALURÔNICO PRODUZIDO EM MELAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR POR *Streptococcus zooepidemicus***

Londrina
2017

NICOLE CALDAS PAN

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO ÁCIDO
HIALURÔNICO PRODUZIDO EM MELAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR POR *Streptococcus zooepidemicus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial ao título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine
Colabone Celligoi.

Londrina
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P187c Pan, Nicole Caldas.

Caracterização e aplicação do ácido hialurônico produzido em melão de cana-de-açúcar por *Streptococcus zooepidemicus* / Nicole Caldas Pan. - Londrina, 2017.

187 f.: il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

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

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia - Teses. 2. Ácido hialurônicos - Teses. 3. Polissacarídeos - Teses. I. Celligoi, Maria Antonia Pedrine Colabone. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Ciência Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

NICOLE CALDAS PAN

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO
PRODUZIDO EM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR
*Streptococcus zooepidemicus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial ao título de Doutora em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine
Colabone Celligoi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Isabel Craveiro Moreira Andrei
Universidade Tecnológica Federal do Paraná,
Campus Londrina – UTFPR

Prof. Dr. Fábio Yamashita
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Suzana Mali
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Cristiani Baldo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 24 de Agosto de 2017.

À minha orientadora, família e amigos pelo incentivo e apoio constante.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me capacitar na realização deste trabalho, pelas oportunidades concedidas, e pelas pessoas que colocou em meu caminho.

À minha orientadora, professora doutora Maria Antonia P. C. Celligoi, por não somente transmitir conhecimento, e sim por me ensinar a buscá-lo. Agradeço pela competência, profissionalismo e amizade.

À professora doutora Cristiani Baldo por ter caminhado conosco na realização desse trabalho, por toda ajuda, conselhos e amizade. Minha sincera gratidão.

À professora doutora Suzana Mali pela contribuição ao trabalho, profissionalismo e dedicação.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa pela disponibilidade e atenção.

Ao professores doutores Guilherme Biz e Fábio Yamashita pela expressiva colaboração nas análises estatísticas.

Ao professor doutor Cesar Andrei pela atenção, entusiasmo e disponibilidade em me ajudar.

Às professoras doutoras Maria de Lourdes Corradi da Silva e Ana Flora Dalberto Vasconcelos pela contribuição na caracterização do polímero.

À professora doutora Renata Katsuko Takayama Kobayashi e professor doutor Gerson Nakazato por me orientarem nas análises de atividade antimicrobiana, assim como, ao aluno Erick Nishio por me ensinar e me acompanhar nos experimentos realizados.

Às professoras doutoras Sandra Regina Georgetti e Rubia Casagrande por terem me permitido testar o ácido hialurônico na redução de danos cutâneos, e às alunas Cristina de Paula Barros de Melo e Priscila Saito que me ajudaram nesse processo, pela parceria e amizade.

À professora doutora Josiane Alessandra Vignoli pela contribuição nos primórdios desse trabalho.

À professora doutora Suzana Lucy Nixdorf e aos alunos Lycio Shinj Watanabe, Tiago Bervelieri Madeira e Yuri Renan Bovolenta pela contribuição nas análises de CLAE.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia por todo aprendizado transmitido.

Ao meu amigo Thales Coletto e a empresa Alltech do Brasil por cederem o melaço de cana-de-açúcar para que esse trabalho fosse desenvolvido.

Ao técnico de laboratório, Nelson Janeiro Rodriguez, pela dedicação e auxílio durante o desenvolvimento experimental do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia pelas trocas de experiência, conhecimento, e também, preocupações. Em especial à Karina, Hanny, Mayara, Dayane, Agnes, Tami, Gabi, Jana, Isa e Marcão. Agradeço à companhia no dia a dia, às noites em claro no biorreator, por toda ajuda, paciência, idéias e incentivos. Boas são as lembranças guardadas.

Aos meus pais, Wilson e Naudete, e irmã, Caroline, pelas vezes que meu cansaço e preocupações foram sentidos e compartilhados com vocês, e que a união e o amor entre nós me incentivou a prosseguir.

Ao meu namorado, Luiz, por toda sua razão quando a minha emoção me inquietava, pela compreensão quando de minha ausência, pela atenção e carinho. Meu eterno amor.

Às minhas sobrinhas, Luiza e Cecilia, que na pequenez e inocência alegraram meus dias.

A todos que de alguma forma contribuíram com a realização desse trabalho. Meu respeito e gratidão.

“Se consegui ver mais além, é porque subi aos ombros de gigantes”
(Isaac Newton)

PAN, Nicole Caldas. **Caracterização e aplicação do ácido hialurônico produzido em melão de cana-de-açúcar por *Streptococcus zooepidemicus***. 2017. 187 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi caracterizar e aplicar o ácido hialurônico (AH) produzido em melão de cana-de-açúcar por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. Para a produção de ácido hialurônico, a concentração de sacarose, melão de cana-de-açúcar, extrato de levedura, glutamina, glutamato e ácido oxálico foram estudadas. Fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers e biorreator. A melhor produção de AH foi de 2,825 g.L⁻¹ obtida em biorreator, com controle de pH em 8,0, e meio contendo melão de cana-de-açúcar pré-tratado a 85,35 g.L⁻¹ de açúcares totais e extrato de levedura a 50 g.L⁻¹. O AH foi caracterizado por espectroscopia de FT-IR, UV-Vis e RMN, confirmando estrutura equivalente ao padrão e massa molecular de 1,35 × 10³ kDa. A atividade sequestrante do radical DPPH do AH a 1 g.L⁻¹ foi de 41% e o polímero não apresentou atividade antimicrobiana. Filmes biodegradáveis e biocompatíveis de AH e álcool polivinílico (PVA) foram produzidos por técnica de *casting*. A adição de AH aos filmes de PVA aumentaram sua estabilidade térmica, solubilidade, grau de intumescimento, permeabilidade ao vapor de água e habilidade de alongação. O melão de cana-de-açúcar mostrou ser um substrato alternativo para a produção do AH, sendo este polímero um material promissor para aplicações biomédicas.

Palavras-chave: Ácido Hialurônico. Polissacarídeo. Fermentação. Biorreator. Álcool Polivinílico. Filmes biodegradáveis .

PAN, Nicole Caldas. **Characterization and application of hyaluronic acid produced in sugarcane molasses by *Streptococcus zooepidemicus***. 2017. 187 p. Thesis (Doctoral degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The aim of this work was to characterize and apply the hyaluronic acid (HA) produced in sugarcane molasses by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. For the HA production, the concentration of sucrose, sugarcane molasses, yeast extract, glutamate, glutamine and oxalic acid were studied. Fermentations were carried out in Erlenmeyer flasks and bioreactor. The best HA production was 2.825 g.L⁻¹ obtained in bioreactor with pH control in 8.0 and medium containing pretreated sugarcane molasses at 85.35 g.L⁻¹ of total sugars and yeast extract at 50 g.L⁻¹. The HA was characterized by the FT-IR, UV-Vis and NMR spectra, confirming structure equivalent to the standard and molecular weight of 1.35 × 10³ kDa. The DPPH radical scavenging activity of HA at 1 g.L⁻¹ was 41% and the polymer showed no antimicrobial activity. The biodegradable and biocompatible films of HA and polyvinyl alcohol (PVA) were produced by *casting* technique. The addition of HA on PVA films increased their thermal stability, solubility, swelling index, water vapor permeability and elongation ability. Sugarcane molasses showed to be an alternative substrate for the HA production, being this polymer a promising material for biomedical applications.

Keywords: Hyaluronic Acid. Polysaccharide. Fermentation. Bioreactor. Polyvinyl alcohol. Biodegradable films.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química do ácido hialurônico	19
Figura 2	Via metabólica de biossíntese do ácido hialurônico por <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	28
Figura 3	Fluxograma da produção, caracterização e aplicação do ácido hialurônico.	44
Figura 4	Fluxograma do processo de produção de AH na Etapa 1.....	47
Figura 5	Fluxograma do processo de produção de AH na Etapa 2.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção de ácido hialurônico em diferentes meios de fermentação de baixo custo.....	35
Tabela 2	Composição do meio BHI (HIMEDIA M-210).	43
Tabela 3	Meio 1 de fermentação.....	43
Tabela 4	Meio 2 de fermentação.....	43
Tabela 5	Composição do caldo Mueller-Hinton (DIFCO 275730).	44
Tabela 6	Planejamento fatorial fracionado $2^{(5-1)}$ para a avaliação da concentração de (X ₁) sacarose, (X ₂) extrato de levedura, (X ₃) glutamato, (X ₄) glutamina e (X ₅) ácido oxálico para a produção de ácido hialurônico, biomassa, ácido láctico e acético por <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	49
Tabela 7	Delineamento composto central rotacional para a avaliação da concentração de melaço de cana-de-açúcar pré-tratado (X ₁) e extrato de levedura (X ₂) para a produção de ácido hialurônico, biomassa, ácido láctico e acético por <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	51
Tabela 8	Formulações empregadas para o preparo de 500 g de solução filmogênica.....	55
Tabela 9	Formulação tópica a base de Polawax®	61

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AH	Ácido Hialurônico
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
ANOVA	Análise de Variância
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais
ATTC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
CLAE	Cromatografia de Exclusão Molecular
CY	Ciclofosfamida
Da	Daltons
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DTNB	Ácido 5-5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FRAP	Poder Antioxidante de Redução Férrica
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada no Fourier
GlcUA	Ácido Glicurônico
GlcNAc	N-acetilglicosamina
GSH	Glutathiona Reduzida
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MH	Müller-Hinton
MIC	Microdiluição em Caldo
MPO	Mieloperoxidase
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
OD	Oxigênio Reduzido
PVA	Álcool Polivinílico
pH	Potencial Hidrogênionico
SI	Índice de Intumescimento
Tg	Temperatura de Transição Vítrea
TGA	Análise Termogravimétrica

TPTZ	2,4,6 tripiridil-S-triazina
TPVA	Taxa de Permeabilidade ao Vapor de Água
TVA	Transmissão de Vapor de Água
UDP	Uridina Difosfato
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UR	Umidade Relativa
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta e Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	ÁCIDO HIALURÔNICO	19
3.1.1	Estrutura.....	19
3.1.2	Propriedades	20
3.2	PRODUÇÃO MICROBIANA DO ÁCIDO HIALURÔNICO.....	26
3.2.1	Produção de Ácido Hialurônico por <i>Streptococcus</i>	27
3.2.2	Fermentação e Condições de Cultivo.....	29
3.2.3	Substratos Alternativos para Produção de Ácido Hialurônico	33
3.3	APLICAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO EM FILMES BIODEGRADÁVEIS	36
3.3.1	Engenharia de Tecidos.....	37
3.3.2	Liberação de Fármacos.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	MATERIAL.....	41
4.1.1	Microrganismos	41
4.1.2	Melaço de Cana-de-açúcar	41
4.1.3	Reagentes	41
4.1.4	Meios de Cultura	42
4.2	MÉTODOS.....	44
4.2.1	Caracterização do Melaço de Cana-de-açúcar	45
4.2.2	Preparo do Melaço de Cana-de-açúcar.....	45

4.2.3	Preservação de <i>Streptococcus</i>	45
4.2.4	Crescimento de <i>Streptococcus</i> em meio BHI	46
4.2.5	Inóculo	46
4.2.6	Produção de Ácido Hialurônico	47
4.2.7	Acompanhamento das Fermentações.....	52
4.2.8	Purificação do Ácido Hialurônico	54
4.2.9	Produção de Filmes de Álcool Polivinílico e Ácido Hialurônico	54
4.2.10	Caracterização do Ácido Hialurônico e dos Filmes	55
4.2.11	Hidrólise do Ácido Hialurônico.....	60
4.2.12	Avaliação da Eficácia <i>in vivo</i> do Ácido Hialurônico em Formulações Tópicas na Redução dos Danos Cutâneos Induzidos pela Irradiação UVB	61
4.2.13	Análise Estatística	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	ENSAIO FATORIAL NO DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	66
5.2	PROCESSO BIOTECNOLÓGICO UTILIZANDO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO MICROBIANO	85
5.3	AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR <i>Streptococcus</i> <i>zooepidemicus</i> EM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	107
5.4	FILMES À BASE DE BLENDS DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO E ÁCIDO HIALURÔNICO MICROBIANO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS.....	136
5.5	RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	161
6	CONCLUSÕES	173
	REFERÊNCIAS	174

1 INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear composto de unidades dissacarídicas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidos alternadamente por ligações β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 4). O polímero é higroscópico, viscoelástico, biocompatível, biodegradável, não-antigênico e apresenta atividade antioxidante. Em humanos, o AH está presente em todos os tecidos, sendo abundante no cordão umbilical, fluido sinovial, humor vítreo do olho e pele. Dentre suas funções biológicas, o AH atua na lubrificação das articulações, hidratação da pele e preenchimento de espaço. Durante uma lesão tecidual, o AH age na regulação do reparo tecidual, ativação de células inflamatórias e regulação do comportamento das células epiteliais e fibroblastos. Além disso, estudos demonstram que o polímero apresenta função em vias de sinalização e regulação de processos patológicos e exibe potencial terapêutico em doenças humanas, como osteoartrite, câncer, diabetes, fibrose cística, asma e cicatrização de feridas.

Comercialmente, o AH é quimicamente extraído da crista de galo ou produzido via fermentação por *Streptococcus* dos grupo A e C de Lancerfield. Atualmente, a produção de AH microbiano vem sendo preferida devido ao risco de contaminação viral e de agentes infecciosos provinda dos tecidos animais. Embora a produção microbiana apresente vantagens devido a produção controlada e economia no processo de extração e purificação do polímero, o alto custo das matérias-primas comerciais utilizadas no meio de fermentação reduz sua competitividade no mercado. Estima-se que mais de 80% do custo de produção do AH microbiano por *Streptococcus* são pelos nutrientes (açúcares e proteínas) do meio de fermentação. Portanto, faz-se necessário encontrar substratos de baixo custo que possam substituir as fontes de carbono e nitrogênio comerciais, como glicose e extrato de levedura, visando reduzir os valores de produção. Outro aspecto importante, é otimizar as concentrações desses substratos no meio de cultivo e as condições da fermentação para que se obtenha alta produção do polímero.

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de açúcar, sendo que segundo o relatório anual da UNICA (2017) a última safra 2016/2017 foi de 38.734 mil toneladas. Considerando que para 1 tonelada de açúcar processado obtém-se 0,3 toneladas de melaço de cana-de-açúcar, estima-se que no Brasil 11,6 milhões de toneladas desse subproduto são gerados anualmente.

Devido à alta concentração de sacarose, glicose, frutose e uma grande variedade de sais e fontes de nitrogênio, o melaço de cana-de-açúcar vem sendo estudado como uma matéria prima de baixo custo em processos fermentativos. Partículas suspensas e estruturas complexas presentes no melaço de cana-de-açúcar bruto causam heterogeneidade no meio de fermentação e podem afetar a taxa de crescimento microbiana. Nesse contexto, pré-tratamentos são propostos para o preparo de um meio de melaço de cana-de-açúcar homogêneo, visando aumentar a produção microbiana. Esse substrato tem sido utilizado para produção de polímeros como celulose, goma velana, succinoglucana e levana.

Crescente interesse no uso de polímeros naturais, como o ácido hialurônico, para aplicações biomédicas e farmacêuticas ocorre devido à sua habilidade de formação de filmes biocompatíveis e biodegradáveis. Trabalhos recentes estudam o desenvolvimento de novos materiais, combinando AH com outros polímeros, sejam eles naturais ou sintéticos, para melhorar as propriedades físicas e biológicas destes, visando aplicações nas áreas de engenharia de tecido e liberação controlada de fármacos. Adicionalmente, considerando o alto custo do ácido hialurônico (U\$ 2.000 a U\$ 60.000 kg⁻¹) e seus derivados, a combinação deste com diferentes polímeros têm como vantagem reduzir o custo do material destinado às aplicações. Álcool polivinílico (PVA), celulose bacteriana, gelatina, ácido polilático, e quitosana são alguns dos polímeros combinados com AH para síntese de novos materiais.

Filmes de PVA e AH têm sido reportados como um material promissor para aplicações biomédicas. PVA é um polímero hidrofílico sintético não tóxico, não cancerígeno, biocompatível, biodegradável e bio-adesivo. Em escala industrial o PVA é obtido por hidrólise parcial ou completa de acetato de polivinila para remover os grupos acetato. Estudos mostram que a combinação desses polímeros gera filmes biodegradáveis, biocompatíveis, com boas propriedades mecânica, de barreira e térmica.

As inúmeras aplicações do AH nas áreas médicas, farmacêuticas e cosméticas, justificam os esforços na busca por uma produção economicamente viável e sustentável. O objetivo desse trabalho foi produzir o ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em melaço de cana-de-açúcar, caracterizar e aplicar em filmes biodegradáveis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em melação de cana-de-açúcar, caracterizar e aplicar o polímero em filmes de álcool polivinílico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO

- Estudar o meio de fermentação para a produção de ácido hialurônico em sacarose utilizando metodologias estatísticas;
- Otimizar a produção de ácido hialurônico em melação de cana-de-açúcar utilizando metodologias estatísticas;
- Avaliar o efeito do controle do pH para a produção de ácido hialurônico em biorreator;
- Caracterizar o ácido hialurônico quanto à estrutura química, massa molecular, atividade antioxidante, antimicrobiana e estabilidade térmica;
- Produzir e caracterizar os filmes de ácido hialurônico e álcool polivinílico.

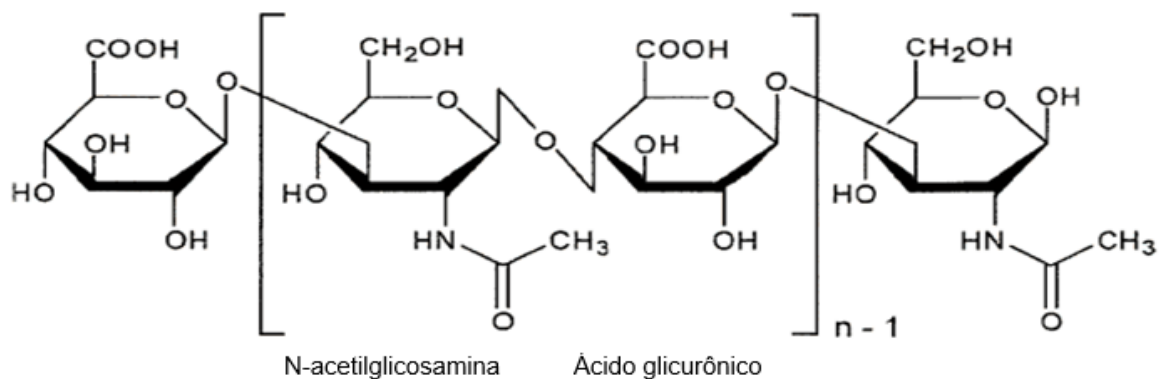
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ÁCIDO HIALURÔNICO

3.1.1 Estrutura

O ácido hialurônico (AH) é um glicosaminoglicano linear, não sulfatado, que consiste em unidades dissacarídicas repetidas de ácido β (1 \rightarrow 4) - glicurônico (GlcUA) e β (1 \rightarrow 3) - N-acetilglicosamina (GlcNAc) (Kogan et al. 2007). A massa molecular do polímero pode variar de 10^4 a 10^7 Da, dependendo da fonte e dos procedimentos de extração e purificação utilizados (Lapcik et al., 1998). A estrutura do AH é mostrada na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura química do ácido hialurônico



Fonte: Adaptado de Wu (2011)

Além da estrutura primária, o AH apresenta estrutura secundária e terciária em solução aquosa. A estrutura secundária é estabilizada por ligações de hidrogênio inter e intramoleculares entre grupos carboxila e N-acetilglicosamina que geram faces hidrofóbicas formadas por átomos de hidrogênio axiais (SCOTT et al., 1991). Tais emplastros hidrofóbicos favorecem energeticamente a formação de uma estrutura de fita torcida, originando a estrutura terciária como resultado da agregação molecular. A estrutura terciária é estabilizada por interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio (HASCALL; LAURENT, 1997; BROWN; JONES, 2005).

Em solução aquosa, o comportamento do AH passa de Newtoniano para não-Newtoniano com o aumento da massa molecular, concentração, ou taxa de cisalhamento. Além disso, os aumentos na concentração e massa molecular do AH elevam a viscoelasticidade da solução. Esta, por sua vez, é dependente do pH e é afetada pela força iônica do meio. O valor de pKa dos grupos carboxílicos dos resíduos de ácido D-glicurônico encontra-se próximo de 3. Por conseguinte, uma alteração no pH irá afetar a ionização das cadeias de AH, e essas variações irão alterar as interações moleculares do polímero e suas propriedades reológicas (BROWN; JONES, 2005).

3.1.2 Propriedades

As propriedades químicas e biológicas do AH, tais como capacidade de retenção de água, viscoelásticas e antioxidantes, fazem do polímero um produto de interesse para aplicações médicas, odontológicas, farmacêuticas e cosméticas, incluindo tratamento de osteoartrite (YU et al. 2014), cirurgia oftálmica (KRETZ; LIMBERGER; AUFFARTH, 2014), cirurgia plástica (COLEMAN, 2006), liberação controlada de drogas (TRIPODO et al., 2015), periodontite (FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017), hidratantes para a pele e cicatrização de feridas (SHIN et al., 2016).

3.1.2.1 Capacidade de retenção de água

O AH apresenta elevada capacidade de retenção de água. Em solução aquosa, as ligações de hidrogênio ocorrem entre as carboxilas adjacentes e o os grupos N-acetil, permitindo que o AH mantenha a rigidez conformacional e retenha a água (DAHIYA; KAMAL, 2013). De acordo com Sutherland (1998), a capacidade de ligação do polímero à água está correlacionada com a massa molecular. Quanto maior a massa molecular maior a quantidade de água retida. Guillaumie et al. (2010) verificaram que a capacidade de retenção de água do AH de massa molecular 770 KDa, 1140 KDa e 1500 KDa variou de 4 – 5 g.g⁻¹.

Presente na matriz extracelular, o AH exerce uma modulação importante na hidratação do tecido e no equilíbrio osmótico (NECAS et al., 2008). Essa propriedade é importante à proliferação e migração celular (CHEN; ABATANGELO, 1999). A capacidade de retenção de água é explorada em procedimentos de

preenchimento de linhas faciais e rugas. Após a injeção do AH na área específica, o polímero pode aumentar a correção em 10 – 15%, uma vez que esse se incha absorvendo água da atmosfera circundante (MOHEIT; COLEMAN, 2006).

3.1.2.2 Propriedades reológicas

As propriedades reológicas das soluções do polímero depende da concentração e massa molecular do AH. Acima do ponto de emaranhamento, a viscosidade aumenta exponencialmente com a concentração e a elasticidade aumenta com o peso molecular e concentração (LAURENT; LAURENT; FRASER, 1996). Para atingir o ponto de emaranhamento, Ambrosio et al. (1999) verificaram que o aumento na massa molecular do AH é mais eficaz que o aumento na concentração. Na concentração de 20 mg.mL⁻¹ o AH de massa molecular 150 kDa apresentou características Newtonianas em taxas de cisalhamento de 10⁰ a 10³ s⁻¹, sendo que nenhum emaranhamento ocorreu entre as cadeias do polímero. O comportamento pseudoplástico foi observado para o polímero de massa molecular 1,2 MDa. O comportamento reológico dessas soluções é típico das redes emaranhadas. Os autores relatam que em baixa frequência de oscilação, a solução apresentou comportamento viscoso, enquanto em alta frequência um comportamento elástico foi observado (AMBROSIO et al., 1999). De acordo com Balazs (1958), a concentração crítica de emaranhamento para o AH de massa molecular de 2 × 10³ – 3 × 10³ kDa é de aproximadamente 0,54 – 1 mg.mL⁻¹.

A natureza viscoelástica do polímero pode influenciar nas funções celulares e pode contribuir para dificultar a passagem de vírus e bactérias através da zona pericelular rica em AH. Como componente do humor vítreo do olho e do líquido sinovial, a viscoelasticidade do AH apresenta uma importante função de amortecimento e lubrificação (CHEN; ABATANGELO, 1999). A viscoelasticidade do AH é a principal característica responsável pela sua aplicação na cirurgia oftálmica. A alta viscosidade da solução de AH permite manipular tecidos oftalmológicos e manter o espaço cirúrgico (SCHIRALDI; GATTA; ROSA, 2003).

3.1.2.3 Biocompatibilidade, biodegradabilidade e não-antigenicidade

A biocompatibilidade, biodegradabilidade e a não-antigenicidade do AH fazem do polímero um material adequado para uso em oftalmologia (CALLES et al., 2016), preenchimento (MOHEIT; COLEMAN, 2006), tecido periodontal (MIRANDA et al., 2016), engenharia de tecidos (EBRAHIMI-HOSSEINZADEH et al., 2016) e administração de fármacos (SGORLA et al., 2016). Essas propriedades estão presentes tanto no AH extraído de fontes animais quanto no AH produzido por bactérias. O AH microbiano é quimicamente idêntico ao polissacarídeo do mamíferos e assim garante sua não imunogenicidade (Chong and Nielsen 2003). Além disso, a biocompatibilidade e biodegradabilidade de polímeros naturais como AH, garantem uma similaridade do polímero com a matriz extracelular, propriedade que é explorada no campo da medicina, para tratamento de feridas e queimaduras (MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014).

3.1.2.4 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do AH é controversa e poucos estudos foram realizados para avaliar esse efeito do polímero. Pirnazar et al. (1999) sugeriram que o AH de alta massa molecular pode ser benéfico na redução da contaminação bacteriana em cicatrização de feridas. Esses autores observaram que 1 mg.mL⁻¹ do AH de massa molecular elevada (1.300 kDa) não teve efeito bactericida, mas apresentou efeito bacteriostático, inibindo o crescimento de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella oris*, *Staphylococcus aureus* e cepas de *Propionibacterium acnes*. Kang et al. (2011) observaram que o AH retardou o crescimento, mas não causou a morte da célula de *Candida*. Ardizzoni et al. (2011) mostraram que diferentes espécies microbianas e, às vezes, diferentes cepas pertencentes à mesma espécie, são afetadas de forma diferente pelo polímero. A inibição no crescimento microbiano dose-dependente foi observada para Staphylococci, Enterococci, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida glabrata* e *C. parapsilosis*. Contudo, não apresentou efeito para a estirpe *E. coli* ATCC 13768. O crescimento de *C. albicans*, e *S. sanguinis* foi favorecido pelo polímero a 4 mg.mL⁻¹ (ARDIZZONI et al., 2011). A atividade antiviral do AH foi também observada por esse grupo de pesquisa (CERMELLI et al., 2011).

Em controvérsia, Cerbo et al. (2013) não observaram qualquer atividade antimicrobiana do AH quando testadas estirpes de bactérias lácticas, mas, ao invés disso, a viabilidade bacteriana aumentou na presença do polímero, sugerindo que o AH pode ser aplicado em uma nova fórmula oral probiótica. Tang, Hou, and Chen (2002) não verificaram efeito bacteriostático do AH para *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Costagliola et al. (1996) verificaram um aumento em cerca de 50% no crescimento de *Staphilococcus* e *Streptococcus* em 72 h de cultivo utilizando 0,7% de AH. Zhang et al. (2007) também observaram um aumento da biomassa de *S. pyogenes* em meio enriquecido com AH, assim como o aumento na regulação dos fatores de virulência. Segundo esses autores, a capacidade de degradar o polímero deve ser considerada como um fator de virulência de streptococcal.

Em algumas aplicações do AH, tais como cicatrização de feridas, cirurgias oftalmológicas e tratamentos de periodontites, as infecções ainda não são completamente evitadas (LEQUEUX et al., 2014). Segundo Kemp et al. (2009), os glicosaminoglicanos são açúcares e podem suportar o crescimento microbiano quando usado nestas aplicações. Logo, devido à sua atividade antimicrobiana controversa, o AH tem sido utilizado em combinação com agentes antimicrobianos, como nanopartículas de prata (KEMP et al., 2009; ABDEL-MOHSEN et al., 2013; CHUDOBOVA et al., 2013; MOHANDAS et al., 2015), antibiótico (AHIRE; DICKS, 2016) e quitosana (HOYO-GALLEGOA et al., 2016). Kemp et al. (2009) observaram uma concentração inibitória mínima de 0,025 e 0,1 μM para soluções de nanopartículas de prata combinadas ao AH para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. O uso da solução de AH isolado não exibiu atividade antimicrobiana para concentrações de até 1 μM para ambas as bactérias. Atividade antimicrobiana também não foi observada em concentrações variando de 1 a 10 mg.mL^{-1} para *S. epidermidis* e *S. aureus*, enquanto o AH combinado com nisina exibiu elevada atividade antimicrobiana em ambas as espécies bacterianas. Nesse estudo, atividade antibacteriana de 99,50% foi observada para *S. epidermidis* utilizando solução de 1 mg.mL^{-1} de AH- $\text{N}_{0,01}$ (0,01 eq de nisina utilizada na reação em relação a um ácido carboxílico do AH) e aproximadamente 99,95% para *S. aureus* utilizando 2 mg.mL^{-1} de AH- $\text{N}_{0,01}$ (LEQUEUX et al., 2014). Hernández-Montelongo (2016) produziram nanofilmes de ácido hialurônico e quitosana associando a capacidade do AH de formar filmes flexíveis, altamente hidratados e não tóxicos com a propriedade

antimicrobiana da quitosana. Os filmes apresentaram atividade antibacteriana contra *Xylella fastidiosa*.

3.1.2.5 Atividade antioxidante

O AH exibe efeito antioxidante, pois atua como agente sequestrante de radicais livres, o que aumenta a proteção da pele em relação à radiação UV e contribui para aumentar a capacidade de reparação tecidual (GUILLAUMIE et al., 2006). O mecanismo pelo qual o AH reduz os danos dos radicais livres esta baseado em sua estrutura, a qual apresenta ligações cruzadas com grupos carboxílicos. Desta forma, esses grupos carboxílicos podem interagir com íons metálicos como Cu^{2+} e Fe^{2+} , permitindo que essas moléculas funcionem como quelantes de metais (CAMPO et al., 2004).

Estudos revelaram que o AH apresenta atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro* (ROSA et al., 2008; EL-SAFORY; LEE, 2010; KANCHANA et al., 2013). A atividade antioxidante *in vitro* pode ser determinada usando diferentes metodologias: inibição da peroxidação lipídica, e redução dos radicais hidroxila, 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS) e eliminação de ânions superóxido. Ke et al. (2011) mostraram forte inibição (92,86%) da peroxidação lipídica com o uso de $1120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do AH com massa molecular de $1,45 \times 10^5$ e moderada atividade (59,38% em $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AH) eliminadora dos radicais DPPH. A atividade sequestrante de radicais DPPH por AH de massa molecular $1,35 \times 10^3$ kDa na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi de 41% (PAN et al., 2017). O efeito antioxidante do AH na eliminação do radical DPPH é devido à sua capacidade de doação de hidrogênio, uma vez que o DPPH aceita um elétron ou um radical de hidrogênio para formar uma molécula diamagnética estável (ANRAKU et al., 2015). Anraku et al. (2015) também avaliaram a atividade sequestrante do AH nos radicais DPPH e ABTS e sugeriram que o AH é um antioxidante potencial. Os autores mostraram uma concentração inibitória de 50% para $1,69 \text{ mg.mL}^{-1}$ de AH em DPPH e a redução do radical ABTS atingiu 100% em $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de AH em 5 h.

In vivo, a atividade antioxidante de AH com alto peso molecular (1000 kDa) foi estudada em células epiteliais da córnea humana, utilizando o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como o agente indutor do estresse oxidativo. Os resultados mostraram que a incubação a 0,2% de AH com células durante 30 min

levou a uma diminuição na síntese de espécies reativas de oxigênio e decréscimo do dano do DNA induzido por EDTA (YE et al., 2012). Estudos em pacientes com osteoartrite mostraram que as injeções intracelulares de AH reduzem os níveis de peróxido de hidrogênio e superóxido no fluido sinovial (Yu et al. 2014). Em modelo de camundongos imunossuprimido induzido por ciclofosfamida (CY), Ke et al. (2011) também mostraram que a administração oral de AH de baixo peso molecular foi capaz de superar a imunossupressão induzida por CY e aumentar significativamente a atividade de superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e capacidade antioxidante total. Trabucchi et al. (2002) relataram que AH de baixa massa molecular é capaz de permear a pele, protegendo o tecido de granulação de espécies reativas de oxigênio estimulando a cicatrização de feridas.

3.1.2.6 Funções Biológicas

Nos vertebrados, o AH é um componente importante da matriz extracelular (GALL, 2010). Altas concentrações de AH são encontradas no cordão umbilical (4,1 mg.mL⁻¹), líquido sinovial (1,4 a 3,6 mg.mL⁻¹) e humor vítreo dos olhos (0,14-0,34 mg.mL⁻¹). Contudo, a maior concentração está na pele, a qual retém 50% do AH do corpo humano (KOGAN et al., 2007; MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009). Estima-se que no corpo de uma pessoa de 70 Kg, cerca de 15 g de AH é encontrada nos diferentes tecidos (GALL, 2010).

As funções do AH estão associadas às suas propriedades reológicas. Enquanto os fragmentos de AH estimulam a expressão de genes por meio de diferentes células que regulam as respostas inflamatórias e o reparo tecidual, o ácido hialurônico presente na superfície celular fornece proteção contra danos nos tecidos causados pelo meio ambiente e promove a regeneração e reparação (LIANG; JIANG; NOBLE, 2016).

No fluido sinovial, devido à sua viscoelasticidade e propriedade hidratante, o AH fornece a lubrificação necessária às articulações, atuando como amortecedor de choque, reduzindo a fricção durante o movimento dos ossos e diminuindo o desgaste. Na cartilagem, atua como um elemento estrutural da matriz extracelular, formando um centro de agregação para proteoglicanos, os quais mantêm a estrutura macromolecular devido suas interações específicas. Na pele, o polímero retém água no tecido, alterando o volume dérmico e compressibilidade. Alterações na massa

molecular e concentração de AH no corpo humano são observadas durante o envelhecimento, cicatrização de feridas e doenças degenerativas (KOGAN et al., 2007).

No processo de cicatrização de feridas, o AH e seus fragmentos desempenham um papel essencial promovendo o aumento da contração da ferida e proliferação epidérmica, regulação de citocinas e adesão de moléculas, aumento da deposição de colágeno e estimulam a neovascularização. Adicionalmente, devido ao seu efeito antioxidante, o AH protege a ferida contra os radicais livres (CHEN; ABATANGELO, 1999; BROWN, 2004).

3.2 PRODUÇÃO MICROBIANA DO ÁCIDO HIALURÔNICO

Tradicionalmente, o ácido hialurônico é extraído quimicamente de tecidos animais, como crista de galo, cordão umbilical e humor vítreo de boi. No entanto, esses recursos são limitados e o AH desses tecidos geralmente está associado a proteoglicanos e frequentemente contaminado com enzimas que degradam o polímero, tornando a obtenção do AH de alta pureza e alto peso molecular muito difícil e dispendioso (YAMADA; KAWASAKI, 2005). Além disso, a utilização de compostos bioquímicos derivados de animais para uso humano não são recomendados devido aos riscos de contaminação viral e de outros agentes infecciosos. Portanto, a produção microbiana vem substituindo a extração de tecidos animais, com menor custo de produção, purificação mais eficiente, maior rendimento e menos poluição ambiental. Os produtos microbianos encontraram um campo de aplicações muito grande em medicina clínica (CHONG et al., 2005; LIU et al., 2011; MOSCOVICI, 2015).

Streptococcus dos grupos A e C de Lancefield e *Pasteurella multocida* são bactérias que produzem o AH naturalmente. Dentre as cepas selvagens de *Streptococci* capazes de produzir o AH estão *Streptococcus equisimilis*, *S. pyogenes* e *S. uberis*. Contudo, entre estas, a espécie *Streptococcus equi* subsp. *equi* e *S. equi* subsp. *zooepidemicus* são as mais utilizadas comercialmente (MARCELLIN; STEEN; NIELSEN, 2014; DE OLIVEIRA et al., 2016).

Alternativamente, engenharia metabólica tem sido usada para obter cepas recombinantes produtoras de AH. Inicialmente, foram criadas cepas recombinantes de *Bacillus subtilis* e *E. coli* para a produção do polímero (WIDNER et al., 2005; YU;

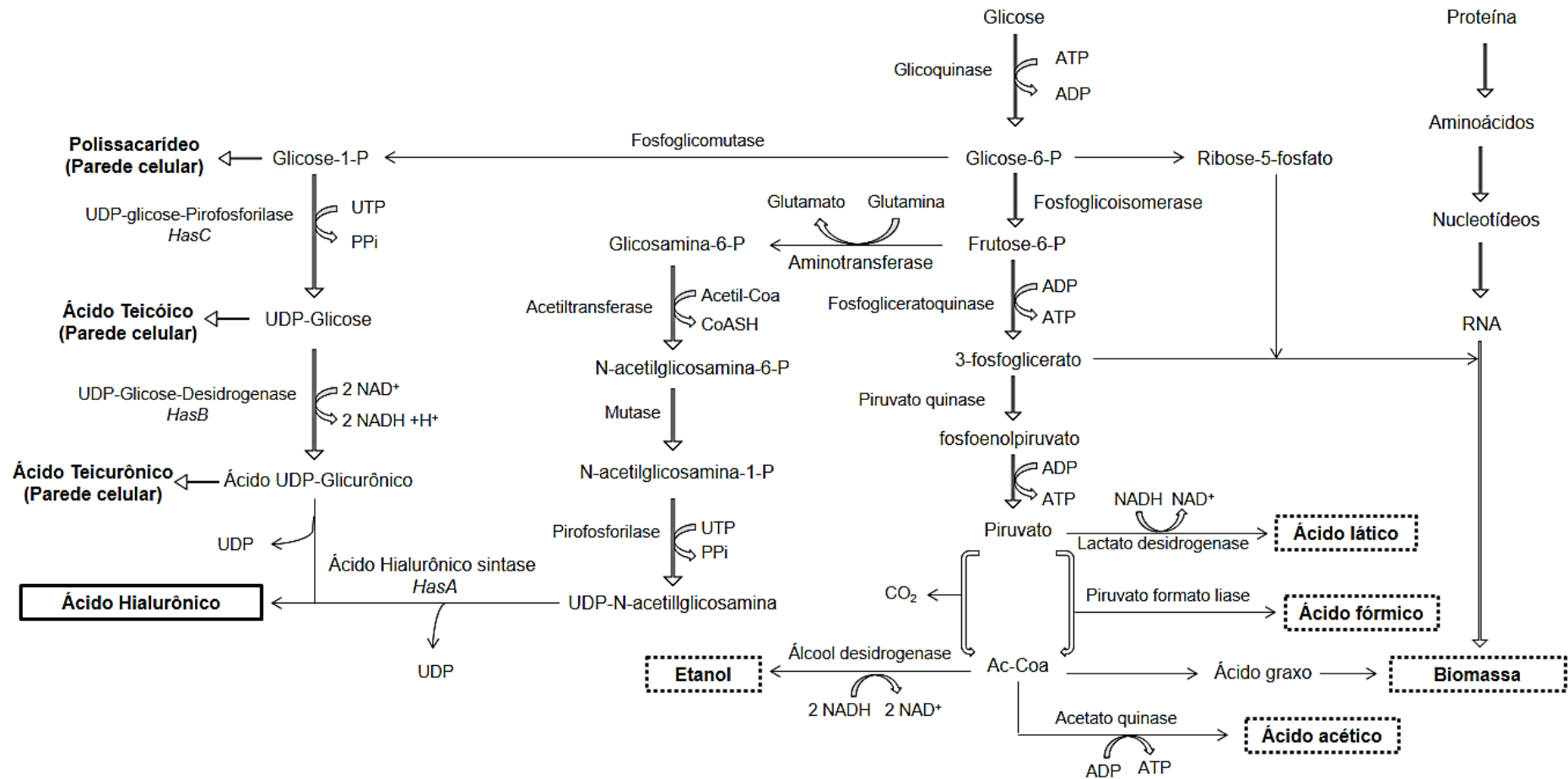
STEPHANOPOULOS, 2008; MAO; SHIN; CHEN, 2009; JIA et al., 2013). Atualmente, o AH já foi produzido por uma grande variedade de hospedeiros heterólogos como *Lactococcus lactis* (PRASAD; JAYARAMAN; RAMACHANDRAN, 2010), *Pichia pastoris* (JEONG; SHIM; KIM, 2014), *Agrobacterium*, *Corynebacterium glutamicum* (CHENG et al., 2016) e *Pasteurella* (CHU et al., 2016).

3.2.1 Produção de Ácido Hialurônico por *Streptococcus*

Streptococcus produzem AH como uma cápsula extracelular. Estas cápsulas são conhecidas como fatores de virulência por protegerem a célula bacteriana do sistema imune de organismos superiores que não a reconhecem como um corpo estranho. Adicionalmente, *Streptococcus* são bactérias Gram-positivas, catalase negativas, anaeróbias facultativas com algumas estirpes aerotolerantes, que não esporulam e produzem ácido láctico como subproduto do catabolismo da glicose (CHONG et al., 2005).

A Figura 2 descreve a via metabólica de biossíntese do AH por *Streptococcus zooepidemicus*. O AH é obtido da polimerização dos açúcares precursores UDP-glicurônico e UDP-N-acetilglicosamina pela enzima ácido hialurônico sintase (TLAPAK-SIMMONS, 1999). Em *Streptococcus*, as unidades de ácido UDP-GlcUA e UDP-GlcNAc são derivadas de glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, respectivamente (Figura 2) (CHONG et al., 2003). O processo consome 4 moles de ATP para produzir 1 mol da unidade dissacarídica, sendo 2 moles consumidos nas reações mediadas pela glicoquinase para fornecer as hexoses precursoras fosforiladas e 2 moles de ATP utilizados para regenerar os doadores UTP. A reação de oxidação catalisada pela UDP-glicose desidrogenase gera 2 moles de NADH para cada 1 mol de AH produzido (YAMADA; KAWASAKI, 2005).

Figura 2 - Via metabólica de biossíntese do ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus*.



Fonte: O próprio autor, 2017

Em *Streptococcus*, a biossíntese do polímero compete pelas fontes de carbono com o crescimento celular, via glicolítica e via das pentoses-fosfato (SHAH; BADLE; RAMACHANDRAN, 2013). Contudo, as necessidades biossintéticas de bactérias lácticas são em grande parte supridas por fontes de nitrogênio complexas. Logo, elevada quantidade da fonte de carbono é convertida nos produtos de fermentação, sendo baixos níveis recuperados na biomassa (CHONG et al., 2005). Aproximadamente 5 a 10% do carbono metabolizado são direcionados à produção de ácido hialurônico (CHONG et al., 2003) e 90% convertido em ácido láctico. No entanto, sob determinadas condições, o metabolismo homolático pode ser perdido e elevadas quantidades de ácido fórmico (em condições anaeróbicas), acético e etanol são produzidos, caracterizando o metabolismo heterolático (GARRIGUES et al., 2001). O redirecionamento do fluxo de carbono do ácido láctico para o ácido acético pode favorecer a produção de AH, pois a síntese de ácido acético gera ATP, necessário para a produção do polímero (CHONG et al., 2003) .

3.2.2 Fermentação e Condições de Cultivo

Os estudos de produção de ácido hialurônico por fermentação têm enfatizado as condições de cultivo, avaliando o metabolismo celular e sua regulação, visando maior rendimento e controle da massa molecular (SHAH; BADLE; RAMACHANDRAN, 2013). Tradicionalmente o polímero é produzido por fermentação em batelada, em temperaturas próximas a 37°C e pH 7,0 (LIU et al., 2011). Contudo, apesar da enzima ácido hialurônico sintase apresentar um pH ótimo em 7,1 (STOOLMILLER; DORFMAN; BTRY, 1969), trabalhos recentes evidenciam um aumento na produção do polímero quando a bactéria é exposta à condições de estresse na qual a célula produz a cápsula de AH para se proteger do meio alcalino ou ácido (LIU et al., 2008; PIRES; SANTANA, 2010).

Liu et al. (2008) investigaram uma estratégia de cultivo de *S. zooepidemicus* WSH-24 sob estresse alcalino intermitente, variando pH de 7,0 para 8,5; o que aumentou a produção do AH de 5 g.L⁻¹ (fermentação com pH fixo em 7,0) para 6,5 g.L⁻¹. Os autores justificam que o fluxo de carbono foi redirecionado, aumentando a produção de ácido hialurônico em 30% e decrescendo a síntese de biomassa em 24%. Pan et al. (2015) observaram o efeito significativo ($p < 0,001$) do pH

por delineamento Box-Behken e concluíram que a condição ótima para produção do polímero é em pH 8,0. O efeito do controle do pH na produção do polímero também foi avaliado. Pan et al. (2017) observaram um aumento na concentração de AH de 2,86 vezes quando comparada a fermentação com controle de pH em 8,0 com a realizada sem controle de pH (pH inicial 8,0). O pH controlado em 8,0 também gerou aumento na produção de ácido láctico, acético e biomassa.

A temperatura de 37°C foi reportada como condição ótima para a produção do polímero por *Streptococcus zooepidemicus* (PAN et al., 2015a). A mesma também foi reportada para a produção de *Streptococcus equi* KFCC 10830, sendo que em temperaturas abaixo de 37°C a massa molecular do polímero também foi reduzida (KIM et al., 1996). Efeito significativo da temperatura para a produção do polímero também foi observado utilizando delineamento Plackett-Burmann em que a maior produção do AH foi a 40 °C (KHUE; VO, 2013).

A disponibilidade de oxigênio é outro fator que influencia na produção do polímero uma vez que o fluxo de carbono é direcionado da produção de ácido láctico para a de ácido acético, levando ao aumento da síntese de ATP (2 moles de ATP/mol de ácido láctico; 3 moles de ATP/ mol de ácido acético) (CHONG et al., 2003; DUAN et al., 2009). Além disso, o oxigênio gera um estresse oxidativo sobre a célula, estimulando a produção do AH pelo mecanismo de proteção (HASEGAWA et al., 1999; HUANG; CHEN; CHEN, 2006). Oliveira et al. (2013) avaliaram a produção do AH em condições anaeróbias e com aeração de 2 vvm, as quais resultaram em 0,12 g.L⁻¹ e 1, 88 g.L⁻¹ do polímero, respectivamente. Jagannath e Ramachandran (2010) mostraram um acréscimo de 28% na produção e aumento de 11% na massa molecular do polímero quando comparado o cultivo anaeróbio com o cultivo nas condições de 1 vvm e 30% de oxigênio dissolvido (OD) (agitação variando de 200 – 800 rpm). Esses autores também observaram um decréscimo na produção de ácido láctico e aumento na concentração de ácido acético em condições aeróbias.

O acúmulo de AH durante sua biossíntese gera um aumento significativo na viscosidade do meio de cultivo. Logo, maiores níveis de agitação são requeridos de modo a manter as condições aeróbias durante a fermentação. No entanto, elevadas taxas de OD e altos níveis de agitação foram associados com a redução na massa molecular, devido a degradação do AH por espécies reativas de oxigênio e danos mecânicos (DUAN et al., 2008; DUAN et al., 2009). Duan et al. (2009) verificaram um aumento das espécies reativas de oxigênio em cultivos com OD ≥ 50%.

Uma alternativa para melhorar o fornecimento de oxigênio, portanto, é aumentar sua solubilidade no meio pela adição de vetores de oxigênio (LIU et al., 2009b). A adição de 0,05% de n-dodecano gerou um aumento de 73% na produção do AH e sua massa molecular aumentou de $5,2 \times 10^6$ Da para $1,54 \times 10^7$ Da (LAI et al., 2012). O uso de antioxidante para inibir a formação de espécies reativas de oxigênio também foi reportado (ZHANG; DUAN; TAN, 2010; SHAH; BADLE; RAMACHANDRAN, 2013). Im et al. (2009) observaram um aumento de 17% na produção do polímero quando adicionado 0,05% (v/v) de ácido oxálico. Zhang, Duan e Tan (2010) relataram um aumento de 33% na massa molecular do polímero quando $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido salicílico foi adicionado. Porém, de modo controverso, têm-se que Liu et al. (2009b) e Macedo e Santana (2012) adicionaram ácido ascórbico no meio de cultivo, visando a despolimerização do AH para a obtenção de um produto de baixa massa molecular. Macedo e Santana (2012) observaram um decréscimo da massa molecular de $2,5 \times 10^5$ Da para $2,0 \times 10^4$ Da e aumento de 56% na produtividade do AH quando a concentração de ácido ascórbico aumentou de 1,7 para 10 mg.mL^{-1} .

A composição do meio de cultivo também influencia diretamente no metabolismo da bactéria. *Streptococcus* requer meio de cultivo rico em aminoácidos, bases nucleotídicas e vitaminas, necessárias ao crescimento microbiano e produção do polímero. Esses requerimentos são tipicamente encontrados em fontes de nitrogênio complexas, como peptonas e extrato de levedura (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009). Além disso, as fontes de nitrogênio orgânico são consideradas essenciais para o bom crescimento do microrganismo, uma vez que existem evidências de que estes componentes fornecem elevada quantidade do carbono requerido para a biossíntese celular (ARMSTRONG; COONEY; JOHNS, 1997).

Em diferentes meios de cultivo, extrato de levedura mostrou ser a variável explicativa com maior efeito positivo para a produção de AH, sendo esta significativa ($p < 0,001$) (PAN et al., 2015a, 2017). Patil, Kamalja e Chaudhari (2011) também verificaram por ensaios estatísticos que a peptona de soja apresentou elevado efeito ($p < 0,001$) na produção do polímero por *S. zooepidemicus* MTCC 3523.

A glutamina é um dos aminoácidos considerados essenciais ao *Streptococcus* (ARMSTRONG; COONEY; JOHNS, 1997). Sua adição ao meio de cultivo é conhecida por aumentar a produção de AH devido a esta ser doadora do grupo amino para a síntese de N-acetilglicosamina (IM et al., 2009; AROSKAR; KAMAT; KAMAT, 2012). Shah, Badle e Ramachandran (2013) observaram que a

adição de 5 g.L^{-1} de glutamina ao meio de cultivo gerou decréscimo na síntese de ácido láctico e aumento na concentração de biomassa. A produção de AH aumentou de 2 g.L^{-1} para $3,3 \text{ g.L}^{-1}$. Porém, não houve efeito significativo sobre a massa molecular do polímero. Adicionalmente, a avaliação do fluxo de carbono mostrou um decréscimo na síntese de frutose-6-fosfato e aumento na produção de ribose-5-fosfato, ácido UDP-glicurônico e N-acetilglicosamina. Logo, os resultados mostraram que um possível balanço no fluxo de carbono para os precursores UDP-GlcUA e UDP-GlcNAc levou ao aumento na produção de AH.

Trabalhos indicaram uma correlação positiva entre a concentração intracelular de UDP-GlcNAc e a massa molecular do polímero (CHEN et al., 2009, 2014; BADLE; JAYARAMAN; RAMACHANDRAN, 2014), o que pode ser justificado pela afinidade do precursor pela enzima hialuronato sintase. O valor de K_m , concentração de substrato necessária para que a enzima atinja a metade da sua velocidade máxima, para UDP-GlcNAc é de $150 - 1.000 \mu\text{M}$, enquanto para UDP-GlcUA é significativamente menor, $30 - 75 \mu\text{M}$, mostrando maior especificidade (ITANO et al., 1999; TLAPAK-SIMMONS, 1999). Logo, maiores concentrações de UDP-GlcNAc são requeridas para manter a função da enzima hialuronato sintase (MARCELLIN; STEEN; NIELSEN, 2014).

Im et al. (2009) também 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.

O rendimento de ATP durante o catabolismo pode ser aumentado por limitação de carbono. No entanto a limitação da glicose reduz a massa molecular do AH devido a um inadequado suprimento de açúcares à AH sintase. Por tanto, a utilização de açúcares complexos, como amido e sacarose, em excesso tem sido relacionada a um maior rendimento de ATP. Em síntese, tem-se que a natureza e o nível de complexidade da fonte de carbono pode alterar o processo glicolítico regulando a produção e massa molecular do polímero (CHONG et al., 2003; JAGANNATH; RAMACHANDRAN, 2010).

Pan et al. (2015b) observaram maior produção de ácido hialurônico em sacarose ($0,488 \text{ g.L}^{-1}$), comparado a glicose ($0,429 \text{ g.L}^{-1}$). A concentração de glicose avaliada por ensaio fatorial não apresentou efeito significativo para a produção do

polímero quando avaliada concentrações de 10 a 30 g.L⁻¹ (PAN et al., 2015a). Patil, Kamalja e Chaudhari (2011) obtiveram que a concentração ótima de glicose para a produção do polímero foi de 40,5 g.L⁻¹.

Fatores que inibem parcialmente a via glicolítica também tem sido estudados, visando maior produção de AH. A adição de 25 µM de iodoacetato de sódio, 5 g.L⁻¹ de triptofano e 10 g.L⁻¹ de piruvato aumentaram a massa molecular para 3,2; 3,2 e 3,1 MDa, respectivamente, comparado ao controle (2,4 MDa). O aumento na produção do polímero (50%) foi mais pronunciada com a adição de iodoacetato de sódio (25 µM), o qual reduziu a síntese de ácido láctico de 18,6 g.L⁻¹ para 10 g.L⁻¹, indicando o decréscimo da função glicolítica (SHAH; BADLE; RAMACHANDRAN, 2013).

Outra estratégia já utilizada que indicou um efeito positivo na produção e no aumento da massa molecular do polímero por *Streptococcus* foi a adição de lisozima no meio de cultivo (KIM et al., 1996). Jagannath e Ramachandran (2010) avaliaram a adição de 20.000 e 60.000 U.L⁻¹ de lisozima no meio, após 4 h e 7 h, respectivamente, e os resultados indicaram um aumento de 46% na massa molecular e 27% para a produção do polímero. Esse aumento, pode ser devido à detecção dos danos provocados pela lisozima, na camada de peptidoglicano e a resposta celular para repará-los, desviando o fluxo de carbono para a síntese de AH. Sun et al. (2012), por sua vez, estudaram o efeito da adição de 80 mg.L⁻¹ de fosfatidilcolina ao meio de cultivo no início da fase exponencial de *S. zooepidemicus*. O redirecionamento no fluxo de carbono da via glicolítica e síntese de biomassa para a produção de AH foi observado, o que resultou no aumento de 17,4% e 67,1% na produção e massa molecular do polímero, respectivamente. A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa dos ácidos graxos da membrana do plasma mostrou que a adição de fosfatidilcolina pode promover a mobilidade e a permeabilidade da membrana celular, facilitando a passagem do polímero pela membrana, o que diminui o consumo de energia.

3.2.3 Substratos Alternativos para Produção de Ácido Hialurônico

O alto custo das matérias-primas para o meio de cultivo, principalmente fontes de nitrogênio e de carbono comerciais (VÁZQUEZ et al., 2010), reduzem a competitividade do AH microbiano no mercado. Estima-se que aproximadamente 80%

do custo de produção do polímero são devido a esses nutrientes (açúcares e proteínas). A formulação de meios de fermentação econômicos é então um tema chave para manter os baixos custos da produção de AH microbiano em comparação com a extração de fontes animais (VÁZQUEZ et al., 2010; AMADO et al., 2016).

O uso de recursos renováveis de baixo custo e subprodutos agroindustriais, em meio de fermentação é uma alternativa para tornar a produção do AH economicamente viável (AMADO et al., 2017). Resíduos e subprodutos agroindustriais, em sua maioria, apresentam composição rica em açúcares, minerais e proteínas, condições estas, ideais para o crescimento de microrganismos (MUSSATTO et al., 2012). Para a produção de ácido hialurônico, os subprodutos e resíduos agroindustriais já estudados são: caldo e melação de cana-de-açúcar, suco de caju, soro de leite e de queijo, leite desnatado, proteína e melação de soja e milhocina. Adicionalmente, subprodutos marinhos como peptonas obtidas a partir de resíduos de víscera de peixe e águas residuais do processamento de mexilhões também foram explorados (Tabela 1).

Uma simples análise de custo estima que a utilização de meios de cultivo formulados com subprodutos pode reduzir em mais de 50% o custo do processo, quando comparada com as fermentações em meios sintéticos (VÁZQUEZ et al., 2010; AMADO et al., 2016). O soro de leite, subproduto da fabricação de queijos, e as peptonas geradas a partir de resíduos da pesca demonstraram ser um substituto adequado às peptonas comerciais na produção do polímero (AMADO et al., 2016).

Pires et al. (2010) e Pan et al. (2015b) estudaram subprodutos agroindustriais, tais como hidrolisado de proteína de soja, concentrado proteico de soro de leite, suco de caju, melação e caldo de cana-de-açúcar, melação de soja e milhocina para a produção de AH por *S. zooepidemicus* ATCC 39920. Suco de caju, suplementado com extrato de levedura, mostrou-se um meio promissor para a produção de AH. Posteriormente, Macedo e Santana (2012) exploraram a alta concentração de vitamina B e ácido ascórbico no suco de caju para a produção de AH de baixa massa molecular ($10^3 - 10^4$ Da) e obtiveram $0,28 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de AH.

Melação de cana-de-açúcar foi pela primeira vez estudado na produção de AH por Pan et al (2015b). Subproduto da fabricação de açúcar, apresenta alta concentração de sacarose, glicose, frutose e uma grande variedade de sais e fontes de nitrogênio, que são essenciais ao metabolismo microbiano (OLIVEIRA et al., 2007; XU; XU, 2014). Os autores verificaram um maior rendimento de AH ($0,066 \text{ g.g}^{-1}$) em

meio contendo melaço de cana-de-açúcar bruto, quando comparado aos meios contendo sacarose ou glicose (PAN et al., 2015b).

Tabela 1 - Produção de ácido hialurônico em diferentes meios de fermentação de baixo custo.

Cepa Bacteriana	Condições de Cultivo	Fonte de Carbono e Nitrogênio (g.L ⁻¹)	Ácido Hialurônico (g.L ⁻¹)	Referências
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	250 mL Erlenmeyer; 37°C; 150 rpm; pH inicial 7.5	Suco de caju (45 de glicose) e extrato de levedura (54)	0,89	(PIRES et al., 2010)
<i>S. thermophilus</i> YIT 2084	2 L biorreator, 40°C; sem aeração; 100 rpm; pH 6.8	10% de leite desnatado e proteína de soja (10)	0,21	(IZAWA et al., 2010)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 35246	2 L biorreator; 37°C; sem aeração; 500 rpm; pH 6.7	Águas residuais do processamento de mexilhões (50), peptonas obtidas a partir de resíduos de víscera de atum (proteína 8) e extrato de levedura (5)	2,46	(VÁZQUEZ et al., 2010)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	3 L biorreator; 37°C; 150 rpm; 2 vvm, pH 7.0	Suco de caju (2 L) e extrato de levedura (60)	1,76	(OLIVEIRA et al., 2013)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	125 mL Erlenmeyer; 37°C; 100 rpm pH inicial 8.0	Melaço de cana (30) e extrato de levedura (30)	0,38	(PAN et al., 2015b)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	125 mL Erlenmeyer; 37°C; 100 rpm pH inicial 8.0	Sacarose (30) e proteína de soja(30)	0,22	(PAN et al., 2015b)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 35246	2 L biorreator; 37°C; sem aeração; 500 rpm; pH 6.7	Glicose (50), peptonas obtidas a partir de resíduos de víscera de peixe (proteína 5) e extrato de levedura (5)	2,32	(VÁZQUEZ et al., 2015)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 35246	5 L biorreator; 37°C; 1vvm; 500 rpm; pH 6.7	Glicose (50), lactose (50) soro de leite (proteína 5) e extrato de levedura (5)	4,0	(AMADO et al., 2016)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	4.5 L biorreator, 37°C; 100 rpm; 0.5 vvm; pH 8.0	Melaço de cana-de-açúcar pré-tratado (85,35) e extrato de levedura(50)	2,83	(PAN et al., 2017)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 35246	0,75 L biorreator; 37°C; 500 rpm; 1 vvm; pH 6,7	Milhocina (10% v/v) e glicose (50)	3,48	(AMADO et al., 2017)

Fonte: O próprio autor, 2017

Contudo, Amado et al. (2017) verificaram uma inibição no crescimento de *S. zooepidemicus* quando utilizado 10% (v/v) de melaço de cana-de-açúcar bruto. Os autores sugeriram que esta inibição pode ter sido causada pelo ácido láctico e compostos fenólicos presentes no melaço de cana-de-açúcar. Pan et al. (2017) compararam a produção de ácido hialurônico em melaço de cana-de-açúcar bruto e pré-tratado com o processo de clarificação em ensaios em Erlenmeyers e obtiveram um aumento de 0,557 g.L⁻¹ para 0,662 g.L⁻¹. Esse resultado sugeriu que o pré-tratamento com carvão ativado reduziu os níveis de inibição, por fatores como íons metais. Embora o melaço de cana-de-açúcar contenha nutrientes essenciais ao crescimento de microrganismos, esse também contém íons metais e suspensões coloidais que podem prejudicar o crescimento microbiano. Esses fatores podem influenciar no pH do meio e inativar enzimas associadas a biossíntese do produto (PAN et al., 2017).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de açúcar, sendo responsável por aproximadamente 20% das produções e 40% das exportações. Em média, considerando a última década, o país produziu 38.293 mil toneladas de açúcar, sendo que a última safra 2016/2017 foi de 38.734 mil toneladas (UNICA, 2017). Logo, considerando que para 1 tonelada de açúcar processado, 0,3 toneladas são descartadas (LI et al., 2015), estima-se que no Brasil 11,6 milhões de toneladas de melaço de cana-de-açúcar são gerados anualmente. Portanto, além de ser uma matéria prima de baixo custo e rica em nutrientes, o melaço de cana-de-açúcar é gerado em elevado volume no país o que o torna uma matéria-prima viável para a aplicação biotecnológica.

3.3 APLICAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO EM FILMES BIODEGRADÁVEIS

Crescente interesse no uso de polímeros naturais, como o ácido hialurônico, para aplicações biomédicas e farmacêuticas ocorre devido à sua habilidade de formação de filmes biocompatíveis e biodegradáveis. Trabalhos recentes estudam o desenvolvimento de novos materiais combinando ácido hialurônico com outros polímeros, sejam eles naturais ou sintéticos, para melhorar as propriedades físicas e biológicas visando aplicações nas áreas de engenharia de tecido e liberação controlada de fármacos. Adicionalmente, considerando o alto custo do ácido hialurônico (US\$ 2.000 a US\$ 60.000 kg⁻¹) e seus derivados (PIRES; SANTANA,

2010), a combinação desse com diferentes polímeros têm como vantagem reduzir o custo do material destinado às aplicações. Álcool polivinílico (PVA), celulose bacteriana, gelatina, ácido polilático, e quitosana são alguns dos polímeros que podem ser combinados com ácido hialurônico para síntese de novos materiais.

3.3.1 Engenharia de Tecidos

Na engenharia de tecidos, filmes são utilizados como matrizes extracelulares que suportam o crescimento de células e tecidos. Essas células passam por etapas de proliferação, migração e diferenciação em três dimensões, o que leva à formação de um tecido específico com funções apropriadas conforme seria encontrada no corpo humano. O filme aplicado nesta área deve ser biocompatível e deve eventualmente ser reabsorvido e substituído por tecido natural (COLLINS; BIRKINSHAW, 2013).

O AH é um polímero de interesse à engenharia de tecidos pois aplicações exógenas do AH facilitam a migração e proliferação celular (SU et al., 2014; FERRARI et al., 2015; SHIN et al., 2016). Além disso, os produtos de degradação do AH modulam a resposta inflamatória e estimulam a angiogênese (COLLINS; BIRKINSHAW, 2008). Contudo, a aplicação de filmes contendo apenas AH é limitada devido às propriedades mecânicas deficientes e elevada solubilidade em água (LOPES et al., 2014).

Sistemas de blendas de PVA e ácido hialurônico tem sido reportados como um material promissor para aplicações biomédicas (FAHMY et al., 2015; PIRINEN et al., 2015). PVA é um polímero hidrofílico sintético que não é tóxico, não cancerígeno, biocompatível, biodegradável e bio-adesivo (STASKO et al., 2009; FAHMY et al., 2015). Em escala industrial o PVA é obtido por hidrólise parcial ou completa de acetato de polivinila para remover os grupos acetato, com os graus parcialmente hidrolisados contendo grupos acetato residuais (TANG; ALAVI, 2011). Fahmy et al. (2015) produziram filmes de PVA-AH usando ciclos consecutivos de congelamento-descongelamento para reticulação. Os resultados mostraram que a incorporação de AH no filme de PVA afetou significativamente suas propriedades físico-químicas. O grau de intumescimento, as propriedades mecânicas, degradação hidrolítica e a adsorção de proteínas aumentaram com o aumento da concentração de AH na composição do hidrogel. Além disso, verificou-se alta viabilidade celular, não-

toxicidade e atividade antimicrobiana para *Candida albicans* nos filmes com concentração de AH inferior a 20 %. Kodavaty e Deshpande (2014) também verificaram que filmes de PVA-AH apresentaram propriedades superiores a do filme contendo somente AH. Guerra et al. (1994) verificaram a citotoxicidade *in vitro* e citocompatibilidade usando técnicas de cultura de células. Nas concentrações de AH testadas (0 – 50% p/p) os filmes não foram citotóxicos, porém, o AH não aumentou a adesão celular dos filmes.

Membranas híbridas de celulose bacteriana e AH podem ser produzidas *in situ* e sugerem que o AH interage com as fibrilas de celulose bacteriana sub-elementares, alterando as propriedades das membranas (LOPES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017). Zhou et al. (2013) estudaram a degradação e propriedades biológicas dos andaimes compostos de gelatina e ácido hialurônico. Os autores observaram que os filmes apresentaram boa compatibilidade com sangue e não apresentaram toxicidade sistêmica aguda.

Um novo produto para curativo de feridas composto de quitosana e AH (0,25% p/p) foi proposto por Xu et al. (2007), sendo que os experimentos *in vivo* mostraram que o filme é facilmente removido da ferida e que a cicatrização foi mais rápida comparada ao controle (vaselina). Compostos com misturas ternárias, AH-gelatina-quitosana, foram estudados quanto suas propriedades físico químicas concluindo que a concentração desses compostos interfere diretamente na miscibilidade, propriedades térmicas e mecânicas dos filmes (LEWANDOWSKA; SIONKOWSKA; GRABSKA, 2015; LEWANDOWSKA et al., 2016a, 2016b; SIONKOWSKA et al., 2016).

Sionkowska et al. (2016) verificaram que as propriedades mecânicas e a estabilidade térmica das misturas de quitosana-colágeno foram melhoradas na presença de AH (1 – 5% p/p). Adicionalmente, Liu et al. (2004) verificaram que o AH alterou significativamente a biocompatibilidade das membranas de gelatina-quitosana, sendo que nas concentrações de AH de 0,01 a 0,1% houve um aumento da adesão, migração e proliferação celular.

3.3.2 Liberação de Fármacos

Na liberação de fármacos em comprimidos, o uso de polissacarídeos pode contribuir para uma melhor adaptação da liberação de moléculas ativas para os locais

intestinais de absorção (SEVERINO et al., 2011). Os polímeros aplicados na liberação de fármacos devem ser quimicamente flexíveis, resistentes às barreiras fisiológicas e capazes de formar filmes de revestimento que mostram excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (ZANIN et al., 2017). Além de cumprir com estas exigências, o AH apresenta afinidade à receptores específicos como o CD44. O receptor CD44 é frequentemente expresso em células tumorais e pode ser um alvo promissor para o diagnóstico e tratamento de vários tipos de câncer humano. Logo, o AH pode ser uma ferramenta importante para o tratamento desta patologia através da entrega direta de drogas direcionadas (TRIPODO et al., 2015).

A alta hidrofiliabilidade do AH resulta na incapacidade de filmes contendo somente AH suportarem as condições no trato intestinal, podendo promover uma liberação prematura do fármaco preso no comprimido revestido (SGORLA et al., 2016). Para superar essa limitação o AH pode ser modificado quimicamente ou combinado a outros polímeros. Filmes obtidos da reticulação de AH com trimetafosfato trisódico evidenciaram uma liberação controlada na proporção distal do trato intestinal (SGORLA et al., 2016). O efeito da concentração de AH foi avaliada em filmes de polivinil acetato (ZANIN et al., 2017). Os autores propuseram que proporções de 95:5 e 90:10 (polivinil acetato: AH) apresentam potencial aplicação no controle de liberação de fármacos.

No tratamento de periodontite a liberação controlada de antimicrobianos é estudada, visando minimizar o desenvolvimento de resistências bacterianas (HAU et al., 2014). Os biomateriais mais comumente utilizados para esse fim são os filmes. A vantagem dos filmes é a facilidade de aplicações destes na cavidade periodontal ou na superfície da gengiva e a liberação controlada do fármaco seja por difusão no caso de polímeros insolúveis em água, ou por dissolução da matriz quando utilizado polímeros degradáveis. Aqueles com adesividade adequada e com espessura inferior a 400 μ m não são facilmente deslocados pela rotina diária de higiene oral seguida pelo paciente. Estas propriedades são especialmente benéficas para pacientes pediátricos, idosos e neurodegenerativos, onde a dosagem adequada e completa pode muitas vezes ser difícil (JOSHI et al., 2014).

Filmes de AH aplicados no tratamento de periodontites não somente podem melhorar as propriedades do material utilizado para a liberação de fármaco como também atua como um agente quimioterápico. Componente da matriz do ligamento periodontal, o AH está envolvido na adesão celular, migração e diferenciação mediada

por proteínas de ligação com o polímero e receptores de superfície celular, tais como o CD44. CD44 também é expresso em tecidos periodontais e a interação AH-CD44 tem sido associada a proliferação celular e atividades de mineralização no ligamento periodontal. Logo, o AH está diretamente ligado ao processo de cicatrização periodontal. Além disso, o polímero apresenta propriedade viscoelástica que contribuem para retardar a penetração de bactérias, característica de interesse ao tratamento de doenças periodontais (DAHIYA; KAMAL, 2013). Miranda et al. (2016) estudaram a aplicação de um filme híbrido de hidrogel, quitosana-AH, na regeneração periodontal. O desempenho destes para cultura de células *in vitro* foi testado e mostrou um aumento significativo na viabilidade celular e alta expressão de CD44, sugerindo que as células migraram mais quando semeadas nos andaimes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Microrganismos

4.1.1.1 Produção de ácido hialurônico

O microrganismo utilizado para produção de AH foi a bactéria *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 obtida da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – CBMAI.

4.1.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do ácido hialurônico

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do AH foram utilizadas 4 cepas bacterianas, sendo 1 gram-negativa: *Escherichia coli* ATCC 25922 e 3 gram-positivas: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus mutans* UA 159, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As cepas foram obtidas da coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Estadual de Londrina.

4.1.2 Melaço de Cana-de-açúcar

O melaço foi adquirido da Alltech do Brasil (São Pedro do Ivaí, PR, Brasil).

4.1.3 Reagentes

O hialuronato de sódio, massa molecular 1,5 a $1,8 \times 10^3$ kDa, produzido por *Streptococcus equi*, foi utilizado como padrão para caracterização do ácido hialurônico produzido. Este foi obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

Álcool polivinílico foi fornecido pela Sekisui Specialty Chemicals (Dallas, TX, USA) como Selvol™ 325, o qual apresenta grau de hidrólise 98,4% e massa molecular de 85 a 124 kDa. Glicerol foi obtido da Synth (Labsynth, São Paulo, Brasil).

Glutathiona reduzida (GSH), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS), 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ), brometo de hexadecil trietil amônio (HTAB), ácido 5-5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) e Trolox foram obtidos da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Brasil Ltd. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.1.3.1 Agentes antimicrobianos

O óleo essencial de orégano foi obtido da Ferquima Indústria e Comércio LTDA (São Paulo, Brasil). A solução de 50% de óleo essencial de orégano foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma – Aldrich; v/v).

A amostra de mel obtidas das abelhas sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier, 1836) foi coletada do meliponário da Universidade Estadual de Londrina. As amostras de mel foram diluídas em volumes iguais de água (50% v/v) e esterilizadas por filtração através de um filtro de 0,22 µm (Millipore®).

Eugenol foi obtido da SSWhite Duflex (Brasil) e uma solução 50 % (v/v) foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma – Aldrich; v/v).

4.1.4 Meios de Cultura

4.1.4.1 Meio de preservação e inóculo

O microrganismo foi preservado em meio composto por 37 g.L⁻¹ de Brain Heart Infusion - Infusão de Cérebro e Coração de boi (BHI) (HIMEDIA M-210) (Tabela 2) com 50 % (v/v) de glicerol. A propagação foi realizada em meio BHI ágar, utilizando 20 g.L⁻¹ de ágar, e BHI caldo.

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
Peptona de proteose	10,00
NaCl	5,00
Dextrose	2,00
Na ₂ HPO ₄	2,50

4.1.4.2 Meios de fermentação para a produção de ácido hialurônico

Dois meios de fermentação foram testados para a produção do polímero, meio 1 e 2 (Tabelas 3 e 4). Sacarose, melaço de cana-de-açúcar, MgSO₄, glutamina e glutamato foram autoclavados separadamente.

Tabela 3 - Meio 1 de fermentação.

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Sacarose	10 – 50
Extrato de levedura	10 – 50
Glutamato	0 - 0,6
Glutamina	0 - 0,6
Ácido oxálico	0 - 0,6
K ₂ HPO ₄	2,50
NaCl	2,0
MgSO ₄	1,5

Tabela 4 - Meio 2 de fermentação.

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Melaço de cana-de-açúcar	14,65 – 85,35*
Extrato de levedura	14,65 – 85,35
K ₂ HPO ₄	2,50
NaCl	2,0
MgSO ₄	1,5

* açúcares totais

4.1.4.3 Meios para os ensaios de atividade antimicrobiana

Os meios utilizados para os ensaios de atividade antimicrobiana foram o meio BHI (Tabela 2) e o caldo Müller-Hinton (MH) (DIFCO 275730) (Tabela 5).

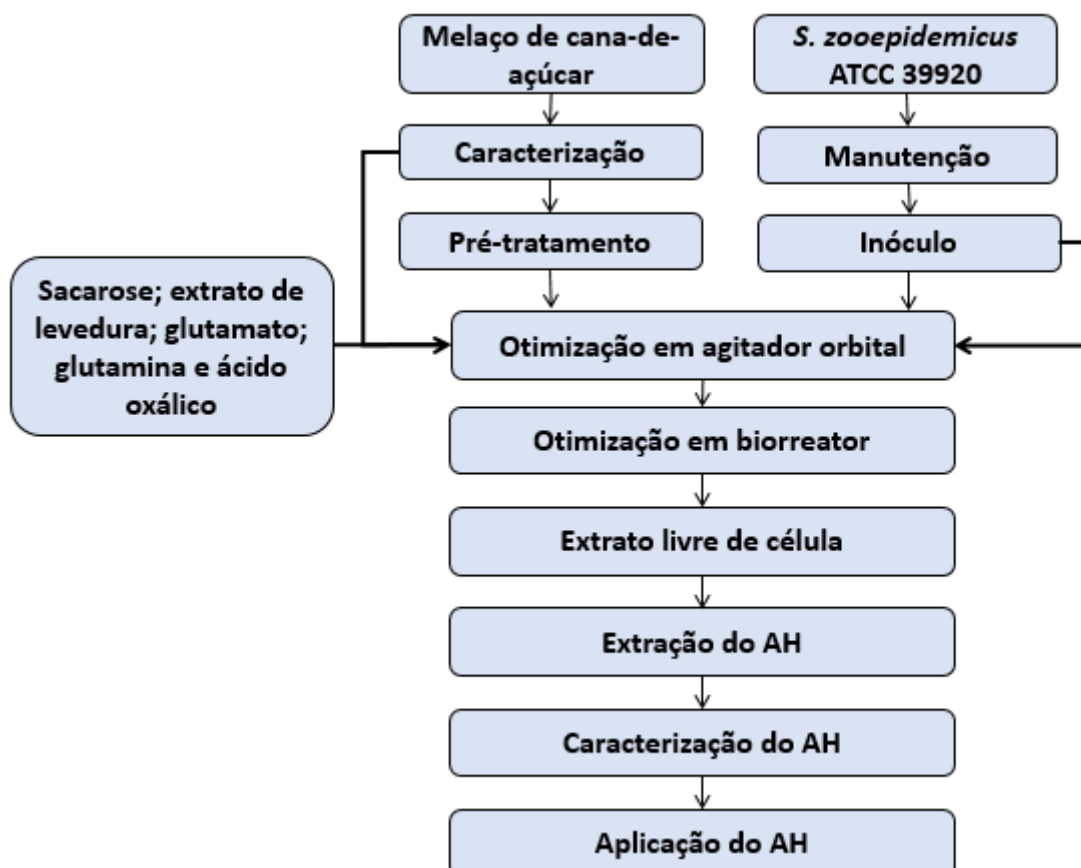
Tabela 5 - Composição do caldo Müller-Hinton (DIFCO 275730).

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

4.2 MÉTODOS

A Figura 3 ilustra a metodologia desenvolvida nesse trabalho para produção, caracterização e aplicação do ácido hialurônico.

Figura 3 - Fluxograma da produção, caracterização e aplicação do ácido hialurônico.



4.2.1 Caracterização do Melaço de Cana-de-açúcar

Melaço de cana-de-açúcar foi caracterizado quanto a concentração de açúcares, teor de cinzas, aminoácidos e metais pesados. Concentração de açúcares foi verificada por cromatografia líquida de alta performance (CLAE) (Shimadzu RID-10A, Japan) acoplada ao detector de índice de refração, coluna Aminex Carbohydrate HPX-87C (300 × 7,8 mm, Biorad) a 80°C. A fase móvel foi água Milli-Q a 0,6 mL.min⁻¹. Teor de cinzas foi determinado em mufla a 550°C durante 24 h. A concentração de aminoácidos e metais pesados foi fornecido pela Alltech do Brasil.

4.2.2 Preparo do Melaço de Cana-de-açúcar

Para as soluções estoque, o melaço de cana-de-açúcar foi diluído na concentração de 150 g.L⁻¹ de açúcares totais com água destilada e centrifugado a 9956 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi denominado de melaço de cana-de-açúcar bruto. Para obter o melaço de cana-de-açúcar pré-tratado, a solução de melaço foi tratada com 12 % (m/v) de carvão ativado em banho-maria a 70 °C por 1 h em constante agitação e novamente centrifugado a 9956 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado com papel filtro (Whatman, n° 1). A solução de melaço de cana-de-açúcar bruto e pré-tratado foram quantificadas quanto aos açúcares totais. Para a correção da concentração, quando necessário, sacarose comercial foi utilizada para obter a concentração desejada de 150 g.L⁻¹.

4.2.3 Preservação de *Streptococcus*

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 x 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.

4.2.4 Crescimento de *Streptococcus* em meio BHI

Para estudar o perfil de crescimento de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em meio BHI, a cultura estoque foi estriada em placas de BHI ágar a 37 °C. Após 24 h, colônias foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio BHI a 37 °C e 150 rpm. Amostras foram retiradas a cada 2 horas, durante 24 h. O cultivo foi interrompido por centrifugação a 9956 × g por 15 min, a 4°C. Das amostras foram quantificados o ácido hialurônico e o crescimento celular.

4.2.5 Inóculo

4.2.5.1 Padronizado em porcentagem (v/v)

O inóculo foi preparado transferindo 1 mL da cultura estoque, mantida em solução salina contendo 50% de glicerol a -80°C, para frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de BHI. Os frascos foram incubados a 150 rpm, 37 °C por 48 horas. Para as fermentações, quando utilizado dessa condição, o inóculo foi padronizado em 10 % (v/v).

4.2.5.2 Padronizado em concentração (g.L⁻¹)

A cepa mantida em glicerol a -80°C foi cultivada em placa de Petri contendo meio BHI ágar a 37°C. Após 24 horas, colônias foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio BHI mantidos a 37 °C, 150 rpm por 24 horas. Posteriormente, 20 mL desse cultivo foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de meio BHI. O cultivo foi conduzido a 150 rpm, 37 °C por 6 h, sendo então interrompido por centrifugação a 9956 × g e 4 °C por 15 min. A biomassa foi ressuspensa em solução salina 0,9 % e teve a concentração determinada por turbidimetria a $\lambda = 600$ nm, sendo correlacionada a curva de calibração de biomassa (g.L⁻¹). Para as fermentação, quando utilizado dessa condição, o inóculo foi padronizado em 0,2 g.L⁻¹.

4.2.6 Produção de Ácido Hialurônico

A produção foi realizada em duas etapas. Na etapa 1, foram realizadas 3 fermentações e na etapa 2, foram 6 fermentações variando as condições conforme a Figura 4 e 5, respectivamente.

As fermentações foram acompanhadas pela coleta de amostras, as quais foram centrifugadas a $9956 \times g$ por 15 min. Do precipitado foi avaliada a biomassa e do sobrenadante quantificou-se o ácido hialurônico, láctico, fórmico, etanol e açúcares totais.

Figura 4 - Fluxograma do processo de produção de AH na Etapa 1.

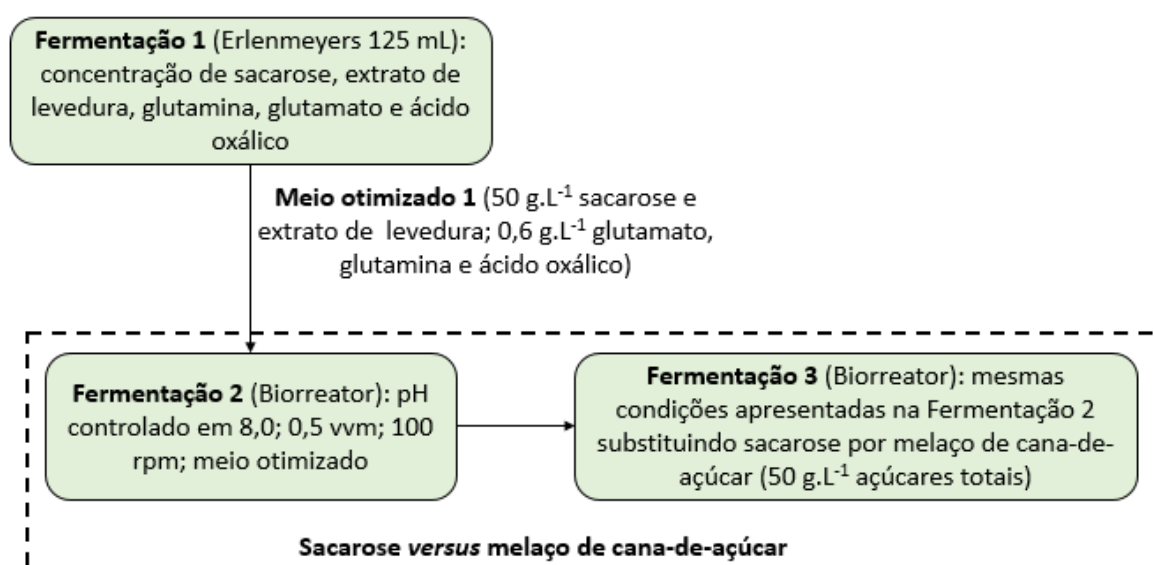
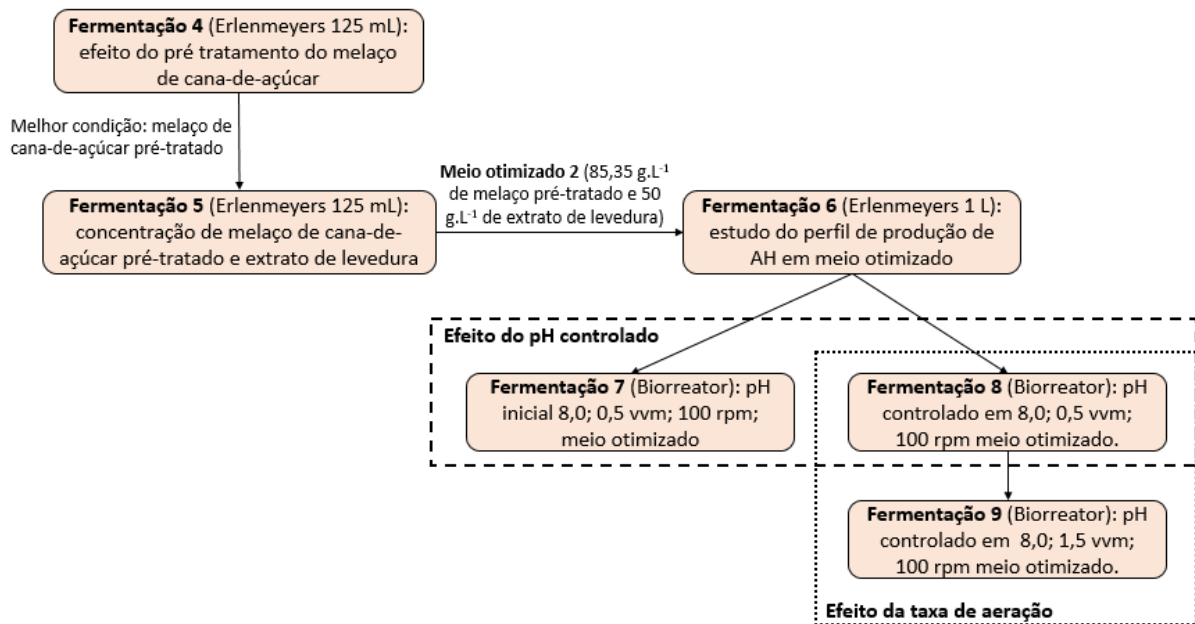


Figura 5 - Fluxograma do processo de produção de AH na Etapa 2.



4.2.6.1 Etapa 1

Para as fermentações realizadas na Etapa 1 o inóculo foi padronizado em 10% (v/v) e o meio de fermentação utilizado foi o meio 1.

4.2.6.1.1 Fermentação 1: Avaliação da concentração de sacarose, extrato de levedura, glutamato, glutamina e ácido oxálico

Ensaio fatorial fracionado 2^{5-1} foi realizado para estudar o efeito das concentrações de sacarose (X_1), extrato de levedura (X_2), glutamato (X_3), glutamina (X_4) e ácido oxálico (X_5) (Tabela 6). A escolha dos níveis dos fatores foi baseada em informações da literatura e trabalhos anteriores (PAN et al., 2015a). Total de 20 ensaios, sendo 16 pontos fatoriais e 4 pontos centrais foram conduzidos em ordem aleatória. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio 1 de fermentação, pH inicial 8,0, a 37°C e 100 rpm por 24 h.

Tabela 6 - Planejamento fatorial fracionado $2^{(5-1)}$ para a avaliação da concentração de (X_1) sacarose, (X_2) extrato de levedura, (X_3) glutamato, (X_4) glutamina e (X_5) ácido oxálico para a produção de ácido hialurônico, biomassa, ácido lático e acético por *Streptococcus zooepidemicus*.

Ensaio*	Variáveis Codificadas					Variáveis Decodificadas				
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	(X_1) Sacarose (g.L ⁻¹)	(X_2) Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	(X_3) Glutamato (g.L ⁻¹)	(X_4) Glutamina (g.L ⁻¹)	(X_5) Ácido oxálico (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	+1	10	10	0,0	0,0	0,6
2	+1	-1	-1	-1	-1	50	10	0,0	0,0	0,0
3	-1	+1	-1	-1	-1	10	50	0,0	0,0	0,0
4	+1	+1	-1	-1	+1	50	50	0,0	0,0	0,6
5	-1	-1	+1	-1	-1	10	10	0,6	0,0	0,0
6	+1	-1	+1	-1	+1	50	10	0,6	0,0	0,6
7	-1	+1	+1	-1	+1	10	50	0,6	0,0	0,6
8	+1	+1	+1	-1	-1	50	50	0,6	0,0	0,0
9	-1	-1	-1	+1	-1	10	10	0,0	0,6	0,0
10	+1	-1	-1	+1	+1	50	10	0,0	0,6	0,6
11	-1	+1	-1	+1	+1	10	50	0,0	0,6	0,6
12	+1	+1	-1	+1	-1	50	50	0,0	0,6	0,0
13	-1	-1	+1	+1	+1	10	10	0,6	0,6	0,6
14	+1	-1	+1	+1	-1	50	10	0,6	0,6	0,0
15	-1	+1	+1	+1	-1	10	50	0,6	0,6	0,0
16	+1	+1	+1	+1	+1	50	50	0,6	0,6	0,6
17	0	0	0	0	0	30	30	0,3	0,3	0,3
18	0	0	0	0	0	30	30	0,3	0,3	0,3
19	0	0	0	0	0	30	30	0,3	0,3	0,3
20	0	0	0	0	0	30	30	0,3	0,3	0,3

(*) Os ensaios foram aleatorizados

4.2.6.1.2 Fermentação 2: Avaliação da produção de ácido hialurônico em biorreator e meio de sacarose

A fermentação foi realizada nas condições otimizadas na Fermentação 1 em biorreator 4,5 L (Tecnal, Brasil) contendo 2 L de meio composto por (g.L⁻¹): sacarose, 50; extrato de levedura, 50; glutamato, 0,6; glutamina, 0,6 e ácido oxálico, 0,6. A fermentação foi realizada em pH 8,0 controlado por solução NaOH 8 mol.L⁻¹. A temperatura foi mantida a 37°C, rotação de 100 rpm e aeração 0,5 vvm. Amostras foram coletadas a cada 2 h por 24 h.

4.2.6.1.3 *Fermentação 3: Avaliação do melaço de cana-de-açúcar pré-tratado na produção de ácido hialurônico*

A fermentação foi realizada na condição otimizada da Fermentação 1 substituindo sacarose por melaço de cana-de-açúcar pré-tratado, em biorreator 4,5 L (Tecnal, Brasil) contendo 2 L de meio composto por (g.L⁻¹): melaço de cana-de-açúcar, 50 de açúcar total; extrato de levedura, 50; glutamato, 0,6; glutamina, 0,6 e ácido oxálico, 0,6. A fermentação foi realizada em pH 8,0 controlado por solução NaOH 8 mol.L⁻¹. A temperatura foi mantida a 37°C, rotação de 100 rpm e aeração 0,5 vvm. Amostras foram coletadas a cada 2 h por 24 h.

4.2.6.2 Etapa 2

Para as fermentações realizadas na Etapa 2 o inóculo foi padrozinado em 0,2 g.L⁻¹ e o meio de fermentação utilizado foi o meio 2.

4.2.6.2.1 *Fermentação 4: Avaliação da produção em meio de melaço de cana-de-açúcar bruto ou pré-tratado*

Para investigar o efeito do pré-tratamento do melaço de cana-de-açúcar, o experimento foi realizado em Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio 2 de fermentação com 30 g.L⁻¹ de melaço de cana-de açúcar bruto ou pré-tratado e 30 g.L⁻¹ de extrato de levedura. O experimento foi realizado em quadruplicata a 37°C, pH inicial 8,0, 100 rpm por 24 h.

4.2.6.2.2 *Fermentação 5: Avaliação da concentração de melaço de cana-de-açúcar pré-tratado e extrato de levedura em frasco Erlenmeyer de 125 mL.*

A concentração de melaço de cana-de-açúcar pré-tratado (X_1) (14,65–85,35 g.L⁻¹ de açúcar total) e extrato de levedura (X_2) (14,65 – 85,35 g.L⁻¹) foram avaliados utilizando delineamento composto central rotacional (DCCR) (Tabela 7). O DCCR requereu 13 experimentos com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 5 pontos centrais. A escolha dos níveis dos fatores foi baseada em Pan et al. (2015a). A

fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio 2, pH inicial 8,0, temperatura mantida a 37°C e rotação de 100 rpm.

Tabela 7 - Delineamento composto central rotacional para a avaliação da concentração de melão de cana-de-açúcar pré-tratado (X_1) e extrato de levedura (X_2) para a produção de ácido hialurônico, biomassa, ácido lático e acético por *Streptococcus zooepidemicus*.

Ensaio*	Variáveis Codificadas		Variáveis Decodificadas	
	x_1	x_2	(X_1) Melão de Cana-de-açúcar (g.L ⁻¹)	(X_2) Extrato de Levedura (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	25	25
2	-1	1	25	75
3	1	-1	75	25
4	1	1	75	75
5	-1,41	0	14,65	50
6	1,41	0	85,35	50
7	0	-1,41	50	14,65
8	0	1,41	50	85,35
9	0	0	50	50
10	0	0	50	50
11	0	0	50	50
12	0	0	50	50
13	0	0	50	50

(*) Ensaio foram aleatorizados

4.2.6.2.3 Fermentação 6: Avaliação da produção em melão de cana-de-açúcar pré-tratado e extrato de levedura em frasco Erlenmeyer de 1 L

Na condição ótima obtida por DCCR (fermentação 5), a fermentação foi realizada em Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de meio 2 de fermentação com 85,35 g.L⁻¹ de melão de cana-de-açúcar (açúcares totais) e 50 g.L⁻¹ de extrato de levedura em triplicata. Amostras foram coletadas a cada 2 h para estudar o perfil de produção do AH. O experimento foi realizado em pH inicial 8,0, temperatura mantida a 37°C e rotação de 100 rpm. Amostras foram coletadas a cada 2 h por 24 h.

4.2.6.2.4 Fermentação 7 e 8: Avaliação da produção em biorreator com e sem controle de pH e taxa de aeração 0,5 vvm.

O efeito do pH controlado foi avaliado nas condições otimizadas por DCCR (fermentação 4). Fermentação em biorreator 4,5 L (Tecnal, Brasil) contendo 2 L de meio de fermentação com 85,35 g.L⁻¹ de melaço de cana-de-açúcar pré-tratado (em açúcares totais) e 50 g.L⁻¹ de extrato de levedura foi realizado em pH 8 controlado com solução NaOH 8 mol L⁻¹ (fermentação 8). Essa fermentação foi comparada a fermentação sem controle de pH (pH inicial 8,0) (fermentação 7). A temperatura foi mantida a 37°C, rotação 100 rpm e aeração 0,5 vvm. Amostras foram coletadas a cada 2 h por 24 h.

4.2.6.2.5 Fermentação 9: Avaliação da produção em biorreator com controle de pH e taxa de aeração 1,5 vvm

A fermentação 9 foi realizada nas mesmas condições da fermentação 8, sendo a taxa de aeração aumentada para 1,5 vvm. Amostras foram coletadas a cada 2 h por 24 h.

4.2.7 Acompanhamento das Fermentações

4.2.7.1 Determinação do pH

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

4.2.7.2 Curva de biomassa de *Streptococcus zooepidemicus*

Para determinação da biomassa, inicialmente foi realizada uma curva de biomassa pelo cultivo de *S. zooepidemicus* em meio BHI por 48 h. A biomassa obtida foi separada por centrifugação a 9956 × g, 4 °C por 15 min e ressuspensa em salina 0,9 %. Quatro 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 absorvância em $\lambda = 600$ nm e 3 alíquotas foram distribuídas em recipientes previamente tarados, mantidos em estufa (70°C) até peso constante. Um gráfico foi plotado relacionando absorvância *versus* peso seco (g.L^{-1}) e esta curva foi utilizada para todas as determinações de biomassa.

4.2.7.3 Determinação da biomassa

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

4.2.7.4 Determinação de açúcares totais

Açúcares totais foram dosados pelo método de Fenol Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) à $\lambda = 490$ nm. O padrão utilizado foi a sacarose (20 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

4.2.7.5 Determinação do ácido hialurônico, ácidos orgânicos e etanol

Para a quantificação de ácido hialurônico, láctico, fórmico, acético e etanol, amostras do sobrenadante livre de células foram filtradas em membranas de 0,45 μm (Millipore) e injetadas (20 μL) em CLAE (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A avaliação do ácido hialurônico foi realizada em coluna OHPak SB-806MHQ 80 \times 300 mm (Shodex, Japão) a 40°C com fase móvel 0,1 M NaNO_3 e fluxo de 1 mL.min^{-1} . Ácido láctico, acético, fórmico e etanol foram avaliados usando coluna Aminex HPX – 87H 300 \times 7,8 mm (Bio-Rad, CA, USA) de ácidos orgânicos, a 60°C e fase móvel H_2SO_4 0,005 mol.L^{-1} com fluxo de 0,7 mL.min^{-1} . O perfil de eluição dos picos foi monitorado com detector de índice de refração Shimadzu RID – 10A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Para cada analito uma curva de calibração foi confeccionada, utilizando padrões de ácido hialurônico variando de 15 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e ácidos orgânicos e etanol em concentrações variando de 50 a 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

4.2.8 Purificação do Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico produzido em biorreator foi precipitado, purificado e caracterizado. Nesta etapa foi utilizado o método de purificação segundo Reddy e Karunakaran (2013) com modificações.

O sobrenadante livre de células foi precipitado com etanol na proporção 1:1,5 (v/v) de amostra:sobrenadante 4 °C e após 1 h, foi centrifugado a 1259 x g, 4 °C por 20 min, redissolvido em solução 0,15 M de NaCl. Esse procedimento de precipitação seguido de dissolução foi repetido 3 vezes para aumentar a pureza do AH. Posteriormente, ácido tricloroacético (1%) foi adicionado à solução resultante de AH até atingir pH 2,0 e foi mantida por 1h a 4°C. A solução foi centrifugada a 7744 x g, 4 °C por 30 min. O sobrenadante foi dialisado por 48 horas com 6 trocas de água. O produto da dialise foi congelado e liofilizado.

4.2.9 Produção de Filmes de Álcool Polivinílico e Ácido Hialurônico

O AH produzido nas condições apresentadas na fermentação 8 foi purificado, caracterizado e utilizado para a produção de filmes. Os filmes foram preparados usando PVA, ácido hialurônico microbiano e glicerol (plastificante). Para cada experimento, os filmes foram preparados com concentração (2,0 g/100 g de solução filmogênica) de sólidos (PVA + AH) e concentração de glicerol (25 g/100 g de sólidos) fixa. Quatro diferentes níveis de AH foram adicionados a solução filmogênica: 0, 5,10 e 15 g AH/ 100 g sólidos, resultando em filmes denominados por PVA100, PVA95-AH5, PVA90-AH10 e PVA85-AH15, respectivamente.

Os filmes foram preparados utilizando o método de *Casting* de acordo com as formulações descritas na Tabela 8. PVA e glicerol foram adicionados à água destilada e mantidos a 95°C por 30 minutos com agitação manual. Após gelatinização, solução de PVA foi arrefecida até cerca de 70 °C e misturada com a solução de AH durante 30 min. As soluções filmogênicas foram vertidas sobre placas acrílicas circulares (0,63 g de solução filmeogênica / cm²) e foram secas a 30 °C em estufa com circulação de ar, modelo TE-394-3 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a um peso constante (aproximadamente 30 h). Os filmes translúcidos resultantes puderam ser facilmente removidos da placa e foram mantidos a 25 °C e umidade relativa (UR) de 58% durante 48 h antes dos testes de caracterização.

Tabela 8 - Formulações empregadas para o preparo de 500 g de solução filmogênica.

Formulações	PVA (g)	AH (g)	Glicerol (g)	Água (g)
Filme PVA100	10	0	2,5	487,5
Filme PVA95-AH5	9,5	0,5	2,5	487,5
Filme PVA90-AH10	9,0	1,0	2,5	487,5
Filme PVA85-AH15	8,5	1,5	2,5	487,5

4.2.10 Caracterização do Ácido Hialurônico e dos Filmes

O ácido hialurônico obtido nas fermentações em biorreator foi caracterizado quanto a homogeneidade e massa molecular, atividade antioxidante, antimicrobiana, espectroscopia UV-Vis, FT-IR e RMN, e propriedades térmicas por DSC e TGA. Este foi comparado ao AH padrão.

Os filmes foram caracterizados quanto a biodegradabilidade (solubilidade e intumescimento), microestrutura (MEV), propriedades mecânicas e de barreiras (permeabilidade ao vapor de água), estabilidade térmica (DSC e TGA) e estrutura (FT-IR). Adicionalmente o PVA foi analisado por FT-IR, DSC e TGA.

4.2.10.1 Homogeneidade e massa molecular

A homogeneidade do AH foi determinada por cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão acoplada ao detector de índice de refração (HPSEC/RID), marca SHIMADZU modelo RID 10A. O sistema de cromatografia consistiu em uma bomba de HPLC (Modelo Shimadzu-10 AD), uma válvula de injeção manual (Shimadzu) equipada com um loop de 200 μ L e colunas Ultrahydrogel (7.8 \times 300 mm) dispostas em série com limites de exclusão diferentes conectados em ordem de diminuição do tamanho dos poros 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Da correspondente ao Ultrahydrogel (Waters) 2000, 500, 250 e 120, respectivamente. A fase móvel foi NaNO_3 0,1 M com azida de sódio (0,03%) e taxa de fluxo de $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A análise de dados foi realizada usando o software de solução LC (Shimadzu Corporation). Uma curva padrão de dextrana com massa molecular de 2000, 1400, 670, 500, 410 e 266 kDa foi feita para determinar o peso molecular aparente do AH.

4.2.10.2 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi estimada utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich Brasil Ltd.). Resumidamente, 300 µL da solução de DPPH 0,1 mM em etanol foi adicionada a uma amostra de 1 mL em concentrações de 0,2-1,0 g.L⁻¹. A mistura foi deixada em repouso durante 30 min à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 517 nm contra um branco (água em vez de amostra e etanol em vez de DPPH). A percentagem de atividade foi calculada conforme equação 1:

$$(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

em que A_0 é a absorvância do controle (água em vez da solução da amostra), A_1 é a absorvância da amostra e A_2 é a absorvância da amostra em condições idênticas à A_1 com etanol em vez de solução de DPPH. O ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Brasil Ltd.) foi utilizado como padrão para o ensaio (SRIKANTH et al., 2015).

4.2.10.3 Determinação da atividade antimicrobiana

4.2.10.3.1 Cultivo das cepas bacterianas

As cepas *E. coli* e *S. aureus* foram cultivadas em meio ágar Müeller-Hinton e *S. mutans* e *S. pyogenes* em meio BHI ágar a 37 °C por 18 a 24 h.

Após crescimento as colônias foram transferidas para solução salina 0,9 % e ajustadas para 5×10^8 UFC, usando padrão MacFarland e diluídas em meio BHI ou MH até obter 5×10^6 UFC.

4.2.10.3.2 Ensaio de Microdiluição em Caldo (MIC)

Primeiramente foi avaliada a atividade antimicrobiana dos compostos em separado. O AH produzido (fermentação 8) e o padrão de hialuronato de sódio foram estudados nas concentrações de 4 a 0,031 mg.mL⁻¹; mel de *Scaptotrigona bipunctata* variando de 10 a 0,12% (v/v); óleo de orégano de 4 a $7,8 \times 10^{-3}$ % e eugenol de 1 a 0,031%. Para a diluição das amostras foi utilizado os meios BHI e MH, de acordo com

a bactéria a ser avaliada. O MIC foi determinado em triplicata por ensaios de microdiluição em placas de 96 poços (CLSI, 2012). Alíquotas de 50 μL das amostras diluídas em meio foram transferidas para placas de 96 poços e adicionadas 50 μL das soluções celulares. Após 24 h de incubação a 37 °C, o MIC foi definido como a menor concentração de agente antimicrobiano que inibiu o crescimento visível.

Posteriormente, para avaliar a interação entre a amostra de AH e mel de *Scaptotrigona bipunctata*, óleo de orégano, ou eugenol, foram utilizados ensaios de microdiluição com duplo gradiente antimicrobiano. Nesta etapa a concentração estudada do AH foi de 1 a 0,031 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e dos demais compostos como descrito na etapa anterior. A microdiluição foi realizada em placas de 96 poços em triplicata de acordo com o protocolo de Kelly e Matsen (1976).

4.2.10.4 Espectroscopia no ultravioleta e visível (UV-Vis)

O AH foi diluído em água deionizada (1,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e analisado por espectrofotômetro de varredura UV-Vis (Biochrom Libra s22) a 25 °C variando λ de 190 a 450 nm. Água deionizada foi utilizada como referência (CHOI et al., 2010).

4.2.10.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A análise estrutural do AH foi avaliada através de RMN no Laboratório de Espectroscopia da central multiusuário de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina. Os espectros de ^{13}C da amostra de AH, obtido na fermentação 8, e do padrão de AH foram obtidas a 24°C e 100,6 MHz utilizando a técnica de polarização cruzada no ângulo mágico a partir de amostras finamente pulverizadas (OLIVEIRA et al., 2017).

4.2.10.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada em Fourier (FT-IR)

Ácido hialurônico produzido e amostras pulverizadas dos filmes foram incorporados a 100 mg de KBr, submetidas a alta pressão para produção de pastilhas. A análise FT-IR foi realizada usando um instrumento Shimadzu-8400 FT-IR (Japão) no Laboratório de Espectroscopia da central multiusuário de laboratórios de pesquisa

da Universidade Estadual de Londrina. As aferições foram realizadas em triplicata, e 100 varreduras foram executadas na faixa espectral de 4000-400 cm^{-1} . A resolução espectral foi de 4 cm^{-1} .

4.2.10.7 Colorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises de DSC foram realizadas em um calorímetro Shimadzu DSC 60 (Japão) no Laboratório de Espectroscopia da central multiusuário de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina. Aproximadamente 3,0 mg de cada amostra foram colocados em recipientes de platina próprios do equipamento. Amostras de AH, PVA e filmes foram aquecidos de 10 a 300 °C com taxa de aquecimento de 5°C.min⁻¹ e atmosfera de hélio. Um cadinho vazio foi usado como referência. A temperatura de transição vítrea (T_g) correspondeu à temperatura à qual ocorreu inflexão basal. As amostras foram submetidas a duas varreduras, e os resultados da segunda varredura foram utilizados para o cálculo de T_g e traçar os termogramas.

4.2.10.8 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas em equipamento Shimadzu, modelo TGA-50 (Japão), sob atmosfera de N₂ (50 mL.min⁻¹), no Laboratório de Espectroscopia da central multiusuário de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina. As amostras (aproximadamente 10 mg) foram aquecidas de 30 a 600°C com taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹. A perda de peso (%) foi avaliada considerando o peso residual a 600°C. Para cada amostra, a temperatura máxima de degradação (T_{máx}) e a temperatura na qual 10% do peso foi perdida (T₉₀) foram determinadas.

4.2.10.9 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada utilizando um micrómetro manual Mitutoyo (São Paulo - Brasil) com uma precisão de ± 1 µm em 10 posições escolhidas aleatoriamente no filme. O desvio padrão médio da espessura do filme foi de aproximadamente 5% da espessura média.

4.2.10.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de MEV foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e de Microanálise da central multiusuária de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina utilizando um microscópio eletrônico JEOL JSPM 100 (Japão). As amostras dos filmes foram fixadas em talões de bronze usando fita adesiva de dupla face e depois revestidas com uma camada de ouro (40-50 nm) para permitir a visualização em superfície e em seção transversal. Todas as amostras foram examinadas usando uma tensão de aceleração de 20 kV.

4.2.10.11 Solubilidade

As análises foram realizadas de acordo com o método de Gontard, Guilbert and Cuq (1992). Os testes foram realizados em triplicata, as amostras foram cortadas em corpos de prova com 3 x 3 cm, e secas em estufa com circulação de ar (Marconi, Brasil) a 60 °C por 24 h. Em seguida as amostras foram pesadas (peso seco inicial) e mergulhadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 80 mL de água destilada, estes frascos foram vedados e agitados a 50 rpm, 25 °C por 24 h em incubadora orbital (Shaker Marconi MA 420). Após este período, as amostras foram removidas cuidadosamente e secas em estufa com circulação de ar por 24 h a 60 °C, para determinar a massa do material não solubilizado (peso final). A solubilidade foi expressa por porcentagem de material seco solubilizado, $solubilidade (\%) = ((p_i - p_f)/p_i) \times 100$; sendo p_f a massa final da amostra e p_i é a massa inicial da amostra, ambos em base seca.

4.2.10.12 Índice de intumescimento (SI)

O índice de intumescimento foi determinado em água destilada a 37°C. Os filmes foram cortados (aproximadamente 1 cm²), colocados em placas de Petri, deixados em um forno a 30 °C por 6 h e pesados para determinar a massa seca (p_s). As amostras secas foram imediatamente imersas em água destilada, incubadas a 37 °C e pesadas novamente (p_i) em intervalos de intervalo específicos (1, 10, 60 e 120 min). O índice de inchaço foi determinado a partir de $SI (\%) = [(p_s - p_i) / p_i] \times 100$.

4.2.10.13 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada pelo método gravimétrico de acordo com as normas da Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM E96-00, 2000) com modificações. Cada amostra de filme foi selada sobre uma abertura circular de $0,00181 \text{ m}^2$ em uma cápsula de permeação e armazenada a 25 °C em dessecador. Para manter um gradiente de umidade relativa (UR) de 75% através do filme, foi colocado cloreto de cálcio anidro (0% de UR) dentro da célula, e uma solução saturada de cloreto de sódio (75% UR) foi utilizada no dessecador. Após a estabilização do sistema (aproximadamente 2 h), a célula foi pesada a cada 2 h por 48 h. Alterações no peso das células foram registrados para o mais próximo de $0,0001 \text{ g}$ e representada graficamente como uma função do tempo. A inclinação de cada reta foi calculada por regressão linear, e a taxa de transmissão de vapor de água (TVA) foi calculada a partir da inclinação da linha reta (g/s) dividida pela área de transferência (m^2). Após os testes de permeação, a espessura do filme foi medida e a taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) ($\text{g} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$) foi calculado como $\text{TPVA} = [\text{TVA} / S (R_1 - R_2)]d$, onde S é a pressão de vapor de saturação de água (Pa) à temperatura de teste (25 °C); R_1 é a UR no dessecador; R_2 é a UR na célula de permeação; e d é a espessura do filme (m). Nestas condições, a força motriz $[S (R_1 - R_2)]$ foi de $1753,55 \text{ Pa}$. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.2.10.14 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas foram determinadas utilizando um analisador EMIC DL 2000 (Brasil), de acordo com o método estabelecido pela ASTM D882-02 (ASTM D882-02, 2002). A resistência máxima à tração, alongação na ruptura e o módulo de elasticidade foram calculados a partir das curvas tensão-deformação, utilizando os resultados de pelo menos cinco testes para cada amostra.

4.2.11 Hidrólise do Ácido Hialurônico

A hidrólise do AH foi realizada de acordo com Tømmerraas e Melander (2008). Ácido hialurônico obtido da fermentação 8 foi diluído a $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ em HCl $0,2 \text{ M}$ e mantido a 80 °C em banho de óleo. As amostras foram retiradas em tempos de 0 a

48 h a cada 12 h. Cada amostra foi imediatamente arrefecida em banho de gelo e neutralizada com quantidades equimolares de NaOH (solução 1 M). Posteriormente, as amostras foram filtradas em membranas de 1000 Da. A solução filtrada foi congelada, liofilizada e o AH quantificado.

Para a dessalinização da amostra, a cada 1 g da amostra hidrolisada e liofilizada foi adicionado 30 mL de solução de etanol 80%. A solução foi centrifugada a 9956 × g por 5 min. Para o precipitado obtido foi realizado mais dois ciclos de precipitação com etanol. A amostra foi liofilizada e o AH quantificado.

4.2.12 Avaliação da Eficácia *in vivo* do Ácido Hialurônico em Formulações Tópicas na Redução dos Danos Cutâneos Induzidos pela Irradiação UVB

Duas formulações tópicas foram estudadas para avaliar a eficácia *in vivo* do AH na redução dos danos cutâneos induzidos pela irradiação UVB. Formulação 1, a base de Polawax® (Tabela 9), e formulação 2, 50% (v/v) propilenoglicol: água. Ácido hialurônico hidrolisado foi adicionado nas formulações em concentrações de 1, 3 e 5% (g/g).

Tabela 9 - Formulação tópica a base de Polawax®

Fase	Constituinte	%
A (fase oleosa a quente)	POLAWAX	10
B (fase aquosa a quente)	Propileno	5
	Água	81,2
C (fase a frio)	Triglicerídeos	3
	Phenonip (conservante)	0,8

Para a avaliação da eficácia do AH nos testes *in vivo* foram utilizados camundongos fêmeas de linhagem HRS/J, sem pelo, pesando em média 30 g. Estes foram mantidos no Biotério do Centro de Ciências da Saúde/UEL. Lâmpada UVB fluorescente modelo PHILIPS TL/12 40W RS foi utilizada nos experimentos para indução das lesões foto-oxidativas. Os camundongos foram colocados a 20 cm de distância da lâmpada UVB e expostos à radiação à temperatura ambiente. A dose de radiação utilizada para indução da inflamação e do estresse oxidativo foi de 4,14 J/cm². Os animais foram tratados com 0,5 g de formulação 12, 6 horas, 5 minutos antes da radiação e 30 minutos depois da irradiação. Os grupos controle não irradiado

e irradiado sem tratamento foram incluídos no teste. A eutanásia com éter etílico ocorreu após 12 horas da exposição dos animais tratados à radiação UVB. A pele do dorso foi retirada, limpa, lavada com cloreto de sódio 145 mM e armazenada a -70 °C para as análises subsequentes. Somente a avaliação do edema foi realizada no mesmo dia da coleta.

Avaliou-se a diminuição do edema cutâneo de acordo com Boller et al. (2010); redução da migração de neutrófilos pela atividade de mieloperoxidase conforme Campanini et al. (2013), inibição da depleção do GSH de acordo com Srinivasan, Sabitha e Shyamaladevi (2007) e avaliação do poder antioxidante de redução férrica (FRAP) e radical ABTS através da técnica descrita em Katalinic et al. (2005). O projeto seguiu as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEL conforme registro 168/2014.

4.2.13 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o Software R (R CORE TEAM, 2016) suprido do pacote rsm (LENTH, 2009) e o Software Statistica 9.0 (StatSoft Inc., USA).

Para os modelos apresentados, a qualidade de ajuste da equação foi expressa pelo coeficiente de determinação ajustado $R_{ajustado}^2$ e sua significância estatística foi avaliada pelo teste F. Os pressupostos dos modelos, normalidade e homogeneidade de variância dos resíduos, foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e teste de Breusch-Pagan (BREUSCH; PAGAN, 1979) e análise gráfica, respectivamente.

4.2.13.1 Ensaio fatorial fracionado e delineamento composto central rotacional

As variáveis respostas do ensaio fatorial fracionado e do delineamento composto central rotacional foram descritas conforme função polinomial de segunda ordem (Equação 2):

$$y_{ij} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon_{ij}$$

(Eq. 2)

em que y_{ij} é a resposta predita, β são os parâmetros cujos valores devem ser determinados, i e j variam de 1 a k variáveis, x_i e x_j são as variáveis independentes definidas em escala codificada, e ϵ_{ij} é o termo de erro aleatório. As estimativas dos parâmetros neste modelo de regressão estão relacionadas com as estimativas de efeito (MONTGOMERY, 2013). A significância dos parâmetros e suas interações foram testadas pela análise de variância (ANOVA) e teste t.

4.2.13.2 Regressão logística

O perfil da produção de ácido hialurônico, biomassa, ácido lático e acético em biorreator foram modelados usando regressão não linear logística (Equação 3):

$$P = P_{max} / (1 + \exp[(x_0 - x)/k])$$

(Eq.3)

em que P_{max} é o valor máximo assintótico de biomassa, ácido hialurônico, lático ou acético ($g.L^{-1}$), k é o parâmetro de escala numérica no eixo de entrada e x_0 o valor x no ponto de inflexão da curva (PINHEIRO; BATES, 2000). A significância dos parâmetros foram testadas pelo teste t.

4.2.13.3 Comparação de médias

Para comparação de médias foi utilizado o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de artigos científicos, patente e resultados complementares:

Artigo 1: “Factorial Design in Fermentation Medium Development for Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus*” será submetido ao periódico Brazilian Journal of Chemical Engineering de acordo com as normas da revista (<http://www.scielo.br/revistas/bjce/iinstruc.htm>). Nesse artigo estão descritos os resultados das fermentações 1 e 2.

Patente: “Processos Biotecnológico Utilizando Melaço de Cana-de-açúcar para Produção de Ácido Hialurônico Microbiano”, depositada junto ao INPI na data de 02/08/2016, sendo seu número de processo BR 10 2016 017870 3. Nessa patente está descrito o resultado da fermentação 3 e a caracterização do AH produzido.

Artigo 2: “Improvement Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* in Sugarcane Molasses”, publicado na revista Applied Biochemistry and Biotechnology, sendo seu DOI:10.1007/s12010-016-2326-y (<https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-016-2326-y>). Nesse artigo estão descritos os resultados da fermentação 4 a 8 e a caracterização do AH produzido.

Artigo 3: “Films Base on Blends of Polyvinyl Alcohol and Microbial Hyaluronic Acid for Biomedical Applications”, submetido a revista Journal Applied Polymer Science ([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1097-4628](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1097-4628)). Nesse artigo estão descritos os resultados referentes aos filmes de AH e álcool polivinílico.

Resultados Complementares: resultados referentes ao crescimento de *Streptococcus* em meio BHI (método descrito em 4.2.4); fermentação 9 (método descrito em 4.2.6.2.5), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (método descrito em 4.2.10.5), atividade antimicrobiana (método descrito em 4.2.10.3), hidrólise do AH (método descrito em 4.2.11) e avaliação da eficácia *in vivo*

do ácido hialurônico em formulações tópicas na redução dos danos cutâneos induzidos pela irradiação UVB (método descrito em 4.2.12).

**5.1 ENSAIO FATORIAL NO DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTIVO PARA
PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR *Streptococcus zooepidemicus***

**FACTORIAL DESIGN IN FERMENTATION MEDIUM DEVELOPMENT FOR
HYALURONIC ACID PRODUCTION BY *Streptococcus zooepidemicus***

Nicole Caldas Pan, Guilherme Biz; Cristiani Baldo, Maria Antonia Pedrine Colabone
Celligoi

Factorial Design in Fermentation Medium Development for Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus*

Nicole Caldas Pan¹; Guilherme Biz²; Cristiani Baldo¹, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid | Pr 445 Km 380 | Campus Universitário Cx. Postal 10.011 | CEP 86.057-970 | Londrina – PR, Brasil.

² Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid | Pr 445 Km 380 | Campus Universitário Cx. Postal 10.011 | CEP 86.057-970 | Londrina – PR, Brasil.

E-mail addresses:

nicolepan@uel.br

gbiz@uel.br

cristianibaldo@uel.br

*macelligoi@uel.br

* Correspondence author:

Telefone: +55 43 3371-4270

E-mail: macelligoi@uel.br (Maria Antonia P. C. Celligoi)

ABSTRACT

Fractional factorial design and response surface were used to evaluate the effect of the concentration of sucrose, yeast extract, glutamine, glutamate and oxalic acid on the hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in shake flasks. Biomass, lactate and acetate production were also verified. Yeast extract showed to be the main variable significant for all the studied responses, showing positive effect. For the hyaluronic acid production, glutamine was also significant and exhibited a high positive effect. The best condition obtained for the polymer production was 50 g L⁻¹ of yeast extract and sucrose and 0.6 g L⁻¹ of glutamine, glutamate and oxalic acid. In this culture condition, a fermentation was carried out in 4.5 L bioreactor with pH controlled at 8 and 0.5 vvm. Hyaluronic acid production in bioreactor was explained by logistic regression model and the maximum concentration asymptotic of HA was 0.860 g L⁻¹. An increase of 34% was observed when compared to shake flask assay.

Key words: Hyaluronic acid, Fractional factorial design, Bioreactor, Logistic regression, Organic acids

INTRODUCTION

The hyaluronic acid (HA) is a polysaccharide that is present in all vertebrates as a main constituent of the extracellular matrix (CHEN; ABATANGELO, 1999). The polymer consists of repeated disaccharide units containing D-glucuronic acid and N-acetyl-glucosamine and present several biological functions, such as joints lubrication, skin hydration and space filling (KOGAN et al., 2007). In addition, studies demonstrate that the polymer acts in several signaling pathway and regulation of pathologic processes, and exhibits therapeutic potential in human diseases such as osteoarthritis, cancer, diabetes, cystic fibrosis, asthma and wound healing (HERMANS et al., 2017; LIANG; JIANG; NOBLE, 2016; TRIPODO et al., 2015).

Due to HA biological applications, the microbial production is preferred compared to extraction from rooster comb, umbilical cords and bovine humor vitreous. Animal-derived biochemical compounds are not recommended for human therapeutics because of viral contamination risks and other infectious agents (YAMADA; KAWASAKI, 2005). The microbial HA is mainly produced by *Streptococcus* that synthesizes the polymer as a extracellular capsule (CHONG et al., 2005).

Streptococci are lactic bacteria which required highly nutritive cultivation media for their growth (CHONG et al., 2005). The typically used media included yeast extract, peptones, or hydrolyzed casein as nitrogen source and growth factors, as magnesium and phosphate salts (ARMSTRONG; COONEY; JOHNS, 1997). The diversity of combinatorial interactions of medium components with the cells metabolism do not permit a satisfactory detailed model elaboration to describe the HA production. Therefore, due to several variables which involve this process and the microorganism metabolic complexity, statistical techniques are used to optimized the fermentation media compositions (WEUSTER-BOTZ, 2000).

The experimental design methodology in the factorial arrangement, associated to the response surfaces analysis, is a tool based on statistical theory, which provides reliable information about the process, minimizing the empiricism that involves trial and error techniques (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978). This is an experimental strategy in which factors are varied together, instead of one at a time. Among the advantages in the use of factorial designs is the reduction in the number of experiments and replications, consequently decreasing the working time and

experiment cost. In addition, it is possible to evaluate the interaction between the factors, besides allowing to calculate and estimate the experimental error (MONTGOMERY, 2013; RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Pan et al. (2017) verified by central composite design the significant effect ($p < 0.05$) of the concentration of sugarcane molasses and yeast extract in the polymer production. Plackett-Burman design was used to estimate the different variables effect on the HA production (KHUE; VO, 2013; MOHAN; BALAKRISHNAN; SIVAPRAKASAM, 2016). Patil, Kamalja and Chaudari (2011) employed a full factorial design and a central composite design to evaluate the concentration of glucose, soy peptone, $MgSO_4$ and K_2HPO_4 . Using these statistical techniques, these authors obtained a 65% increase in HA production (PATIL; KAMALJA; CHAUDHARI, 2011).

In addition, it has been described that amino acids and organic acids can influence in the metabolism of *Streptococcus*. The glutamine addition in the culture medium is known to increase HA production (AROSKAR; KAMAT; KAMAT, 2012; IM et al., 2009; SHAH; BADLE; RAMACHANDRAN, 2013), because it favors the N-acetyl-glucosamine synthesis, precursor unit for the polymer production (CHONG et al., 2005). Aroskar, Kamat S.D. and Kamat D.V. (2012) observed an increase of 0.7 to 1 $g L^{-1}$ HA when added glutamine and arginine at the concentration of 2.0 $g L^{-1}$. Arginine was reported as an essential amino acid for microbial growth and HA production by *S. zooepidemicus* ATCC 35246 (ARMSTRONG; COONEY; JOHNS, 1997). Im et al. (2009) evaluated seventeen amino acids and twenty-three organic acids, obtaining that glutamine, glutamate and oxalic acid positively influence the polymer production.

In this context, the present study had as objective to identify the important components of the fermentation medium, using fractional factorial design, and to optimize by surface response methodology, the HA biosynthesis by *S. zooepidemicus* ATCC 39920. Sucrose, yeast extract, glutamine, glutamate and oxalic acid were the explanatory variables studied. Fermentation in bioreactor was performed in the best condition obtained for the HA production in shake flasks and the variables responses were explained by logistic regression. The production of organic acids, lactate and acetate, and biomass synthesis were observed to analyze the metabolic fluxes under the experimental conditions.

MATERIAL AND METHODS

Microorganism and Medium

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 was obtained from the Brazilian Collection of Environmental and Industrial Microorganisms (CBMAI). The strain was maintained in saline solution containing 50% glycerol stock at -80°C . The inoculum was prepared by transferring 1 mL of the stock culture to 125 mL Erlenmeyer flasks, containing 25 mL of Brain Heart Infusion medium (BHI) (HIMEDIA M-210). The flasks were incubated on an orbital shaker at 150 rpm, at 37°C , for 48h. For each fermentation, the inoculum was standardized to 10% (v / v).

The fermentation media contained (g L^{-1}): sucrose, 10 - 50; yeast extract, 10 - 50; glutamate, 0 - 0,6; glutamine, 0-0,6; oxalic acid 0 - 0,6; K_2HPO_4 , 2,5; NaCl, 2,0 and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5.

Fractional Factorial Design

Fractional factorial design 2^{5-1} was performed to study the concentration effect of sucrose, yeast extract, glutamine, glutamate and oxalic acid on HA production (Table 1). Hyaluronic acid, biomass, lactate and acetate production were evaluated as response variables. The factor level choice was based on the literature and previous work (PAN et al., 2015). Total of 20 assays, being 16 factorial points and 4 central points were conducted in random order. The experiment was carried out in 125 mL Erlenmeyers containing 25 mL fermentation medium at the concentrations described for each run (Tabela 2); initial pH 8.0 at 37°C and 100 rpm for 24 h.

Bioreactor

The fermentation was evaluated under the HA production conditions optimized by fractional factorial designs in 4.5 L bioreactor (Tecnal, Brazil) containing

2 L of fermentation medium with 50 g L⁻¹ of yeast extract and sucrose and 0.6 g L⁻¹ of glutamate, glutamine and oxalic acid. Fermentation was performed at 8.0 pH that was controlled by 8 mol L⁻¹ of NaOH solution. The temperature was maintained at 37 °C, the rotation at 100 rpm and the aeration rate at 0.5 vvm. Samples were collected every 2 h for 24 h.

Analytical Methods

Fermentation samples were centrifuged at 9956 g for 15 min. The biomass was determined by measuring the turbidimetry at $\lambda = 600$ nm and correlated to the biomass curve in g L⁻¹. For the HA, lactate and acetate quantifications, the culture supernatant samples were filtered (0.45 μ m pore size, Millipore) and 20 μ L was injected into a high-performance liquid chromatograph (HPLC) instrument (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The HA evaluation was performed in an OHpak SB-806MHQ 80 \times 300 mm column (Shodex, Japan) at 40°C with a 0.1 M NaNO₃ mobile phase and a 1 mL min⁻¹ flow rate. Lactate and acetate were evaluated using an Aminex 7.8 \times 300 mm HPX- 87H organic acid column (Bio-Rad, CA, USA) at 60°C; the mobile phase was composed of a 0.005 mol L⁻¹ H₂SO₄ solution with a 0.7 mL min⁻¹ flow rate. The peak elution profile was monitored with a Shimadzu RID – 10A refractive index detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

Statistical Analysis

The data analysis was performed using the Software R (R CORE TEAM, 2016) and package the rsm (LENTH, 2009). The fit quality of the models was evaluated by the determination coefficient R² and its statistical significance was assessed by the F-test. The models assumptions, homogeneity of variances and normality of the residues, were evaluated by the Breusch-Pagan test (BREUSCH; PAGAN, 1979) and graphical analysis, and Shapiro-Wilk test (SHAPIRO; WILK, 1965), respectively.

Fractional Factorial Design

For optimal point prediction, a second order polynomial function (equation 1) was fitted to the fractional factorial design experimental results:

$$y_{ij} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon_{ij}$$

(Eq. 1)

in which y_{ij} is the predicted response, β are unknown parameters that will be estimated from the data in the experiment, i and j range from 1 to k variables, x_i and x_j are the independent variables defined on a coded scale from -1 to +1, and ϵ_{ij} is the random error term. The parameter estimates in this regression model turn out to be related to the effect estimates (MONTGOMERY, 2013). The parameters significance of polynomial models and their interactions were tested by analysis of variance (ANOVA) and test-t.

Logistic regression

The profiles of hyaluronic acid, biomass, lactate and acetate productions in bioreactor were modelled using the following non-linear logistic regression (Equation 2):

$$P = P_{max} / (1 + \exp[(x_0 - x)/k])$$

(Eq.2)

where P_{max} is the maximum asymptotic value of biomass, hyaluronic acid, lactate or acetate production (g L^{-1}), k is the numeric scale parameter on the input axis, and x_0 is the x value at the inflection point of the curve (PINHEIRO; BATES, 2000). The parameters significance were tested by t-test.

RESULTS AND DISCUSSION

Fractional Factorial Design

The concentration of carbon and nitrogen sources and other fermentation medium supplements have already been described as important variables for HA productions (IM et al., 2009; PAN et al., 2017; SHAH; BADLE; RAMACHANDRAN, 2013). Through fractional factorial design 2^{5-1} the concentration of sucrose (X_1), yeast extract (X_2), glutamate (X_3), glutamine (X_4) and oxalic acid (X_5) were evaluated for the HA, lactate, acetate and biomass production (Table 1). For each variable response a model was proposed and the assumptions and adequacy of these were satisfied (Table 2 – 5). The models proposed present homogeneity of variance (Breusch-Pagan test, $p > 0.05$) and normality (Shapiro-Wilk test, $p > 0.05$) of the residues, and the lack-of-fit was not significant ($p > 0.05$). Yeast extract and sucrose were the factors that presented positive and significant effect for biomass synthesis (Table 2). The model explained 97.71% of the variability in the response. Armstrong et al. (1997) justify that organic nitrogen sources supply the need of essential amino acids to *Streptococci*, besides containing a large proportional of carbon necessary for microbial synthesis. Corroborating with this result, yeast extract was also the most significant factor for the HA and organic acids production, being its effect positive for all variables responses.

Table 1 – Fractional factorial design 2^{5-1} for the production of hyaluronic acid, lactate, acetate and biomass by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 in different concentrations of sucrose (x_1), yeast extract (x_2), glutamate (x_3), glutamine (x_4) and oxalic acid (x_5).

Runs	Factor levels					Variable Responses			
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	Hyaluronic acid (g L ⁻¹)	Lactate (g L ⁻¹)	Acetate (g L ⁻¹)	Biomass (g L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	+1	0.302	2.611	1.002	0.928
2	+1	-1	-1	-1	-1	0.320	3.547	0.836	1.097
3	-1	+1	-1	-1	-1	0.608	7.619	1.528	1.799
4	+1	+1	-1	-1	1	0.367	8.691	1.355	1.782
5	-1	-1	+1	-1	-1	0.290	3.578	0.995	1.053
6	+1	-1	+1	-1	+1	0.371	2.781	1.091	1.137
7	-1	+1	+1	-1	+1	0.380	9.688	1.581	1.713
8	+1	+1	+1	-1	-1	0.415	8.226	1.154	1.886
9	-1	-1	-1	+1	-1	0.350	3.175	0.870	1.020
10	+1	-1	-1	+1	+1	0.344	2.931	0.960	1.040
11	-1	+1	-1	+1	+1	0.547	8.484	1.467	1.745
12	+1	+1	-1	+1	-1	0.501	4.103	1.756	1.955
13	-1	-1	+1	+1	+1	0.578	3.821	1.887	1.006
14	+1	-1	+1	+1	-1	0.563	3.707	1.245	1.064
15	-1	+1	+1	+1	-1	0.512	8.054	1.239	1.923
16	+1	+1	+1	+1	+1	0.608	7.105	1.294	1.905
17	0	0	0	0	0	0.481	6.009	1.167	1.651
18	0	0	0	0	0	0.562	5.678	1.038	1.666
19	0	0	0	0	0	0.491	6.081	0.976	1.750
20	0	0	0	0	0	0.463	5.919	1.033	1.626

Symbols	Factors	Coded levels		
		-1	0	+1
(X ₁)	Sucrose (g L ⁻¹)	10	30	50
(X ₂)	Yeast extract (g L ⁻¹)	10	30	50
(X ₃)	Glutamate (g L ⁻¹)	0	0.3	0.6
(X ₄)	Glutamine (g L ⁻¹)	0	0.3	0.6
(X ₅)	Oxalic acid (g L ⁻¹)	0	0.3	0.6

Table 2 – Estimates of the model parameters for biomass production by *S. zooepidemicus* ATCC 399 2 from the fractional factorial designs.

Factors	Estimate	Standard error	t-value	p-value
Intercept	1.673	0.032	52.928	< 0.0001 *
x ₁	0.043	0.016	2.692	0.016 *
x ₂	0.398	0.016	25.163	<0.0001 *
x ₂ ²	-0.232	0.035	-6.576	<0.0001 *

Regression: $p < 0.0001$; $R^2 = 0.9771$; $R^2_{\text{adjusted}} = 0.9728$; lack-of-fit: $p = 0.9510$; $p = *$ significant factors ($p < 0.05$); x₁ = sucrose; x₂ = yeast extract

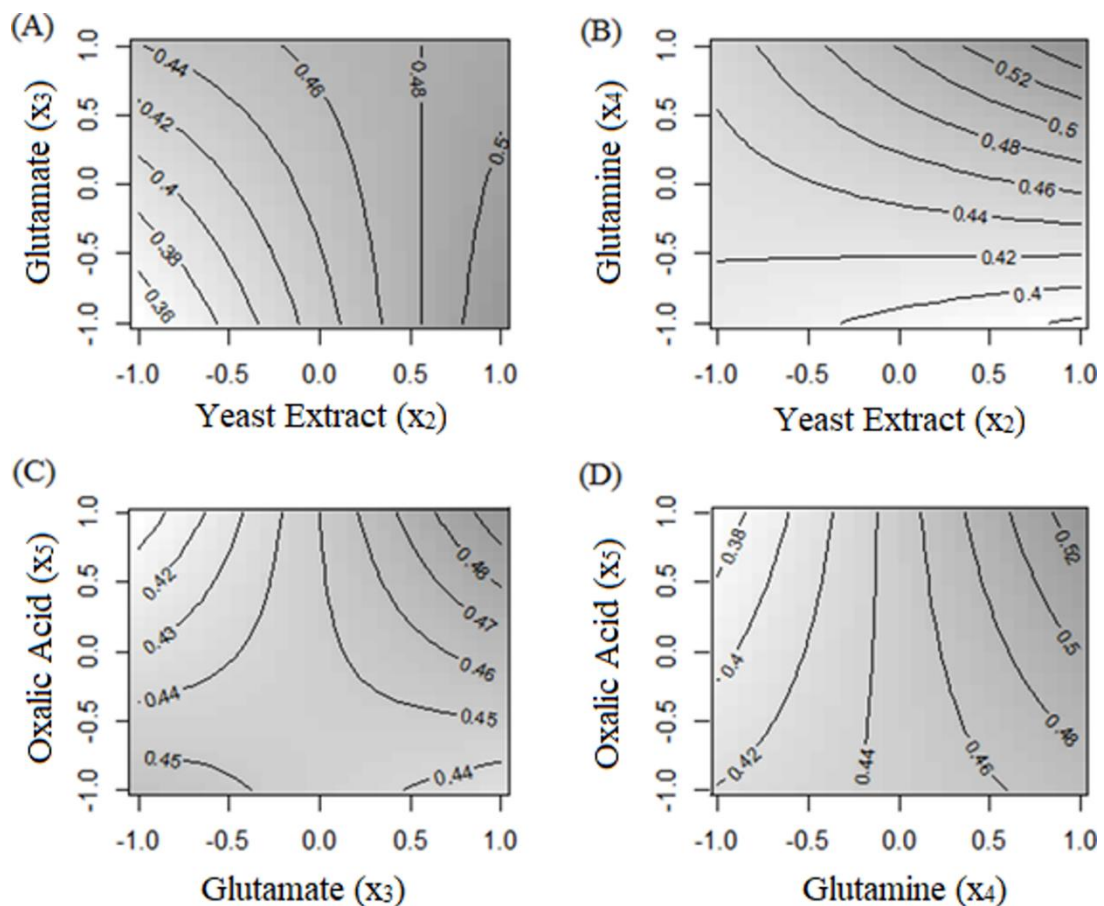
For the HA production (Table 3), the glutamine and its interaction with glutamate were also significant at a 5% significance level. The variables that present higher estimated effect were yeast extract (0.114 g L⁻¹), followed by glutamine (0.106 g L⁻¹). The interactions between yeast extract and glutamate, oxalic acid and glutamine and oxalic acid and glutamate were significant at a 10% significance level. The increase in the polymer production through the addition of glutamine in the cultivation medium is due to this amino acid act as amino group donor to fructose 6-phosphate in presence of amidotransferase enzyme which yields glucosamine 6-phosphate. Later on, this forms N-acetyl-glucosamine is synthesized (SHAH; BADLE; RAMACHANDRAN, 2013). Im et al. (2009) observed an 18% increase in the HA production with addition of glutamine, glutamate and oxalic acid to the fermentation medium. The model proposed for the HA production explained 81.7% of the variability of the data obtained and the result the F-test result ($p < 0.05$) was significant and indicated that this is an adequate model. The contour curve (Figure 1) shows that for all the model variables, the HA production increases the higher the factors concentration. Among the conditions studies, the best condition for HA production was 50 g L⁻¹ yeast extract and 0.6 g L⁻¹ glutamine, glutamate and oxalic acid. Sucrose did not present significant effect in hyaluronic acid production at 10% of significance level. Pires and Santana (2010) e Pan et al. (2015) observed that glucose carbon source also did not exert influence on the polymer production in shake flask cultivations.

Table 3 – Estimates of the model parameters for hyaluronic acid production by *S. zooepidemicus* ATCC 3992 from the fractional factorial designs.

Factors	Estimate	Standard error	t-value	p-value
Intercept	0.448	0.013	34.507	<0.0001 *
X ₂	0.057	0.015	3.950	0.00227 *
X ₃	0.018	0.015	1.213	0.25053
X ₄	0.053	0.015	3.675	0.00366 *
X ₅	0.002	0.015	0.155	0.87974
X ₂ :X ₃	-0.031	0.015	-2.142	0.05537
X ₃ :X ₄	0.035	0.015	2.418	0.03411 *
X ₄ :X ₅	0.029	0.015	1.985	0.07260
X ₃ :X ₅	0.029	0.015	2.031	0.06716

Regression: $p=0.0037$; $R^2 = 0.8170$; $R^2_{\text{adjusted}} = 0.6839$; lack-of-fit: $p=0.2970$; *significant factors ($p<0.05$); x_2 = yeast extract; x_3 = glutamate; x_4 = glutamine; x_5 = oxalic acid

Figure 1 – Contour curve of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 3992 in function of concentration of (a) glutamate (x_3) and yeast extract (x_2); b) glutamine (x_4) and yeast extract (x_2); c) oxalic acid (x_5) and glutamate (x_3); d) oxalic acid (x_5) and glutamine (x_4). Variables when fixed were in the central point.



Lactate and acetate are the main metabolites produced by *Streptococcus* in aerobic cultivation (CHONG; NIELSEN, 2003). The production of lactate and acetate

in the assays range from 2.611 to 9.688 g L⁻¹ and 0.836 to 1.887 g L⁻¹, respectively. The ANOVA of the model obtained to describe the lactate synthesis showed determination coefficient (R²) of 0.99 and it was significant at the 5% significance level. Yeast extract, glutamate, oxalic acid and the interaction between yeast extract and oxalic acid were significant (p <0.05) and showed positive effect for the lactate synthesis (Table 4). The other significant variables of the model presented a negative effect. The interaction between yeast extract and glutamate was not significant, however it was essential to satisfy the model assumptions.

Table 4 - Estimates of the model parameters for lactate production by *S. zooepidemicus* ATCC 3992 from the fractional factorial designs.

Factors	Estimate	Standard error	t-value	p-value
Intercept	5.590	0.092	60.488	<0.0001 *
X ₁	-0.371	0.103	-3.592	0.00706 *
X ₂	2.239	0.103	21.665	<0.0001 *
X ₃	0.363	0.103	3.508	0.00798 *
X ₄	-0.335	0.103	-3.244	0.01181 *
X ₅	0.257	0.103	2.483	0.03796 *
X ₁ :X ₂	-0.344	0.103	-3.327	0.01043 *
X ₁ :X ₄	-0.340	0.103	-3.289	0.01104 *
X ₂ :X ₃	0.160	0.103	1.544	0.16114
X ₂ :X ₄	-0.475	0.103	-4.594	0.00177 *
X ₂ :X ₅	0.489	0.103	4.734	0.00148 *
X ₅ :X ₃	-0.278	0.103	-2.688	0.02758 *

Regression: p<0.0001; R² = 0.9865; R²_{adjusted} = 0.9680; lack-of-fit: p=0.0560; *significant factors (p<0.05); x₁ = sucrose; x₂ = yeast extract; x₃ = glutamate; x₄ = glutamine; x₅ = oxalic acid

The significant variables at the 5% level for the acetate production were yeast extract and the interaction between yeast extract and glutamate (Table 5). At 10% significance the interaction between sucrose and oxalic acid and glutamate and oxalic acid were significant. The main effects of sucrose, glutamate and oxalic acid remained in the model because they were present significantly in the interactions between the compounds. The model for acetate production obtained determination coefficient of 0.72.

Table 5 - Estimates of the model parameters for acetate production by *S. zooepidemicus* ATCC 3992 from the fractional factorial designs.

Factors	Estimate	Standard error	t-value	p-value
Intercept	1.224	0.044	28.075	<0.0001 *
X ₁	-0.055	0.049	-1.126	0.28213
X ₂	0.155	0.049	3.190	0.00778 *
X ₃	0.044	0.049	0.911	0.38009
X ₅	0.063	0.049	1.302	0.21747
X ₁ :X ₅	-0.100	0.049	-2.046	0.06336
X ₂ :X ₃	-0.149	0.049	-3.063	0.00985*
X ₃ :X ₅	0.089	0.049	1.828	0.09248

Regression: $p=0.0121$; $R^2 = 0.7201$; $R^2_{\text{adjusted}} = 0.5569$; lack-of-fit: $p=0,0626$; *significant factors ($p<0.05$); x_1 = sucrose; x_2 = yeast extract; x_3 = glutamate; x_5 = oxalic acid

Although assays in shake flask are the most used when applying statistical designs for the biotechnological processes optimization, they have some limitations such as unable to control the pH and aeration (GAMBOA-SUASNAVART et al., 2013; LIU et al., 2008; MOHANDAS et al., 2015; PAN et al., 2017). The final pH ranged from 4.44 to 4.76 in the assays in shake flask by fractional factory design. The decrease in pH may have caused the inhibition of microbial growth and metabolites production. Therefore, fermentation in a bioreactor was performed under the best condition obtained for the HA production. The concentration of sucrose was not significant for the polymer production, but it had a positive effect on biomass. Then, in the conditions studied, it was defined that the best condition for the HA production by *S. zooepidemicus* was in medium containing 50 g L⁻¹ of sucrose and yeast extract and 0.6 g L⁻¹ of glutamate, glutamine and acid oxalic. The value predicted by the model in this condition was 0.640 g L⁻¹ HA.

Bioreactor

The fermentation in bioreactor was performed using the culture medium optimized by the fractional factorial assay. The production of HA, biomass, lactate and acetate were modelled using logistic regression (Equation 2). The proposed models (Equation 2; Table 6) showed high agreement between predicted and experimental data with R^2 values higher than 0.99. The p-values ($p<0.001$) from Fisher's F-test also indicated the consistency of the models to describe the experimental data. The residues analysis showed homogeneity of variance and normality (Shapiro-Wilk test,

$p > 0.05$) of the residual, taking into account the assumptions of the model. The kinetic parameters defined by equation 2 were statistically significant ($p < 0.001$) for biomass and production of hyaluronic acid, lactate and acetate.

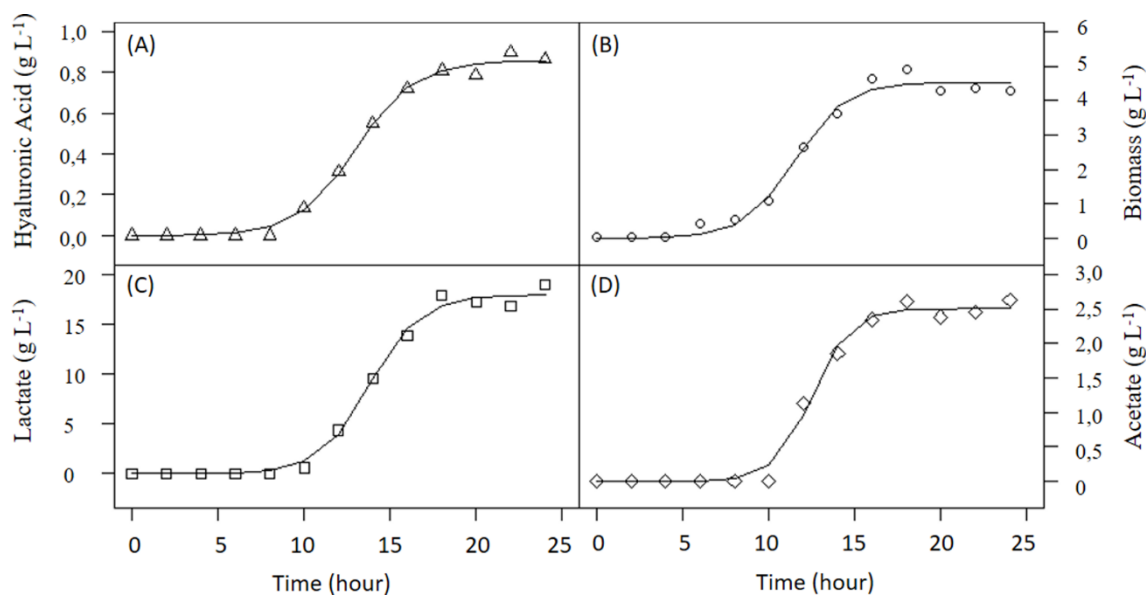
Table 6 – Parametric estimations corresponding to logistic regression (Equation 2) applied to the production of hyaluronic acid, lactate, acetate and biomass in bioreactor by *S. zooepidemicus* ATCC 39920.

Parameters	Hyaluronic acid	Lactate	Acetate	Biomass
P_{max}	0.860 ± 0.017	17.958 ± 0.398	2.503 ± 0.060	4.525 ± 0.123
K	1.712 ± 0.151	1.468 ± 0.159	1.114 ± 0.171	1.500 ± 0.223
x_0	13.036 ± 0.179	13.855 ± 0.186	12.532 ± 0.198	11.513 ± 0.260
R^2	0.996	0.994	0.991	0.988
p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

The maximum concentration asymptotic of HA was 0.860 g L^{-1} (Figure 2A). There was a 34% increase in the polymer production compared with predict value in shake flask (0.640 g L^{-1}). This increase in the HA production can be explained by the pH control, since in shake flask the pH decreased during the fermentation. Previous work has shown that the optimal pH for the polymer production by *S. zooepidemicus* ranges from 7 to 8 (JOHNS; GOH; OEGGERU, 1994; LIU et al., 2008; PAN et al., 2015; ZAKERI; RASAE, 2016). Pan et al. (2017) evaluated the HA production in bioreactor with controlled and uncontrolled pH in sugarcane molasses medium. The authors obtained an increase in the polymer production of 2.86 times with controlled pH at 8.0. The aeration also influences polymer production (JAGANNATH; RAMACHANDRAN, 2010; OLIVEIRA et al., 2013). The positive effect of alkaline pH and aeration on the HA production might be due to the exposition of the microorganisms to the stress condition in which the cells produce the capsule as a protective mechanism (HASEGAWA et al., 1999; LIU et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013).

The synthesis of organic acids and biomass also increased in bioreactor compared to the shake flask assays (Figure 2B). After 8 hours of lag phase, cells started exponential growth until 14 hours, and biomass concentration reached maximum concentration asymptotic of 4.525 g L^{-1} . The maximum production of lactate and acetate were 17.985 g L^{-1} and 2.503 g L^{-1} , respectively (Figure 2C and 2D).

Figure 2 – Production of hyaluronic acid (A), biomass (B), lactate (C) and acetate (D) by *S. zooepidemicus* ATCC 39920 in bioreactor.



CONCLUSION

In this study the hyaluronic acid production by *S. zooepidemicus* was optimized using fractional factorial design. The best defined condition for the polymer production was 50 g L⁻¹ sucrose and yeast extract and 0.6 g L⁻¹ glutamine, glutamate and oxalic acid. Yeast extract was the significant explanatory variable that exhibited higher positive effect for hyaluronic acid production and synthesis of lactate, acetate and biomass. In bioreactor, pH 8.0 and 0.5 vvm, the maximum hyaluronic acid production increased to 0.860 g L⁻¹ compared to 0.640 g L⁻¹ in shake flask.

ACKNOWLEDGEMENTS The authors thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES – Brazil) for financial support.

REFERENCES

- 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.
- AROSKAR, V. J.; KAMAT, S. D.; KAMAT, D. V. Effect of various nutritional supplements on hyaluronic acid production. **IIOAB Letters**, v. 2, n. 1, p. 16–24, 2012.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters : an introduction to design, data analysis, and model building**. [s.l.] Wiley, 1978.
- BREUSCH, T. S.; PAGAN, A. R. A Simple test for heteroscedasticity and random coefficient variation. **Econometrica**, v. 47, n. 5, p. 1287 -1294, 1979.
- CHEN, W. Y.; ABATANGELO, G. Functions of hyaluronan in wound repair. **Wound Repair and Regeneration**, v. 7, n. 2, p. 79–89, 1999.
- CHONG, B. F.; BLANCK, L. M.; MCLAUGHLIN, R.; NIELSEN, L. K. 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.
- GAMBOA-SUASNAVART, R. A.; MARÍN-PALACIO, L. D.; MARTÍNEZ-SOTELO, J. A.; ESPITIA, C.; SERVÍN-GONZÁLEZ, L.; VALDEZ-CRUZ, N. A.; TRUJILLO-ROLDÁN, M. A. Scale-up from shake flasks to bioreactor, based on power input and *Streptomyces lividans* morphology, for the production of recombinant APA (45/47 kDa protein) from *Mycobacterium tuberculosis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 1421–1429, 2013.
- HASEGAWA, S.; NAGATSURU, M.; SHIBUTANI, M.; YAMAMOTO, S.; HASEBE, S. Productivity of concentrated hyaluronic acid using a Maxblend fermentor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 1, p. 68–71, 1999.
- HERMANS, J.; HERMANS, J.; REIJMAN, M.; GOOSSENS, L. M.; VERBURG, H.; BIERMA-ZEINSTRAS, S. M.; KOOPMANSCHAP, M. A. A cost utility analysis of high molecular weight hyaluronic acid for knee osteoarthritis in everyday clinical care in patients in the working age. An economic evaluation of a randomized clinical trial. **Arthritis Care & Research**, v. 11, n. 5, p. 475–476, 2017.
- IM, J.-H.; SONG, J.-M.; KANG, J.-H.; KANG, D.-J. Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. **Journal of Industrial Microbiology & 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.; OEGGERU, A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 5, p. 507–512, 1994.

KHUE, N. T. H.; VO, P. T. M. Study of complex nutrients, temperature and salts on hyaluronic acid production in *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 43079. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 5, p. 12–15, 2013.

KOGAN, G.; SOLTÉS, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 1, p. 17–25, 2007.

LENTH, R. V. Response-surface methods in R, using rsm. **Journal of Statistical Software**, v. 32, n. 7, p. 1–17, 2009.

LIANG, J.; JIANG, D.; NOBLE, P. W. Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 186–203, 2016.

LIU, L.; WANG, M.; DU, G.; CHEN, J. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. **Letters in applied microbiology**, v. 46, n. 3, p. 383–388, 2008.

MANDENIUS, C.; BRUNDIN, A. Review: biocatalysis and bioreactor design. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 1191–1203, 2008.

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**, v. 46, n. 6, p. 628–638, 2016.

MOHANDAS, A.; ANISHA, B. S. S.; CHENNAZHI, K. P. P.; JAYAKUMAR, R. Chitosan-hyaluronic acid/VEGF loaded fibrin nanoparticles composite sponges for enhancing angiogenesis in wounds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 127, p. 105–113, 2015.

MONTGOMERY, D. C. Design and analysis of experiments. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc, 2013.

OLIVEIRA, A. H.; OGRODOWSKI, C. C.; MACEDO, A. C.; SANTANA, M. H. A. Cashew apple juice as microbial cultivation medium for non-immunogenic hyaluronic acid production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1097–1104, 2013.

PAN, N. C.; VIGNOLI, J. A.; BALDO, C.; PEREIRA, H. C. B.; SILVA, R. S. S. F.; CELLIGOI, M. A. P. C. 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.; PEREIRA, H. C. B.; SILVA, M. D. L. C.; VASCONCELOS, A. F. D.; CELLIGOI, M. A. P. C. Improvement production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* in sugarcane molasses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 1, p. 276–293, 2017.

PATIL, K. P.; KAMALJA, K. K.; CHAUDHARI, B. L. Optimization of medium components for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 using a statistical approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1573–1577, 2011.

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.

R, C. T. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria, 2016. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 12 jan. 2017

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Experimental design and process optimization. 1 edition ed. [s.l.] CRC Press, 2014.

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, p. 53–60, 2013.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3, p. 591–611, 1965.

TRIPODO, G. et al. Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, n. Pt B, p. 400–16, 2015.

WEUSTER-BOTZ, D. Experimental design for fermentation media development: Statistical design or global random search? **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 5, p. 473–483, 2000.

YAMADA, T.; KAWASAKI, T. Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: New approaches. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 6, p. 521–8, 2005.

ZAKERI, A.; RASAEI, M. J. Identification of wild type *Streptococcus zooepidemicus* and optimization of culture medium and fermentation conditions for production of hyaluronic acid. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 13, n. 1, p. 189–198, 2016.

**5.2 PROCESSO BIOTECNOLÓGICO UTILIZANDO MELAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO MICROBIANO**

**BIOTECHNOLOGICAL PROCESS USING SUGARCANE MOLASSES FOR
PRODUCTION OF MICROBIAL HYALURONIC ACID**

Nicole Caldas Pan; Josiane Alessandra Vignoli; Hanny Cristina Braga Pereira;
Cristiani Baldo; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi



02/08/2016 870160041135
10:29

00.000.2.2.16.0552096.3

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 017870 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 78840489000153

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS UNIVERSITARIO

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86055-900

País: Brasil

Telefone: (043) 3371 5812

Fax: (043) 3371 5812

Email: aintecpi@uel.br

Escritório de Propriedade Intelectual

I

FORMULÁRIO DE DECLARAÇÃO DE INVENÇÃO

O Formulário de Declaração de Invenção (FDI) deve ser usado por professores, funcionários e alunos da UEL e pelas empresas da Intuel/Aintec para declarar a criação de uma invenção e solicitar sua propriedade intelectual.

Após o preenchimento do FDI coloque-o em envelope fechado, protocole na UEL (na ASUEL) endereçando-o para:

AINTEC/UEL

Escritório de Propriedade Intelectual – EPI

Com isto sua Declaração de Invenção fica oficialmente registrada e será enviados ao Escritório de Propriedade Intelectual (EPI) da Aintec para análise, parecer e outras providências.

Os inventores devem ler os documentos sobre a Política de Propriedade Intelectual da UEL, no endereço www.aintec.uel.br/aintec/legislação.

Escritório de Propriedade Intelectual

1. INFORMAÇÃO PESSOAL

Nome para contato: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Depto. na UEL./Empresa: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE

Tel: (43) 3371-4270

e-mail: macelligoi@uel.br

2. TÍTULO PROPOSTO PARA A INVENÇÃO: Processo biotecnológico utilizando melão de cana-de-açúcar para produção de ácido hialurônico microbiano

Palavras-chave: Ácido hialurônico, *Streptococcus zooepidemicus*; melão de cana-de-açúcar

3. ÁREA/SUB-ÁREA/ESPECIALIDADE DA INVENÇÃO (SE SOUBER): biotecnologia

4. CAMPO DA INVENÇÃO. ESTA INVENÇÃO DIZ RESPEITO FUNDAMENTALMENTE

A: A presente invenção refere-se à produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* em melão de cana-de-açúcar visando à economia e o aumento na produção do polímero.

5. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

5.1. Descreva o problema ou desafio técnico que a presente invenção se propõe a solucionar: O ácido hialurônico (AH), maior componente da matriz extracelular, é um glicosaminoglicano não sulfatado composto de unidades dissacarídicas de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina. Em humanos, o AH está presente em todos os tecidos sendo abundante no humor vítreo, cordão umbilical, fluido sinovial, válvulas cardíacas e tecido esquelético. Dentre as funções biológicas do polímero destaca-se a de preenchimento, hidratação, lubrificação das articulações, e fornecimento de uma matriz para a adesão e migração celular estimulando a proliferação tecidual (LIANG; JIANG; NOBLE, 2016). Adicionalmente, o AH é um polímero biodegradável e não imunogênico que apresenta propriedades hidrofílicas e viscoelásticas (TRIPODO et al., 2015). Devido as favoráveis características físico-químicas e biológicas, o AH é amplamente utilizado em aplicações biomédicas, como no tratamento de osteoartrite (YU et al., 2014), cirurgia plástica (WU et al., 2016), cirurgia oftalmológica (KRETZ; LIMBERGER; AUFFARTH, 2014),

Escritório de Propriedade Intelectual

reparo tecidual (WU et al., 2015), na formulação de microcápsulas para liberação controlada de fármacos (YANG et al., 2015) e em cosméticos (ITO, 2014).

O polímero disponível comercialmente pode ser obtido por extração animal ou produção microbiana. Na extração animal o polímero se encontra complexado com proteoglicanos, necessitando de processos de extração e purificação que podem encarecer o produto final. Além disso, a utilização de compostos bioquímicos derivados de animais para terapêuticas humanas não são recomendados devido aos riscos de contaminação viral e de outros agentes infecciosos. Portanto, a extração do ácido hialurônico de tecido animal vem sendo substituída pela produção microbiana (CHONG et al., 2005; YAMADA; KAWASAKI, 2005; LIU et al., 2011). No entanto, o continuo aumento no custo das matérias-primas para o meio de cultivo, principalmente fontes de nitrogênio e de carbono (VÁZQUEZ et al., 2010), reduz a competitividade comercial do AH microbiano. Logo, faz-se necessário encontrar substratos mais baratos para reduzir o custo de produção do polímero (AMADO et al., 2016).

5.2. Descreva as conhecidas soluções já existentes ao problema ou desafio, seus limites e deficiências: A possibilidade de utilizar recursos agrícolas e resíduos industriais como matérias-primas alternativas para produção de AH microbiano é pouco explorada. Uma simples análise de custo estima que a utilização de meios de cultivo formulados com subprodutos pode reduzir em mais de 50% o custo do processo, quando comparada com as fermentações em meios sintéticos. O soro de leite, subproduto da fabricação de queijos, demonstrou ser um substituto adequado às peptonas comerciais na produção do polímero (AMADO et al., 2016). Peptonas geradas a partir de resíduos da pesca também são substratos de alto valor para os processos fermentativos (VÁZQUEZ et al., 2015). Dentre os derivados agrícolas já estudados para a produção, têm-se o suco de caju, proteína de soja, melão de soja e milhocina (PIRES et al., 2010; PAN et al., 2015). O suco de caju suplementado com extrato de levedura mostrou ser um meio promissor na produção de AH de baixa massa molar devido à alta concentração de vitaminas do complexo B e ácido ascórbico na composição nutricional do fruto (OLIVEIRA et al., 2013).

5.3. Descreva como sua invenção supera estes limites e deficiências, destacando suas vantagens e ganhos: O desenvolvimento industrial é um fator importante para a economia de um país. Contudo, diretamente proporcional ao crescimento industrial, urbano e populacional, têm-se a elevada geração de resíduos e

Escritório de Propriedade Intelectual

subprodutos industriais que podem causar riscos ao meio ambiente e a saúde (KAUR et al., 2014). A utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais em bioprocessos não somente representa substratos alternativos para a produção de biomoléculas, mas também contribui com o meio ambiente (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Melaço de cana-de-açúcar, subproduto da fabricação de açúcar, vem sendo estudado como uma matéria-prima de baixo custo em processos fermentativos. Esse substrato tem sido utilizado para a produção de etanol (MURUAGA et al., 2016), goma xantana (FARIA et al., 2011), celulose (ÇAKAR et al., 2014), goma velana (AI et al., 2015), orinitina e ácido succínico (XU et al., 2015). A elevada aplicação do melaço de cana-de-açúcar se deve a alta concentração de sacarose, glicose, frutose e uma grande variedade de sais e fontes de nitrogênio, que são essenciais ao metabolismo microbiano (OLIVEIRA et al., 2007; XU; XU, 2014).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de açúcar, sendo responsável por aproximadamente 20% das produções e 40% das exportações. Em média, considerando a última década, o país produziu 33.613 mil toneladas de açúcar, sendo que a última safra 2015/2016 foi de 33.928 mil toneladas (UNICA, 2016). Logo, considerando que para 1 tonelada de açúcar processado, 0,3 toneladas são descartadas (LI et al., 2015), estima-se que no Brasil 10 milhões de toneladas de melaço de cana-de-açúcar são gerados anualmente. Portanto, além de ser uma matéria prima de baixo custo e rica em nutrientes, o melaço de cana-de-açúcar é gerado em elevado volume no país o que o torna uma matéria-prima viável para a aplicação biotecnológica.

As inúmeras aplicações do AH justificam os esforços na busca por uma produção economicamente viável e sustentável. A produção de ácido hialurônico utilizando melaço de cana-de-açúcar vem sendo estudada por nosso grupo, e mostrou ser uma fonte de carbono promissora para a produção do polímero. Dessa forma, a presente invenção refere-se a um novo processo biotecnológico utilizando melaço de cana-de-açúcar para produção de ácido hialurônico em biorreator por *Streptococcus zooepidemicus*. A produção do polímero em melaço de cana-de-açúcar superou a obtida em sacarose, demonstrando o alto valor do substrato e a eficiência do processo desenvolvido. O AH produzido em melaço de cana-de-açúcar foi caracterizado, comprovando a qualidade do produto e a elevada atividade antioxidante.

Escritório de Propriedade Intelectual

6. DESCRIÇÃO DETALHADA

6.1. Descreva detalhadamente a invenção de forma que um técnico ou pessoa com conhecimento técnico no assunto consiga reproduzi-la:

Microorganismo

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 foi obtido da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – CBMAI.

Preservação do microrganismo e inóculo

A cultura de *Streptococcus zooepidemicus* foi mantida em solução salina contendo 50% de glicerol a -80°C . O inóculo foi preparado transferindo 1 mL desta cultura para Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio de infusão de cérebro e coração (BHI) a 37°C e 150 rpm por 48 h.

Clarificação do Melaço de cana-de-açúcar

Melaço de cana-de-açúcar foi diluído para 15% (m/v) de açúcares totais (Dubois et al., 1956) com água destilada, centrifugado ($9.956 \times g$, 4°C 15 min), tratado com carvão ativado 12% a 70°C em constante agitação por 1 h, centrifugado novamente e filtrado (Whatman, nº 1).

Fermentações

A produção de AH em melaço de cana-de-açúcar foi realizada utilizando reator Bio-tec (Tecnal) com capacidade de 4,5 L, equipado com sensor de pH (Mettler Toledo) e temperatura (Pt-100 classe A, Mettler Toledo). O volume operacional foi de 2 L do meio contendo (g.L^{-1}): melaço de cana-de-açúcar clarificado, 50 de açúcares totais (Dubois et al., 1956); extrato de levedura, 50; glutamina, 0,6; glutamato, 0,6; ácido oxálico, 0,6; K_2HPO_4 , 2,5; NaCl, 2,0 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5. Melaço de cana-de-açúcar e MgSO_4 foram autoclavados em separado. O meio foi inoculado com 10% v/v. O pH foi controlado em 8,0 pela adição de NaOH 10 mol/L e a temperatura foi mantida a 37°C . A taxa de aeração foi de 0,5 vvm e agitação de 100 rpm. Amostras foram retiradas a cada 2 horas, durante 24 h. O cultivo foi interrompido por centrifugação a $9.956 \times g$ por

Escritório de Propriedade Intelectual

15 min, a 4°C. Do sobrenadante foi avaliada a concentração de ácido hialurônico, láctico, acético, fórmico e etanol.

As concentrações utilizadas de melão de cana-de-açúcar, extrato de levedura, glutamina, glutamato e ácido oxálico foram definidas de acordo com estudo prévio em que as concentrações de sacarose (10; 30; 50 g.L⁻¹) (X₁), extrato de levedura (10; 30; 50 g.L⁻¹) (X₂), glutamato (0; 0,3; 0,6 g.L⁻¹) (X₃), glutamina (0; 0,3; 0,6 g.L⁻¹) (X₄) e ácido oxálico (0; 0,3; 0,6 g.L⁻¹) (X₅) foram avaliadas por planejamento fatorial fracionado 2⁽⁵⁻¹⁾ com 4 pontos centrais totalizando 20 ensaios (Tabela 1). Os fatores e os níveis das variáveis foram baseados na literatura e em experimentos preliminares. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio suplementado por (g.L⁻¹): K₂HPO₄, 2,5; NaCl, 2,0 e MgSO₄.7H₂O, 1,5; pH inicial 8,0 a 37°C e 100 rpm por 24h. Sacarose e MgSO₄ foram autoclavados separadamente. O meio foi inoculado com 10 % (v/v). O cultivo foi interrompido por centrifugação a 9956 × g por 15 min a 4°C. No sobrenadante foram quantificados os ácidos hialurônico, láctico, acético, fórmico e etanol. A resposta concentração de ácido hialurônico em g.L⁻¹ obtida no experimento realizado foi analisada pelo programa Statistica 9.0 para análise de variância (ANOVA) ao nível de significância de 5%, e metodologia de superfície de resposta (MRS) para otimização da produção. O modelo codificado ($y=0,0453+0,051x_2^*+0,024x_3+0,059x_4^*+0,029x_1x_3^*-0,037x_2x_3^*+0,041x_3x_4^*+0,023x_3x_5+0,023x_4x_5$) explicou 87% dos resultados esperados e foi utilizado para gerar a superfície de resposta (Figura 1). O modelo ajustado indicou que a melhor condição para a produção de AH foi de 50 g.L⁻¹ de sacarose, 50 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 0,6 g.L⁻¹ de glutamina, 0,6 g.L⁻¹ de glutamato e 0,6 g.L⁻¹ de ácido oxálico. A análise de variância mostrou que extrato de levedura (x₂) (p=0,0017) e glutamina (x₄=0,0006) foram significativos para p<0,05. Na melhor condição obtida por meio do planejamento fatorial fracionado (50 g.L⁻¹ de sacarose e extrato de levedura e 0,6 g.L⁻¹ de glutamina, glutamato e ácido oxálico) foram realizados cultivos em biorreator com pH controlado e aeração de 0,5 vvm em sacarose e em melão de cana-de-açúcar. Considerando que aproximadamente 85% dos açúcares totais do melão de cana-de-açúcar é sacarose, definimos a concentração a ser utilizada de melão de cana-de-açúcar em 50 g.L⁻¹, concentração está definida como ótima para a sacarose.

Em biorreator, o AH foi produzido em sacarose e em melão de cana-de-açúcar conforme as condições descritas anteriormente. Em melão de cana-de-açúcar a



Escritório de Propriedade Intelectual

produção de AH foi 3,14 vezes maior que a produção máxima obtida em sacarose (Figura 2 e 3). Esses resultados mostram a eficácia do processo desenvolvido para a produção de ácido hialurônico em melão de cana-de-açúcar. Devido ao baixo custo do melão de cana-de-açúcar esta é uma estratégia promissora para a redução do custo de produção do AH.

Tabela 1 - Produção de ácidos hialurônico, láctico, fórmico e acético por *Streptococcus zooepidemicus* variando a concentração de sacarose, extrato de levedura, glutamato, glutamina e ácido oxálico por planejamento fatorial fracionado $2^{(5-1)}$

Ensaio (ordem padrão)*	Níveis dos Fatores					Respostas			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Ácido hialurônico (g.L ⁻¹)	Ácido láctico (g.L ⁻¹)	Ácido fórmico (g.L ⁻¹)	Ácido acético (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	+1	0,302	2,611	0,068	1,002
2	+1	-1	-1	-1	-1	0,320	3,547	0,932	0,836
3	-1	+1	-1	-1	-1	0,608	7,619	0,000	1,528
4	+1	+1	-1	-1	1	0,367	8,691	0,376	1,355
5	-1	-1	+1	-1	-1	0,290	3,578	0,307	0,995
6	+1	-1	+1	-1	+1	0,371	2,781	0,293	1,091
7	-1	+1	+1	-1	+1	0,380	9,688	2,119	1,581
8	+1	+1	+1	-1	-1	0,415	8,226	0,592	1,154
9	-1	-1	-1	+1	-1	0,350	3,175	0,244	0,870
10	+1	-1	-1	+1	+1	0,344	2,931	0,484	0,960
11	-1	+1	-1	+1	+1	0,547	8,484	1,249	1,467
12	+1	+1	-1	+1	-1	0,501	4,103	1,537	1,756
13	-1	-1	+1	+1	+1	0,578	3,821	0,698	1,887
14	+1	-1	+1	+1	-1	0,563	3,707	1,045	1,245
15	-1	+1	+1	+1	-1	0,512	8,054	0,963	1,239
16	+1	+1	+1	+1	+1	0,608	7,105	0,000	1,294
17	0	0	0	0	0	0,481	6,009	0,539	1,167
18	0	0	0	0	0	0,562	5,678	0,366	1,038
19	0	0	0	0	0	0,491	6,081	0,040	0,976
20	0	0	0	0	0	0,463	5,919	0,581	1,033

Códigos	Fatores	Níveis		
		-1	0	+1
(X ₁)	Sacarose (g.L ⁻¹)	10	30	50
(X ₂)	Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	10	30	50
(X ₃)	Glutamato (g.L ⁻¹)	0	0,3	0,6
(X ₄)	Glutamina (g.L ⁻¹)	0	0,3	0,6
(X ₅)	Ácido oxálico (g.L ⁻¹)	0	0,3	0,6

(*) Os ensaios foram aleatorizados

Escritório de Propriedade Intelectual

Os resultados obtidos também demonstraram que as condições de cultivo influenciam diretamente na biomassa e síntese de ácidos orgânicos. A Tabela 1 mostrou que o acréscimo na concentração de extrato de levedura aumentou a produção de ácido láctico, sendo que em 10 g.L⁻¹ (Ensaio 1, 2, 5, 6, 13 e 16) esta variou de 2,661 a 3,821 g.L⁻¹, em 30 g.L⁻¹ (Ensaio 17, 18, 19 e 20) de 5,678 a 6,081 g.L⁻¹ e em 50 g.L⁻¹ (Ensaio 3, 4, 7, 8, 11,12, 15 e 16) de 4,103 a 9,688 g.L⁻¹. A concentração de ácido láctico e acético aumentou quando comparado o ensaio em Erlenmeyer (Ensaio 16 – Tabela 1) com a fermentação em biorreator e meio contendo sacarose (Figura 2). Ácido fórmico somente foi detectado em cultivos em Erlenmeyer, o que indica que em biorreator a enzima piruvato formato liase foi inibida devido à aeração. Etanol não foi observado nas condições estudadas. Em meloço de cana-de-açúcar (Figura 2) a síntese de ácido láctico e biomassa aumentaram 2,34 e 1,90 vezes, respectivamente, quando comparados à fermentação em sacarose. Logo, tem-se que o cultivo em meloço de cana-de-açúcar também favoreceu a biomassa e a síntese de ácido láctico.

Quantificação do ácido hialurônico, láctico, acético, fórmico e etanol

Para a quantificação dos ácidos hialurônico, láctico, acético, fórmico e etanol amostras do sobrenadante foram filtradas em membranas de 0,45 µm (Milipore) e injetadas (20 µL) em cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) equipado com detector de índice de refração (Shimadzu RID – 20A). Para avaliação do ácido hialurônico foi utilizada coluna OHPak SB-806M HQ 80 × 300mm (Shodex, Japan), mantida a 40°C, e solução de NaNO₃ 0,1 M a 1 mL.min⁻¹ como fase móvel. Ácidos láctico, acético, fórmico e o etanol foram estudados utilizando coluna Aminex HPX – 87H 300 × 7,8 mm, mantida a 60°C, e solução de H₂SO₄ 0,005 mol.L⁻¹ como fase móvel a 0,7 mL.min⁻¹.

Separação do AH obtido em meio contendo meloço de cana-de-açúcar

Para a caracterização do AH, amostra obtida após 24 h de cultivo em meloço de cana-de-açúcar foi centrifugada (9,956 × g, 15 min, 4°C), e o sobrenadante livre de célula foi precipitado com etanol na proporção de 1.5:1 (v/v) de etanol:sobrenadante a 4°C por 1 hora. O AH foi redissolvido em solução NaCl 0.15 mol.L⁻¹. Três precipitações foram realizadas para aumentar a pureza do AH. Ácido tricloroacético (1%) foi adicionado até a solução de AH atingir pH 2,0 e esta foi mantida por 1 hora a 4°C. A

Escritório de Propriedade Intelectual

solução foi centrifugada a $7.744 \times g$ a 4°C por 30 min. O sobrenadante foi dialisado por 48 h com seis trocas de água destilada. O produto obtido na dialise foi liofilizado para a caracterização estrutural e antioxidante do AH produzido. Hialuronato de sódio (Sigma-Aldrich, Brazil Ltd.) foi utilizado como padrão.

Caracterização do AH obtido em meio contendo melão de cana-de-açúcar

As análises de infravermelho com transformada em Fourier (FTIR) foram realizadas em comprimento de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} em espectrômetro IR PRESTIGE-21 (Shimadzu, Kyoto, Japan). As amostras foram comprimidas em discos de KBr e trinta e duas varreduras com resolução de 4 cm^{-1} foram calculadas e referenciadas contra o ar.

O espectro de absorção UV-Vis foi avaliado utilizando espectrofotômetro Biochrom Libra s22 entre 190 - 450 nm . Água destilada foi usada como referência e para diluição das amostras.

A atividade antioxidante foi estimada usando 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich Brazil Ltd.). Para isso foi usado $300\text{ }\mu\text{L}$ de DPPH 0.1 mM em etanol adicionado a 1 mL de amostra nas concentrações de $0.2 - 1.0\text{ g.L}^{-1}$. A mistura foi mantida por 30 min em temperatura ambiente. A absorbância foi mensurada a 517 nm contra um branco (água substituindo a amostra e etanol substituindo DPPH). A atividade antioxidante foi calculada como $(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$, onde A_0 é a absorbância do controle (água substituindo a amostra), A_1 é a absorbância da amostra e A_2 é a absorbância da amostra nas mesmas condições de A_1 com etanol substituindo a solução de DPPH.

Os espectros de FTIR (Figura 4) e UV-Vis (Figura 5) demonstraram que o AH produzido em meio contendo melão de cana-de-açúcar apresentou características estruturais similares ao AH comercial e a atividade antioxidante obtida para o AH produzido foi de 63% na concentração de 1 g.L^{-1} (Figura 6). Portanto, o processo biotecnológico desenvolvido demonstrou a possibilidade de produzir ácido hialurônico com características desejadas às indústrias biomédicas e cosméticas utilizando um substrato de baixo custo, o melão de cana-de-açúcar.

Escritório de Propriedade Intelectual

7. DESENHOS E ESQUEMAS

7.1 Havendo desenhos e esquema que auxiliem na interpretação da invenção anexe-os abaixo, com comentários e explicações para cada um dele

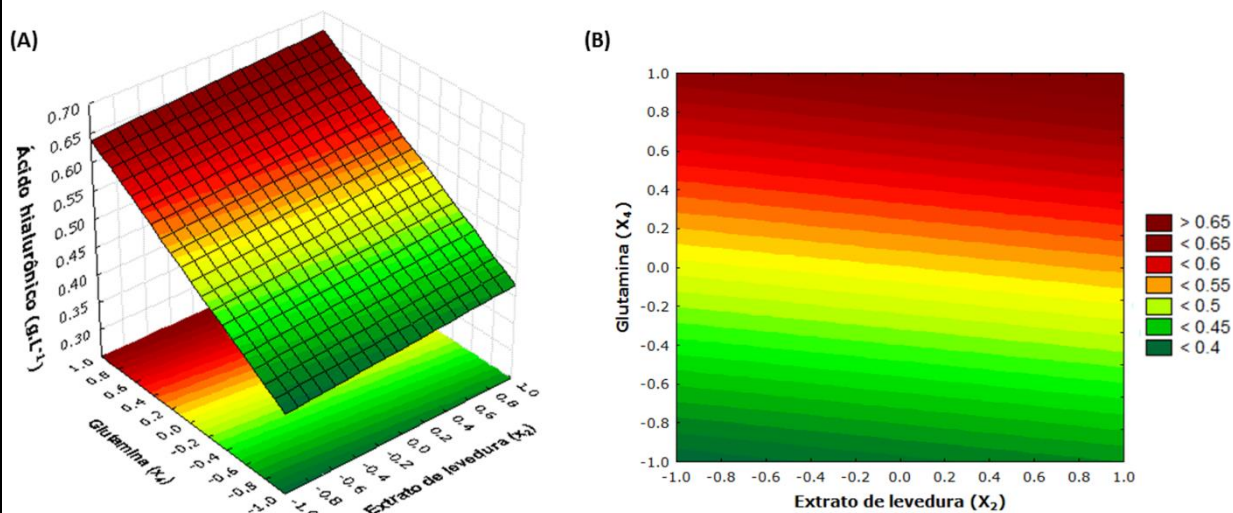


Figura 1. Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* relacionando glutamina (x_1) e extrato de levedura (x_2) e fixando as demais variáveis no nível +1.0.

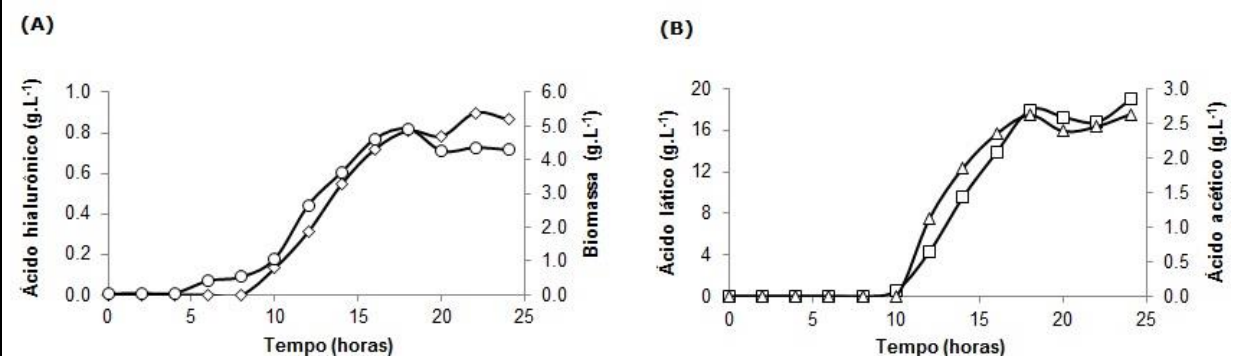


Figura 2. Produção de ácido hialurônico (\diamond), biomassa (\circ), ácido láctico (\square), ácido acético (Δ) por *S. zooepidemicus* ATCC 39920 em biorreator nas condições otimizadas pelo planejamento experimental em sacarose.



Escritório de Propriedade Intelectual

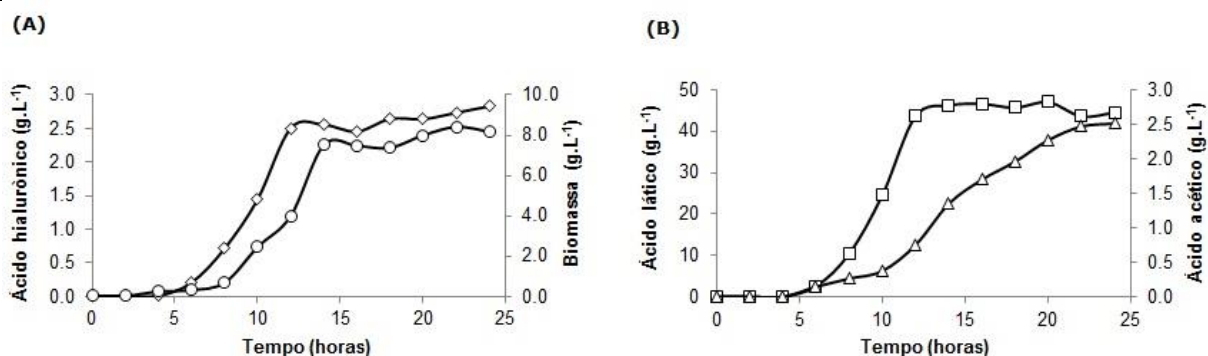


Figura 3. Produção de ácido hialurônico (\diamond), biomassa (\circ), ácido láctico (\square), ácido acético (Δ) por *S. zooepidemicus* ATCC 39920 em biorreator em melaço de cana-de-açúcar (nas condições pré otimizadas no meio de sacarose).

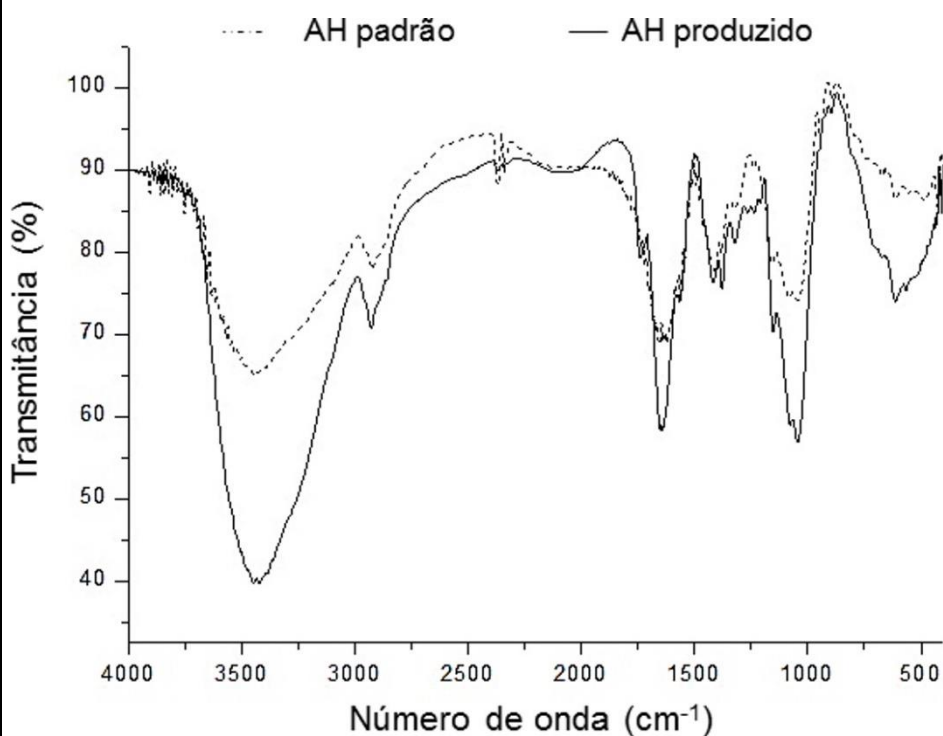


Figura 4. Espectro FTIR do ácido hialurônico padrão e ácido hialurônico produzido por *S. zooepidemicus* ATCC 39920 em meio de melaço de cana-de-açúcar.

Escritório de Propriedade Intelectual

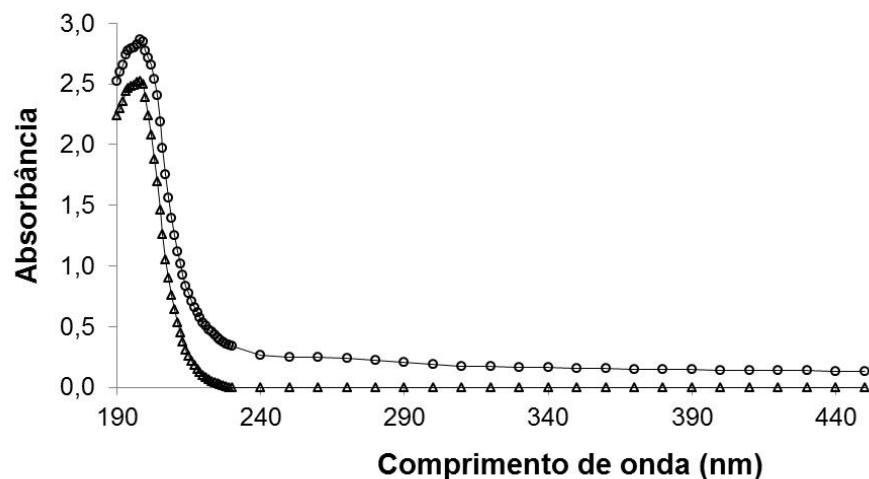


Figura 5. Espectro UV-Vis do ácido hialurônico padrão (Δ) e ácido hialurônico produzido (\circ) por *S. zooepidemicus* ATCC 39920 em meio de melão de cana-de-açúcar.

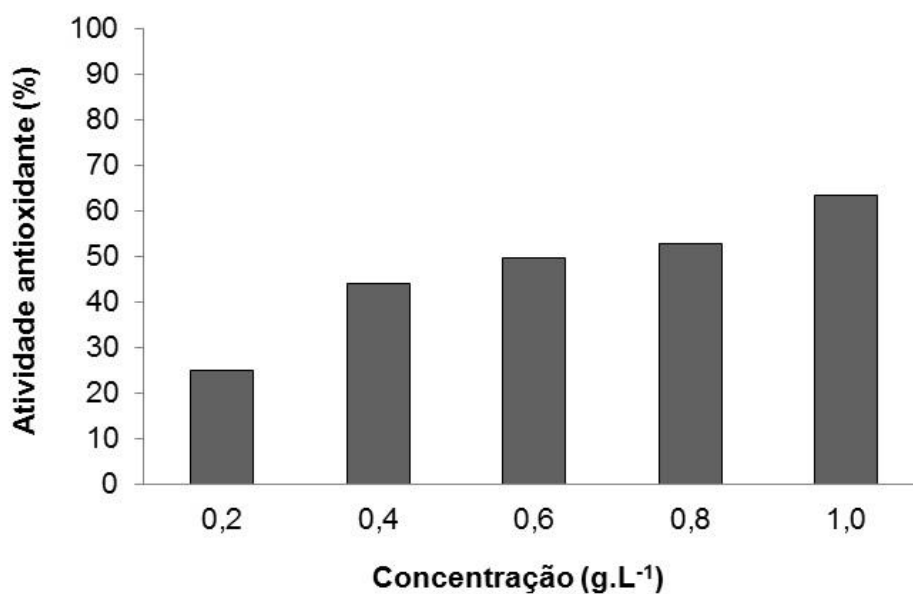


Figura 6. Atividade antioxidante do ácido hialurônico produzido por *S. zooepidemicus* ATCC 39920 em meio de melão de cana-de-açúcar.



Escritório de Propriedade Intelectual

8.1. INVENTOR 1	
Nome completo: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi	
Depto. da UEL onde atua/estuda: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE	
Endereço residencial completo: Av. Gil de Abreu e Souza, 1501 – Londrina/PR	
Tel: (43) 9995 7993	e-mail: macelligoi@uel.br
Atividade na UEL: Docente	
Percentual da participação na invenção: 42,5% Tempo de participação: 5 anos	

8.2. INVENTOR 2	
Nome completo: Nicole Caldas Pan	
Depto. da UEL onde atua/estuda: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE	
Endereço residencial completo: Rua Santos, 1130, apto 1001	
Tel: (43) 88034632	e-mail: nicolepan.eq@gmail.com
Atividade na UEL: Doutoranda	
Percentual da participação na invenção: 42,5% Tempo de participação: 5 anos	

8.3. INVENTOR 3	
Nome completo: Josiane Alessandra Vignoli	
Depto. da UEL onde atua/estuda: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia - CCE	
Endereço residencial completo: : Av. José Gabriel de Oliveira, 915, apto 1502/ TII – Londrina/PR	
Tel: (43) 9992 8110	e-mail: javignoli@uel.br
Atividade na UEL: Docente	
Percentual da participação na invenção: 5% Tempo de participação: 2 anos	



Escritório de Propriedade Intelectual

8.4. INVENTOR 4	
Nome completo: Hanny Cristina Braga Pereira	
Depto. da UEL onde atua/estuda: Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos	
Endereço residencial completo: Rua Professor João Cândido, 875, apto 601, Londrina-PR	
Tel: (043) 98193603	e-mail: pereira.hanny@gmail.com
Atividade na UEL: Mestranda	
Percentual da participação na invenção: 5% Tempo de participação: 2 anos	

8.5. INVENTOR 5	
Nome completo: Cristiani Baldo	
Depto. da UEL onde atua/estuda: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia - CCE	
Endereço residencial completo: R. Elizio Turino, 400, casa 8, Jd Sabará, Londrina, PR	
Tel: (043) 96905212	e-mail: cristianibaldo@uel.br
Atividade na UEL: Docente	
Percentual da participação na invenção: 5% Tempo de participação: 1 ano	

9. CONCEPÇÃO DA INVENÇÃO	
9.1. Quando a invenção foi concebida? 2015	
9.2. Ela já foi descrita ou documentada?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/>
9.3. Se sim, onde e de que forma (escrita, oral) foi realizada a primeira descrição?	
9.4. A invenção está finalizada e com protótipo?	Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>

10. DIVULGAÇÃO EXTERNA DA INVENÇÃO	
10.1. Houve alguma divulgação pública da invenção?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/>
10.2. Se sim, quando e como?	
10.3. Neste caso, foi assinado um acordo de sigilo ou de não-divulgação?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Obs: Se possível, anexe uma cópia da divulgação realizada.	

12. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS E TÉCNICAS



Escritório de Propriedade Intelectual

11. DIVULGAÇÃO INTERNA DA INVENÇÃO

11.1. Houve alguma divulgação interna da invenção, por exemplo, para alunos, funcionários, docentes, palestra, eventos? Sim Não

11.2. Se sim, a divulgação foi tecnicamente detalhada? Sim Não

Obs: Se possível, anexe uma cópia da divulgação realizada.

12.1. Foram publicados artigos, nos quais um dos inventores aparece com como autor, contendo informações suficientes para que uma pessoa com conhecimentos na área possa reproduzir a invenção?

Sim Não

Obs: Se sim, anexe cópias dos artigos.

13. COMUNICAÇÕES

13.1. Foram realizadas comunicações orais (palestras, aulas), no qual um dos inventores aparece com como autor, contendo informações suficientes para que uma pessoa com conhecimentos na área possa reproduzir a invenção?

Sim Não

Obs: Se sim, anexe cópias das comunicações.

13.2. Foram realizados comunicados da invenção à imprensa, ou a jornais internos da UEL, de empresas, de agências de fomento ou outro instrumento de divulgação? Não

Obs: Se sim, anexe cópias dos comunicados ou comentários sobre eles

14. TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA (APLICÁVEL ÀS INVENÇÕES DA UEL)

14.1. Se souber, faça uma lista de possíveis empresas nacionais e internacionais que poderiam vir a se interessar pela invenção, após ter sido devidamente protegida: Novozymes Biopolymer A/S, Reliance Life Sciences Pvt. Ltd, Shiseido Co. Ltd., Ildong Pharm. Co. Ltd., Eastar Holding Group Co. Ltd., Sichuan Kesen oilfield Chemical Co. Ltd, Kyowa Hakko Bio. Co. Ltd.

15. DIVULGAÇÕES FORA DA EMPRESA (APLICÁVEL ÀS EMPRESAS)

15.1. Houve alguma divulgação da invenção fora da empresa, nas formas escrita, oral ou expositiva? Sim Não

Obs.: Se sim, anexe cópias ou forneça detalhes das mesmas.

Escritório de Propriedade Intelectual

15.2. As divulgações foram realizadas sob algum instrumento legal de sigilo ou confidencialidade? Sim Não

16. PATENTES RELACIONADAS

16.1 Se tiver disponível, liste quaisquer publicações ou patentes que descrevam invenções similares a esta, para a qual está sendo solicitada a propriedade: Processos relacionados a produção microbiana de ácido hialurônico em sacarose por *Streptococcus*: AU2013273729 (A1), CN102617754 (A), JP2012023996 (A), JPS5856692 (A), JPS6115698 (A).

17. Declaração

Declaro que as informações acima prestadas são verdadeiras e de minha inteira responsabilidade. Concordo que este é um pedido de proteção intelectual e industrial e isento a UEL, a AINTEC e todo seu pessoal de toda e qualquer responsabilidade, direta ou indireta, se a referida proteção não for concedida integral ou parcialmente pelo INPI ou por outro órgão a que for submetido.



Escritório de Propriedade Intelectual

INVENTOR 1

Nome: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi
CPF: 040.984.648-10

INVENTOR 2

Nome: Nicole Caldas Pan
CPF: 066.892.379-23

INVENTOR 3

Nome: Josiane Alessandra Vignoli
CPF: 278.450.908-75

INVENTOR 4

Nome: Hanny Cristina Braga Pereira
CPF: 088.204.259-98

INVENTOR 5

Nome: Cristiani Baldo
CPF: 051.992.526-23

Londrina, 1 de Julho de 2016.

Escritório de Propriedade Intelectual

Referências

- AI, H.; LIU, M.; YU, P.; ZHANG, S.; SUO, Y.; LUO, P.; LI, S.; WANG, J. Improved welan gum production by *Alcaligenes* sp. ATCC31555 from pretreated cane molasses. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 35–43, 2015.
- AMADO, I. R.; VÁZQUEZ, J. A.; PASTRANA, L.; TEIXEIRA, J. A. Cheese whey: a cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Food Chemistry**, v. 198, p. 54–61, 2016.
- ÇAKAR, F.; ÖZER, I.; AYTEKIN, A. Ö.; ŞAHIN, F. Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 7–13, 2014.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A. HAMILTON, J.K. REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- CHONG, B. F.; BLANK, L. M.; MCLAUGHLIN, R.; NIELSEN, L. K. Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 341–351, 2005.
- FARIA, S.; OLIVEIRA PETKOWICZ, C. L. DE; MORAIS, S. A. L. DE; TERRONES, M. G. H.; RESENDE, M. M. DE; FRANÇA, F. P. DE; CARDOSO, V. L. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 469–476, 2011.
- ITO, A. The effects of a hyaluronan lotion with a molecular weight of around 50 - 110 kDa on the aged atrophic skin. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 04, n. 03, p. 150–155, 2014.
- KAUR, S.; DHILLON, G. S.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; KAUR, S.; OBEROI, H. S. **Waste biomass: a prospective renewable resource for development of bio-based economy/ processes**. In: S. K. Brar; G. S. Dhillon; C. R. Soccol (Eds.), *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*. p.3 – 28, 2014.
- 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.
- LI, H.; JIANG, Z.; YANG, X.; YU, L.; ZHANG, G.; WU, J.; LIU, X. Sustainable resource opportunity for cane molasses: use of cane molasses as a grinding aid in the production of Portland cement. **Journal of Cleaner Production**, v. 93, p. 56–64, 2015.
- LIANG, J.; JIANG, D.; NOBLE, P. W. Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 186–203, 2016.
- LIU, L.; LIU, Y.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. Microbial production of hyaluronic acid: current

Escritório de Propriedade Intelectual

state, challenges, and perspectives. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 99, 2011.

MURUAGA, M. L.; CARVALHO, K. G.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SOUZA OLIVEIRA, R. P. DE; PEROTTI, N. Isolation and characterization of *Saccharomyces* species for bioethanol production from sugarcane molasses: Studies of scale up in bioreactor. **Renewable Energy**, v. 85, p. 649–656, 2016.

OLIVEIRA, A. H.; OGRODOWSKI, C. C.; MACEDO, A. C. DE; SANTANA, M. H. A.; GONÇALVES, L. R. B. Cashew apple juice as microbial cultivation medium for non-immunogenic hyaluronic acid production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1097–104, 2013.

OLIVEIRA, M. R.; SILVA, R. S. S. F.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 2, p. 177–183, 2007.

PAN, N. C.; VIGNOLI, J. A.; BALDO, C.; PEREIRA, H. C. B.; SILVA, R. S. S. F.; CELLIGOI, M. A. P. C. Agroindustrial byproducts for the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 4, n. 04, p. 114–118, 2015.

PIRES, A. M. B.; MACEDO, A. C.; EGUCHI, S. Y.; SANTANA, M. H. A. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6506–6509, 2010.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 205–218, 2003.

TRIPODO, G.; TRAPANI, A.; TORRE, M. L.; GIAMMONA, G.; TRAPANI, G.; MANDRACCHIA, D. Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 400–416, 2015.

UNICA, 2016. **Sugarcane, ethanol and sugar production - 2015/2016 harvest season**. Brazilian Sugarcane Ind. Assoc. -UNICA

VÁZQUEZ, J. A.; MONTEMAYOR, M. I.; FRAGUAS, J.; MURADO, M. A. 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.

VÁZQUEZ, J. A.; PASTRANA, L.; PIÑEIRO, C.; TEIXEIRA, J. A.; PÉREZ-MARTÍN, R. I.; AMADO, I. R. Production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* on protein substrates obtained from *Scylliorhinus canicula* discards. **Marine Drugs**, v. 13, n. 10, p. 6537–6549, 2015.

WU, Y.; SUN, N.; XU, Y.; LIU, H.; ZHONG, S.; CHEN, L.; LI, D. Clinical comparison between two hyaluronic acid-derived fillers in the treatment of nasolabial folds in Chinese subjects: BioHyalux versus Restylane. **Archives of Dermatological Research**, v. 308, n. 3, p. 145–151, 2016.

Escritório de Propriedade Intelectual

WU, Z.; TANG, Y.; FANG, H.; SU, Z.; XU, B.; LIN, Y.; ZHANG, P.; WEI, X. Decellularized scaffolds containing hyaluronic acid and EGF for promoting the recovery of skin wounds. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 26, n. 1, p. 1-10, 2015.

XU, K.; XU, P. Efficient production of L-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 23-29, 2014.

XU, S.; HAO, N.; XU, L.; LIU, Z.; YAN, M.; LI, Y.; OUYANG, P. Series fermentation production of ornithine and succinic acid from cane molasses by *Corynebacterium glutamicum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 99, p. 177-182, 2015.

YAMADA, T.; KAWASAKI, T. Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: New approaches. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 6, p. 521-8, 2005.

YANG, C.; WANG, X.; YAO, X.; ZHANG, Y.; WU, W.; JIANG, X. Hyaluronic acid nanogels with enzyme-sensitive cross-linking group for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 205, p. 206-217, 2015.

YU, C.-J.; KO, C.-J.; HSIEH, C.-H.; CHIEN, C.-T.; HUANG, L.-H.; LEE, C.-W.; JIANG, C.-C. Proteomic analysis of osteoarthritic chondrocyte reveals the hyaluronic acid-regulated proteins involved in chondroprotective effect under oxidative stress. **Journal of Proteomics**, v. 99, p. 40-53, 2014.

5.3 AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR *Streptococcus zooepidemicus* EM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

IMPROVEMENT PRODUCTION OF HYALURONIC ACID BY *Streptococcus zooepidemicus* IN SUGARCANE MOLASSES

Nicole Caldas Pan; Hanny Cristina Braga Pereira; Maria de Lourdes Corradi da Silva; Ana Flora Dalberto Vasconcelos; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi



Improvement Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* in Sugarcane Molasses

Nicole Caldas Pan¹ · Hanny Cristina Braga Pereira¹ ·
Maria de Lourdes Corradi da Silva² ·
Ana Flora Dalberto Vasconcelos² ·
Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi¹

Received: 8 September 2016 / Accepted: 3 November 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Microbial hyaluronic acid (HA) production has been preferred rather than extraction from animal tissue for medical and cosmetic applications. In this context, to obtain an economically competitive HA production by *Streptococcus zooepidemicus*, culture conditions were studied to improve the polymer production in sugarcane molasses. The highest HA production by *S. zooepidemicus* ATCC 39920 achieved was 2.825 g L⁻¹ in a 4.5 L bioreactor with controlled pH (8.0) and medium containing molasses (85.35 g L⁻¹ total sugar) pretreated with activated charcoal and yeast extract (50 g L⁻¹). The HA produced exhibited a high molecular weight of 1.35 × 10⁵ kDa and the DPPH radical scavenging activity of the polymer at 1 g L⁻¹ was 41 %. The FTIR and UV-Vis spectra showed no substantial differences in the spectral pattern between

✉ Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi
macelligoi@uel.br

Nicole Caldas Pan
nicolepan@uel.br

Hanny Cristina Braga Pereira
hannypereira@uel.br

Maria de Lourdes Corradi da Silva
corradi@fct.unesp.br

Ana Flora Dalberto Vasconcelos
anafloa@fct.unesp.br

¹ Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Rodovia Celso Garcia Cid - Pr 445 Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 10.011, Londrina, PR CEP 86.057-970, Brazil

² Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rua Roberto Simonsen, n.º. 305, Presidente Prudente, São Paulo CEP 19060-900, Brazil

Improvement production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* in sugarcane molasses

Nicole Caldas Pan^a; Hanny Cristina Braga Pereira^a; Maria de Lourdes Corradi da Silva^b; Ana Flora Dalberto Vasconcelos^b; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Rodovia Celso Garcia Cid - Pr 445 Km 380 – Campus Universitário, Caixa Postal 10.011 - CEP 86.057-970 - Londrina – PR, Brasil.

^bDepartamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista -UNESP, Rua Roberto Simonsen, nº. 305 - CEP 19060-900, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Author's e-mails

nicolepan@uel.br

hannypereira@uel.br

corradi@fct.unesp.br

anaflora@fct.unesp.br

*macelligoi@uel.br

Abstract

Microbial hyaluronic acid (HA) production has been preferred rather than extraction from animal tissue for medical and cosmetic applications. In this context, to obtain an economically competitive HA production by *Streptococcus zooepidemicus*, culture conditions were studied to improve the polymer production in sugarcane molasses. The highest HA production by *S. zooepidemicus* ATCC 39920 achieved was 2.825 g.L⁻¹ in a 4.5 L bioreactor with controlled pH (8.0) and medium containing molasses (85.35 g.L⁻¹ total sugar) pretreated with activated charcoal and yeast extract (50 g.L⁻¹). The HA produced exhibited a high molecular weight of 1.35 x 10³ kDa and the DPPH radical scavenging activity of the polymer at 1 g.L⁻¹ was 41%. The FTIR and UV-Vis spectra showed no substantial differences in the spectral pattern between produced and standard HA. This study is a promising strategy for sugarcane molasses application by producing high value-added products such as hyaluronic acid.

Keywords: hyaluronic acid, sugarcane molasses, *Streptococcus*, fermentation, bioreactor

1 Introduction

Hyaluronic acid (HA) is a linear polysaccharide composed of disaccharide units of (1,4)- β -linked glucuronic acid and (1,3)- β -linked N- acetylglucosamine [1]. Due to its unique physico-chemical properties, such as high intrinsic viscosity, antioxidant properties, chain stiffness and water-holding capacity [2], HA has been used for a wide variety of medical applications, including osteoarthritis [3, 4], ophthalmic surgery [5, 6] and cutaneous wound healing [7, 8]. In dermatology and cosmetic practices, HA has been employed to help the skin regain elasticity, turgor and moisture [9, 10]. Depending on the applications, the values of HA products and derivatives range from US \$2,000 to \$60,000 Kg⁻¹ [11].

Traditionally, hyaluronic acid is chemically extracted from animal waste such as rooster combs or umbilical cords. However, these resources are limited and HA from these tissues is generally associated with proteoglycans and often contaminated with HA degrading enzymes that make isolation of high purity and high molecular weight HA very difficult and costly [12]. Furthermore, the risk of cross-species viral and infection agent has been pointed out when using animal-derived biochemicals for human therapeutics. Therefore, microbial production is gradually replacing extraction as the preferred HA source with lower production cost, more efficient purification, higher yield compared to animal sources and less environmental pollution [1]. Although great progress has been achieved in HA microbial production, the price of culture media reduces the commercial competitiveness of this alternative, and thus it is necessary to find a low-cost substrate replacement to reduce production cost [13].

More than 80% of the production costs of microbial HA produced by *Streptococcus* (particularly *S. equi* subsp. *zooepidemicus*) are due to the fermentation medium [14]. Thus, one important goal of the fermentation process is to study a new cost-effective culture medium that can increase HA production. In most studies, glucose is used as the primary carbon source for HA production [15, 16]. The possibility of using byproducts rich in carbon and other essential nutrients for microorganism growth in industry is underexplored. Vázquez et al. [14, 17] reported the successful use of marine peptones from fishing byproducts for hyaluronic acid production. Agricultural resource derivatives such as cashew apple juice, cheese whey, and soy

protein were also studied [11, 18, 19]. For instance, Amado et al. [20] saved 70% of the nutrient cost by replacing commercial peptone with cheese whey during polymer production.

Brazil is the largest sugar producer and exporter in the world, with 2015/2016 harvests of 33,928 thousand tons [21]. Approximately 0.3 tons are discharged when one ton of sugar is processed [22]. It is estimated that around 10 million tons of sugarcane molasses are discharged annually, which makes this product an available raw material for fermentation processes. In the current market, glucose prices are approximately \$0.39 Kg⁻¹, whereas sugarcane molasses is \$0.1 kg⁻¹ [23]. This raw material has previously been applied to polymer production, such as cellulose [24] welan gum [25], succinoglycan [26] and levan [27]. In our study, we confirmed that crude sugarcane molasses could also be used as a promising carbon source for HA production [18].

Sugarcane molasses contains approximately 50% (w/w) total sugar (primarily sucrose, fructose and glucose), suspended colloids, metal ions, vitamins and nitrogen compounds [23]. The suspended particles and complex structures cause heterogeneity in the medium and may affect the cell growth rate. Therefore, many molasses pretreatments have been proposed to prepare a unique molasses medium and improve microbial production [24, 25]. Another important aspect of the use of agro-industrial byproducts for high value aggregated molecule production is the optimization of the concentrations of these substrates [28].

The aims of the present study were to improve HA production by *S. zooepidemicus* ATCC 39920 in sugarcane molasses medium, characterize its structure and estimate the antioxidant activity. The main highlight of this study is the originality of the pretreated sugarcane molasses application for hyaluronic acid production by *S. zooepidemicus*.

2 Material and Methods

2.1 Sugarcane molasses

Sugarcane molasses was obtained from the Alltech group (São Pedro do Ivaí, PR, Brazil) and contained (w/w): 53% sucrose, 4% glucose, 5% fructose, 6.6%

ash, 1.2% amino acids such as glutamic acid, aspartic acid and alanine, and 0.17% metal ions including sodium, aluminum, iron, nitride, phosphide and potassium. Sugars were analyzed by high-performance liquid chromatograph (HPLC) (Shimadzu RID-10A, Japan) coupled to a refractive index detector, with an Aminex Carbohydrate HPX-87C (300 × 7.8 mm, Biorad) column at 80 °C. The mobile phase was Milli-Q water at a 0.6 mL.min⁻¹ flow rate. Ash content was determined in an oven at 550 °C during 24 h. Amino acids and metal ions concentrations were provided by Alltech group. The sugarcane molasses (SM) was diluted to 15% (w/v) of the total sugar concentration [29] with distilled water and centrifuged at 9,956 × g at 4°C for 15 min. To obtain pretreated sugarcane molasses (PSM), the molasses solution was treated with 12% (w/v) activated charcoal at 70°C with constant stirring for 1 h, centrifuged at 9,956 × g at 4°C for 15 min and filtered (Whatman, n° 1) [28].

2.2 Microorganism and medium

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 was obtained from the Brazilian Collection of Environmental and Industrial Microorganisms (CBMAI). The strain was maintained in glycerol stock at -80°C and cultured on brain heart infusion (BHI) agar plates at 37°C for 24 h. For the inoculum, colonies from the agar plates were transferred to 125 mL Erlenmeyer flasks containing 25 mL BHI medium for 24 h. These cultures were used to inoculate 1 L Erlenmeyer flasks containing 200 mL BHI medium for 6 h. The flasks were incubated at 37°C in a reciprocal shaker under 150 rpm. The cell concentration was determined by measuring turbidimetry at $\lambda = 600$ nm; for each fermentation, the inoculum was standardized to 0.2 g.L⁻¹.

The fermentation media contained (g.L⁻¹): yeast extract (YE) ranging from 14.65 to 85.35; SM or PSM ranging from 14.65 to 85.35 of the total sugar content [29]; 2.5 K₂HPO₄; 2.0 NaCl and 1.5 MgSO₄. SM, PSM and MgSO₄ were autoclaved separately.

2.3 Hyaluronic acid production

2.3.1 Effect of sugarcane molasses and yeast extract

To investigate the effect of the molasses pretreatment, the first experiment was performed in a 125 mL Erlenmeyer flask containing 25 mL fermentation media with SM or PSM at a 30 g.L⁻¹ concentration total sugar and 30 g.L⁻¹ YE. The experiment was performed in quadruplicate, and the samples were collected at the initial and final fermentation. Because the molasses pretreatment increased polymer production, we investigated the effect of the PSM (14.65 – 85.35 g.L⁻¹ of the total sugar) and YE (14.65 – 85.35 g.L⁻¹) concentrations using a central composite design (CCD) (Table 2). The CCD required 13 experiments with four factorial points, four axial points and five central points. The factor level choice was based on Pan et al. [30]. Samples were collected at the initial and final fermentation. Based on the CCD results, fermentation in triplicate was performed in a 1 L Erlenmeyer flask containing 200 mL fermentation medium with 85.35 g.L⁻¹ PSM and 50 g.L⁻¹ YE. Samples were collected every 2 hours to study the HA production profile. All experiments were incubated at 37°C with an initial pH of 8.0 and rotation at 100 rpm for 24 h.

2.3.2 Effect of pH on the bioreactor

The pH control effect was evaluated under the HA production conditions optimized by CCD. Batch fermentation in a 4.5 L bioreactor (Tecnal, Brazil) containing 2 L fermentation medium with 85.35 g.L⁻¹ PSM and 50 g.L⁻¹ YE was performed at 8.0 pH that was controlled by an 8 mol.L⁻¹ NaOH solution. This fermentation was compared to a batch reactor without pH control (initial pH 8.0). The temperature was maintained at 37°C, the rotation at 100 rpm and the aeration rate at 0.5 vvm. Samples were collected every 2 h for 24 h.

2.4 Biomass, hyaluronic acid, organic acids, ethanol and total sugar determination

Fermentation samples were centrifuged at $9,956 \times g$ for 15 min. The biomass was determined by measuring the turbidimetry at $\lambda = 600$ nm and correlated to the biomass curve in $g.L^{-1}$. Total sugar concentration was determined from the supernatant sample according to methodology described by Dubois and co-workers [29]. For the HA, lactate, formate, acetate and ethanol quantifications, the culture supernatant samples were filtered ($0.45 \mu m$ pore size, Millipore) and $20 \mu L$ was injected into a HPLC instrument (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The HA evaluation was performed in an OHpak SB-806M HQ 80×300 mm column (Shodex, Japan) at $40^\circ C$ with a $0.1 M NaNO_3$ mobile phase and a $1 mL.min^{-1}$ flow rate. Lactate, acetate, formate and ethanol were evaluated using an Aminex 7.8×300 mm HPX-87H organic acid column (Bio-Rad, CA, USA) at $60^\circ C$; the mobile phase was composed of a $0.005 mol.L^{-1} H_2SO_4$ solution with a $0.7 mL.min^{-1}$ flow rate. The peak elution profile was monitored with a Shimadzu RID – 10A refractive index detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

2.5 Hyaluronic acid characterization

To characterize HA, the 24 h samples from the bioreactor with the controlled pH were centrifuged ($9,956 \times g$, 15 min, $4^\circ C$), and the cell-free supernatant was precipitated with ethanol at a 1.5:1 (v/v) ratio of ethanol:supernatant at $4^\circ C$ for 1 h. The HA was re-dissolved in a $0.15 mol.L^{-1} NaCl$ solution. Three precipitations were performed to increase the HA purity. Then, trichloroacetic acid (1%) was added until the HA solution reached pH 2.0 and was maintained for 1 h at $4^\circ C$. The solution was centrifuged at $7,744 \times g$ at $4^\circ C$ for 30 min. The supernatant was dialyzed for 48 h with six distilled water changes. The frozen dialysis product was lyophilized to characterize the structural and antioxidant properties of the produced HA. Sodium hyaluronate with a molecular weight of $1.5 - 1.8 \times 10^3$ kDa (Sigma-Aldrich, Brazil Ltd.) was used as the standard.

The HA homogeneity was determined by high performance steric exclusion chromatography (HPSEC) coupled to a refractive index (RI) detector model RID 10A.

The chromatography system consisted of an HPLC pump (Model Shimadzu-10AD), a manual injection valve (Shimadzu) fitted with a 200- μ L loop and Ultrahydrogel columns (7.8 x 300 mm) arranged in series with different exclusion limit connected in order of decreasing pore size 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 and 5×10^3 Da corresponding to Ultrahydrogel (Waters) 2000, 500, 250 and 120, respectively. The mobile phase was 0.1 M NaNO_3 with sodium azide (0.03%), and a $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ flow rate. Data analysis was performed using LC solution software (Shimadzu Corporation). A standard curve of dextran with MW of 2000, 1400, 670, 500, 410, and 266 kDa was made to determine the HA apparent molecular weight.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was recorded at wavelengths between 4000 and 400 cm^{-1} on an IR PRESTIGE-21 (Shimadzu, Kyoto, Japan) spectrophotometer. Thirty-two scans at a 4 cm^{-1} resolution were averaged and referenced against air. The powdered samples were compressed into KBr disks to measure the FTIR.

The UV-Vis absorption spectrum was assessed using a UV-Vis recording spectrophotometer (Biochrom Libra s22) in the 190-450 nm range. Distilled water was used as a reference and to dilute HA samples.

Antioxidant activity was estimated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich Brazil Ltd.). Briefly, 300 μ L 0.1 mM DPPH in ethanol was added to 1 mL sample in 0.2 - $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ concentrations. The mixture was left to stand for 30 min at room temperature. The absorbance was measured at 517 nm against a blank (water instead of sample and ethanol instead of DPPH). The scavenging percentage activity was calculated as $(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$, where A_0 is the control absorbance (water instead of sample solution), A_1 is the sample absorbance and A_2 is the sample absorbance under identical conditions as A_1 with ethanol instead of DPPH solution. Ascorbic acid (Sigma-Aldrich Brazil Ltd.) was used as a standard for the assay.

2.6 Statistical analysis

The data analysis was performed using the Statistica 9.0 software (StatSoft Inc., USA). The averages were compared using the Tukey test at a 5% probability level

($p < 0.05$). For optimal point prediction, a second order polynomial function was fitted to the CCD experimental results:

$$Y_i = b_0 + \sum_i b_i x_i + \sum_i b_{ii} x_i^2 + \sum_{ij} b_{ij} x_i x_j \quad (\text{Eq.1})$$

in which Y_i is the response, x_i, x_j are independent variables, b_0 is the offset term, is the i th linear coefficient, b_{ii} is the i th quadratic coefficient, and b_{ij} is the ij th interaction coefficient. Analysis of variance (ANOVA) was used to estimate the statistical parameters. The fit quality of the polynomial model equation was expressed by the determination coefficient R^2 , and its statistical significance was assessed by the F-test.

3 Results and Discussion

3.1 Hyaluronic acid production

3.1.1 Effect of sugarcane molasses pretreatment

Molasses and molasses pretreated with activated charcoal were evaluated as carbon sources for HA production. PSM increased HA production by 19% compared to SM (Table 1). This result suggested that activated charcoal pretreatment decreased the level of inhibition by factors such as excessive metal ions and raised the fermentation quality. Although sugarcane molasses generally contains essential nutrients beneficial to microorganism growth, it also has metal ions and suspended colloids, which may be detrimental to microorganisms because they influence the medium pH and inactivate enzymes associated with product biosynthesis [25]. The individual presence of Na^+ and Fe^{2+} in medium containing glucose and yeast extract inhibited HA production by *S. zooepidemicus* ATCC 39920 [31]. Moreover, Tlapak-Simmons et al. [32] reported that hyaluronan synthase was sensitive to the concentrations of monovalent cations such as Na^+ and K^+ . This result complied with research on the production of bacterial cellulose [24], welan gum [25] and polyhydroxyalkanoates [33] that reported an increase in polymer production when crude molasses was replaced by pretreated molasses. The total sugar consumption

was 8.839 ± 0.297 g.L⁻¹ in SM and 8.433 ± 0.343 g.L⁻¹ in PSM and these results did not show significant difference ($p > 0.05$). Acetate synthesis (Table 1) was also increased in PSM compared to SM, which confirmed the change in cellular metabolism in favor of polymer production. This finding was explained by Chong and Nielsen [34], who observed that extra ATP concurrently generated during acetate formation by acetate kinase facilitated HA production. Biomass and lactate synthesis were not significantly different in PSM and SM media. Thus, the pretreatment of molasses with activated charcoal was advantageous because the cost of this pretreatment was low and the product has a high aggregated value. Therefore, we used PSM for the subsequent experiments.

Table 1. Hyaluronic acid, biomass, lactate and acetate production by *S. zooepidemicus* ATCC 39920 in sugarcane molasses and pretreated sugarcane molasses

Molasses	Hyaluronic acid g.L ⁻¹	Biomass g.L ⁻¹	Lactate g.L ⁻¹	Acetate g.L ⁻¹
SM	0.557 ± 0.038^b	2.178 ± 0.133^a	4.021 ± 0.229^a	0.582 ± 0.031^b
PSM	0.662 ± 0.003^a	2.123 ± 0.286^a	4.315 ± 0.161^a	0.678 ± 0.018^a

SM – sugarcane molasses; PSM – pretreated sugarcane molasses. Different lower-case letters indicate significant differences at the $\alpha=0.05$ level in each column.

3.1.2 Effect of pretreated sugarcane molasses and yeast extract

The PSM and YE concentrations were assessed by CCD to evaluate their effects on HA production, biomass, lactate and acetate synthesis (Table 2). Because molasses has a low total nitrogen content, supplementation with yeast extract is necessary to achieve an ideal carbon/nitrogen ratio. Lancefield group A and C streptococci bacteria require complex nutrients due to their limited ability to synthesize specific amino acids and vitamins [19,35]. Previous studies suggested that certain essential amino acids cannot be synthesized from an inorganic nitrogen source, because hyaluronic acid production in this medium is very low [36,37]. Other studies that evaluated different organic nitrogen sources demonstrated that the highest HA production was obtained using yeast extract [11,18,37]. The main contributions of yeast extract to hyaluronic acid production are purine, pyrimidine bases and vitamin B [38]. Therefore, yeast extract was the nitrogen source used in this research. The maximum observed HA production was 0.860 g.L⁻¹ and was achieved in medium

containing PSM with 85.35 g.L⁻¹ total sugar content and 50 g.L⁻¹ YE. HA production was 30% higher than the production level obtained in the previous experiment using PSM (0.662 g.L⁻¹) (Table 1). The effect estimated for each variable was also reported (Table 3). An increase in the PSM and YE concentrations from 25 to 75 g.L⁻¹ led to an increase in the HA production of 0.106 and 0.108 g.L⁻¹, respectively. In contrast, the interaction between PSM and YE had a negative influence. This result supports the finding that agro-industrial byproducts have complex compositions in which a substrate can show an individual positive effect but have a negative effect in the overall system due to an increment in the concentration of other constituents [28]. Only the PSM quadratic term was not significant ($p < 0.01$) for hyaluronic acid production at a 99% confidence level. These results showed the importance of the amounts of the PSM and YE variables for hyaluronic acid production. The effects of these variables in biomass, lactate and acetate synthesis were also evaluated to observe the carbon flux at the studied conditions. The total sugar consumption in the assays (Table 2) was 18.238 ± 3.698 % initial sugar concentration, except for assays 2 (42.469 %) and 5 (49.630 %). Of these metabolized carbons, 60 – 80% was utilized for lactate production and 8 – 14% for acetate. According to Chong and Nielsen [34] the HA and biomass synthesis account for 5 – 10% of the carbon metabolized, whereas lactate and acetate are held responsible for the majority of the carbon. YE was the most significant variable for the biomass, lactate and acetate synthesis, with the YE linear term significant at 1% level of significance. The increase from 25 g.L⁻¹ to 75 g.L⁻¹ YE caused an increase of 15%, 30% and 55% in the biomass, lactate and acetate concentrations, respectively. The effect of PSM was not significant for these responses and the interaction between YE and PSM was significant only for biomass, and its was effect negative. Equations 2 – 5 represent the coded models used for HA production, biomass, lactate and acetate synthesis.

$$HA = 0.775 + 0.053 \times PSM + 0.054 \times YE - 0.048 \times YE^2 - 0.049 \times PSM \times YE \quad (\text{Eq.2})$$

$$Biomass = 2.683 + 0.205 \times YE - 0.060 \times YE^2 - 0.120 \times PSM \times YE \quad (\text{Eq.3})$$

$$Lactate = 7.037 - 0.262 \times PSM^2 + 1.940 \times YE \quad (\text{Eq.4})$$

$$Acetate = 1.100 - 0.076 \times PSM^2 + 0.298 \times YE - 0.070 \times PSM \times YE \quad (\text{Eq.5})$$

ANOVA was used to evaluate the adequacy of the fitted model (Table 4). The determination coefficient (R^2) was 93.83% for HA production, 88.56% for biomass, 94.05% for lactate and 89.49% for acetate synthesis. According to Haaland [39], R^2 values above 90% are considered very good for the experimental design of biotechnological processes. Based on the F test, the models were predictive because F -calc was higher than F -tab. Furthermore, the pure error was very low and the lack of fit was not significant, indicating that the models were reproductive and adequately represented by the data in the experimental region.

Table 2. Hyaluronic acid, biomass, lactate and acetate production by *S. zooepidemicus* ATCC 39920 at different pretreated sugarcane molasses and yeast extract concentrations

Run*	Factor level		Response			
	X ₁	X ₂	Hyaluronic acid (g.L ⁻¹)	Biomass (g.L ⁻¹)	Lactate (g.L ⁻¹)	Acetate (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	0.555	2.304	4.256	0.682
2	-1	1	0.759	2.891	9.096	1.549
3	1	-1	0.749	2.529	4.796	0.659
4	1	1	0.758	2.634	8.692	1.245
5	-1.41	0	0.695	2.749	5.991	0.937
6	1.41	0	0.860	2.720	7.166	0.944
7	0	-1.41	0.623	2.261	4.378	0.698
8	0	1.41	0.776	2.933	9.172	1.357
9	0	0	0.809	2.760	7.329	1.131
10	0	0	0.796	2.566	7.549	1.167
11	0	0	0.766	2.677	6.898	1.060
12	0	0	0.775	2.607	6.968	1.068
13	0	0	0.767	2.772	7.094	1.204

Code	Variables	Coded variables levels				
		-1.414	-1	0	+1	+1.414
(X ₁)	PSM (total sugar g.L ⁻¹)	14.65	25	50	75	85.35
(X ₂)	YE (g.L ⁻¹)	14.65	25	50	75	85.35

(*) Assays were randomized; PSM – pretreated sugarcane molasses; YE – yeast extract

Table 3. Effect estimates for hyaluronic acid production by *S. zooepidemicus* ATCC 3992 from the CCD

Factor	Effect	Std. Err.	t – value	p- value
Average	0.783	0.011	74.171	0.00000*
PSM (L)	0.106	0.017	6.366	0.00037*
PSM (Q)	-0.022	0.018	-1.221	0.26175
YE (L)	0.108	0.017	6.448	0.00035*
YE (Q)	-0.100	0.018	-5.574	0.00084*
PSM × YE	-0.098	0.024	-4.138	0.00436*

PSM – pretreated sugarcane molasses; YE – yeast extract. * Significant factors (p<0.01).

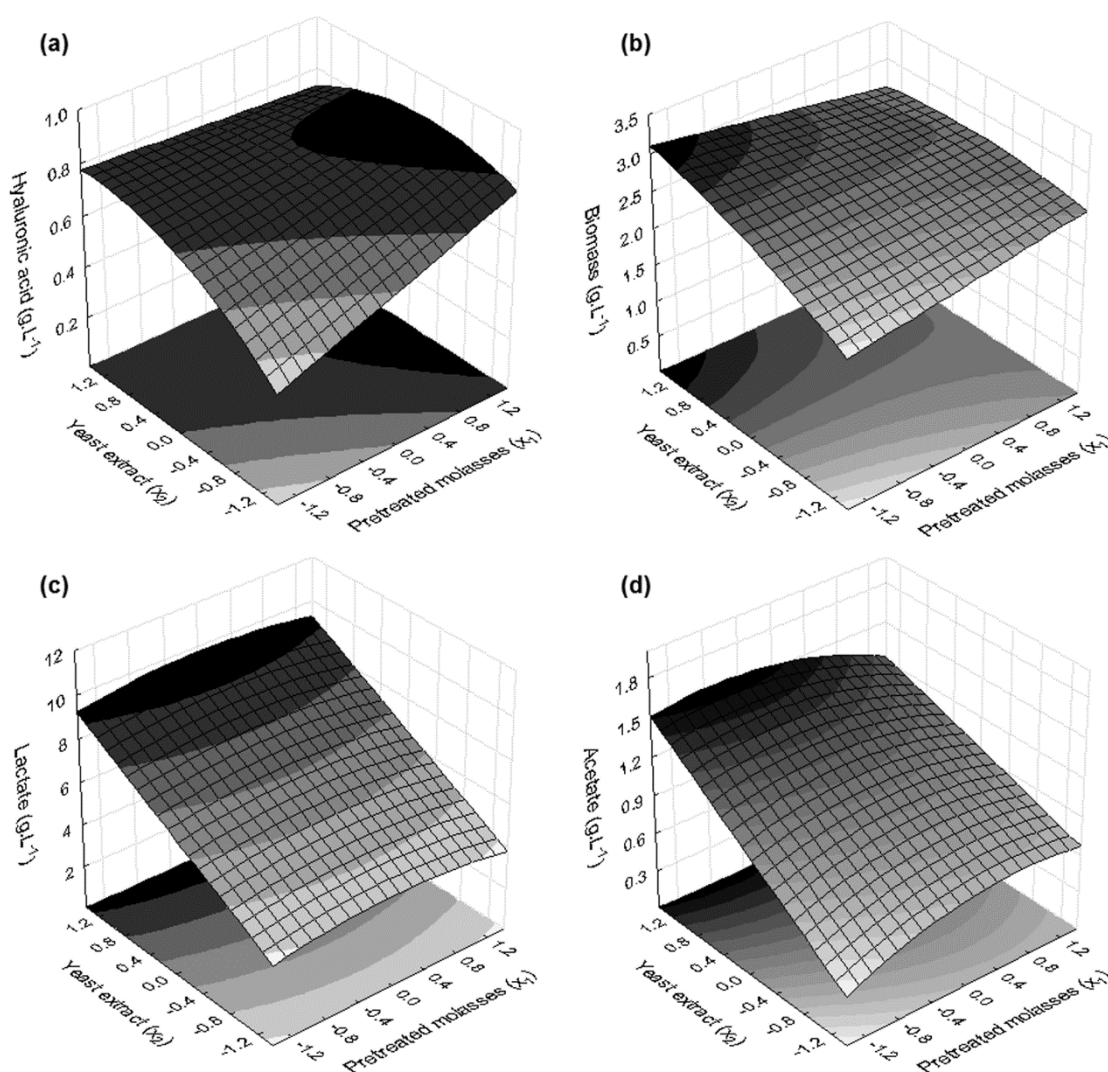
Table 4. Analysis of the variance (ANOVA) of hyaluronic acid, biomass, lactate and acetate production by *S. zooepidemicus* ATCC 39920 from the CCD

Variance source	Level of freedom	Sum of Square	Mean Square	f-calc	f-tab	R ²	R ² _{adj}	p value
<i>Hyaluronic acid</i>								
Regressor	0.07185	4	0.01796	30.40	3.84	0.93828	0.90742	
Residue	0.00473	8	0.00059					
Lack of fit	0.00327	4	0.00082					0.22559
Pure error	0.00145	4	0.00036	2.25	6.39			
Total	0.07657	12	-					
<i>Biomass</i>								
Regressor	0.42052	3	0.14017	23.21	3.86	0.88555	0.84740	
Residue	0.05435	9	0.00604					
Lack of fit	0.02132	5	0.00426	0.52	6.26			0.75731
Pure error	0.03303	4	0.00826					
Total	0.47487	12	-					
<i>Lactate</i>								
Regressor	30.57855	2	15.28928	79.03	4.10	0.94050	0.92860	
Residue	1.93463	10	0.19346					
Lack of fit	1.64519	6	0.27420	3.79	6.16			0.10901
Pure error	0.28943	4	0.07236					
Total	32.51318	12	-					
<i>Acetate</i>								
Regressor	0.77148	3	0.25716	25.56	3.86	0.89494	0.85993	
Residue	0.09056	9	0.01006					
Lack of fit	0.07499	5	0.01500	3.85	6.26			0.10781
Pure error	0.01557	4	0.00389					
Total	0.86204	12	-					

The response surfaces were obtained using equations 2 – 5 (Fig. 1). The biomass concentration was enhanced by the increase in YE and decrease in PSM (Fig. 1b). This result is in accordance with the typical behavior of lactic acid bacteria, whose biosynthetic need is met by the complex nitrogen source. Organic nitrogen sources are considered essential for good *Streptococci* growth because there is evidence that these components also supply a large proportion of the carbon for cellular biosynthesis [40]. Several *Streptococcus* strains can only grow in media containing vitamins, purines and amino acids which are mainly used as carbon sources for the cell skeleton due to a lack of tricarboxylic acid cycle (TCA) and precursors for the synthesis of most amino acids and nucleotides [41]. The lactate and acetate concentrations were raised by the increase in YE (Fig. 1 c,d), and 50 g.L⁻¹ and 32 g.L⁻¹ of PSM were the best concentrations for the synthesis of these organic acids, respectively.

The desirability function was used to find the optimal conditions for HA production. Under this best condition, which coincided with the condition assessed in assay 6 (85.35 g.L⁻¹ PSM and 50 g.L⁻¹ YE), the predicted value was 0.850 g.L⁻¹ (Fig. 1a). To confirm the predicted results, experiments were performed in quintuplicate using these conditions, and a value of 0.842±0.025 g.L⁻¹ was obtained. The good correlation between these results ($p=0.50095$) verifies the model validation for HA production. In these experiments, the total sugar consumption, biomass, lactate and acetate results were 9.375±0.598 g.L⁻¹, 2.398±0.054 g.L⁻¹, 5.682±0.639 g.L⁻¹ and 0.706±0.053 g.L⁻¹, respectively.

Fig. 1 Response surfaces of (a) hyaluronic acid, (b) biomass, (c) lactate and (d) acetate production by *S. zooepidemicus* ATCC 39920 in pretreated sugarcane molasses (x_1) and yeast extract (x_2)



In the conditions optimized by CCD, medium containing PSM with 85.35 g.L⁻¹ total sugar content and 50 g.L⁻¹ YE, the assays were performed in 1 L Erlenmeyer flasks containing 200 mL medium to study the HA production profile. As shown in Fig. 2a, after 2 hours of lag phase, cells began exponential growth until 6 hours with a specific growth rate at 0.30±0.10 h⁻¹ and biomass concentration reached 2.075±0.023 g.L⁻¹. The HA concentration followed the biomass synthesis trend and achieved a value of 0.825±0.075 g.L⁻¹ at 24 hours. This value was not significantly different compared to the result predicted in the model by CCD (p=0.622210). The maximum lactate and acetate synthesis were 7.840±0.445 g.L⁻¹ at 24 h and 0.531±0.072 g.L⁻¹ at 14 h, respectively, and the total sugar consumption at 24 h was 10.622±0.895 g.L⁻¹.

Due to the lactate and acetate production, the final pH in the assays performed in Erlenmeyers ranged from 4.7 to 5.0. The decrease in pH which cannot be controlled in shake flasks may have caused inhibition of microbial growth and limited hyaluronic acid production. Then, fermentations in bioreactor were performed to evaluate the effect of pH control in optimized medium.

3.1.3 Effect of pH on the bioreactor

Pan et al. [30] investigated the effect of the initial pH on *S. zooepidemicus* fermentation in a shake flask and concluded an initial pH of 8.0 was best for HA production. Shake flasks have been widely used in both studies and biotechnology process optimization because they allow experiments to be conducted with minimal costs and materials. However, shake flasks have several limitations. For instance, some are unable to control the pH and the dependency of the oxygen transfer rate on the agitation speed. Therefore, scaling from shake flasks to bioreactors is essential to obtain large quantities of the final product [42]. The influence of controlled pH on HA production was evaluated in a bioreactor using medium optimized by CCD and 0.5 vvm aeration (Fig. 2c). A control experiment was run at initial pH 8.0 that was not controlled (Fig. 2b). Under alkaline conditions, the maximum specific cell growth rate was 0.14 h⁻¹ and the biomass concentration reached 6.22 g.L⁻¹, compared with 0.27 h⁻¹ and 2.539 g.L⁻¹ in the control experiment, respectively. During fermentation without pH control, the pH decreased to 4.9 during the first 8 hours, which may have caused the inhibition of microbial growth. The pH reduction was caused mainly by lactate

production. According to other studies, batch culture at pH less than 6.0 slowed cell growth and resulted in very low HA production [35,43]. Diauxic growth was observed when the pH was controlled, suggesting the preferential utilization of the carbon sources present in PSM (predominantly sucrose and lower concentrations of fructose and glucose). The total sugar consumption in pH controlled medium was 75.754 g.L⁻¹ at 24h, which was 6.12-fold greater than in the control experiment. HA, lactate and acetate were produced in parallel with the biomass. Under controlled pH conditions, the maximum HA production was 2.825 g.L⁻¹ at 24 h. This value was 2.86-fold greater than the maximum HA production in uncontrolled pH conditions (0.988 g.L⁻¹ at 12 h). The positive effect of intermittent alkaline-stress on HA production by *S. zooepidemicus* WSH-24 was reported by Liu et al. [44]. The authors suggested that the carbon flux was redirected, thereby increasing HA production by up to 30% and decreasing the biomass by 24%. However, in our results the relationship between biomass and HA production was positive. This effect was also observed by Shah and co-workers [16]. Pires and Santana [15] explained that the high HA concentration in an alkaline medium might be due to the exposition of the microorganisms to the stress condition in which the cells produce the capsule as a way to shield themselves. Lactate and acetate synthesis increased to 65.368 and 1.855 g.L⁻¹ compared with 7.623 and 0.408 g.L⁻¹ in the control, respectively.

Formate and ethanol were not observed in any experiments in this research. The lack of formate synthesis suggested good aeration conditions in the experiments because pyruvate formate lyase is extremely sensitive to oxygen [34].

HA productions by *S. zooepidemicus* ATCC 39920 in bioreactor reported in previous studies ranges from 1 to 5 g.L⁻¹. The highest HA concentration observed by Pires and Santana [15] was 1.21 g.L⁻¹ in a medium containing glucose, yeast extract and salts. Lai et al. [36] reported that about 2.442 g.L⁻¹ HA was synthesized at an optimal C/N of 1.5:1 using glucose and a mixture of yeast extract and tryptone. The highest polymer productions were observed in media containing casein, 3.32 g.L⁻¹ [45] and 5.0 g.L⁻¹ [46], and media supplemented with amino acid, oxygen vector, and other additives that aimed to redirect the carbon flux to HA production. Adding 5 g.L⁻¹ glutamine and 25 µM sodium iodoacetate increased the HA concentration to 5.0 g.L⁻¹ from 2.0 g.L⁻¹ in a control run [16]. Lai et al. [47] studied the potential of oxygen vectors for enhancing HA biosynthesis and obtained a high production of 4.25 g.L⁻¹ when 0.5% (v/v) n-hexadecane was added. These supplementations to the fermentation medium

increase the production cost, and are not an advantage when the aim of study is to reduce the polymer price. Considering the studies that evaluated alternative fermentation media for hyaluronic acid production (Table 5), the concentration of 2.825 g.L⁻¹ polymer obtained in our study was high. These results point out the possibility of obtaining a high HA production by replacing the commercial sources with an inexpensive alternative, emphasizing the use of sugarcane molasses as a promising carbon source.

Fig. 2 Production of hyaluronic acid (□), biomass (◇), lactate (Δ) and acetate (○) by *S. zooepidemicus* ATCC 39920 in (a) Erlenmeyer flask uncontrolled pH, (b) bioreactor uncontrolled pH and (c) bioreactor with controlled pH

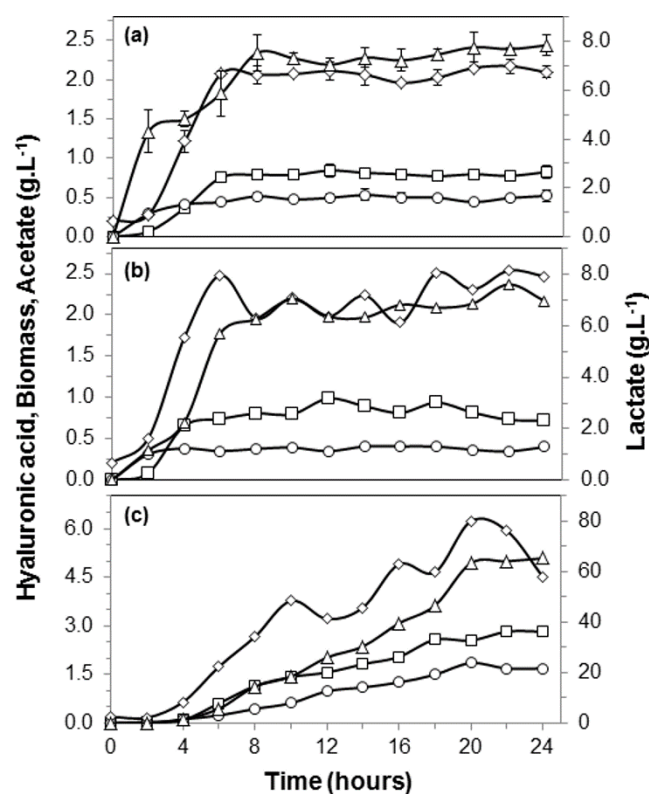


Table 5. Hyaluronic acid production in different fermentation media containing alternative sources

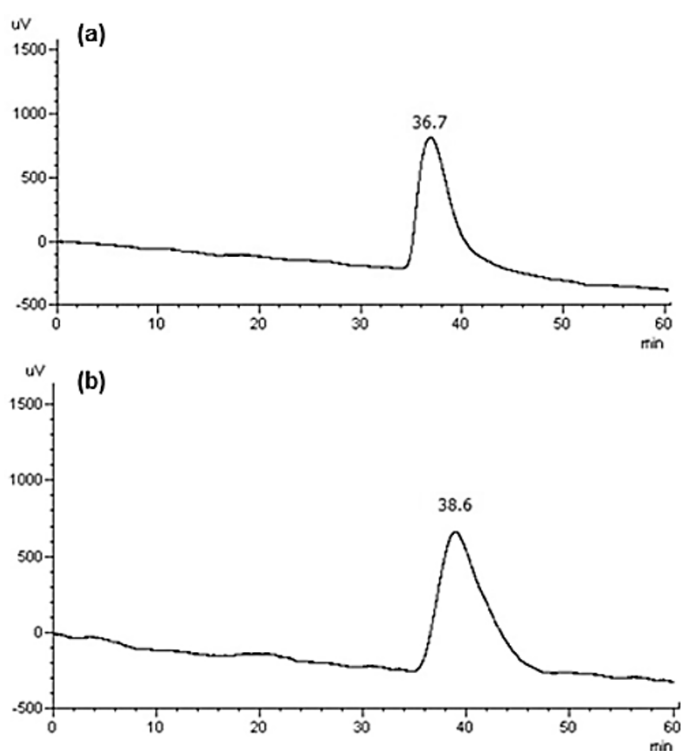
Bacterial strain	Cultivation Conditions	Carbon and nitrogen source (g.L ⁻¹)	Hyaluronic acid (g.L ⁻¹)	Reference
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	250 mL Erlenmeyer; 37°C; 150 rpm; pH initial 7.5	cashew apple juice (45 of glucose) and yeast extract (54)	0.89	[11]
<i>S. thermophilus</i> YIT 2084	2 L bioreactor, 40°C; no aeration; 100 rpm; pH 6.8	10% of skimmed milk and soybean peptides (10)	0.21	[43]
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 35246	2 L bioreactor; 37°C; no aeration; 500 rpm; pH 6.7	glycogen of mussel processing wastewater (50), tuna peptone from viscera residue (protein 8) and yeast extract (5)	2.46	[14]
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	3 L bioreactor; 37°C; 150 rpm; 2 vvm, pH 7.0	2 L cashew apple juice and yeast extract (60)	1.76	[19]
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	125 mL Erlenmeyer flasks; 37°C; 100 rpm pH initial 8.0	sugarcane molasses (30) and yeast extract (30)	0.38	[18]
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	125 mL Erlenmeyer flasks; 37°C; 100 rpm pH initial 8.0	sucrose (30) and soy protein (30)	0.22	[18]
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 35246	2 L bioreactor; 37°C; no aeration; 500 rpm; pH 6.7	glucose (50), peptones from alcalase hydrolyzed viscera (protein 5) and yeast extract (5)	2.32	[17]
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 35246	5 L bioreactor; 37°C; 1vvm; 500 rpm; pH 6.7	glucose (50), lactose (50) cheese whey (protein 5) and yeast extract (5)	4.0	[20]
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	4.5 L bioreactor, 37°C; 100 rpm; 0.5 vvm; pH 8.0	sugarcane molasses pretreated (85.35) and yeast extract (50)	2.83	Present study

3.2 Hyaluronic acid characterization

The homogeneity of the hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* in a bioreactor with the pH controlled at 8.0 was verified by HPSEC/RID. The chromatography profile showed a single symmetrical peak (Fig. 3b) with an enlarged base that most likely indicated a higher polydispersity (Mw/Mn 1.32)

than the hyaluronic acid standard (Fig. 3a), which eluted in 36.7 min and had $1.5 - 1.8 \times 10^3$ kDa molecular weight. The hyaluronic acid molecular weight from *S. zooepidemicus* was 1.35×10^3 kDa, using dextrans of known molecular weight as standards. HA applications depend on its molecular weight, a high molecular weight (>1 MDa) is used for clinical and cosmetic applications [48,49].

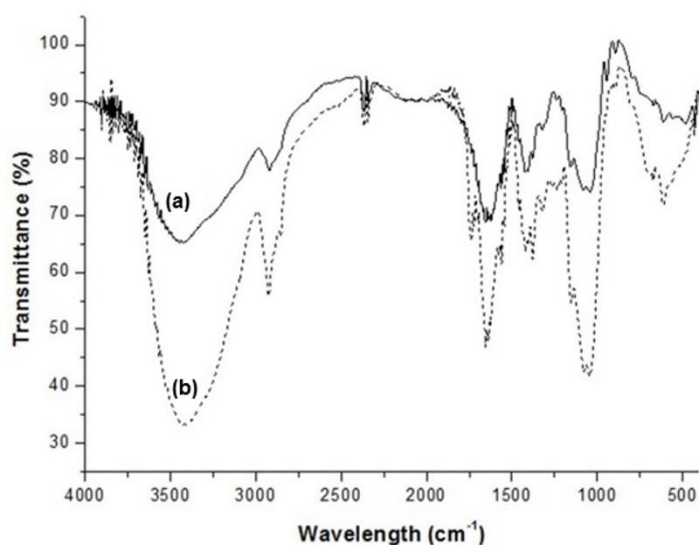
Fig. 3 Elution profile of (a) hyaluronic acid standard and (b) hyaluronic acid produced by *S. zooepidemicus* ATCC 39920 in a bioreactor with controlled pH analyzed by HPSEC/RID



The FTIR spectra of the produced HA (Fig. 4b) was similar to the HA standard (Fig. 4a). The strong band at approximately 3449 cm^{-1} can be attributed to hydrogen-bonded O-H and N-H stretching vibrations of the N-acetyl side chain. A group of overlapping bands of moderate intensity is observed at approximately 2922 cm^{-1} due to the C-H stretching vibrations. The bands at 1622 and 1418 cm^{-1} can be attributed to the asymmetric (C=O) and symmetric (C-O) stretching modes of the planar carboxyl groups in the hyaluronate. According to Gilli et al. [50], after protonation, these peaks are shifted to 1735 and 1255 cm^{-1} , respectively. This explained the band at 1738 cm^{-1} observed in the produced HA. The protonation of the carboxyl group leading to carboxylic acid occurred during the purification process due

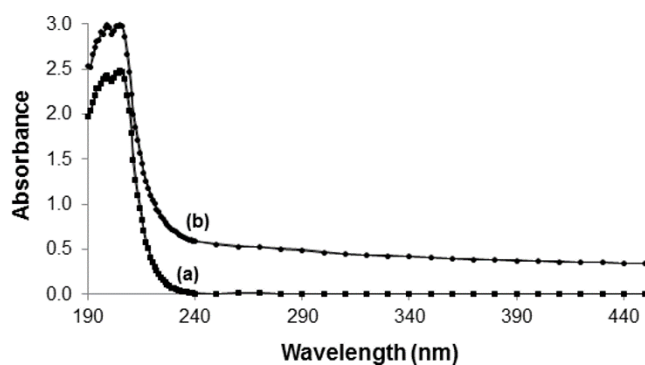
to the use of trichloroacetic acid. The absorption bands at approximately 1653, 1564 and 1325 cm^{-1} are characteristic of the amide I, II and III bands, respectively. The C-O-C group at 1155 cm^{-1} (O-bridge), C-O (exocyclic) and C-C groups at 1082 cm^{-1} and the C-OH group at 1043 cm^{-1} are also present [2]. The band at 945 cm^{-1} can be assigned to an asymmetrical out-of-phase ring vibration [51].

Fig. 4 FTIR spectra of the (a) hyaluronic acid standard and (b) hyaluronic acid produced by *S. zooepidemicus* ATCC 39920 in a bioreactor with controlled pH



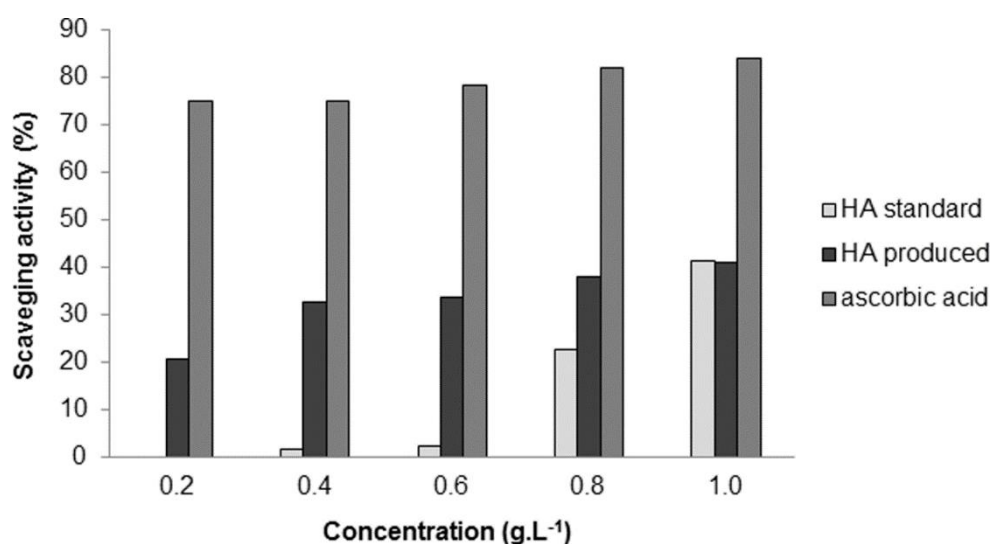
The UV-vis spectra of the standard HA and the HA produced by *S. zooepidemicus* (Fig. 5) showed that both had the same absorption profile. The maximum absorbance wavelength was 205 nm. Absorbance at ~ 210 nm was attributed to carboxyl groups [2].

Fig. 5 UV-vis spectrum of the (a) hyaluronic acid standard and (b) hyaluronic acid produced by *S. zooepidemicus* ATCC 39920 in a bioreactor with controlled pH



DPPH radical scavenging activity of the produced HA was evident at all of the tested concentrations but was lower than that of ascorbic acid (Fig. 6). The highest scavenging effects were 41% for the produced and standard HA and 84% for ascorbic acid at 1 g.L⁻¹. Produced HA showed higher scavenging activity than standard HA at the range of 0.2 – 0.8 g.L⁻¹. This result might be correlated with the lowest molecular weight of the produced HA. Several studies showed that polymer antioxidant activity is related to molecular weight [52-54]. Kim et al. [53] showed a gradual increase in DPPH radical scavenging ability of HA by the decreased polymer molecular weight. El-Safory and Lee [52] also observed a stronger radical scavenging activity of HA oligomers than native HA. The mechanism by which HA reduces damage from free radicals is based on its structure, which has cross-linked carboxylic groups. Thus, these carboxylic groups can interact with metal ions such as Cu²⁺ and Fe²⁺, allowing these molecules to act as metal chelators [55]. These encouraging results reveal that the HA produced in sugarcane molasses can be employed as a natural antioxidant.

Fig. 6 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity of the hyaluronic acid standard, hyaluronic acid produced by *S. zooepidemicus* ATCC 39920 in a bioreactor with controlled pH and ascorbic acid



4 Conclusion

The present study demonstrated that it is possible to obtain high hyaluronic acid production in an alternative medium using pretreated sugarcane molasses such

as carbon source. The maximum HA production was 2.825 g.L⁻¹ at 24 h in pH 8.0 medium containing pretreated molasses with 85.35 g.L⁻¹ total sugar content and 50 g.L⁻¹ YE in a bioreactor by *S. zooepidemicus* ATCC 39920. The controlled pH of 8.0 increased the production 2.86-fold. Polymers characterization showed that sugarcane molasses fermentation medium provided an HA appropriate for medical and cosmetic application with 1.35 x10³ kDa molecular weight and potential antioxidant activity. Thus, pretreated molasses may be an excellent substrate for cost-effective HA production.

Acknowledgments

The authors thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES – Brazil) for financial support, Dr. Dionisio Borsato from Londrina State University for support with the statistical analysis, and the Laboratory of Spectroscopy (SPEC) – State University of Londrina for the analyses.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Statement

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

1. Chong, B. F., Blank, L. M., Mclaughlin, R., & Nielsen, L. K. (2005). Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 66(4), 341–351.
2. Choi, J., Kim, J.-K., Kim, J.-H., Kweon, D.-K., & Lee, J.-W. (2010). Degradation of hyaluronic acid powder by electron beam irradiation, gamma ray irradiation, microwave irradiation and thermal treatment: A comparative study. **Carbohydrate Polymers**, 79(4), 1080–1085.

3. Yu, C.-J., Ko, C.-J., Hsieh, C.-H., Chien, C.-T., Huang, L.-H., Lee, C.-W., & Jiang, C.-C. (2014). Proteomic analysis of osteoarthritic chondrocyte reveals the hyaluronic acid-regulated proteins involved in chondroprotective effect under oxidative stress. **Journal of Proteomics**, 99, 40–53.
4. Ong, K. L., Anderson, A. F., Niazi, F., Fierlinger, A. L., Kurtz, S. M., & Altman, R. D. (2016). Hyaluronic acid injections in medicare knee osteoarthritis patients are associated with longer time to knee arthroplasty. **The Journal of Arthroplasty**, 31(8), 1667–1673.
5. Kretz, F. T. A., Limberger, I.-J., & Auffarth, G. U. (2014). Corneal endothelial cell coating during phacoemulsification using a new dispersive hyaluronic acid ophthalmic viscosurgical device. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, 40(11), 1879–1884.
6. Stead, R. E., Juma, Z., Turner, S., Jones, L. D., & Sung, V. C. T. (2016). A novel use of reticulated hyaluronic acid (Healaflo) for hypotony eyes in patients with uveitis. **British Journal of Ophthalmology**, 100(6), 727–730.
7. Su, Z., Ma, H., Wu, Z., Zeng, H., Li, Z., Wang, Y., Liu, G., Xu, B., Lin, Y., Zhang, P. & Wei, X. (2014). Enhancement of skin wound healing with decellularized scaffolds loaded with hyaluronic acid and epidermal growth factor. **Materials Science and Engineering C**, 44, 440–448.
8. Wu, Z., Tang, Y., Fang, H., Su, Z., Xu, B., Lin, Y., Zhang, P. & Wei, X. (2015). Decellularized scaffolds containing hyaluronic acid and EGF for promoting the recovery of skin wounds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 26(1), 1–10.
9. Wiest, L., & Kerscher, M. (2008). Native hyaluronic acid in dermatology – results of an expert meeting. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, 6(3), 176–180.
10. Sundaram, H., Mackiewicz, N., Burton, E., Peno-Mazzarino, L., Lati, E., & Meunier, S. (2016). Pilot comparative study of the topical action of a novel, crosslinked resilient hyaluronic acid on skin hydration and barrier function in a dynamic, three-dimensional human explant model. **Journal of Drugs in Dermatology**, 15(4), 434–441.
11. Pires, A. M. B., Macedo, A. C., Eguchi, S. Y., & Santana, M. H. A. (2010). Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. **Bioresource Technology**, 101(16), 6506–6509.
12. Yamada, T., & Kawasaki, T. (2005). Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: New approaches. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 99(6), 521–8.
13. Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G., & Chen, J. (2011). Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. **Microbial Cell Factories**, 10, 99.

14. Vázquez, J. A., Montemayor, M. I., Fraguas, J., & Murado, M. A. (2010). Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. **Microbial Cell Factories**, 9, 46.
15. Pires, A. M. B., & Santana, M. H. A. (2010). Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 162(6), 1751–1761.
16. Shah, M. V., Badle, S. S., & Ramachandran, K. B. (2013). Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. **Biochemical Engineering Journal**, 80, 53–60.
17. Vázquez, J. A., Pastrana, L., Piñeiro, C., Teixeira, J. A., Pérez-Martín, R. I., & Amado, I. R. (2015). Production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* on protein substrates obtained from *Scyliorhinus canicula* discards. **Marine Drugs**, 13(10), 6537–6549.
18. Pan, N. C., Vignoli, J. A., Baldo, C., Pereira, H. C. B., Silva, R. S. S. F., & Celligoi, M. A. P. C. (2015). Agroindustrial byproducts for the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. **International Journal of Scientific & Technology Research**, 4(04), 114–118.
19. Oliveira, A. H., Ogradowski, C. C., Macedo, A. C., Santana, M. H. A., & Gonçalves, L. R. B. (2013). Cashew apple juice as microbial cultivation medium for non-immunogenic hyaluronic acid production. **Brazilian Journal of Microbiology**, 44(4), 1097–1104.
20. Amado, I. R., Vázquez, J. A., Pastrana, L., & Teixeira, J. A. (2016). Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chemistry*, 198, 54–61.
21. UNICA. (2016). Sugarcane, ethanol and sugar production - 2015/2016 harvest season. In: **Brazilian Sugarcane Industry Association - UNICA**. Retrieved May 23, 2016, from <http://www.unicadata.com.br>
22. Li, H., Jiang, Z., Yang, X., Yu, L., Zhang, G., Wu, J., & Liu, X. (2015). Sustainable resource opportunity for cane molasses: use of cane molasses as a grinding aid in the production of Portland cement. **Journal of Cleaner Production**, 93, 56–64.
23. Xu, S., Hao, N., Xu, L., Liu, Z., Yan, M., Li, Y., & Ouyang, P. (2015). Series fermentation production of ornithine and succinic acid from cane molasses by *Corynebacterium glutamicum*. **Biochemical Engineering Journal**, 99, 177–182.
24. Tyagi, N., & Suresh, S. (2016). Production of cellulose from sugarcane molasses using *Gluconacetobacter intermedius* SNT-1: optimization & characterization. **Journal of Cleaner Production**, 112, 71–80.

25. Ai, H., Liu, M., Yu, P., Zhang, S., Suo, Y., Luo, P., Li, S., & Wang, J. (2015). Improved welan gum production by *Alcaligenes* sp. ATCC31555 from pretreated cane molasses. **Carbohydrate Polymers**, 129, 35–43.
26. Ruiz, S. P., Martinez, C. O., Noce, A. S., Sampaio, A. R., Baesso, M. L., & Matioli, G. (2015). Biosynthesis of succinoglycan by *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 immobilized on loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological characterization of biopolymer. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 122, 15–28.
27. Oliveira, M. R., Silva, R. S. S. F., Buzato, J. B., & Celligoi, M. A. P. C. (2007). Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**, 37(2), 177–183.
28. Treichel, H., Mazutti, M. A., Mauger Filho, F., & Rodrigues, M. I. (2009). Technical viability of the production, partial purification and characterisation of inulinase using pretreated agroindustrial residues. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 32(4), 425–433.
29. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28(3), 350–356.
30. Pan, N. C., Vignoli, J. A., Baldo, C., Pereira, H. C. B., Silva, R. S. dos S. F., & Celligoi, M. A. P. C. (2015). Effect of fermentation conditions on the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 37(4), 411 – 417.
31. Pires, A. M. B., Eguchi, S. Y., & Santana, M. H. A. (2010). The influence of mineral ions on the microbial production and molecular weight of hyaluronic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 162(8), 2125–2135.
32. Tlapak-Simmons, V. L., Baron, C. A., & Weigel, P. H. (2004). Characterization of the purified hyaluronan synthase from *Streptococcus equisimilis*. **Biochemistry**, 43(28), 9234–9242.
33. Gomaa, E. Z. (2014). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 57(February), 145–154.
34. Chong, B. F., & Nielsen, L. K. (2003). Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. **Biochemical Engineering Journal**, 16(2), 153–162.
35. Armstrong, D. C., & Johns, M. R. (1997). Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63(7), 2759–2764.
36. Lai, Z.-W., Rahim, R. A., Ariff, A., & Mohamad, R. (2011). Medium formulation and impeller design on the biosynthesis of high molecular weight hyaluronic

- acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. **African Journal of Microbiology Research**, 5(15), 2114 – 2123.
37. Im, J.-H., Song, J.-M., Kang, J.-H., & Kang, D.-J. (2009). Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus sp.* ID9102 via a statistical approach. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 36(11), 1337–1344.
 38. Amrane, A., & Prigent, Y. (1994). Lactic acid production from lactose in batch culture: analysis of the data with the help of a mathematical model; relevance for nitrogen source and pre culture assessment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 40, 644–649.
 39. Haaland, P. D. (1989). **Experimental design in biotechnology**. (Marcell Dekker, Ed.). NY: CRC Press.
 40. Armstrong, D. C., Cooney, M. J., & Johns, M. R. (1997). Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 47(3), 309–312.
 41. Gao, H.-J., Du, G.-C., & Chen, J. (2006). Analysis of metabolic fluxes for hyaluronic acid (HA) production by *Streptococcus zooepidemicus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 399–408.
 42. Gamboa-Suasnavart, R. A., Marín-Palacio, L. D., Martínez-Sotelo, J. A., Espitia, C., Servín-González, L., Valdez-Cruz, N. A., & Trujillo-Roldán, M. A. (2013). Scale-up from shake flasks to bioreactor, based on power input and *Streptomyces lividans* morphology, for the production of recombinant APA (45/47 kDa protein) from *Mycobacterium tuberculosis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 29(8), 1421–1429.
 43. Izawa, N., Hanamizu, T., Sone, T., & Chiba, K. (2010). Effects of fermentation conditions and soybean peptide supplementation on hyaluronic acid production by *Streptococcus thermophilus* strain YIT 2084 in milk. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 109(4), 356–360.
 44. Liu, L., Wang, M., Du, G., & Chen, J. (2008). Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. **Letters in Applied Microbiology**, 46(3), 383–388.
 45. Sun, X., Wang, Z., Bi, Y., Wang, Y., & Liu, H. (2015). Genetic and functional characterization of the hyaluronate lyase HylB and the Beta-N-Acetylglucosaminidase HylZ in *Streptococcus zooepidemicus*. **Current Microbiology**, 70(1), 35–42.
 46. Rangaswamy, V., & Jain, D. (2008). An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. **Biotechnology Letters**, 30(3), 493–496.
 47. Lai, Z.-W., Rahim, R. A., Ariff, A. B., & Mohamad, R. (2012). Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using

- oxygen vector and optimum impeller tip speed. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 114(3), 286–91.
48. Jeong, E., Shim, W. Y., & Kim, J. H. (2014). Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. **Journal of Biotechnology**, 185, 28–36.
 49. Guillaumie, F., Furrer, P., Felt-Baeyens, O., Fuhlendorff, B. L., Nymand, S., Westh, P., Gurny, R., & Schwach-Abdellaoui, K. (2010). Comparative studies of various hyaluronic acids produced by microbial fermentation for potential topical ophthalmic applications. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, 92(4), 1421–1430.
 50. Gilli, R., Kacuráková, M., Mathlouthi, M., Navarini, L., & Paoletti, S. (1994). FTIR studies of sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solution. **Carbohydrate Research**, 263(2), 315–326.
 51. Wu, Y. (2012). Preparation of low-molecular-weight hyaluronic acid by ozone treatment. **Carbohydrate Polymers**, 89(2), 709–712.
 52. El-Safory, N. S., & Lee, C.-K. (2010). Cytotoxic and antioxidant effects of unsaturated hyaluronic acid oligomers. **Carbohydrate Polymers**, 82(4), 1116–1123.
 53. Kim, J. K., Srinivasan, P., Kim, J. H., Choi, J., Park, H. J., Byun, M. W., & Lee, J. W. (2008). Structural and antioxidant properties of gamma irradiated hyaluronic acid. **Food Chemistry**, 109(4), 763–770.
 54. Ke, C., Sun, L., Qiao, D., Wang, D., & Zeng, X. (2011). Antioxidant activity of low molecular weight hyaluronic acid. **Food and Chemical Toxicology**, 49(10), 2670–2675.
 55. Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., D'Ascola, A., Ferlazzo, A. M., & Calatroni, A. (2004). 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**, 148(3), 125–138.

**5.4 FILMES À BASE DE BLENDS DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO E ÁCIDO
HIALURÔNICO MICROBIANO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

**FILMS BASED ON BLENDS OF POLYVINYL ALCOHOL AND MICROBIAL
HYALURONIC ACID FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS**

Nicole Caldas Pan; Gabrielly Terassi Bersaneti; Suzana Mali; Maria Antonia Pedrine
Colabone Celligoi

Films based on blends of polyvinyl alcohol and microbial hyaluronic acid for biomedical applications

Nicole Caldas Pan; Gabrielly Terassi Bersaneti; Suzana Mali; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Department of Biochemistry and Biotechnology, CCE, State University of Londrina, P.O. Box 10011, 86050-970 Londrina, PR, Brazil

E-mail addresses:

nicolepan@uel.br (N.C.Pan)

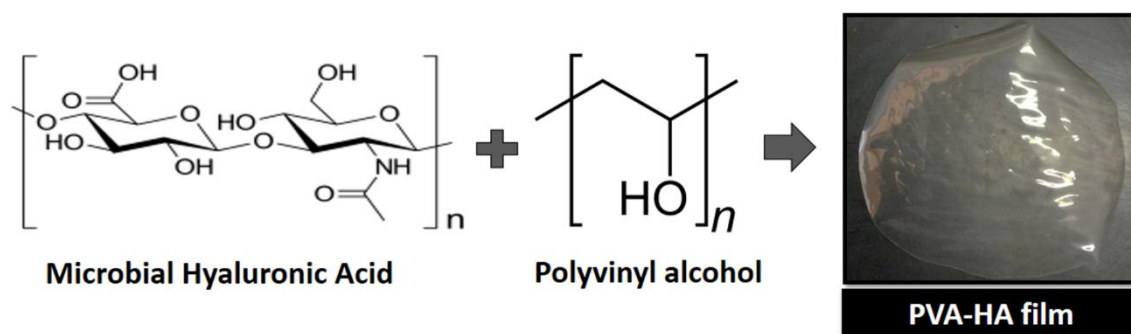
gabriellybersaneti@uel.br (G.T. Bersaneti)

smali@uel.br (S. Mali)

macelligoi@uel.br (M.A.P.C. Celligoi)

Correspondence to: Suzana Mali (E-mail: S. Mali)

Graphical Abstract



ABSTRACT

The aims of this work were to produce hyaluronic acid (HA) by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 in a low cost sugarcane molasses fermentation medium and to employ it to obtain films blends based on polyvinyl alcohol (PVA). The films were produced by casting and they were characterized according to their microstructure, mechanical and barrier properties. HA was added in different concentrations (0, 5, 10 and 15 g/100 g solids), and glycerol was used as a plasticizer (25 g/100 g solids). All formulations resulted in easily manipulated films with good appearance. Analyses of FT-IR confirmed the presence of HA sample in films blends. The addition of HA on PVA films increased their thermal stability, solubility, swelling index, water vapor permeability and elongation. Microbial HA sample combined with PVA showed to be a promising material to biomedical application, and an addition between 5 and 10 % was sufficient to improve films properties.

Key-words: microbial hyaluronic acid, polyvinyl alcohol, barrier properties, mechanical properties

INTRODUCTION

Hyaluronic acid (HA) is a non-sulfated linear glycosaminoglycan that consists of repeating disaccharide units of β (1 \rightarrow 4)-glucuronic acid (GlcUA) and β (1 \rightarrow 3)-N-acetylglucosamine (GlcNAc).¹ It is also a major extracellular matrix component that is found in vertebrates.² Its capacity for holding water and its high viscoelasticity, as well as its biocompatibility and biodegradability, make HA a suitable biomaterial for use in several areas ranging from tissue engineering to cosmetic application.^{3,4}

Traditionally, native HA was extracted from animal tissues, most often from rooster comb. More recently, the polymer has been produced by the fermentation of *Streptococci*, thereby eliminating the possibility of inter-species disease transfer.^{5,6} In addition, the use of low-cost renewable resources and agro-industrial by-products as fermentation media contributes to making microbial HA production economically feasible.⁷⁻¹⁰

According to Mogoşanu and Grumezescu¹¹, there are several natural and synthetic polymers that are used as dressings for regenerating and repairing dermal and epidermal tissues during the wound healing process. They also reported that HA is a natural polymer with the potential to be used for this purpose; however, it is expensive, as the value of HA products and their derivatives range from US \$2,000 to \$60,000 kg⁻¹.¹²

Due to its high cost, HA can be combined with different polymers to reduce its price and improve its physicochemical and biological properties.¹³⁻¹⁵ The blend system of polyvinyl alcohol (PVA) and HA has been reported to be a promising material for biomedical application.¹⁵⁻¹⁷

On an industrial scale, PVA is obtained by partial or complete hydrolysis of polyvinyl acetate to remove the acetate groups, with the partially hydrolysed grades containing residual acetate groups.¹⁸ PVA is a synthetic hydrophilic polymer that is non-toxic, non-carcinogenic, biocompatible, biodegradable and bio-adhesive.^{15,19}

Previous studies have used commercial HA for production of PVA-HA gels^{16,20-22} and solutions²³. Ding et al.²⁴ obtained a multi-layered hydrogel film system based on hyaluronic acid–cysteamine (HA-Cym) and PVA. Fahmy et al.¹⁵ produced PVA-HA films using consecutive freeze-thaw cycles for cross-linking.

In our work, we employed HA produced by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 in a low-cost sugarcane molasses fermentation medium to produce a blend with polyvinyl alcohol. The blend produced biodegradable and biocompatible films, which were characterized according to their microstructure, mechanical and barrier properties. The HA addition between 5 and 10% was sufficient to improve films properties and these showed to be a promising material to biomedical application.

EXPERIMENTAL

Materials

The polyvinyl alcohol was provided by Sekisui Specialty Chemicals (Dallas, TX, USA) as Selvol™ 325 (degree of hydrolysis = 98.4% and 85–124 kDa molecular weight). Glycerol was purchased from Synth (Labsynth, São Paulo, Brazil). *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 (for HA production) was obtained from the Brazilian Collection of Environmental and Industrial Microorganisms (CBMAI). The sugarcane molasses fermentation medium was obtained from the Alltech group (São Pedro do Ivaí, PR, Brazil).

HA Production

The HA production and purification were conducted based on the method described by Pan et al.⁸. Batch fermentation in a bioreactor (Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil) was conducted in a fermentation medium containing clarified sugarcane molasses with 85.35 g L⁻¹ total sugar content, 50 g L⁻¹ yeast extract, 2.5 g L⁻¹ K₂HPO₄, 2.0 g L⁻¹ NaCl and 1.5 g L⁻¹ MgSO₄ at pH 8.0 for 24 h. Cell-free supernatant was precipitated with ethanol at a 1.5:1 (v/v) ratio of ethanol:supernatant at 4°C for 1 h. The HA was re-dissolved in a 0.15 mol L⁻¹ NaCl solution. Three precipitations were performed to increase the HA purity. Trichloroacetic acid (1%) was added until the HA solution reached pH 2.0, and the solution was maintained for 1 h at 4°C. Next, the solution was centrifuged at 7744 g at 4°C for 30 min. The supernatant was dialyzed for 48 h with six distilled water changes, and the frozen dialysis product was lyophilized.

Sodium hyaluronate with a molecular weight of $1.5\text{--}1.8 \times 10^6$ Da (Sigma-Aldrich) was used as the standard.

The HA homogeneity was determined by high performance steric exclusion chromatography (HPSEC) coupled with a refractive index (RI) detector, model RID 10A. The chromatography system consisted of an HPLC pump (Model Shimadzu-10 AD), a manual injection valve (Shimadzu) fitted with a 200- μ L loop and Ultrahydrogel columns (7.8 \times 300 mm) arranged in series with a different exclusion limit connected in order of decreasing pore size, 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 and 5×10^3 Da, corresponding to Ultrahydrogel (Waters) 2000, 500, 250 and 120, respectively. The mobile phase was 0.1 M NaNO₃ with sodium azide (0.03%), with a 0.6 mL min⁻¹ flow rate. Data analysis was performed using LC solution software (Shimadzu Corporation). A standard curve of dextran with molecular weights of 2000, 1400, 670, 500, 410, and 266 kDa was used to determine the apparent molecular weight of the HA, which was 1.35×10^6 Da.

Film Production

The films were prepared using PVA, microbial HA and glycerol (plasticizer). For each experiment, the films were prepared with a fixed concentration (2.0 g/100 g filmogenic solution) of solids (PVA + HA) and a fixed glycerol concentration (25 g/100 g solids). Four different HA levels were added to the filmogenic solutions: 0, 5, 10 and 15 g HA/100 g solids, and the resulting films were labelled PVA100, PVA95-HA5, PVA90-HA10 and PVA85-HA15, respectively. The films were prepared by casting according to the formulations described in Table 1. PVA and glycerol were directly mixed with distilled water and maintained at 95°C for 30 min with manual shaking. After gelatinization, each PVA solution was cooled to nearly 70°C and mixed with the HA solution for 30 min. The filmogenic solutions were poured onto circular acrylic plates (0.63 g filmogenic solution/cm²), and dried at 30°C in a ventilated oven, model TE-394-3 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil) to a constant weight (approximately 30 h). The resulting translucent films could be easily removed from the plate and were equilibrated at 25°C and a relative humidity (RH) of 58% for 48 h before testing.

Table 1 - Formulation employed to prepare 500 g of the filmogenic solutions.

Formulations	PVA (g)	HA (g)	Glycerol (g)	Water (g)
PVA100 film	10	0	2.5	487.5
PVA95-HA5 film	9.5	0.5	2.5	487.5
PVA90-HA10 film	9.0	1.0	2.5	487.5
PVA85-HA15 film	8.5	1.5	2.5	487.5

Film Characterization

Thickness

The film thickness was determined using a Mitutoyo manual micrometer (São Paulo – Brazil) with an accuracy of $\pm 1 \mu\text{m}$ at 10 random positions on the film. The mean standard deviation of the film thickness was approximately 5% of the average thickness.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

SEM analyses were performed using a JEOL JSPM 100 electron microscope (Japan). Film pieces were mounted on bronze stubs using double-sided tape and then coated with a layer of gold (40–50 nm) to allow surface and cross-section visualization. All samples were examined using an accelerating voltage of 20 kV.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

Pulverized and dried samples were mixed with potassium bromide and compressed into tablets. FT-IR analysis was performed using a Shimadzu-8400 FT-IR instrument (Japan). Measurements were performed in triplicate, and 100 scans were run in the spectral range of $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$. The spectral resolution was 4 cm^{-1} .

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The DSC analyses were performed on a Shimadzu DSC 60 (Japan) calorimeter. Approximately 3.0 mg of each sample were placed in platinum containers. The HA, PVA and film samples were heated from 10 to 300°C at a heating rate of 5°C min⁻¹ in a helium atmosphere. An empty pan was used as a reference. The glass transition temperature (T_g) corresponded to the temperature at which a baseline inflexion occurred. The samples were subjected to two scans, and the results of the second scan were used for T_g calculation and to plot the thermograms.

Thermogravimetric Analysis (TGA)

Thermogravimetric analysis (TGA 50, Shimadzu) was carried out in a nitrogenous atmosphere (50 mL min⁻¹), and the samples (approximately 10 mg) were heated from 30 to 600°C at a heating rate of 10°C min⁻¹. The weight loss (%) was evaluated by considering the residual weight at 600°C. For each sample, the temperature of maximum degradation (T_{max}) and the temperature at which 10% weight loss occurred (T₉₀) were determined.

Solubility

The film solubility in water was measured as the percentage of dry matter of the film solubilized during a 24 h period.²⁵ The initial dry matter of each film was obtained after drying the film specimens in desiccators containing anhydrous calcium chloride for a week. The samples were weighed and immersed in 80 mL distilled water at 25°C with constant agitation for 24 h. Film fraction not solubilized in water was separated by centrifugation and dried to determine the dry matter weight. Tests were performed in triplicate.

Swelling Index (SI)

The swelling index was determined in distilled water at 37°C. Films were cut into pieces of approximately 1 cm², placed in Petri dishes, left into an oven at 30°C for 6 h and weighed to determine the dry mass (W_d). The dried samples were immediately immersed in distilled water, incubated at 37°C and weighed again (W_s) at specific interval times (1, 10, 60 and 120 min). The swelling index was determined from SI (%) = $[(W_s - W_d)/W_d] \times 100$.

Water Vapor Permeability (WVP)

WVP tests were conducted using the ASTM method E96²⁶. Each film sample was sealed over a circular opening of 0.00181 m² in a permeation cell stored at 25°C in a desiccator. To maintain a 75% RH gradient across the film, anhydrous calcium chloride (0% RH) was placed inside the cell, and a saturated sodium chloride solution (75% RH) was used in the desiccator. After steady state conditions were reached (approximately 2 h), the cell was weighed every 2 h for 48 h. Changes in the cell weight were recorded to the nearest 0.0001 g and plotted as a function of time. The slope of each line was calculated by linear regression, and the water vapor transmission rate (WVTR) was calculated from the slope of the straight line (g/s) divided by the transfer area (m²). After the permeation tests, the film thickness was measured, and the WVP (g Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻¹) was calculated as $WVP = [WVTR/S(R_1 - R_2)]d$, where S is the saturation vapor pressure of water (Pa) at the test temperature (25°C); R_1 is the RH in the desiccator; R_2 is the RH in the permeation cell; and d is the film thickness (m). Under these conditions, the driving force [$S(R_1 - R_2)$] was 1753.55 Pa. All tests were conducted in duplicate.

Mechanical Properties

The mechanical properties were determined using an EMIC DL 2000 analyser (Brazil), according to the method established by ASTM D882-02²⁷. The maximum tensile strength, elongation-at-break and elastic modulus were calculated from the stress–strain curves using the results of at least five tests for each sample.

Statistical Analysis

Tukey's test ($p \leq 0.05$) was performed using the R Software ²⁸ to compare the means.

RESULTS AND DISCUSSION

The lyophilized HA produced in this work could be easily incorporated into the PVA solution, resulting in a homogeneous filmogenic solution, which provided translucent films that could be easily manipulated and had a good appearance (Figure 1). This result indicates that the solid content of 2% (w/v) used to obtain the film solution was appropriate. Due to the high molecular weight (1.35×10^6 Da) of the HA produced by the *S. zooepidemicus* in this work, the polymer is suitable for use in biomedical applications such as wound healing ²⁹, drug delivery ³⁰, anti-adhesive barriers ³¹ and topical ocular therapy ³².

Thickness and SEM

The thicknesses of the films ranged from 0.20 to 0.22 μm , and the values did not differ significantly (Table 2) between the different formulations.

The film surfaces were evaluated using SEM (Figure 2). All samples exhibited a homogeneous surface without phase separation, indicating a good interaction between the PVA and HA. The addition of HA resulted in rougher surfaces for the PVA95-HA5 and PVA90-HA10 films; however, the film with the higher HA content (PVA85-HA15) showed a smooth surface, similar to the film produced without HA (PVA100).

Figure 1. Appearance of films based on PVA and HA.

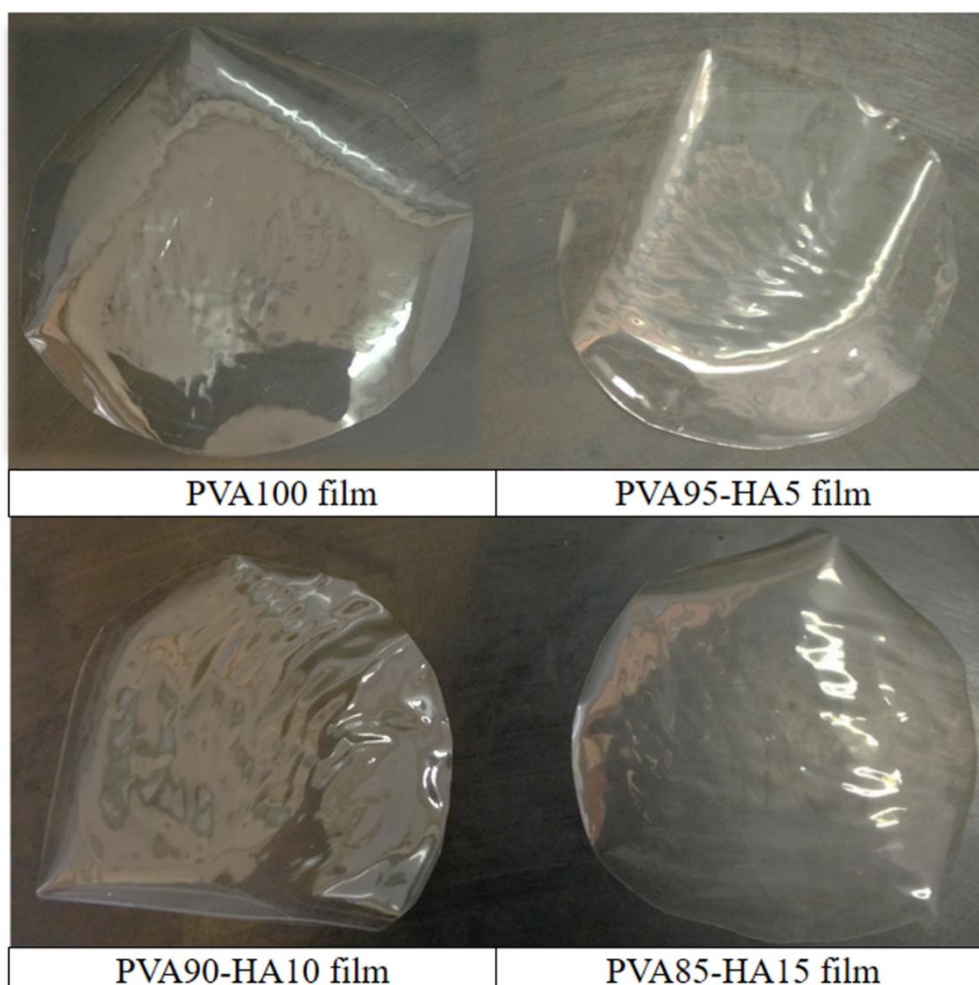
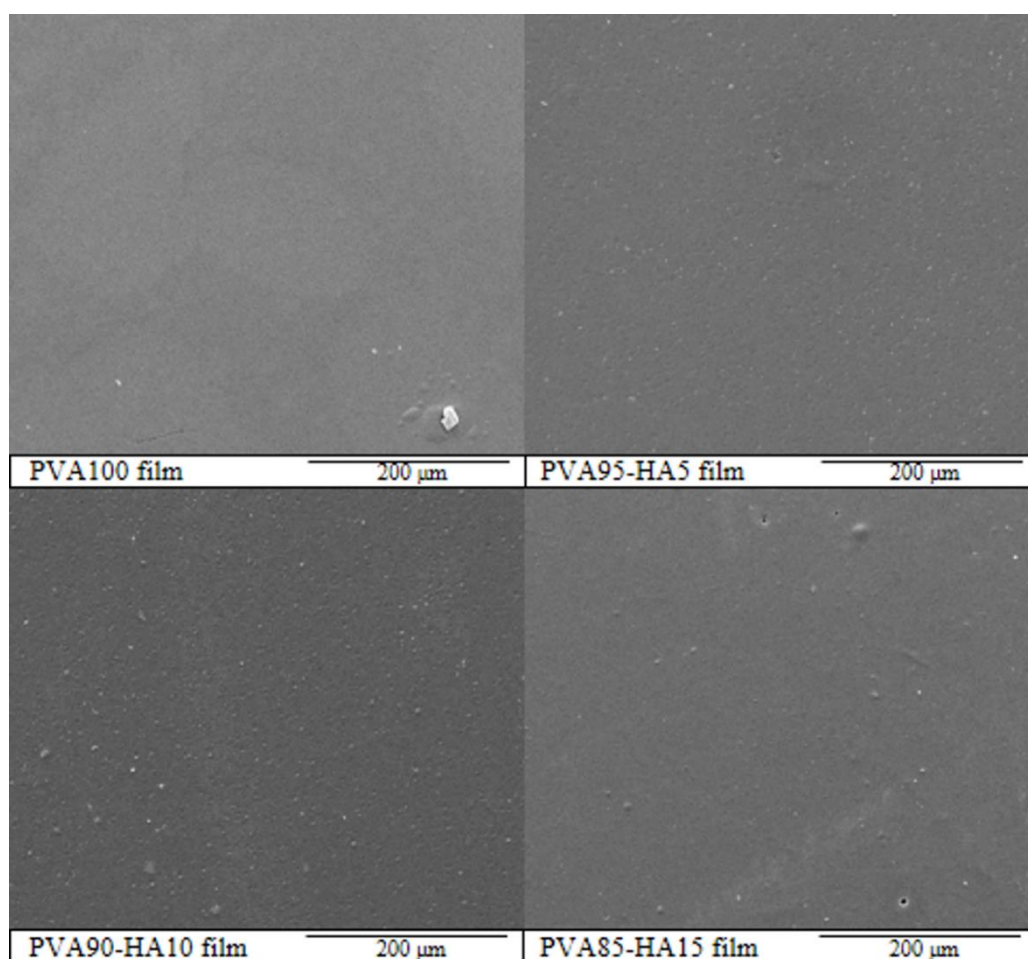


Table 2. Results of thickness, solubility and water vapor permeability (WVP) of films based PVA and HA.

Formulations	Thickness (μm)	Solubility (%)	WVP $\times 10^{11}$ (g/msPa)
PVA100 film	0.20 \pm 0.01 ^a	28.95 \pm 3.02 ^d	2.69 \pm 0.11 ^b
PVA95-HA5 film	0.22 \pm 0.01 ^a	36.81 \pm 1.42 ^c	3.85 \pm 0.74 ^b
PVA90-HA10 film	0.21 \pm 0.01 ^a	47.12 \pm 2.74 ^b	6.25 \pm 0.78 ^a
PVA85-HA15 film	0.21 \pm 0.02 ^a	57.76 \pm 2.27 ^a	5.90 \pm 0.47 ^a

Results express in mean \pm standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ($p \leq 0.05$) according to the Tukey's test

Figure 2. SEM micrographs of film surfaces.



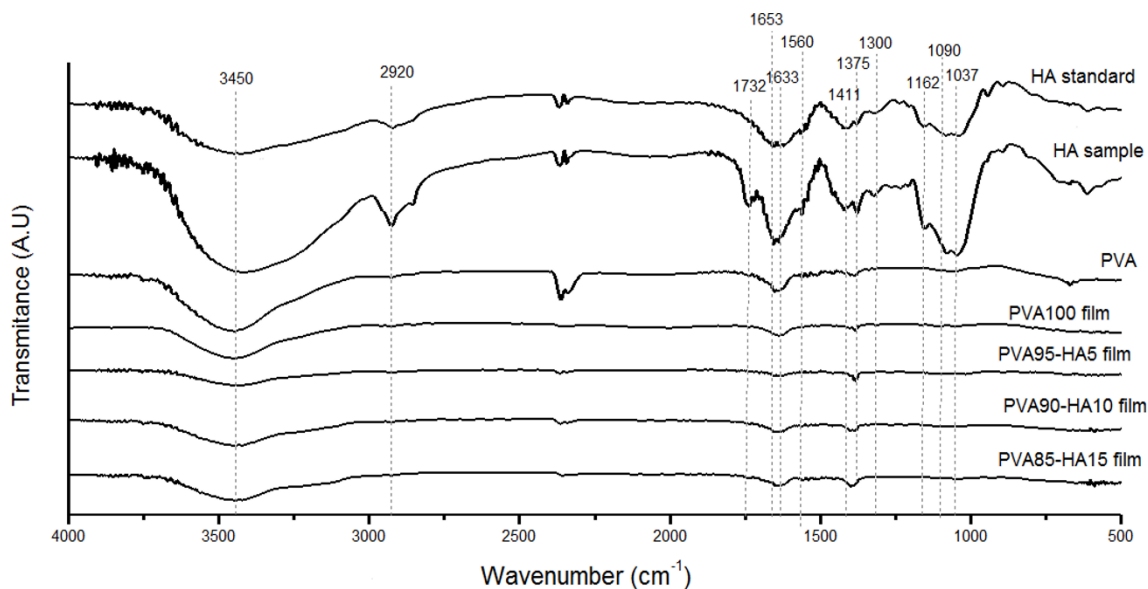
Fourier Transform Infrared Spectroscopy

The FT-IR spectra of the PVA, HA and the films produced with PVA and the microbial HA sample are presented in Figure 3. The spectra of the HA sample produced by *S. zooepidemicus* was very close to the HA standard (Sigma-Aldrich).

In all samples, a strong band was observed near 3445 cm^{-1} , which was related to the hydroxyl stretching vibrational modes of the OH groups presented on the HA, PVA and glycerol.^{33,34} However, in the film samples, this band appeared to be less intense, which likely indicates a decrease in the free OH groups³⁵ that may be participating in hydrogen bonding between the polymer chains. The hydrogen bond formation between two different macromolecules competes with the hydrogen bond formation between molecules from the same polymer.¹⁴ Due to a higher concentration of PVA in all film formulations, the PVA-PVA interaction might be more dominant than

the PVA-HA interaction. Therefore, the film spectra presented greater similarity to the PVA pure spectrum.

Figure 3. FT-IR spectra of HA, PVA and films produced from PVA and HA blends.



In the samples containing HA, the band near 3445 cm^{-1} can also be attributed to the N-H stretching vibrations of the N-acetyl side chain.^{36,37}

The band approximately 2920 cm^{-1} appeared in both HA samples, but in the HA standard it was more intense than in the microbial HA sample, which corresponds to the C-H stretching.³⁸

The bands between 1732 and 1560 cm^{-1} that appeared in both HA samples could be related to the superposition of the amide I and II bands in the HA, as well as the various carbonyl and carboxyl groups. Haxaire et al.³⁹ also observed an intense group of bands in this region in a commercial microbial HA.

The bands at 1633 and 1410 cm^{-1} were assigned to the asymmetric and symmetric stretching modes of the planar carboxyl groups in the HA, respectively.

In the PVA, the 1635 cm^{-1} band was attributed to the carbonyl functional groups since residual acetate groups remained after the PVA manufacturing due to the hydrolysis of the polyvinyl acetate.⁴⁰ The rise in intensity of these bands was observed with the increase in HA content in the PVA-HA films. Additionally, the film bands around 1635 cm^{-1} might be due to embedded water molecules.⁴⁰

A band at the 1375 cm^{-1} region was observed in all samples, which could be associated with the angular deformation of the CH and CH₂ groups.

The amide I absorption peaks at 1653 cm^{-1} , amide II peaks at 1560 cm^{-1} and amide III peaks at 1300 cm^{-1} are characteristic of the HA spectrum.³⁷ These bands were more intense in both HA spectra and less intense in the films containing HA. This indicates that interactions occurred between the film components.

Bands in the $1200 - 950\text{ cm}^{-1}$ region were attributed to a C-O-C (O-bridge), a C-O (exocyclic), and a C-OH group and were more intense in the HA.⁴¹

Thermogravimetric Analysis

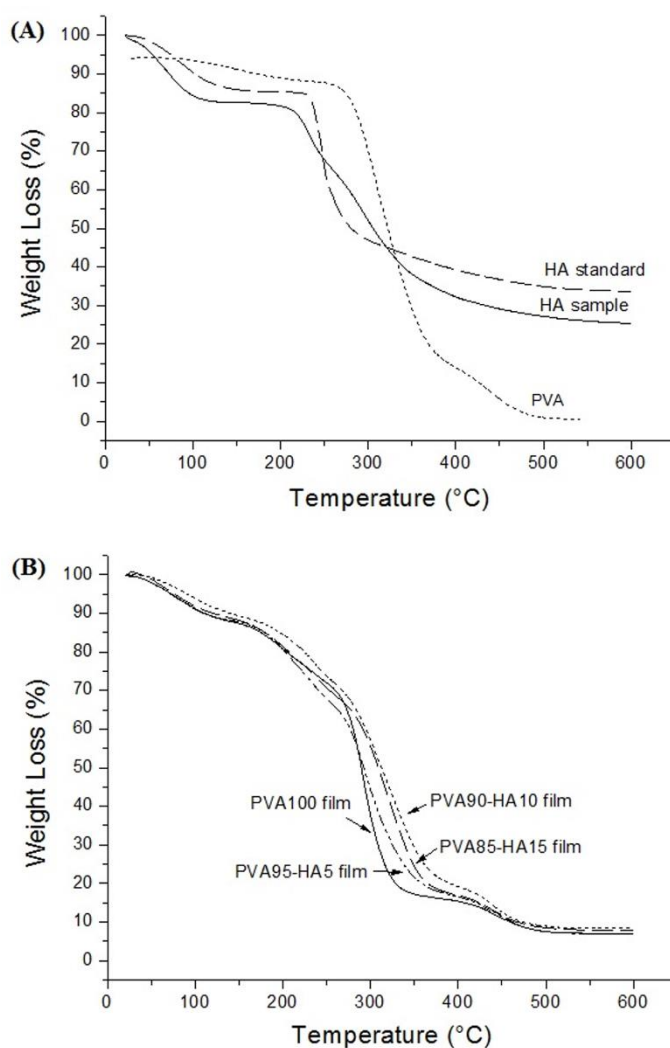
Thermogravimetric analysis was used to characterize the thermal stability of the samples. TGA curves for the HA, PVA and PVA-HA films are shown in Figure 4, and the T_{max} and T_{90} for each sample are shown in Table 3.

Both the produced HA and the standard microbial HA samples showed two mass loss events: an initial loss at $70 - 100^\circ\text{C}$, possibly associated with the evaporation of water, and a second, more important, mass loss at 245°C in the HA standard and 286°C in the microbial HA sample. The residual mass at 600°C was 33.5% and 25.4%, respectively (Table 3). Chen and Cheng⁴² related a maximum degradation temperature of 290°C for HA when it was obtained by fermenting *Streptococcus zooepidemicus* with an average molecular weight of 1.78×10^6 Da. Lewandowska et al.⁴³ suggested a partial breakage of the HA molecular structure in the range of 200°C and 300°C .

Table 3. Results of TGA parameters.

Sample	$T_{90\%}$ ($^\circ\text{C}$)	T_{max} ($^\circ\text{C}$)		
		I	II	III
HA standard	103	245		
HA sample	73	286		
PVA	278	311	450	
PVA100 film	110	214	295	452
PVA95-HA5 film	110	218	305	454
PVA90-HA10 film	139	237	320	450
PVA85-HA15 film	120	220	321	452

Figure 4. TGA thermograms of HA, PVA (A) and films produced from PVA and HA blend (B).



Pure PVA presented a more important weight loss event at 311°C and a second event at 450°C (Table 3). According to Tubbs and Ting⁴⁴ and Sin et al.⁴⁵, thermal degradation of PVA occurs in two steps, an initial decomposition beginning at 200°C, which is related to the dehydration of hydroxyl groups, followed by the formation of volatile organic compounds and the generation of conjugated unsaturated polyene structures. At higher temperatures, approximately 450°C, the second stage of degradation predominates by producing small quantities of hydrocarbon-related products such as alkenes, alkanes and aromatics.

The residue of the PVA mass at approximately 600°C was 6.5%, lower than the residue from the HA. However, according to the T_{90} , PVA is more stable than HA ($T_{90} \text{ HA} < T_{90} \text{ PVA}$) because it has a more organized polymer chain than HA.

The PVA film without the addition of HA (PVA100) presented a T_{90} of 100°C, which is much lower than pure PVA, which has a T_{90} of 278°C. This is explained by the thermal processing of the PVA in the presence of glycerol during film preparation. According to Jang and Lee ⁴⁶, the introduction of glycerol as a plasticizer increases mobility between the PVA chains and decreases the crystallite region, which is associated with the thermal processing, and results in a decrease of thermal stability in the PVA. Othman et al. ⁴⁷ also reported that PVA-starch-glycerol films had less thermal stability than pure PVA. Wang, Wang and Li ⁴⁸ reported that when glycerol is added to an aqueous solution of PVA, the concentration of hydroxyl groups in the system increases, favouring the formation of new hydrogen bonds between the glycerol and PVA, replacing the interaction between the PVA chains, and decreasing the melting point and decomposition temperature of the PVA remarkably.

The thermal degradation of the PVA100 film occurred in three steps at 214, 295 and 452°C. As observed by Pereira et al. ⁴⁹, the pure PVA film decomposed in four consecutive steps. The first step was due to thermal dehydration and the subsequent stages attributed to thermal decomposition of the anhydrous compound. The steps at 214°C and 295°C were due to dehydration accompanied by the formation of volatile products, and the last decomposition step at 452°C was due to the degradation of the polyene residue from the synthesis of carbon and hydrocarbons.⁵⁰

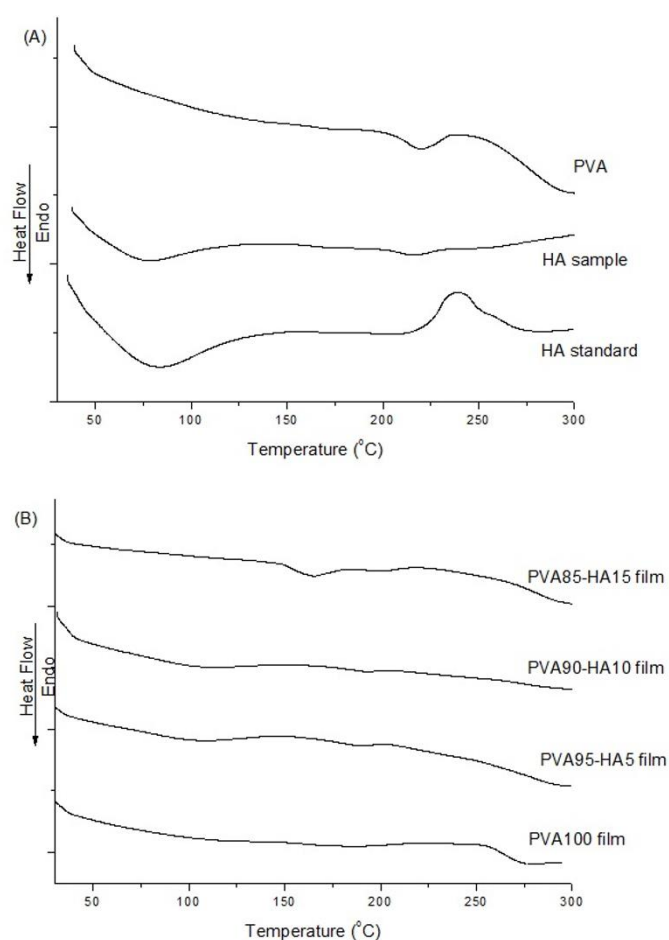
The addition of 10% HA into the blend film (PVA90-HA10 film) resulted in the film having higher values of T_{90} and T_{max} , indicating that this HA concentration improves the thermal stability of the PVA films, possibly due to interactions between the PVA and HA. Sionkowska et al. ⁵¹ also observed an increase in thermal stability when HA was added into chitosan and collagen membranes.

PVA95-HA5 showed T_{90} and T_{max} values that were very close to the PVA100 film (Table 3), possibly because this HA concentration was not enough to improve thermal stability in the PVA films. The PVA85-HA15 film had higher T_{90} and T_{max} values than the PVA100 film, but these values were lower than those observed for the PVA90-HA10 film, suggesting that an HA addition of 10% results in a more organized structure, with a higher thermal stability.

Differential Scanning Calorimetry

The DSC thermograms of pure PVA (Figure 5A) show an endothermic peak at 219°C, related to the melting of the polymer. Maria et al.⁵² reported temperatures between 180-190°C for melting PVA with a similar degree of hydrolysis.

Figure 5. DSC thermograms of HA, PVA (A) and films produced from PVA and HA blends (B).



An exothermic sharp peak was observed at 239°C for the HA standard (Figure 5A), which was associated with the thermal decomposition of the HA. This result was consistent with reports from other authors.^{53,54} The microbial HA did not have this exothermic peak. As observed in the TGA results, the T_{\max} for the HA standard (245°C) was lower than the T_{\max} of the microbial HA sample (286°C), and it was possible that the decomposition of the microbial HA did not appear in the DSC thermograms.

Thermograms of the films did not show any significant endo or exothermic events, with the exception of the PVA100 film, which had a discrete exothermic peak at 252°C, and the PVA85-HA15 film, which had an endothermic peak at 163°C (Figure 5B). During the thermal processing of the films, a new organization was established between the polymers chains, and according to Othman et al. ⁴⁷, who studied PVA-starch films, interaction between the polymers could result in different melting and decomposition temperatures, which would indicate that there are interactions taking place.

Solubility, Swelling Index and Water Vapor Permeability

The solubility of the films increased from 28.95% for the PVA100 film to 57.76% for the PVA85-HA15. The lower solubility of the pure film (PVA100) can be attributed to the formation of strong interactions between PVA chains due to the high degree of hydrolysis. ⁵⁵ According to Jang and Lee ⁴⁶, PVA with a higher degree of hydrolysis is less soluble in water because the large number of free hydroxyl groups increases the number of interactions (hydrogen bonds) that are carried out between the polymer chains, leaving fewer free hydroxyls to interact with the water.

When HA was added to the PVA films, the solubility significantly increased, and the PVA85-HA15 film was the most soluble, due to the higher HA concentration (Table 2). Adding HA molecules into the PVA film matrix may have affected the interactions between the PVA chains, resulting in more free hydroxyl groups in the PVA to interact with the water. Additionally, when the HA molecules were added, the concentration of hydroxyl groups in the system increased, favouring the interaction between HA and water by hydrogen bonding.

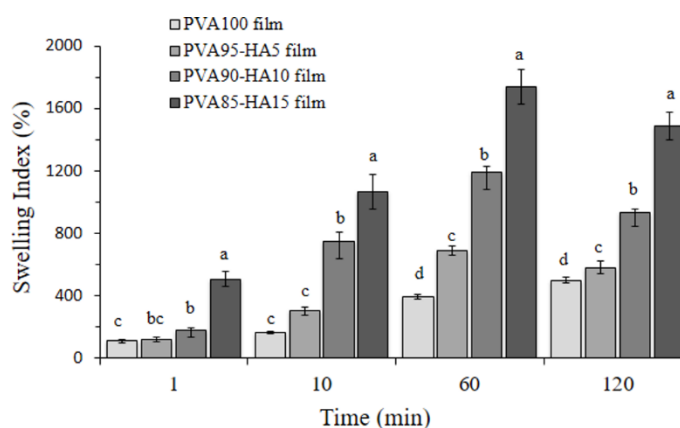
The swelling index of the samples are displayed in Figure 6. The SI significantly increased with the increase of time, and for all assay times, the SI were significantly higher for the PVA90-HA10 and PVA85-HA15 films, with 10 and 15% HA, respectively (Figure 6). The increase in the SI of the PVA films with the HA addition has been observed in previous works, and it is related to the high HA hydrophilicity. ^{15,51} These results were consistent with the solubility results.

The swelling behaviour of scaffolds is critical for their practical use in biomedical applications. ⁵⁶ An increase in pore size due to swelling facilitates cell

attachment and growth in a three-dimensional fashion.⁵⁷ Additionally, blood contains approximately 90% water, so films with good swelling properties can be used in the wound healing process because they can absorb a large amount of water and stop the bleeding.³⁴

The water vapor permeability of the films ranged from 2.69 to 5.90 x 10⁻¹¹ (Table 2), and these values were significantly influenced by the HA addition. The films with 10 and 15% HA presented higher values of WVP, and these values were consistent with solubility values. Permeability can be defined as the product of diffusion and solubility, and the higher the solubility is, the higher the WVP.⁵⁸ Sgorla et al.⁵⁴ also verified a WPV increase when 10% HA was added to ethylcellulose film, and these authors reported that HA is rich in hydroxyl groups that interact with water molecules to form hydrogen bonds. According to Xu et al.⁵⁹, WPV is required for proper wound dressing because controlling the water that is lost from an open wound is crucial for maintaining a wet environment during the wound-repairing process.

Figure 6. Swelling index of films produced from PVA and HA blends. Different letters in the same time indicate significant differences ($p \leq 0.05$) according to the Tukey's test.



Mechanical Properties

The mechanical properties of the films are presented in Table 4. The tensile strength of the films ranged from 8.48 MPa to 10.30 MPa, and this property was not significantly affected by adding HA. As HA possibly interferes with interactions between the PVA chains, it is best if the tensile strength of the film remains stable after HA is

added. Young's modulus ranged from 25.27 to 31.87 MPa (Table 4) and, similar to the tensile strength, was not significantly affected by adding HA.

Unlike the tensile strength and Young's modulus, elongation was affected by addition of HA (Table 4). The maximum elongation value (290.25%) was obtained for the PVA90-HA10 film, which contained 10% HA, but when 15% HA was added, the elongation decreased. An increase in film elongation is important in wound dressing, as the dressing materials should remain intact when stretched.³⁴ Sionkowska et al.⁵¹ observed that adding HA improves the elongation of chitosan-collagen blends due to the high hygroscopicity of the HA.

Table 4 - Results of mechanical properties of films based on PVA and HA.

Formulations	Tensile Strength (MPa)	Elongation (%)	Young's Modulus (MPa)
PVA100 film	9.72±1.12 ^a	158.23±17.16 ^c	25.54±3.99 ^a
PVA95-HA5 film	8.48±1.60 ^a	170.86±13.24 ^c	31.87 ±5.33 ^a
PVA90-HA10 film	9.44±0.62 ^a	290.25±6.39 ^a	30.04± 2.37 ^a
PVA85-HA15 film	10.30±3.17 ^a	235.13±5.23 ^b	25.27±1.15 ^a

Results express in mean ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ($p \leq 0.05$) according to the Tukey's test

CONCLUSIONS

In this study, we produced a high molecular weight HA from a fermentation process using *Streptococcus zooepidemicus* in a low-cost sugarcane molasses fermentation medium for use in a blend with polyvinyl alcohol to produce biodegradable and biocompatible films. All formulations resulted in films with a good appearance and were easily removed from the plates without cracking. Thermal stability of these films increased with the addition of HA. Solubility, swelling, water vapor permeability and elongation also increased when HA was added. Therefore, the properties obtained from the addition of HA in the PVA films showed that HA is a material that shows promise for use in biomedical applications. Among the different HA concentrations, the additions of 5 and 10% HA were sufficient to improve the properties of the PVA films.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Laboratory of Microscopy and Microanalysis (LMEM), the Laboratory of Spectroscopy (ESPEC), the Department of Food Science and Technology from State University of Londrina, for the analyses and CAPES – Brazil.

REFERENCES

1. Kogan, G.; Soltés, L.; Stern, R.; Gemeiner, P. *Biotechnol. Lett.* **2007**, 29, 17–25.
2. Chen, W. Y.; Abatangelo, G. *Wound repair Regen.* **1999**, 7, 79–89.
3. Chong, B. F.; Blank, L. M.; Mclaughlin, R.; Nielsen, L. K.. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 66, 341–351.
4. Collins, M. N.; Birkinshaw, C. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 92, 1262–1279.
5. Liu, L.; Liu, Y.; Li, J.; Du, G.; Chen, J. *Microb. Cell Fact.* **2011**, 10, 99.
6. Yamada, T.; Kawasaki, T. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, 99, 521–528.
7. Amado, I. R.; Vázquez, J. A.; Pastrana, L.; Teixeira, J. A. *Biochem. Eng. J.* **2017**, 117, 181–187.
8. Pan, N. C.; Pereira, H. C. B.; Silva, M. D. L. C.; Vasconcelos, A. F. D.; Celligoi, M. A. P. C. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2017**, 182, 276–293.
9. Pan, N. C.; Vignoli, J. A.; Baldo, C.; Pereira, H. C. B.; Silva, R. S. S. F.; Celligoi, M. A. P. C. *Int. J. Sci. Technol. Res.* **2015**, 4, 114–118.
10. Vázquez, J. A.; Pastrana, L.; Piñeiro, C.; Teixeira, J. A.; Pérez-Martín, R. I.; Amado, I. R. *Mar. Drugs* **2015**, 13, 6537–6549.
11. Mogoşanu, G. D.; Grumezescu, A. M. *Int. J. Pharm.* **2014**, 463, 127–136.
12. Pires, A. M. B.; Macedo, A. C.; Eguchi, S. Y.; Santana, M. H. A. *Bioresour. Technol.* **2010**, 101, 6506–6509.
13. Oliveira, S. A.; Silva, B. C.; Riegel-Vidotti, I. C.; Urbano, A.; Faria-Tischer, P. C. S.; Tischer, C. A. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 97, 642–653.
14. Lewandowska, K.; Sionkowska, A.; Grabska, S.; Kaczmarek, B.; Michalska, M. *J. Mol. Liq.* **2016**, 220, 726–730.
15. Fahmy, A.; Kamoun, E. A.; El-Eisawy, R.; El-Fakharany, E. M.; Taha, T. H.; El-Damhougy, B. K.; Abdelhai, F. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, 26, 1466–1474.

16. Pirinen, S.; Karvinen, J.; Tiitu, V.; Suvanto, M.; Pakkanen, T. T. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, 132, 1–6.
17. Lazzeri, L.; Barbani, N.; Cascone, M. G.; Lupinacci, D.; Giusti, P.; Laus, M. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1994**, 5, 862–867.
18. Tang, X.; Alavi, S. *Carbohydr. Polym.* **2011**, 85, 7–16.
19. Stasko, J.; Kalniņš, M.; Dzene, A.; Tupureina, V. *Proc. Est. Acad. Sci.* **2009**, 58, 63.
20. Kupal, S. G.; Cerroni, B.; Ghugare, S. V.; Chiessi, E.; Paradossi, G. *Biomacromolecules* **2012**, 13, 3592–3601.
21. Kodavaty, J.; Deshpande, A. P. *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, 131, 1–10.
22. Kodavaty, J.; Deshpande, A. P. *Polym. Bull.* **2017**. doi:10.1007/s00289-017-1913-6.
23. Kim, S. H.; Hyun, K.; Moon, T. S.; Mitsumata, T.; Hong, J. S.; Ahn, K. H.; Lee, S. *J. Polymer (Guildf)*. **2005**, 46, 7156–7163.
24. Ding, J.; He, R.; Zhou, G.; Tang, C.; Yin, C. *Acta Biomater.* **2012**, 8, 3643–3651.
25. Gontard, N.; Guilbert, S.; Cuq, J. *J. Food Sci.* **1992**, 57, 190–199.
26. ASTM E96-00. *In Annual book of ASTM Standards*; ASTM International, Ed.; West Conshohocken, PA, **2000**.
27. ASTM D882-02. *In Annual Book of ASTM Standards*; ASTM International, Ed.; West Conshohocken, PA, **2002**.
28. R Core Team. *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, **2016**. <https://www.R-project.org/>.
29. Hemshekhar, M.; Thushara, R. M.; Chandranayaka, S.; Sherman, L. S.; Kemparaju, K.; Girish, K. S. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 86, 917–928.
30. Zanin, G. D.; Bunhak, É. J.; Santos, L. F.; Melo, E. B.; Cavalcanti, O. A. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, 134, 1–10.
31. Li, L.; Wang, N.; Jin, X.; Deng, R.; Nie, S.; Sun, L.; Wu, Q.; Wei, Y.; Gong, C. *Biomaterials* **2014**, 35, 3903–3917.
32. Calles, J. A.; López-García, A.; Vallés, E. M.; Palma, S. D.; Diebold, Y. *Int. J. Pharm.* **2016**, 509, 237–243.
33. Kwon, S. S.; Kong, B. J.; Park, S. N. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, 92, 146–154.
34. Fan, L.; Yang, H.; Yang, J.; Peng, M.; Hu, J. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 146, 427–434.

35. Brandelero, R. P. H.; Almeida, F. M.; Alfaro, A. *Quim. Nova* **2015**, 38, 910–916.
36. Kanchana, S.; Arumugam, M.; Giji, S.; Balasubramanian, T. *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre* **2013**, 2, 1–7.
37. Wu, Y. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 89, 709–712.
38. Reddy, K. J.; Karunakaran, K. T. *J. BioSci. Biotech* **2013**, 2, 173–179.
39. Haxaire, K.; Maréchal, Y.; Milas, M.; Rinaudo, M. *Biopolym. - Biospectroscopy Sect.* **2003**, 72, 10–20.
40. Jayasekara, R.; Harding, I.; Bowater, I.; Christie, G. B. Y.; Lonergan, G. T. *Polym. Test.* **2004**, 23, 17–27.
41. Gilli, R.; Kacuráková, M.; Mathlouthi, M.; Navarini, L.; Paoletti, S. *Carbohydr. Res.* **1994**, 263, 315–326.
42. Chen, J.-P.; Cheng, T.-H. *Polymer (Guildf).* **2009**, 50, 107–116.
43. Lewandowska, K.; Sionkowska, A.; Grabska, S.; Kaczmarek, B. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 92, 371–376.
44. Tubbs, R. K.; Ting, K. W. *In Polyvinyl alcohol – Developments*; Finch, C. A., Ed.; John Wiley: Chichester, **1973**; p 167–182.
45. Sin, L. T.; Rahman, W. A. W. A.; Rahmat, A. R.; Mokhtar, M. *Carbohydr. Polym.* **2011**, 83, 303–305.
46. Jang, J.; Lee, D. K. *Polymer (Guildf).* **2003**, 44, 8139–8146.
47. Othman, N.; Azahari, N. A.; Ismail, H. *Malaysian Polym. J.* **2011**, 6, 147–154.
48. Wang, R.; Wang, Q.; Li, L. *Polym. Int.* **2003**, 52, 1820–1826.
49. Pereira, V. A.; Arruda, I. N. Q.; Stefani, R. *Food Hydrocoll.* **2015**, 43, 180–188.
50. Lewandowska, K. *Thermochim. Acta* **2009**, 493, 42–48.
51. Sionkowska, A.; Kaczmarek, B.; Lewandowska, K.; Grabska, S.; Pokrywczyńska, M.; Kloskowski, T.; Drewa, T. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 89, 442–448.
52. Maria, T. M. C.; Carvalho, R. A.; Sobral, P. J. A.; Habitante, A. M. B. Q.; Solorza-Feria, J. *J. Food Eng.* **2008**, 87, 191–199.
53. Collins, M. N.; Birkinshaw, C. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, 19, 3335–3343.
54. Sgorla, D.; Almeida, A.; Azevedo, C.; Bunhak, ýlcio J.; Sarmiento, B.; Cavalcanti, O. A. *Int. J. Pharm.* **2016**, 511, 380–389.
55. Briscoe, B.; Luckham, P.; Zhu, S. *Polymer (Guildf).* **2000**, 41, 3851–3860.

56. Li, Z.; Ramay, H. R.; Hauch, K. D.; Xiao, D.; Zhang, M. *Biomaterials* **2005**, 26, 3919–3928.
57. Shanmugasundaram, N.; Ravichandran, P.; Neelakanta Reddy, P.; Ramamurty, N.; Pal, S.; Panduranga Rao, K. *Biomaterials* **2001**, 22, 1943–1951.
58. Bertuzzi, M. A.; Castro Vidaurre, E. F.; Armada, M.; Gottifredi, J. C. *J. Food Eng.* **2007**, 80, 972–978.
59. Xu, H.; Ma, L.; Shi, H.; Gao, C.; Han, C. *Polym. Adv. Technol.* **2007**, 18, 869–875.

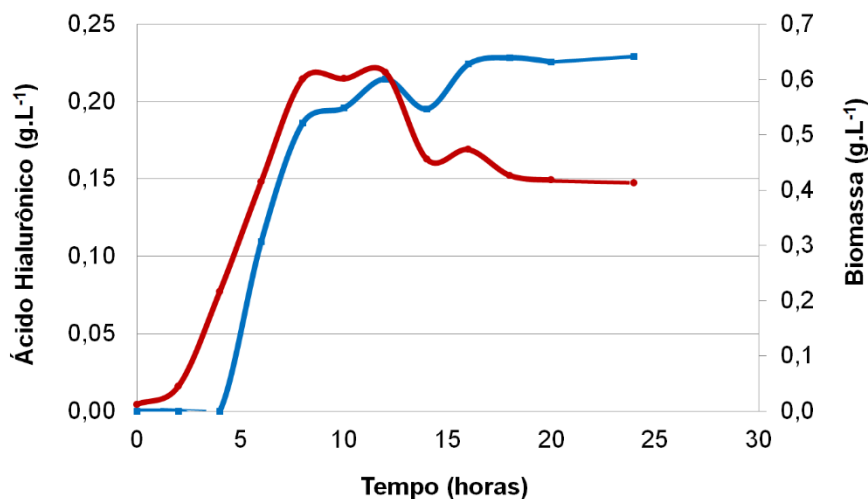
5.5 RESULTADOS COMPLEMENTARES

1. Crescimento de *Streptococcus* em Meio BHI

Os resultados obtidos durante o cultivo de *S. zooepidemicus* em meio BHI estão apresentados na Figura 1, onde o crescimento celular apresentou uma fase exponencial de 2 a 8 horas, com velocidade específica de crescimento microbiano de $0,235 \text{ h}^{-1}$. Trabalhos de Don e Shoparwe (2010) e Liu et al. (2009), avaliando diferentes meios de fermentação, observaram resultados semelhantes, com fase exponencial de crescimento entre 2 a 8 h de cultivo. A maior biomassa foi de $0,613 \text{ g.L}^{-1}$, em 12 horas de cultivo, onde a produção de AH foi de $0,215 \text{ g.L}^{-1}$. Após 24 horas, a produção do polímero atingiu $0,229 \text{ g.L}^{-1}$. A produção de AH acompanhou o crescimento celular e a maior produtividade foi obtida após 8 horas de cultivo, sendo esta de $0,023 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Considerando este resultado, o tempo de crescimento do inóculo para as fermentações realizadas na Etapa 2 foi definido em 6 h, no qual a bactéria encontrase na fase de crescimento exponencial.

Figura 1 – Cinética de crescimento celular (●) e produção de ácido hialurônico (■) por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em meio Brain Heart Infusion.



2. Fermentação 9: Produção em Biorreator nas Condições Otimizadas na Fermentação 5 para Avaliar a Taxa de Aeração

A produção de AH em melaço de cana-de-açúcar em biorreator a 1,5 vvm (fermentação 9) foi comparada com a fermentação 8 em que a taxa de aeração foi de 0,5 vvm (Figura 2). Os dados obtidos foram modelados utilizando equação logística, sendo os pressupostos atendidos. Os resultados observados demonstraram concordância com os preditos pelo modelo ($R^2 > 0,9$). Os p-valores do teste F indicaram consistência dos modelos e os parâmetros cinéticos foram significativos ($p < 0,01$) (Tabela 1).

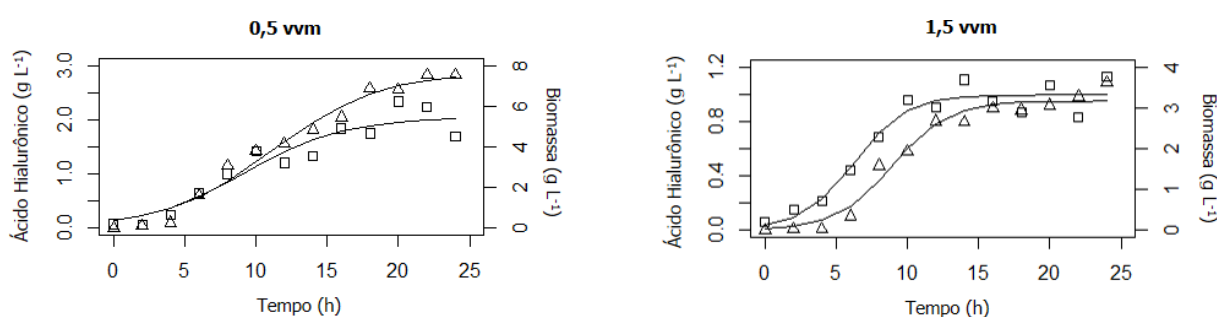
O aumento na aeração resultou em um decréscimo na produção de AH de 2,87 para 0,95 g.L⁻¹ ($P_{\text{máx}}$, Tabela 1). Nas condições estudadas a produção de AH acompanhou a biomassa, a qual estabilizou após 20 h ($P_{\text{máx}} = 5,44$ g.L⁻¹) em 0,5 vvm e 12 h em 1,5 vvm ($P_{\text{máx}} = 3,31$ g.L⁻¹). Trabalhos anteriores concluíram que cultivos aeróbicos geram um aumento na produção do polímero quando comparado aos anaeróbicos (JOHNS; GOH; OEGGERU, 1994; JAGANNATH; RAMACHANDRAN, 2010; OLIVEIRA et al., 2013). Contudo, o efeito da taxa de aeração é pouco discutido. Armstrong e John (1997) observaram um pequeno aumento de produção de 1,60 para 1,65 g.L⁻¹ variando a aeração de 0,2 vvm para 1 vvm. Izawa et al. (2010), por sua vez, obtiveram produção de 100 mg.L⁻¹ de AH por *Streptococcus thermophilus* quando a aeração aumentou de 0 a 1 vvm.

Concluimos com esse experimento que a aeração é um fator importante para a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* em melaço de cana-de-açúcar. O aumento na taxa de aeração de 0,5 vvm para 1,5 vvm resultou em um decréscimo de 3,02 vezes na produção do polímero.

Tabela 1 – Estimativa dos parâmetros correspondentes a equação logística aplicada a produção de AH e biomassa em biorreator com aeração de 0,5 vvm e 1,5 vvm.

Aeração	Ácido Hialurônico					Biomassa				
	$P_{\text{máx}}$	K	x_0	R^2	p-valor	$P_{\text{máx}}$	K	x_0	R^2	p-valor
0,5 vvm	2,87±0,17	3,75±0,58	11,14±0,77	0,97	<0,001	5,44±0,46	3,49±0,97	9,19±1,16	0,92	<0,001
1,5 vvm	0,95±0,03	2,00±0,38	8,94±0,44	0,97	<0,001	3,31±0,14	1,88±0,46	6,23±0,53	0,94	<0,001

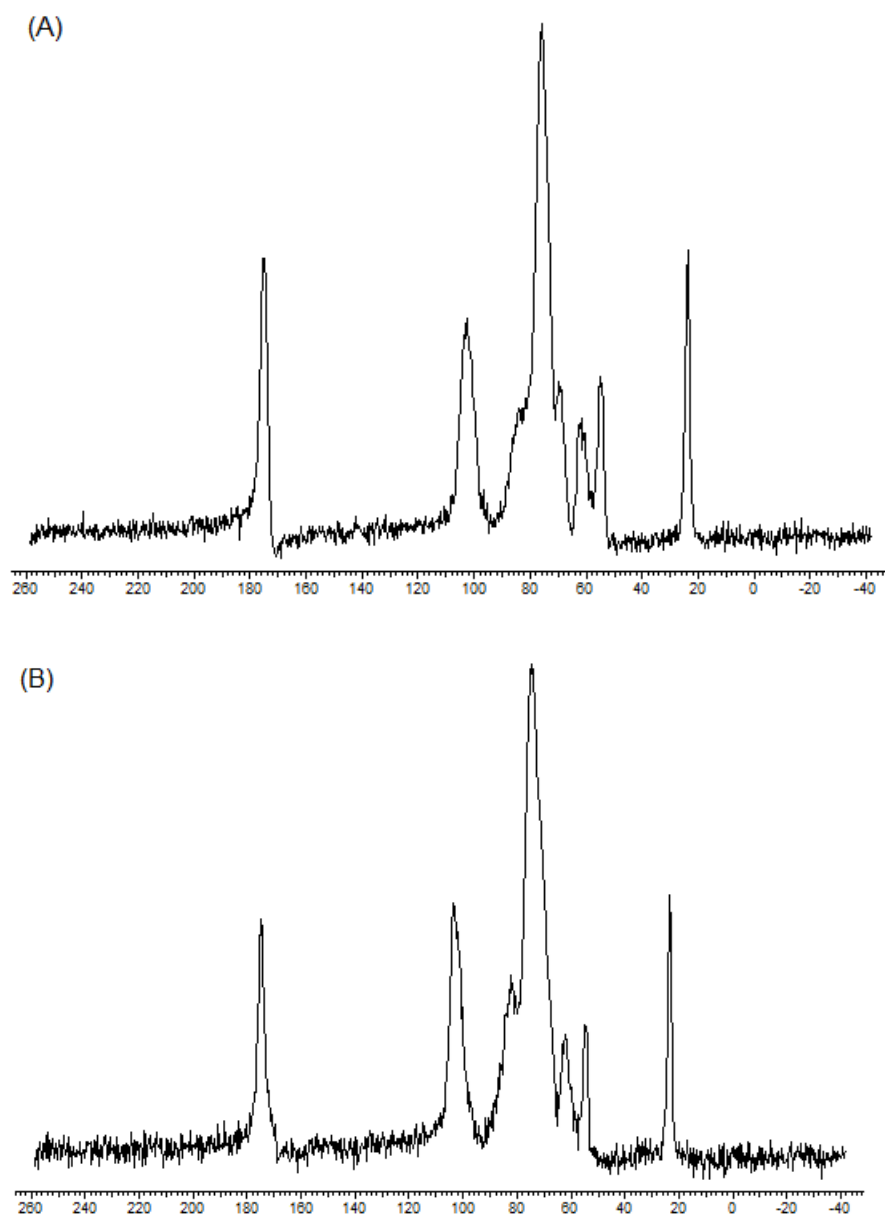
Figura 2 – Biomassa (\square) e produção de ácido hialurônico (Δ) por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em biorreator a 0,5 vvm e 1,5 vvm.



3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

O espectro de ^{13}C do AH obtido na fermentação 8 (Figura 3 B) apresentou os mesmos picos obtidos no espectro do AH padrão (Figura 3 A). Em 175 ppm têm-se o pico referente a carbonila. O pico próximo a 105 ppm é atribuído ao C1, o qual está ligado a dois átomos de oxigênio e o de 80 ppm à hidroxilas ligadas ao carbono secundário (C-OH). Em 55 ppm atribui-se o pico ao C2 N-acetilado e o obtido em 23 ppm refere-se ao grupo metil da acetamida.

Figura 3 – Espectros ^{13}C da ressonância magnética do ácido hialurônico padrão (A) e amostra (B).



4. Determinação da Atividade Antimicrobiana

Nas concentrações testadas (4 a $0,031 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para a amostra de AH (fermentação 8) e padrão não foi possível determinar a concentração mínima inibitória (Quadro 1). Esse resultado está de acordo com Cerbo et al. (2013), o quais não observaram qualquer atividade antimicrobiana do AH quando testado em bactérias lácticas. Tang, Hou e Chen (2002) também não verificaram efeito bacteriostático do AH

para *E. coli* e *S. aureus* e Zhang et al. (2007) observaram um aumento da biomassa de *S. pyogenes* em meio enriquecido com AH.

A concentração mínima inibitória obtida para o mel das abelhas sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata*, eugenol e óleo de orégano corroboram com os resultados apresentados na literatura (PERUGINI BIASI-GARBIN et al., 2015; NISHIO et al., 2016; SCANDORIEIRO et al., 2016). O MIC obtido para estes compostos foi inferior a 5% evidenciando a atividade antimicrobiana (Quadro 1).

Quadro 1 – Concentração inibitória mínima de amostras ácido hialurônico, de mel de *Scaptotrigona*, eugenol e óleo de orégano usados individualmente contra bactérias gram-positivas e gram-negativa.

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. mutans</i>
Ácido hialurônico (amostra e padrão)	> 4 mg.mL ⁻¹	> 4 mg.mL ⁻¹	> 4 mg.mL ⁻¹	> 4 mg.mL ⁻¹
Mel de <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	5%	1,25%	1,25%	1,25%
Eugenol	0,5%	0,25%	0,06%	0,125%
Óleo de orégano	0,062%	0,125%	0,031%	0,062%

O estudo da interação entre a amostra de AH em concentrações de 1 a 0,031 mg.mL⁻¹ e os agentes antimicrobianos (mel de *Scaptotrigona bipunctata*, eugenol e óleo de orégano) revelou que o polímero não apresentou qualquer efeito de sinergismo ou antagonismo na atividade antimicrobiana. O fator que determinou o MIC foi somente a concentração dos agentes antimicrobianos, sendo que esta coincidiu com a obtida nos ensaios dos compostos isolados (Quadro 2). Logo, conclui-se que o AH não apresenta qualquer efeito antimicrobiano nas condições estudadas.

Quadro 2 – Concentração inibitória mínima da combinação da amostra de ácido hialurônico (1 a 0,031 mg.mL⁻¹) produzida com os agentes antimicrobianos (mel de *Scaptotrigona*, eugenol e óleo de orégano) contra bactérias gram-positivas e gram-negativa.

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. mutans</i>
Mel de <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	5%	1,25%	1,25%	1,25%
Eugenol	0,5%	0,25%	0,06%	0,125%
Óleo de orégano	0,062%	0,125%	0,031%	0,062

5. Hidrólise do Ácido Hialurônico

O mecanismo proposto para a hidrólise ácida do polímero está descrito na Figura 4. O tempo de 24 h a 80 °C foi suficiente para hidrolisar 76,4 % do AH (fermentação 8) obtendo massa molecular inferior a 1000 Da. A amostra foi avaliada por espectroscopia FT-IR confirmando a natureza do polímero hidrolisado (Figura 5). Durante a hidrólise ácida ocorreu a desprotonação do grupo carboxílico, justificando não haver a banda em 1738 cm^{-1} no AH hidrolisado.

No processo de hidrólise ácida com HCl e neutralização com NaOH, houve formação de NaCl, obtendo amostra de AH com 75% de NaCl. Após a dessalinização obtivemos uma redução do sal, resultando em uma amostra de AH com 50% de NaCl.

Figura 4 – Mecanismo de hidrólise do ácido hialurônico.

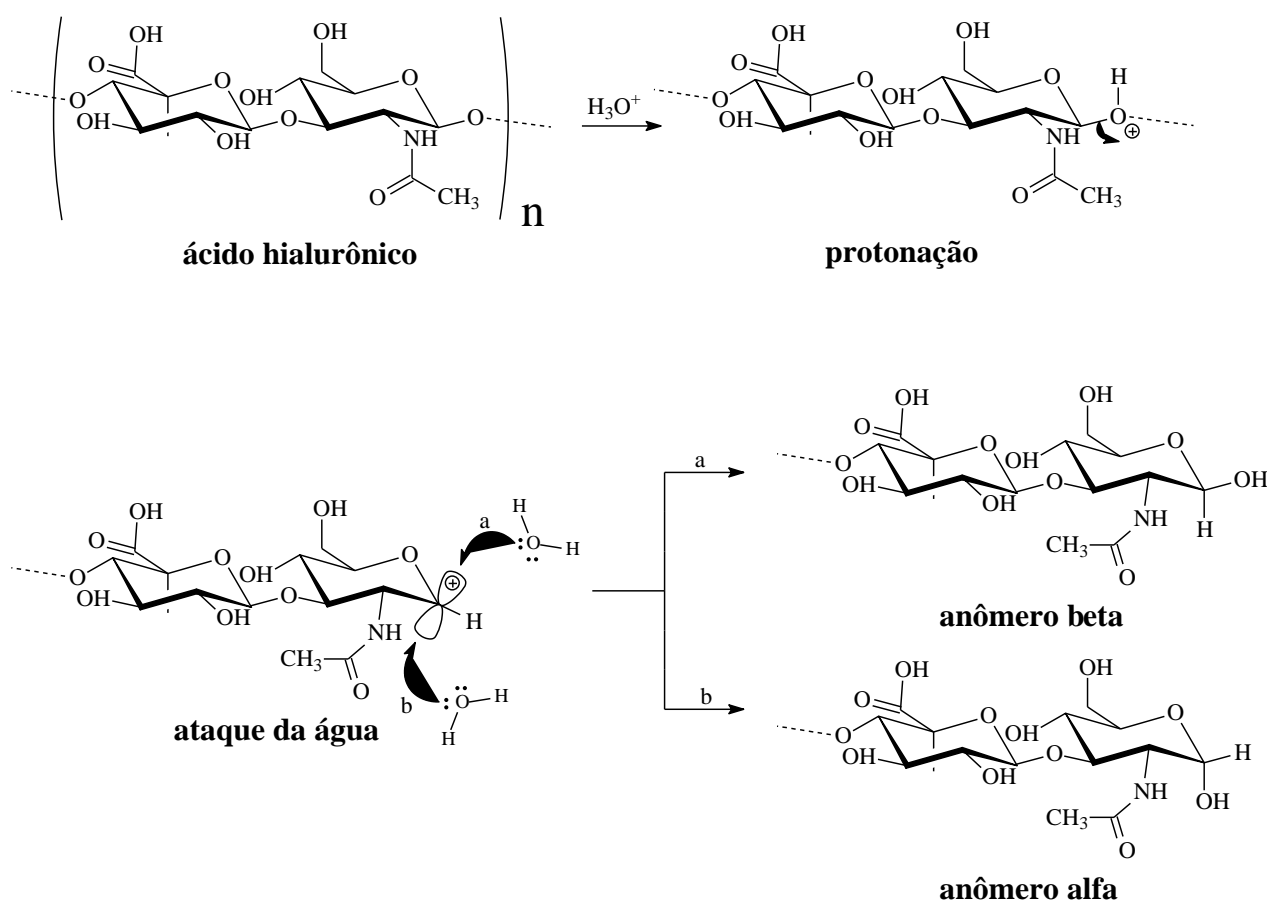
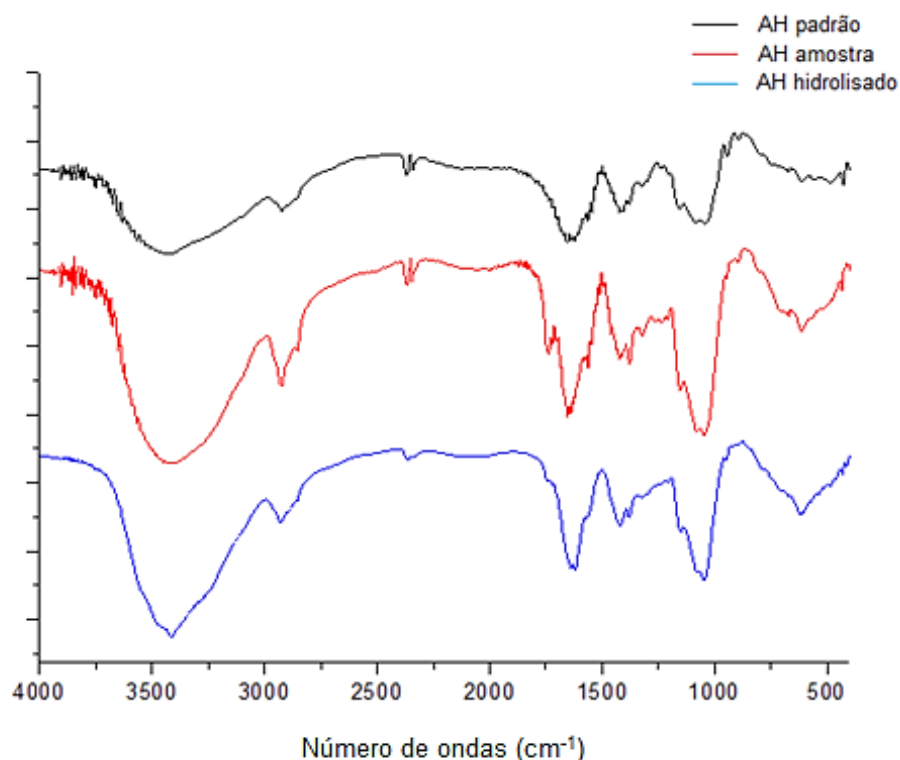


Figura 5 – Espectro FT-IR do ácido hialurônico padrão, amostra e amostra hidrolisada.



6. Avaliação da Eficácia *in vivo* do Ácido Hialurônico em Formulações Tópicas na Redução dos Danos Cutâneos Induzidos pela Irradiação UVB

A pele é a interface do corpo com o ambiente externo, e é a primeira linha de defesa contra estímulos tóxicos, tais como as radiações ultravioleta (UV) e visível, compostos químicos pró-oxidantes, infecções, e radiação ionizante (SAIJA et al., 1998). Dentre estas, a radiação UV é a principal causa do estresse oxidativo cutâneo (BICKERS; ATHAR, 2006). A exposição da pele à radiação UV induz um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e os sistemas antioxidante endógeno, tais como a glutathiona reduzida (CARINI et al., 2000). Além disso, a liberação de citocinas que participam no aparecimento da inflamação cutânea, entre as quais IL-1 β e TNF- α , são certamente importantes. Estas moléculas causam vasodilatação, alargamento das junções inter endoteliais e separação de células endoteliais, aumentando a proteína microvascular e vazamento de fluido no interstício, resultando em edema. Os neutrófilos também são ativados, estimulando a atividade da mieloperoxidase, uma

enzima geradora de espécies reativas de oxigênio (CAMPO; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; CAMPANINI et al., 2013).

Embora quase todos os organismos possuam sistemas de defesa e reparação antioxidantes, estes não são suficientes para impedir totalmente o dano (GUO et al., 2011). Neste contexto, a administração tópica de antioxidantes proporciona uma maneira eficiente para enriquecer o sistema de proteção cutânea endógena (SAIJA et al., 1998).

Devido o AH desempenhar uma função importante na ativação e modulação da resposta inflamatória e apresentar propriedade antioxidante avaliamos sua eficácia *in vivo* em formulações tópicas na redução dos danos cutâneos induzidos pela irradiação UVB. Para isso foi necessário hidrolisar o polímero para que a molécula pudesse ultrapassar a barreira transcutânea.

Para as formulações foi utilizado a amostra de AH da fermentação 8 hidrolisada sem ter sido realizado o processo de dessalinização. A formulação 1, a base de Polawax, não cumpriu com os requisitos de estabilidade de produtos cosméticos segundo o guia da ANVISA (ANVISA, 2004). O produto apresentou separação de fases o que deve ter ocorrido devido a elevada porcentagem de sal nas amostras.

A formulação 2, 50% (v/v) propilenoglicol:água, foi utilizada para os testes *in vivo*. Os resultados (Figura 6) não mostraram eficácia nas formulações contendo AH quanto aos parâmetros antioxidantes e anti-inflamatórios. Nos resultados de edema grande, diferença significativa não foi encontrada quando comparado o controle irradiado e não irradiado, e nem quando comparada as amostras contendo AH com o veículo. Para o edema pequeno, controle irradiado e controle não irradiado diferiram significativamente, mas somente a amostra contendo 5% de AH diferiu do controle não irradiado e do veículo.

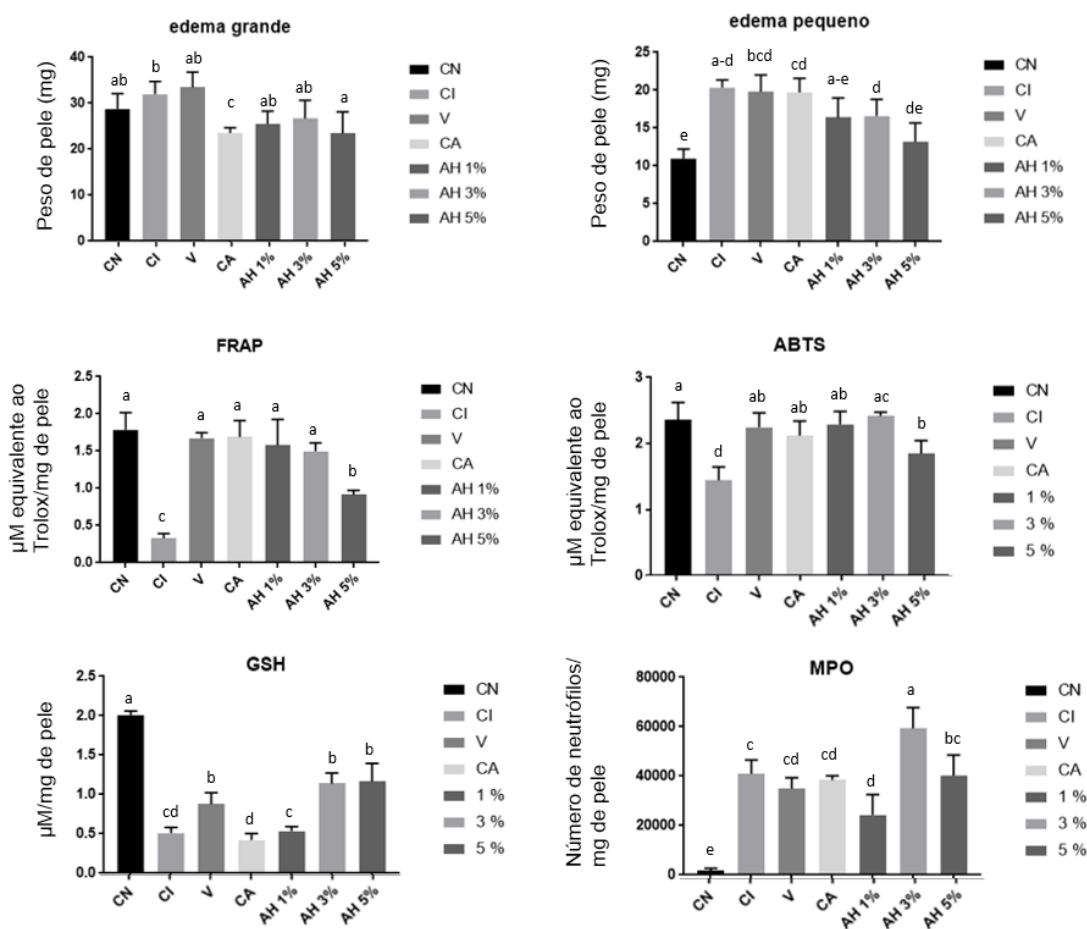
A quantificação da migração de neutrófilos para a pele induzida por radiação UVB foi determinada indiretamente pela atividade da mieloperoxidase (MPO). Amostra com 1% de AH apresentou um decréscimo na taxa de neutrófilos quando comparada ao controle irradiado, contudo, com 3% de AH houve um significativo aumento nessa taxa.

Avaliando os parâmetros antioxidantes obtemos que para o ensaio de FRAP somente a formulação com 5% de AH foi significativamente diferente do controle não irradiado e do veículo, contudo houve um decréscimo do poder

antioxidante. Na redução do radical ABTS as amostras contendo AH não diferiram do veículo. A avaliação dos níveis do antioxidante endógeno GSH mostraram um aumento com 3 e 5% de AH comparado ao controle irradiado, contudo não apresentou diferença significativa quando comparado ao veículo.

Os resultados sugeriram que o veículo utilizado nas formulações e o NaCl presente nas amostras de AH hidrolisado influenciaram na resposta à redução dos danos cutâneos induzidos pela irradiação UVB. Portanto, para avaliarmos a eficácia do AH, será necessário novos experimentos utilizando amostra de AH contendo menor teor de NaCl e diferentes veículos. Afim de retirarmos o NaCl da amostra hidrolisada foi realizado etapas de precipitação com etanol conforme descrito na etapa de dessalinização, contudo essa nova amostra ainda não foi estudada.

Figura 6 – Eficácia in vivo do ácido hialurônico em formulação tópica na redução dos danos cutâneos induzidos pela irradiação UVB. CN: controle não irradiado, CI: controle irradiado; V: veículo; CA: veículo e NaCl; AH 1%: veículo e AH 1%; AH 3%: veículo e AH 3%; AH 5%: veículo e AH 5%. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).



Referências

- ANDREI, C. **Mecanismo de hidrólise do ácido hialurônico**. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <nicolepan.eq@gmail.com> em 13 de Maio de 2016.
- ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2004.
- 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.
- BICKERS, D. R.; ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 12, p. 2565–2575, 2006.
- CAMPANINI, M. Z.; PINHO-RIBEIRO, F. a; IVAN, A. L. M.; FERREIRA, V. S.; VILELA, F. M. P.; VICENTINI, F. T. M. C.; MARTINEZ, R. M.; ZARPELON, A. C.; FONSECA, M. J. V; FARIA, T. J.; BARACAT, M. M.; VERRI, W. a; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 127, p. 153–60, 2013.
- CAMPO, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Wound healing. **ABCD – Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51–58, 2007.
- CARINI, M.; ALDINI, G.; PICCONE, M.; FACINO, R. M. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **II Farmaco**, v. 55, n. 8, p. 526–534, 2000.
- CERBO, A.; APONTE, M.; ESPOSITO, R.; BONDI, M.; PALMIERI, B. Comparison of the effects of hyaluronidase and hyaluronic acid on probiotics growth. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 243, 2013.
- DON, M. M.; SHOPARWE, N. F. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 1, p. 95–103, 2010.
- GUO, T.; WEI, L.; SUN, J.; HOU, C.; FAN, L. Antioxidant activities of extract and fractions from *Tuber indicum* Cooke & Masee. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1634–1640, 2011.
- IZAWA, N.; HANAMIZU, T.; SONE, T.; CHIBA, K. Effects of fermentation conditions and soybean peptide supplementation on hyaluronic acid production by *Streptococcus thermophilus* strain YIT 2084 in milk. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 356–360, 2010.
- 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.; OEGGERU, A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biotechnology letters**, v. 16, n. 5, p. 507–512, 1994.

LIU, L.; DU, G.; CHEN, J.; ZHU, Y.; WANG, M.; SUN, J. Microbial production of low molecular weight hyaluronic acid by adding hydrogen peroxide and ascorbate in batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 362–367, 2009.

NISHIO, E. K.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; PRONI, E. A.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. **Scientific Reports**, v. 6, p. 21641, 2016.

OLIVEIRA, A. H.; OGRODOWSKI, C. C.; MACEDO, A. C.; SANTANA, M. H. A.; GONÇALVES, L. R. B. Cashew apple juice as microbial cultivation medium for non-immunogenic hyaluronic acid production. **Brazilian journal of microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1097–1104, 2013.

PERUGINI BIASI-GARBIN, R.; SAORI OTAGUIRI, E.; MOREY, A. T.; FERNANDES DA SILVA, M.; BELOTTO MORGUETTE, A. E.; ARMANDO CONTRERAS LANCHEROS, C.; KIAN, D.; PERUGINI, M. R. E.; NAKAZATO, G.; DURÁN, N.; NAKAMURA, C. V.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. Effect of eugenol against *streptococcus agalactiae* and synergistic interaction with biologically produced silver nanoparticles. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; GIACCHI, M.; DE PASQUALE, A.; BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, n. 1, p. 85–94, 1998.

SCANDORIEIRO, S.; DE CAMARGO, L. C.; LANCHEROS, C. A. C.; YAMADA-OGATTA, S. F.; NAKAMURA, C. V.; DE OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; DURAN, N.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. T. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–14, 2016.

TANG, Z.; HOU, C.; CHEN, Q. Experimental study on bacteriostasis of chitosan and sodium hyaluronate. **Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery**, v. 16, n. 4, p. 259–261, 2002.

ZHANG, M.; MCDONALD, F. M.; STURROCK, S. S.; CHARNOCK, S. J.; HUMPHERY-SMITH, I.; BLACK, G. W. Group A streptococcus cell-associated pathogenic proteins as revealed by growth in hyaluronic acid-enriched media. **Proteomics**, v. 7, n. 9, p. 1379–1390, 2007.

6 CONCLUSÕES

- Utilizando a sacarose como fonte de carbono, a melhor condição definida para a produção do polímero foi de 50 g.L⁻¹ de sacarose e extrato de levedura e 0,6 g.L⁻¹ de glutamina, glutamato e ácido oxálico;
- A melhor produção de ácido hialurônico foi de 2,825 g.L⁻¹ obtida em biorreator com controle de pH em 8,0 e meio contendo melaço de cana-de-açúcar pré-tratado a 85,35 g.L⁻¹ de açúcares totais e extrato de levedura a 50 g.L⁻¹;
- Extrato de levedura foi a variável explicativa que apresentou maior efeito, sendo significativa ao nível de 5% de significância, para a produção de ácido hialurônico, biomassa e ácidos orgânicos;
- O ácido hialurônico produzido foi caracterizado e o polímero apresentou estrutura equivalente ao padrão, massa molecular de $1,35 \times 10^3$ kDa e temperatura máxima de degradação de 286°C;
- A atividade antioxidante do ácido hialurônico variou de 41% a 64%. O polímero não demonstrou atividade antimicrobiana, nem efeito de sinergismo ou antagonismo quando associado com agentes antimicrobianos, como mel de *Scaptotrigona bipunctata*, eugenol e óleo de orégano;
- Os filmes de ácido hialurônico e álcool polivinílico apresentaram biodegradabilidade, biocompatibilidade e boa aparência. A adição de ácido hialurônico aumentou a estabilidade térmica, solubilidade, grau de intumescimento, permeabilidade ao vapor de água e alongação dos filmes de álcool polivinílico.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOHSEN, A. M. M.; HRDINA, R.; BURGERT, L.; ABDEL-RAHMAN, R. M.; HAŠOVÁ, M.; ŠMEJKALOVÁ, D.; KOLÁŘ, M.; PEKAR, M.; ALY, A. S. S. Antibacterial activity and cell viability of hyaluronan fiber with silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1177–1187, 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, 2016.
- AMADO, I. R.; VÁZQUEZ, J. A.; PASTRANA, L.; TEIXEIRA, J. A. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Food Chemistry**, v. 198, p. 54–61, 2016.
- AMADO, I. R.; VÁZQUEZ, J. A.; PASTRANA, L.; TEIXEIRA, J. A. Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: molasses and corn steep liquor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 181–187, 2017.
- AMBROSIO, L.; BORZACCHIELLO, A.; NETTI, P. A.; NICOLAIS, L. Rheological study on hyaluronic acid and its derivative solutions. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 36, n. 7–8, p. 991–1000, 1999.
- ANRAKU, M.; TABUCHI, R.; IFUKU, S.; ISHIGURO, T.; IOHARA, D.; HIRAYAMA, F. Surface-deacetylated chitin nano-fiber/hyaluronic acid composites as potential antioxidative compounds for use in extended-release matrix tablets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 24707–24717, 2015.
- ARDIZZONI, A.; NEGLIA, R. G.; BASCHIERI, M. C.; CERMELLI, C.; CARATOZZOLO, M.; RIGHI, E.; PALMIERI, B.; BLASI, E. Influence of hyaluronic acid on bacterial and fungal species, including clinically relevant opportunistic pathogens. **Journal of materials science. Materials in medicine**, 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.
- AROSKAR, V. J.; KAMAT, S. D.; KAMAT, D. V. Effect of various nutritional supplements on hyaluronic acid production. **IIOAB Letters**, v. 2, n. 1, p. 16–24, 2012.
- ASTM D882-02. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In: ASTM International (Ed.). **Annual Book of ASTM Standards**.

ASTM E96-00. Standard test methods for water vapor transmission of materials. In: ASTM International (Ed.). **Annual book of ASTM**.

BADLE, S. S.; JAYARAMAN, G.; RAMACHANDRAN, K. B. Ratio of intracellular precursors concentration and their flux influences hyaluronic acid molecular weight in *Streptococcus zooepidemicus* and recombinant *Lactococcus lactis*. **Bioresource Technology**, v. 163, p. 222–7, 2014.

BALAZS, E. A. Physical chemistry of hyaluronic acid. **Federation proceedings**, v. 17, n. 4, p. 1086–1093, 1958.

BREUSCH, T. S.; PAGAN, A. R. A Simple test for heteroscedasticity and random coefficient variation. **Econometrica**, v. 47, n. 5, 1979.

BROWN, J. A. The role of hyaluronic acid in wound healing's profile phase. **Journal of Wound Care**, v. 13, n. 2, p. 48–51, 2004.

BROWN, M. B.; JONES, S. a. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV**, v. 19, n. 3, p. 308–18, 2005.

BOLLER, S.; SOLDI, C.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, E. P.; CABRINI, D. A.; PIZZOLATTI, M. G.; ZAMPRONIO, A. R.; OTUKI, M. F. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 2, p. 262–266, 2010.

CALLES, J. A.; LÓPEZ-GARCÍA, A.; VALLÉS, E. M.; PALMA, S. D.; DIEBOLD, Y. Preliminary characterization of dexamethasone-loaded cross-linked hyaluronic acid films for topical ocular therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 509, n. 1–2, p. 237–243, 2016.

CAMPANINI, M. Z.; PINHO-RIBEIRO, F. a; IVAN, A. L. M.; FERREIRA, V. S.; VILELA, F. M. P.; VICENTINI, F. T. M. C.; MARTINEZ, R. M.; ZARPELON, A. C.; FONSECA, M. J. V; FARIA, T. J.; BARACAT, M. M.; VERRI, W. a; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 127, p. 153–60, 2013.

CAMPO, G. M.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; D'ASCOLA, A.; FERLAZZO, A. M.; CALATRONI, A. 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.; CUOGHI, A.; SCURI, M.; BETTUA, C.; NEGLIA, R. G.; ARDIZZONI, A.; BLASI, E.; IANNITTI, T.; PALMIERI, B. In vitro evaluation of antiviral and virucidal activity of a high molecular weight hyaluronic acid. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 141, 2011.

CHEN, W. Y.; ABATANGELO, G. Functions of hyaluronan in wound repair. **Wound Repair and Regeneration**, v. 7, n. 2, p. 79–89, 1999.

- CHEN, W. Y.; MARCELLIN, E.; HUNG, J.; NIELSEN, L. K. Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 27, p. 18007–18014, 2009.
- CHEN, W. Y.; MARCELLIN, E.; STEEN, J. a; NIELSEN, L. K. The role of hyaluronic acid precursor concentrations in molecular weight control in *Streptococcus zooepidemicus*. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 147–56, 2014.
- CHENG, F.; GONG, Q.; YU, H.; STEPHANOPOULOS, G. High-titer biosynthesis of hyaluronic acid by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 4, p. 574–584, 2016.
- CHOI, J. il; KIM, J.-K. H. J.-H. K.; KIM, J.-K. H. J.-H. K.; KWEON, D.-K. K.; LEE, J.-W. W. 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. M.; MCLAUGHLIN, R.; NIELSEN, L. K. Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 341–351, 2005.
- CHONG, F. B.; NIELSEN, L. K.; 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.
- CHU, X.; HAN, J.; GUO, D.; FU, Z.; LIU, W.; TAO, Y. Characterization of UDP-glucose dehydrogenase from *Pasteurella multocida* CVCC 408 and its application in hyaluronic acid biosynthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 85, p. 64–70, 2016.
- CHUDOBOVA, D.; NEJDL, L.; GUMULEC, J.; KRYSSTOFOVA, O.; RODRIGO, M. A. M.; KYNICKY, J.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; KOPEL, P.; BABULA, P.; ADAM, V.; KIZEK, R. Complexes of silver(I) ions and silver phosphate nanoparticles with hyaluronic acid and/or chitosan as promising antimicrobial agents for vascular grafts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 13592–13614, 2013.
- CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; approved atandard. 9 ed. Wayne, PA, USA, CLSI v. 32, n. 2, p. 18, 2012.
- COLEMAN, S. R. Cross-linked hyaluronic acid fillers. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, p. 661–665, 2006.
- COLLINS, M. N.; BIRKINSHAW, C. Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 11, p. 3335–3343, 2008.
- COLLINS, M. N.; BIRKINSHAW, C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering-a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1262–1279, 2013.

COSTAGLIOLA, C.; PRETE, A. Del; WINKLER, N. R.; CARPINETO, P.; CIANCAGLINI, M.; PICCOLOMINI, R.; MASTROPASQUA, L. The ability of bacteria to use Na-hyaluronate as a nutrient. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 74, p. 566–568, 1996.

DAHIYA, P.; KAMAL, R. Hyaluronic acid: A boon in periodontal therapy. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 5, n. 5, p. 309, 2013.

OLIVEIRA, J. D.; CARVALHO, L. S.; GOMES, A. M. V.; QUEIROZ, L. R.; MAGALHÃES, B. S.; PARACHIN, N. S. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. **Microbial Cell Factories**, v. 15, p. 119, 2016.

CERBO, A.; APONTE, M.; ESPOSITO, R.; BONDI, M.; PALMIERI, B. Comparison of the effects of hyaluronidase and hyaluronic acid on probiotics growth. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 243, 2013.

DON, M. M.; SHOPARWE, N. F. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 1, p. 95–103, 2010.

DUAN, X.-J.; NIU, H.; TAN, W.; ZHANG, X. Mechanism analysis of effect of oxygen on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 299–306, 2009.

DUAN, X.-J.; YANG, L.; ZHANG, X.; TAN, W.-S. Effect of oxygen and shear stress on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 718–724, 2008.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EBRAHIMI-HOSSEINZADEH, B.; PEDRAM, M.; HATAMIAN-ZARMI, A.; SALAHSHOUR-KORDESTANI, S.; RASTI, M.; MOKHTARI-HOSSEINI, Z. B.; MIRDERIKVAND, M. In vivo evaluation of gelatin/hyaluronic acid nanofiber as burn-wound healing and its comparison with ChitoHeal gel. **Fibers and Polymers**, v. 17, n. 6, p. 820–826, 2016.

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.

FAHMY, A.; KAMOUN, E. A.; EL-EISAWY, R.; EL-FAKHARANY, E. M.; TAHA, T. H.; EL-DAMHOUGY, B. K.; ABDELHAI, F. Poly(vinyl alcohol)-hyaluronic acid membranes for wound dressing applications: synthesis and in vitro bio-evaluations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 7, p. 1466–1474, 2015.

FERRARI, R.; BORACCHI, P.; ROMUSSI, S.; RAVASIO, G.; STEFANELLO, D. Application of hyaluronic acid in the healing of non-experimental open wounds: A pilot study on 12 wounds in 10 client-owned dogs. **Veterinary World**, v. 8, n. 10, p. 1247–1259, 2015.

FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; MÜLLER, H.-D.; MUELLER, A.; LUSSI, A.; SCULEAN, A.; SCHMIDLIN, P. R.; MIRON, R. J. In vitro effects of hyaluronic acid on human periodontal ligament cells. **BMC Oral Health**, v. 17, n. 1, p. 44, 2017.

GALL, Y. Hyaluronic acid: structure, metabolism and implication in cicatrisation. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, v. 137, p. 30-39, 2010.

GARRIGUES, C.; MERCADE, M.; COCAIGN-BOUSQUET, M.; LINDLEY, N. D.; LOUBIERE, P. Regulation of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis* depends on the imbalance between catabolism and anabolism. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 74, n. 2, p. 108–115, 2001.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 190–199, 1992.

GUERRA, R. S. Del; CASCONI, M. G.; BARBANI, N.; LAZZERI, L. Biological Characterization of hydrogels of poly(vinyl alcohol) and hyaluronic-acid. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 5, n. 9–10, p. 613–616, 1994.

GUILLAUMIE, F.; MALLE, B. M.; SCHWACH-ABDELLAOUI, K.; BECK, T. A new sodium hyaluronate for skin moisturization and antiaging. **Cosmetics & Toiletries**, v. 121, p. 51–58, 2006.

GUILLAUMIE, F.; FURRER, P.; FELT-BAEYENS, O.; FUHLENDORFF, B. L.; NYMAND, S.; WESTH, P.; GURNY, R.; SCHWACH-ABDELLAOUI, K. Comparative studies of various hyaluronic acids produced by microbial fermentation for potential topical ophthalmic applications. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 92, n. 4, p. 1421–1430, 2010.

HASCALL, V. C.; LAURENT, T. C. **Hyaluronan: structure and physical properties**. Disponível em: <<http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>. Acesso em: 8 nov. 2014.

HASEGAWA, S.; NAGATSURU, M.; SHIBUTANI, M.; YAMAMOTO, S.; HASEBE, S. Productivity of concentrated hyaluronic acid using a Maxblend fermentor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 1, p. 68–71, 1999.

HAU, H.; ROHANIZADEH, R.; GHADIRI, M.; CHRZANOWSKI, W. A mini-review on novel intraperiodontal pocket drug delivery materials for the treatment of periodontal diseases. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 4, n. 3, p. 295–301, 2014.

HERNÁNDEZ-MONTELONGO, J.; NASCIMENTO, V. F.; MURILLO, D.; TAKETA, T. B.; SAHOO, P.; DE SOUZA, A. A.; BEPPU, M. M.; COTTA, M. A. Nanofilms of hyaluronan/chitosan assembled layer-by-layer: an antibacterial surface for *Xylella fastidiosa*. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 1–11, 2016.

HOYO-GALLEGOA, S. del; PÉREZ-ÁLVAREZA, L.; GÓMEZ-GALVÁNA, F.; LIZUNDIAA, E.; KURITKAC, I.; SEDLARIKC, V.; LAZAA, J. M.; VILA-VILELA, J. L. Construction of antibacterial poly(ethylene terephthalate) films via layer by layer assembly of chitosan and hyaluronic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 35–43, 2016.

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.; SONG, J.-M.; KANG, J.-H.; KANG, D.-J. Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1337–1344, 2009.

ITANO, N.; SAWAI, T.; YOSHIDA, M.; LENAS, P.; YAMADA, Y.; IMAGAWA, M.; SHINOMURA, T.; HAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, Y.; OHNUKI, Y.; MIYAUCHI, S.; SPICER, a. P.; MCDONALD, J. a.; KIMATA, K. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 35, p. 25085–25092, 1999.

IZAWA, N.; HANAMIZU, T.; SONE, T.; CHIBA, K. Effects of fermentation conditions and soybean peptide supplementation on hyaluronic acid production by *Streptococcus thermophilus* strain YIT 2084 in milk. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 356–360, 2010.

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.

JEONG, E.; SHIM, W. Y.; KIM, J. H. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. **Journal of Biotechnology**, v. 185, p. 28–36, 2014.

JIA, Y.; ZHU, J.; CHEN, X.; TANG, D.; SU, D.; YAO, W.; GAO, X. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the efficient biosynthesis of uniform hyaluronic acid with controlled molecular weights. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 427–31, 2013.

JOHNS, M. R.; GOH, L.; OEGGERU, A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 5, p. 507–512, 1994.

JOSHI, D.; GARG, T.; GOYAL, A. K.; RATH, G. Advanced drug delivery approaches against periodontitis. **Drug Delivery**, v. 0, n. 0, p. 1–15, 2014.

KANCHANA, S.; ARUMUGAM, M.; GIJI, S.; BALASUBRAMANIAN, T. Isolation, characterization and antioxidant activity of hyaluronic acid from marine bivalve mollusc *Amussium pleuronectus* (Linnaeus, 1758). **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2013.

KANG, J. H.; KIM, Y. Y.; CHANG, J. Y.; KHO, H. S. Influences of hyaluronic acid on the anticandidal activities of lysozyme and the peroxidase system. **Oral Diseases**, v. 17, n. 6, p. 577–583, 2011.

KATALINIC, V.; MODUN, D.; MUSIC, I.; BOBAN, M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2V-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power

(FRAP) assays. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 140, p. 47-52, 2005.

KE, C.; SUN, L.; QIAO, D.; WANG, D.; ZENG, X. Antioxidant activity of low molecular weight hyaluronic acid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2670–5, 2011.

KELLY, M. T.; AND MATSEN, J. M. In vitro activity, synergism, and testing parameters of amikacin, with comparisons to other aminoglycoside antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 9, n. 3, p. 440–447, 1976.

KEMP, M. M.; KUMAR, A.; CLEMENT, D.; AJAYAN, P.; MOUSA, S.; LINHARDT, R. J. Hyaluronan- and heparin-reduced silver nanoparticles with antimicrobial properties. **Nanomedicine**, v. 4, n. 4, p. 421–429, 2009.

KHUE, N. T. H.; VO, P. T. M. Study of complex nutrients, temperature and salts on hyaluronic acid production in *Streptococcus zooepidermicus* ATCC 43079. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 5, p. 12–15, 2013.

KIM, J.-H.; YOO, S.-J.; OH, D.-K.; KWEON, Y.-G.; PARK, D.-W.; LEE, C.-H.; GIL, G.-H. 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.

KODAVATY, J.; DESHPANDE, A. Mechanical and swelling properties of poly (vinyl alcohol) and hyaluronic acid gels used in biomaterial systems - a comparative study. **Defence Science Journal**, v. 64, n. 3, p. 222–229, 2014.

KOGAN, G.; SOLTÉS, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. 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.

LAI, Z.-W.; RAHIM, R. A.; ARIFF, A. B.; MOHAMAD, R. Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using oxygen vector and optimum impeller tip speed. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 3, p. 286–91, 2012.

LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B.; FRASER, J. R. The structure and function of hyaluronan: An overview. **Immunology and Cell Biology**, v. 74, n. 2, p. A1–A7, 1996.

LENTH, R. V. Response-Surface Methods in R, Using rsm. **Journal of Statistical Software**, v. 32, n. 7, p. 1–17, 2009.

LEQUEUX, I.; DUCASSE, E.; JOUENNE, T.; THEBAULT, P. Addition of antimicrobial properties to hyaluronic acid by grafting of antimicrobial peptide. **European Polymer Journal**, v. 51, p. 182–190, 2014.

LEWANDOWSKA, K.; SIONKOWSKA, A.; GRABSKA, S. Chitosan blends containing hyaluronic acid and collagen. Compatibility behaviour. **Journal of Molecular Liquids**, v. 212, p. 879–884, 2015.

LEWANDOWSKA, K.; SIONKOWSKA, A.; GRABSKA, S.; KACZMAREK, B. Surface and thermal properties of collagen/hyaluronic acid blends containing chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 371–376, 2016a.

LEWANDOWSKA, K.; SIONKOWSKA, A.; GRABSKA, S.; KACZMAREK, B.; MICHALSKA, M. The miscibility of collagen/hyaluronic acid/chitosan blends investigated in dilute solutions and solids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 220, p. 726–730, 2016b.

LI, H.; JIANG, Z.; YANG, X.; YU, L.; ZHANG, G.; WU, J.; LIU, X. Sustainable resource opportunity for cane molasses: use of cane molasses as a grinding aid in the production of Portland cement. **Journal of Cleaner Production**, v. 93, p. 56–64, 2015.

LIANG, J.; JIANG, D.; NOBLE, P. W. Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 186–203, 2016.

LIU, L.; DU, G.; CHEN, J.; WANG, M.; SUN, J. Influence of hyaluronidase addition on the production of hyaluronic acid by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 923–926, 2008a.

LIU, L.; DU, G.; CHEN, J.; ZHU, Y.; WANG, M.; SUN, J. Microbial production of low molecular weight hyaluronic acid by adding hydrogen peroxide and ascorbate in batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 362–367, 2009a.

LIU, L.; LIU, Y.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 99, 2011.

LIU, L.; WANG, M.; DU, G.; CHEN, J. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 383–388, 2008b.

LIU, L.; YANG, H.; ZHANG, D.; DU, G.; CHEN, J.; WANG, M.; SUN, J. Enhancement of hyaluronic acid production by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus* with n-dodecane as an oxygen vector. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 596–603, 2009b.

LIU, H.; YIN, Y.; YAO, K.; MA, D.; CUI, L.; CAO, Y. Influence of the concentrations of hyaluronic acid on the properties and biocompatibility of Cs-Gel-HA membranes. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3523–3530, 2004.

LOPES, T. D.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C.; GREIN, A.; TISCHER, C. A.; FARIA-TISCHER, P. C. de S. Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: production and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 401–408, 2014.

- MACEDO, A. C.; SANTANA, M. H. A. Hyaluronic acid depolymerization by ascorbate-redox effects on solid state cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in cashew apple fruit bagasse. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2213–2219, 2012.
- MAO, Z.; SHIN, H. D.; CHEN, R. A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 63–69, 2009.
- MARCELLIN, E.; CHEN, W.; NIELSEN, L. K. Microbial hyaluronic acid biosynthesis. In: REHM, B. H. A. (Ed.). **Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives**. Norfolk: Caister Academic Press, 2009. p. 163–180.
- 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.
- MIRANDA, D. G.; MALMONGE, S. M.; CAMPOS, D. M.; ATTIK, N. G.; GROSGOGEAT, B.; GRITSCH, K. A chitosan-hyaluronic acid hydrogel scaffold for periodontal tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 104, n. 8, p. 1691–1702, 2016.
- MOGOŞANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, n. 2, p. 127–136, 2014.
- MOHANDAS, A.; ANISHA, B. S. S.; CHENNAZHI, K. P. P.; JAYAKUMAR, R. Chitosan-hyaluronic acid/VEGF loaded fibrin nanoparticles composite sponges for enhancing angiogenesis in wounds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 127, p. 105–113, 2015.
- MOHEIT, G. D.; COLEMAN, K. M. Hyaluronic acid fillers. **Dermatologic Therapy**, v. 19, p. 141–150, 2006.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc, 2013.
- MOSCOVICI, M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. SEP, p. 1–11, 2015.
- MUSSATTO, S. I.; BALLESTEROS, L. F.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A. Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. In: Show, K.-Y. (Ed.). **Industrial Waste**. [s.l.] InTech, 2012.
- NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L.; BRAUNER, P.; KOLAR, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. **Veterinarni Medicina**, v. 2008, n. 8, p. 397–411, 2008.
- NISHIO, E. K.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; PRONI, E. A.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. **Scientific Reports**, v. 6, p. 21641, 2016.

- OLIVEIRA, A. H.; OGRODOWSKI, C. C.; MACEDO, A. C.; SANTANA, M. H. A.; GONÇALVES, L. R. B. Cashew apple juice as microbial cultivation medium for non-immunogenic hyaluronic acid production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1097–1104, 2013.
- OLIVEIRA, M. R.; SILVA, R. S. S. F.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 2, p. 177–183, 2007.
- OLIVEIRA, S. A.; SILVA, B. C.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C.; URBANO, A.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 642–653, 2017.
- PAN, N. C.; PEREIRA, H. C. B.; SILVA, M. D. L. C.; VASCONCELOS, A. F. D.; CELLIGOI, M. A. P. C. Improvement production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* in sugarcane molasses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 1, p. 276–293, 2017.
- PAN, N. C.; VIGNOLI, J. A.; BALDO, C.; PEREIRA, H. C. B.; SILVA, R. S. S. F.; CELLIGOI, M. A. P. C. 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, 2015a.
- PAN, N. C.; VIGNOLI, J. A.; BALDO, C.; PEREIRA, H. C. B.; SILVA, R. S. S. F.; CELLIGOI, M. A. P. C. Agroindustrial byproducts for the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 4, n. 4, p. 114–118, 2015b.
- PATIL, K. P.; KAMALJA, K. K.; CHAUDHARI, B. L. Optimization of medium components for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 using a statistical approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1573–1577, 2011.
- BIASI-GARBIN, R. P.; OTAGUIRI, E. S.; MOREY, A. T.; SILVA, M. F.; MORGUETTE, A. E. B.; LANCHEROS, C. A. C.; KIAN, D.; PERUGINI, M. R. E.; NAKAZATO, G.; DURÁN, N.; NAKAMURA, C. V.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. Effect of eugenol against *Streptococcus agalactiae* and synergistic interaction with biologically produced silver nanoparticles. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–8, 2015.
- PINHEIRO, J. C.; BATES, D. M. **Mixed-effects models in s and s-plus**. New York: Springer-Verlag, 2000.
- PIRES, A. M. B.; MACEDO, A. C.; EGUCHI, S. Y.; SANTANA, M. H. A. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6506–6509, ago. 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.

PIRINEN, S.; KARVINEN, J.; TIITU, V.; SUVANTO, M.; PAKKANEN, T. T. Control of swelling properties of polyvinyl alcohol/hyaluronic acid hydrogels for the encapsulation of chondrocyte cells. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 28, p. 1–6, 2015.

PIRNAZAR, P.; WOLINSKY, L.; NACHNANI, S.; HAAKE, S.; PILLONI, A.; BERNARD, G. W. Bacteriostatic effects of hyaluronic acid. **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 4, p. 370–374, 1999.

PRASAD, S. B.; JAYARAMAN, G.; RAMACHANDRAN, K. B. Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, n. 1, p. 273–83, 2010.

R Core Team. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.

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.

ROSA, C. S.; HOELZEL, S. C.; VIERA, V. B.; BARRETO, P. M.; BEIRÃO, L. H. Atividade antioxidante do ácido hialurônico extraído da crista de frango. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2593–2598, 2008.

SCANDORIEIRO, S.; DE CAMARGO, L. C.; LANCHEROS, C. A. C.; YAMADA-OGATTA, S. F.; NAKAMURA, C. V.; DE OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; DURAN, N.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. T. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–14, 2016.

SCHIRALDI, C.; GATTA, A. ; ROSA, M. De. **Biotechnological production and application of hyaluronan**. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/biopolymers/biotechnological-production-characterization-and-application-of-hyaluronan>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

SCOTT, J. E.; CUMMINGS, C.; BRASS, A.; CHEN, Y.; BRASST, A. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. **Biochemical Journal**, v. 274, p. 699–705, 1991.

SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; MALMONGE, S. M.; SOUTO, E. B. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. **Polímeros**, v. 21, n. 5, p. 361–368, 2011.

SGORLA, D.; ALMEIDA, A.; AZEVEDO, C.; BUNHAK, Ylacio J.; SARMENTO, B.; CAVALCANTI, O. A. Development and characterization of crosslinked hyaluronic acid polymeric films for use in coating processes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, n. 1, p. 380–389, 2016.

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, p. 53–60, 2013.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3, p. 591–611, 1965.

SHIN, Y. C.; SHIN, D.-M.; LEE, E. J.; LEE, J. H.; KIM, J. E.; SONG, S. H.; HWANG, D.-Y.; LEE, J. J.; KIM, B.; LIM, D.; HYON, S.-H.; LIM, Y.-J.; HAN, D.-W. Hyaluronic acid/plga core/shell fiber matrices loaded with EGCG beneficial to diabetic wound healing. **Advanced Healthcare Materials**, v. 5, n. 23, p. 3035–3045, 2016.

SIONKOWSKA, A.; KACZMAREK, B.; LEWANDOWSKA, K.; GRABSKA, S.; POKRYWCZYŃSKA, M.; KLOSKOWSKI, T.; DREWA, T. 3D composites based on the blends of chitosan and collagen with the addition of hyaluronic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 442–448, 2016.

SRIKANTH, R.; SIDDARTHA, G.; REDDY, C. H. S. S. S.; HARISH, B. S.; RAMAIAH, M. J.; UPPULURI, K. B. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 8–16, 2015.

SRINIVASAN, P.; SABITHA, K. E.; SHYAMALADEVI, C. S. Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide induced *in vitro* lipid peroxidation by green tea polyphenols. **Life Sciences**, v. 80, n. 12, p. 1080–1086, 2007.

STASKO, J.; KALNIŃŠ, M.; DZENE, A.; TUPUREINA, V. Poly(vinyl alcohol) hydrogels. **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences**, v. 58, n. 1, p. 63, 2009.

STOOLMILLER, A. C.; DORFMAN, A.; BTRY, C. H. E. The biosynthesis of hyaluronic acid by *Streptococcus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 2, p. 236–246, 1969.

SU, Z.; MA, H.; WU, Z.; ZENG, H.; LI, Z.; WANG, Y.; LIU, G.; XU, B.; LIN, Y.; ZHANG, P.; WEI, X. 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.

SUN, J.; WANG, M.; CHEN, Y.; SHANG, F.; YE, H.; TAN, T. Understanding the influence of phosphatidylcholine on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 1, p. 47–57, 2012.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 41–6, 1998.

TANG, X.; ALAVI, S. Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 7–16, 2011.

TANG, Z.; HOU, C.; CHEN, Q. Experimental study on bacteriostasis of chitosan and sodium hyaluronate. **Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery**, v. 16, n. 4, p. 259–261, 2002.

TLAPAK-SIMMONS, V. L. Kinetic characterization of the recombinant hyaluronan synthases from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 7, p. 4246–4253, 1999.

TØMMERAAS, K.; MELANDER, C. Kinetics of hyaluronan hydrolysis in acidic solution at various pH values. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 6, p. 1535–1540, 2008.

TRABUCCHI, E.; PALLOTTA, S.; MORINI, M.; CORSI, F.; FRANCESCHINI, R.; CASIRAGHI, A.; PRAVETTONI, A.; FOSCHI, D.; MINGHETTI, P. Low molecular weight hyaluronic acid prevents oxygen free radical damage to granulation tissue during wound healing. **International Journal of Tissue Reactions**, v. 24, n. 2, p. 65–71, 2002.

TRIPODO, G.; TRAPANI, A.; TORRE, M. L.; GIAMMONA, G.; TRAPANI, G.; MANDRACCHIA, D. Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: recent advances and challenges. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 400–16, 2015.

UNICA. **Sugar Production (2006/2007 - 2016/2017 harvest season)**. Disponível em: <http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipo Historico=2>. Acesso em: 02, Jul. 2017

VÁZQUEZ, J. A.; MONTEMAYOR, M. I.; FRAGUAS, J.; MURADO, M. A. 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.

VÁZQUEZ, J. A.; PASTRANA, L.; PIÑEIRO, C.; TEIXEIRA, J. A.; PÉREZ-MARTÍN, R. I.; AMADO, I. R. Production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* on protein substrates obtained from *Scylliorhinus canicula* discards. **Marine Drugs**, v. 13, n. 10, p. 6537–6549, 2015.

WIDNER, B.; DOLLEN, S. Von; TANG, M.; HEU, T.; SLOMA, A.; STERNBERG, D.; DEANGELIS, P. L.; WEIGEL, P. H.; BROWN, S. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3747–3752, 2005.

XU, H.; MA, L.; SHI, H.; GAO, C.; HAN, C. Chitosan–hyaluronic acid hybrid film as a novel wound dressing: in vitro and in vivo studies. **Polymers for Advanced Technologie**, v. 18, p. 869–875, 2007.

XU, K.; XU, P. Efficient production of L-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 23–29, 2014.

YAMADA, T.; KAWASAKI, T. Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: New approaches. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 6, p. 521–8, 2005.

YE, J.; WU, H.; WU, Y.; WANG, C.; ZHANG, H.; SHI, X.; YANG, J. High molecular weight hyaluronan decreases oxidative DNA damage induced by EDTA in human corneal epithelial cells. **Eye**, v. 26, n. 7, p. 1012–1020, 2012.

YU, C.-J.; KO, C.-J.; HSIEH, C.-H.; CHIEN, C.-T.; HUANG, L.-H.; LEE, C.-W.; JIANG, C.-C. Proteomic analysis of osteoarthritic chondrocyte reveals the hyaluronic acid-regulated proteins involved in chondroprotective effect under oxidative stress. **Journal of Proteomics**, v. 99, p. 40–53, 2014.

YU, H.; STEPHANOPOULOS, G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 1, p. 24–32, 2008.

ZANIN, G. D.; BUNHAK, É. J.; DOS SANTOS, L. F.; DE MELO, E. B.; CAVALCANTI, O. A. Influence of hyaluronic acid on the formation of isolated poly(vinyl acetate) films for oral solid coatings. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 20, p. 1–10, 2017.

ZHANG, M.; MCDONALD, F. M.; STURROCK, S. S.; CHARNOCK, S. J.; HUMPHERY-SMITH, I.; BLACK, G. W. Group A streptococcus cell-associated pathogenic proteins as revealed by growth in hyaluronic acid-enriched media. **Proteomics**, v. 7, n. 9, p. 1379–1390, 2007.

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.

ZHOU, Z. H.; HE, S. L.; HUANG, T. L.; LIU, L. H.; LIU, Q. Q.; ZHAO, Y. M.; OU, B. L.; ZENG, W. N.; YANG, Z. M.; CAO, D. F. Degradation behaviour and biological properties of gelatin/hyaluronic acid composite scaffolds. **Materials Research Innovations**, v. 17, n. 6, p. 420–424, 2013.