



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NICOLE CALDAS PAN

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR *Streptococcus*
zooepidemicus ATCC 39920 EM DIFERENTES CONDIÇÕES
DE CULTIVO UTILIZANDO METODOLOGIAS
ESTATÍSTICAS**

NICOLE CALDAS PAN

PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO UTILIZANDO METODOLOGIAS ESTATÍSTICAS

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

Orientadora: Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Co-orientadora: Dra. Josiane Alessandra Vignoli

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P187p Pan, Nicole Caldas.

Produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em diferentes condições de cultivo utilizando metodologias estatísticas / Nicole Caldas Pan. – Londrina, 2014.

159p. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Co-orientador: Josiane Alessandra Vignoli.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014. Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia – Teses. 2. *Streptococcus zooepidemicus* – Teses. 3. Acido hialurônico – Produção – Teses. I. Celligoi, Maria Antonia Pedrine Colabone. II. Vignoli, Josiane Alessandra. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 663.1

NICOLE CALDAS PAN

PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO UTILIZANDO METODOLOGIAS ESTATÍSTICAS

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

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Maria Antonia P. Colabone Celligoi
UEL - Londrina - PR

Prof.^a Dra. Maria Helena Andrade Santana
UNICAMP - Campinas - SP

Prof. Dr. João Batista Buzato
UEL - Londrina - PR

Londrina, 13 de março de 2014.

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

Aos meus pais e a minha irmã,
por me darem a base para que este
trabalho fosse concretizado.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder sabedoria e mostrar o caminho.

À professora doutora Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi pela competência, profissionalismo e orientação. Orientar não é só transmitir conhecimento. É ser guia, companheiro e amigo. É caminhar com o orientando, passo a passo, transmitindo entusiasmo, confiança e força. Ser orientador é ser exemplo.

À professora doutora Josiane Alessandra Vignoli, co-orientadora, pelo conhecimento, disposição de ajudar, paciência e amizade. Minha sincera gratidão.

Ao professor Rui Sérgio dos Santos Ferreira da Silva pela expressiva colaboração nas análises estatísticas.

Aos membros titulares, professora doutora Maria Helena Andrade Santana e professor doutor João Batista Buzato, e suplentes da banca, professor doutor Marcelo Rodrigues de Melo e professora doutora Daniele Sartori, pela disponibilidade e atenção.

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

À estagiária, Hanny Pereira com quem compartilhei alegrias e tristezas no decurso das atividades. Agradeço a responsabilidade e o empenho para com este trabalho.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia pelas trocas de experiências, conhecimentos, informações e preocupações, especialmente à Juliana Barion, Karina Milani, Erika Mitsuo e Amanda Aleixo, pela amizade e por fazerem meus dias mais alegres.

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

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 Carvalho Filho, por toda sua razão quando a minha emoção me inquietava, pela compreensão quando de minha ausência, pela atenção e carinho. Meu eterno amor.

Aos amigos distantes, Juliana Weiller e Frederico Lovato, pela amizade sincera e por estarem sempre presentes em minha vida, pois, de forma singular, me incentivaram a ir em busca de meus objetivos. A certeza da mais pura e sincera amizade.

Aos meus amigos próximos, pelo incentivo necessário para que continuasse caminhando. Agradeço as horas que, juntos, nos divertimos, compartilhando alegrias, sorrisos e os votos de confiança. A vocês, que mesmo nos momentos que não pudemos nos ver, estiveram presentes.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho. Meu respeito e minha gratidão.

PAN, Nicole Caldas. **Produção de Ácido Hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em Diferentes Condições de Cultivo Utilizando Metodologias Estatísticas**. 2014. 159f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, 2014.

RESUMO

O presente trabalho avaliou diferentes condições de cultivo que influenciam na produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 utilizando metodologias estatísticas. A síntese de ácidos orgânicos foi acompanhada. Os fatores fermentativos pH (6,0; 7,0, 8,0), temperatura (34; 37; 40°C) e agitação (100; 150; 200 rpm) foram avaliados por planejamento de Box-Benken e a maior produção foi de 0,437 g.L⁻¹ em pH 8,0, 37°C e 100 rpm. Definida estas condições, os parâmetros nutricionais, glicose (10; 20; 30 g.L⁻¹) e extrato de levedura (10; 20; 30 g.L⁻¹), foram avaliados por planejamento fatorial completo, obtendo 0,787 g.L⁻¹ em 30 g.L⁻¹ de glicose e 30 g.L⁻¹ de extrato de levedura. O estudo de meios alternativos contendo derivados agroindustriais, indicou maior produção em caldo e melaço de cana-de-açúcar a 30 g.L⁻¹ de açúcares totais com extrato de levedura a 30 g.L⁻¹. A produção foi de 0,266 g.L⁻¹ e 0,376 g.L⁻¹, respectivamente. Dentre as fontes alternativas de nitrogênio, a maior produção foi de 0,219 g.L⁻¹ quando utilizou 30 g.L⁻¹ de proteína de soja em meio contendo sacarose a 30 g.L⁻¹ de açúcares totais. A avaliação de sacarose (10; 30; 50 g.L⁻¹), extrato de levedura (10; 30; 50 g.L⁻¹), glutamina (0,0; 0,3; 0,6 g.L⁻¹), glutamato (0,0; 0,3; 0,6 g.L⁻¹) e ácido oxálico (0,0; 0,3; 0,6 g.L⁻¹) foi realizada por planejamento fatorial fracionário 2⁽⁵⁻¹⁾ e a maior produção foi de 0,608 g.L⁻¹ em 50 g.L⁻¹ de sacarose e extrato de levedura e 0,6 g.L⁻¹ de glutamina, glutamato e ácido oxálico. Em sacarose (50 g.L⁻¹), glutamato (0,6 g.L⁻¹) e ácido oxálico (0,6 g.L⁻¹), extrato de levedura (50; 57,32; 92,68 e 100 g.L⁻¹) e glutamina (0,6; 0,9514; 1,8; 2,6486; 3,0 g.L⁻¹) foram avaliados por delineamento composto central rotacional, obtendo produção de 0,654 g.L⁻¹ em 1,8 g.L⁻¹ de glutamina e 100 g.L⁻¹ de extrato de levedura. Das variáveis avaliadas demonstrou-se que o pH e o extrato de levedura apresentam elevada influência sobre o metabolismo microbiano. Em pH ácido (pH 6,0) obteve-se um desvio do fluxo de carbono para o metabolismo heterolático, não apresentando produção de ácido lático, e o incremento do extrato de levedura aumentou a síntese do mesmo. Os resultados obtidos neste trabalho serão utilizados como norteadores para futuros estudos que busquem a produção de ácido hialurônico em maiores escalas para aplicações industriais.

Palavra chave: Ácido hialurônico. *Streptococcus zooepidemicus*. Fermentação. Metodologias estatística. Metabolismo.

PAN, Nicole Caldas. **Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 in Different Conditions of Cultures Using Statistical Methodologies**. 2014. 159p. Dissertation (Master's on Biotechnology) – State University of Londrina, 2014.

ABSTRACT

The current work evaluated different conditions of culture which influenced at the production of hyaluronic acid (AH) by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 using statistical methodologies. The synthesis of organic acids was followed. The fermentative factors pH (6,0; 7,0, 8,0), temperature (34; 37; 40°C) and agitation (100; 150; 200 rpm) were evaluated by Box-Benkhken planning and the greatest production was 0,437 g.L⁻¹ in pH 8,0, 37°C and 100 rpm. Being defined these conditions, the nutritional parameters, glucose (10; 20; 30 g.L⁻¹) and yeast extract (10; 20; 30 g.L⁻¹), were evaluated by complete factorial planning, obtaining 0,787 g.L⁻¹ in 30 g.L⁻¹ of glucose and 30 g.L⁻¹ of yeast extract. The study of alternative cultures containing agroindustrial derivatives, indicated enhanced production in sugar cane juice and molasses at 30 g.L⁻¹ of total sugars with yeast extract at 30 g.L⁻¹. The production was 0,266 g.L⁻¹ and 0,376 g.L⁻¹, respectively. Among the alternative sources of nitrogen, the greatest production was 0,192 g.L⁻¹ when it was used 30 g.L⁻¹ of soy protein in a culture containing sucrose at 30 g.L⁻¹ of total sugars. The evaluation of sucrose (10; 30; 50 g.L⁻¹), yeast extract (10; 30; 50 g.L⁻¹), glutamine (0,0; 0,3; 0,6 g.L⁻¹), glutamate (0,0; 0,3; 0,6 g.L⁻¹) and oxalic acid (0,0; 0,3; 0,6 g.L⁻¹) was accomplished by factorial fractional planning 2⁽⁵⁻¹⁾ and the greatest production was 0,608 g.L⁻¹ at 50 g.L⁻¹ of sucrose and yeast extract and 0,6 g.L⁻¹ of glutamine, glutamate and oxalic acid. In sucrose (50 g.L⁻¹), glutamate (0,6 g.L⁻¹) and oxalic acid (0,6 g.L⁻¹), yeast extract (50; 57,32; 92,68 e 100 g.L⁻¹) and glutamine (0,6; 0,9514; 1,8; 2,6486; 3,0 g.L⁻¹) were evaluated by compound central rotational experimental design, obtaining production of 0,654 g.L⁻¹ at 1,8 g.L⁻¹ of glutamine and 100 g.L⁻¹ of yeast extract. From the studied variables it was shown that the pH and the yeast extract showed high influence over the microbial metabolism. In acid pH (pH 6,0) it was obtained a flow deviation of carbon for the heterothallic metabolism, not showing production of lactic acid, and the increasing of yeast extract increased its synthesis. The results obtained at this paper will be used as guide for future studies which search for production of hyaluronic acid in greater scales for industrial applications.

Keywords: Hyaluronic acid. *Streptococcus zooepidemicus*. Fermentation. Statistical methodologies. Metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química do ácido hialurônico	18
Figura 2 - Conformação molecular do ácido hialurônico: (a) estrutura helicoidal simples do AH; (b) dupla hélice do AH	19
Figura 3 - Modelos de condensação elucidadas por microscopia de força atômica do ácido hialurônico microbiano com massa molar entre 105 a 106 Da em solução aquosa neutra.....	20
Figura 4 - Modelo demonstrativo das propriedades viscosas e elásticas das soluções de AH	21
Figura 5 - Micrografia eletrônica de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> obtidas no final da fase exponencial de crescimento em microscópio eletrônico de transmissão	24
Figura 6 - Via metabólica de biossíntese do ácido hialurônico por <i>Streptococcus ssp.</i>	25
Figura 7 - Esquema da elongação da cadeia do AH na membrana plasmática	27
Figura 8 - Fluxo de carbono baseado em 100 C - mol de glicose consumida. Fluxos foram estimados a partir das alterações nas concentrações de metabólitos durante a fase exponencial de crescimento, utilizando modelo de fluxo metabólico. O balanço de carbono foi próximo de 98,5% e contribuições do metabolismo de aminoácidos foram desconsideradas. UDPG: UDP-ácido glicurônico, UDPNAG: UDP-N-acetilglicosamina, AcCoA: aceti-CoA.	29
Figura 9 - Concentração de ácido hialurônico do tecido conjuntivo de acordo com a idade	39
Figura 10 - Fluxograma das fermentações realizadas para produção de ácido hialurônico por <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fontes de ácido hialurônico de tecidos e fluidos animais.....	23
Tabela 2 - Produção e massa molar do AH em diferentes condições de cultivo por espécies de Streptococcus zooepidemicus.	35
Tabela 3 - Meio Brain Heart infusion (BHI).....	46
Tabela 4 - Meio de fermentação.....	46
Tabela 5 - Planejamento de Box Behnken 33 para avaliação da influência do (X1) pH, (X2) temperatura (°C), e (X3) agitação (rpm) do meio na produção de ácido hialurônico por Streptococcus zooepidemicus	49
Tabela 6 - Planejamento fatorial completo 3 ² para a avaliação da concentração de (X1) glicose e (X2) extrato de levedura para a produção de ácido hialurônico por Streptococcus zooepidemicus.....	50
Tabela 7 - Planejamento fatorial fracionário 2(5-1) para a avaliação da concentração de (X1) sacarose, (X2) extrato de levedura, (X3) glutamato, (X4) glutamina e (X5) ácido oxálico para a produção de ácido hialurônico por Streptococcus zooepidemicus.....	52
Tabela 8 - Delineamento composto central rotacional para a otimização da concentração de (X2) extrato de levedura e (X4) glutamina para a produção de ácido hialurônico por Streptococcus zooepidemicus	53

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AH	Ácido Hialurônico
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
Coa	Coenzima A
Da	Daltons
Glc	Glicose
GlcUA	Ácido D- glicurônico
GlcNAc	N- acetilglicosamina
LSS	Lauril Sulfato de Sódio
MEV	Microscopia eletrônica de Varredura
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
P.A	Padrão Analítico
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPi	Pirofosfato
UDP	Uridina difosfato
UTP	Uridina trifosfato
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	GERAL	16
2.2	ESPECÍFICO	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	HISTÓRICO	17
3.2	ESTRUTURA E PROPRIEDADES	17
3.3	FONTES DE ÁCIDO HIALURÔNICO.....	22
3.4	PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR STREPTOCOCCUS.....	24
3.4.1	Fatores que Interferem a Produção de Ácido Hialurônico	29
3.4.2	Meio de Cultivo para Produção de Ácido Hialurônico.....	31
3.5	SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE AH.....	36
3.6	APLICAÇÕES	38
3.6.1	Cosmético.....	38
3.6.2	Viscossuplementação.....	40
3.6.3	Oftalmologia	41
3.6.4	Reparo de Tecidos	41
3.6.5	Farmacologia e Liberação de Fármacos	42
3.7	PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO PARA OTIMIZAÇÃO DE PRODUÇÃO	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	MATERIAL.....	45
4.1.1	Microrganismo	45
4.1.2	Reagentes	45
4.1.2.1	Reagente de carbazol	45
4.1.2.2	Hialuronato de sódio.....	45
4.1.2.3	Ácidos orgânicos	45
4.1.3	Meios de Cultura	45
4.1.3.1	Meio de preservação e inóculo.....	46
4.1.3.2	Meio de fermentação	46

4.1.3.3	Derivados agroindustriais	46
4.2	MÉTODOS.....	47
4.2.1	Preservação do Microrganismo	47
4.2.2	Preparo do Inóculo	47
4.2.3	Fermentações.....	47
4.2.3.1	Estudo dos parâmetros: pH, temperatura e agitação para a produção de AH.....	48
4.2.3.2	Avaliação da concentração de glicose e extrato de levedura para a produção de AH.....	49
4.2.3.3	Influência de diferentes fontes de carbono para a produção de AH	50
4.2.3.4	Efeito de diferentes fontes de nitrogênio para a produção de AH	50
4.2.3.5	Avaliação da concentração de sacarose, extrato de levedura, glutamato, glutamina, e ácido oxálico na produção de AH.....	51
4.2.3.6	Otimização da concentração de extrato de levedura e glutamina para a produção de AH	52
4.3	MÉTODOS ANALÍTICOS	53
4.3.1	Quantificação da Biomassa	53
4.3.2	Quantificação de Açúcares Totais das Fermentações	54
4.3.3	Quantificação de Nitrogênio Total e Nitrogênio Proteico	54
4.3.4	Quantificação de AH.....	54
4.3.4.1	Método colorimétrico de carbazol.....	54
4.3.4.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	55
4.3.5	Quantificação de Ácido Lático, Fórmico e Acético.....	55
4.3.6	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	55
4.3.7	Análise Estatística	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	ARTIGO 1 - AVALIAÇÃO DE FATORES FERMENTATIVOS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS ATCC 39920 ATRAVÉS DE DELINEAMENTOS ESTATÍSTICOS.....	57
5.2	ARTIGO 2 - APROVEITAMENTO DE FONTES AGRÍCOLAS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS ATCC 39920	72

5.3	ARTIGO 3 - UTILIZAÇÃO DE PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS NO DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS ATCC 39920.....	85
5.4	RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	103
6	CONCLUSÕES	108
	REFERÊNCIAS	109
	ANEXOS	116
	ANEXO A - Normas do Periódico Applied Biochemistry and Biotechnology	117
	ANEXO B - Normas do Periódico Bioresource Technology	120
	ANEXO C - Normas do Periódico Process Biochemistry	141

1 INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear de alta massa molar constituído de unidades dissacarídicas de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina (LAURENT; FRASER, 1992). Devido suas propriedades hidratante, antioxidante e viscoelástica, este polímero apresenta interesse à indústria médica, farmacêutica e cosmética (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009).

Dentre as inúmeras aplicações do AH destacam-se a viscosuplementação de fluido sinovial no tratamento de artrite, reparo tecidual, cirurgias oftalmológicas, prevenção de aderência causada por cirurgias abdominais, viscoaumento e reparo de cordas vocais, preenchimento cutâneo, preparações de microcápsulas para liberação controlada de fármacos e no combate a desidratação cutânea em aplicações cosméticas (KOGAN et al., 2007; MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009).

O AH comercial pode ser de origem animal, obtido prioritariamente do cordão umbilical e da crista de galo, ou produzido por fermentação microbiana (KOGAN et al., 2007). Ambos apresentam a mesma estrutura química do polímero encontrado nos humanos (COONEY et al., 1999). Contudo, o processo laborioso de extração e purificação para obtenção do AH de origem animal e a resistência à utilização deste em terapêuticas humanas, devido ao risco de contaminação viral, impulsionam as pesquisas direcionadas à produção de AH por processos fermentativos (CHONG et al., 2005).

O AH microbiano é sintetizado por *Streptococcus*, em particular *Streptococcus equi* e *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus*. Essas bactérias são Gram-positivas, não esporulam e produzem ácidos láctico, fórmico e acético, e etanol como metabólitos do catabolismo de glicose. A cápsula do AH é produzida como um fator de virulência por esses microrganismos e esta é excretada no meio de cultivo, possibilitando o controle das características do polímero e do rendimento do produto. As unidades de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina, que constituem as moléculas de AH, são derivadas de glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, respectivamente e são polimerizadas pela enzima AH sintase (CHONG, 2005).

Streptococcus apresentam exigências nutricionais em relação a aminoácidos, bases nucleotídicas e vitaminas. Esses requisitos são encontrados em

fontes de nitrogênio complexas, como extrato de levedura e peptonas (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009). Outro fator importante para a produção do polímero é a fonte de carbono. A mais utilizada é a glicose, sendo que o efeito da concentração inicial desta foi estudada em diversos trabalhos (PIRES; SANTANA, 2010; DON; SHOPARWE, 2010; ARMSTRONG; COONEY; JOHNS, 1997).

O pH, temperatura, agitação e aeração também influenciam no crescimento celular e produção do polímero, sendo que as condições comumente utilizadas são temperatura de 37°C e pH neutro (LIU et al., 2011).

Em resposta as condições de cultivo, as bactérias podem alterar o metabolismo celular e conseqüentemente o fluxo de carbono. O estudo das alterações metabólicas, através da síntese de ácidos orgânicos, apresenta elevada importância para a compreensão de como aumentar a produção do AH (PIRES; SANTANA, 2010).

A otimização da produção de ácido hialurônico vem sendo estudada através de planejamentos experimentais (KHUE; VO, 2013; PATIL; KAMALJA; CHAUDHARI, 2011; IM et al., 2009; AROSKAR; KAMAT, S. D.; KAMAT, D. V., 2012a). Essa técnica tem como objetivo extrair o máximo de informações úteis ao sistema em estudo, realizando o número mínimo de experimentos e permitindo que o pesquisador faça conclusões apropriadas de sua investigação experimental, podendo determinar a confiabilidade dos resultados (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996).

Neste trabalho diferentes condições de cultivo foram avaliadas visando aumentar a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* através de metodologias estatísticas. Para um conhecimento mais detalhado do metabolismo de *Streptococcus* a síntese dos ácidos orgânicos foi acompanhada durante o estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estudar o efeito de diferentes condições de cultivo para produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* utilizando metodologias estatísticas.

2.2 ESPECÍFICO

- Testar os parâmetros: temperatura, pH e agitação, para produção do ácido hialurônico;
- Verificar o efeito das diferentes concentrações de glicose e extrato de levedura para produção de ácido hialurônico através de delineamento estatístico;
- Avaliar diferentes fontes de carbono e nitrogênio para produção de ácido hialurônico;
- Otimizar estatisticamente o meio de cultivo, nas condições estudadas, para a produção de ácido hialurônico utilizando metodologias estatísticas;
- Acompanhar a síntese dos ácidos orgânicos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HISTÓRICO

Em 1934 inicia-se o estudo de uma molécula versátil e fascinante, o ácido hialurônico (AH). Karl Meyer e seu assistente John Palmer descreveram o procedimento para isolamento desta substância do humor vítreo bovino no laboratório de bioquímica do Departamento de Oftamologia da Universidade de Columbia (MEYER; PALMER, 1934).

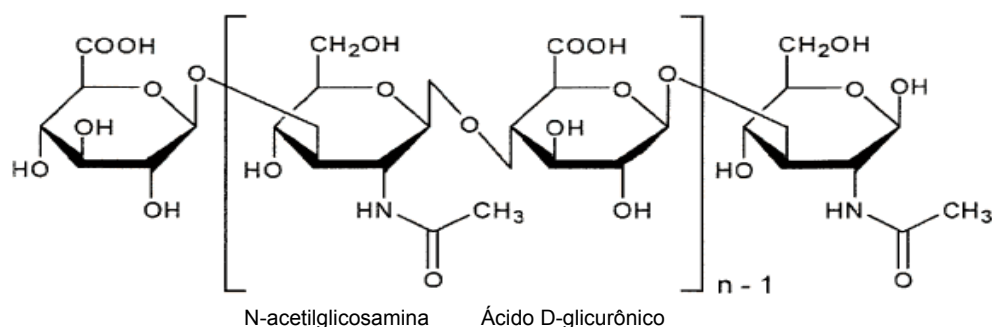
Na década seguinte, Meyer e colaboradores se dedicaram a isolar o AH presente na pele, fluido sinovial, cordão umbilical e crista de galo (LAURENT, 2002). Em 1937, Kendall, Heidelberger e Dawson observaram semelhança entre um polissacarídeo da cápsula de *Streptococcus* do grupo A hemolítica e o AH de origem animal, dando início ao estudo do AH microbiano. Somente em 1950, Meyer e seus assistentes determinaram a estrutura do AH e suas propriedades (LAURENT, 2002; MCDONALD, HASCALL, 2002). A nomenclatura deste biopolímero resultou da junção entre o termo grego hialóide, que significa vítreo, e ácido urônico, que é a denominação de uma das moléculas de monossacarídeo que o compõe (YAMADA; KAWASAKI, 2005).

3.2 ESTRUTURA E PROPRIEDADES

O ácido hialurônico é um polissacarídeo linear de alta massa molar que varia de 10^4 a 10^7 Da e consiste em unidades dissacarídicas polianiónicas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidos alternadamente por ligações β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 4) (LAURENT; FRASER, 1992; ARMSTRONG; JOHN, 1997) (Figura 1).

Esse polímero pertence ao grupo de polissacarídeos denominados polissacarídeos do tecido conjuntivo, mucopolissacarídeos ou glicosaminoglicanos. Dentre esses polissacarídeos estão incluídos a condroitina sulfato, dermatana sulfato e heparina. O AH é estruturalmente o mais simples do grupo, sendo o único não covalentemente associado a um núcleo proteico e não sulfatado (KOGAN et. al, 2007).

Figura 1 - Estrutura química do ácido hialurônico



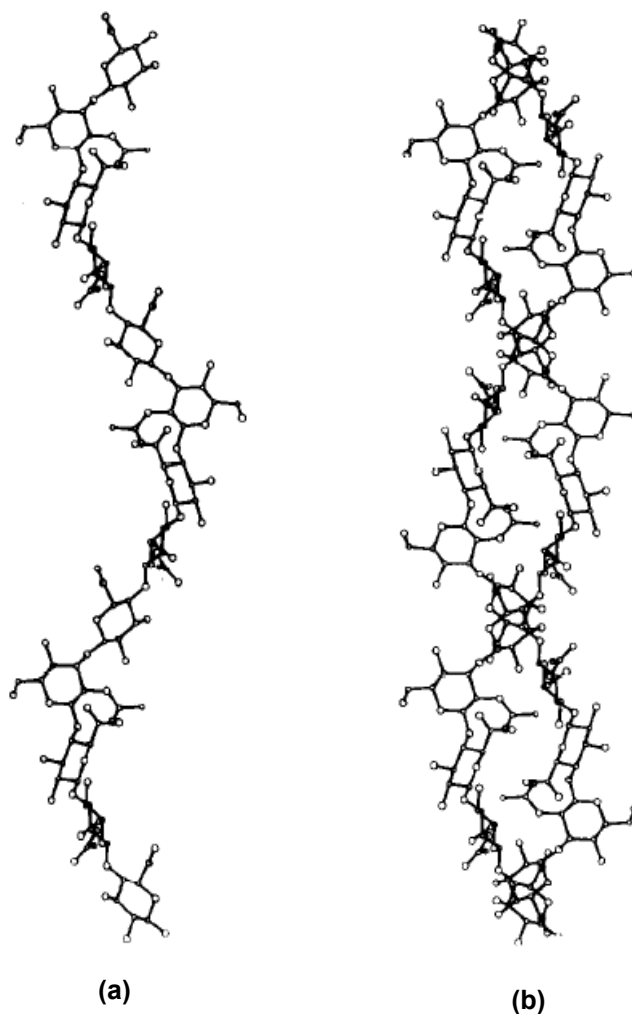
Fonte: Adaptado de Wu (2011),

O AH pode conter em torno de 30.000 unidades dissacarídicas repetidas na molécula extraída de tecidos animais, o que significaria uma massa molar superior a 10^7 Da (WEIGEL; HASCALL; TAMMY, 1997). Quando estendida a molécula de ácido hialurônico contendo 6000 KDa apresenta comprimento de aproximadamente 15 μ m e diâmetro de 0,5 nm (COWMAN; MATSUOKA, 2005).

As funções biológicas do AH estão diretamente relacionadas com suas conformações e interações específicas. Logo, dependem da massa molar, concentração, ambiente local, força iônica, constante dielétrica, exposição às forças mecânicas perturbadoras e interação com proteínas e lipídios (FOUISSAC MILAS; RINAUDO, 1993; HARDINGHAM, 2004; COWMAN; MATSUOKA, 2005).

A conformação do AH no estado sólido, determinada por difração em raio-X, revelou uma conformação helicoidal simples contendo 2, 3 ou 4 dissacarídeos por volta, dependendo do íon presente (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , etc). Uma dupla hélice, contendo 4 dissacarídeos por volta, foi observada sob condições iônicas não usuais (H^+/K^+ , Rb^+ , NH_4^+). Todas as estruturas são estabilizadas por ligações de hidrogênio que unem resíduos de açúcares adjacentes através de ligações glicosídicas (COWMAN; MATSUOKA, 2005) (Figura 2).

Figura 2 - Conformação molecular do ácido hialurônico: (a) estrutura helicoidal simples do AH; (b) dupla hélice do AH



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

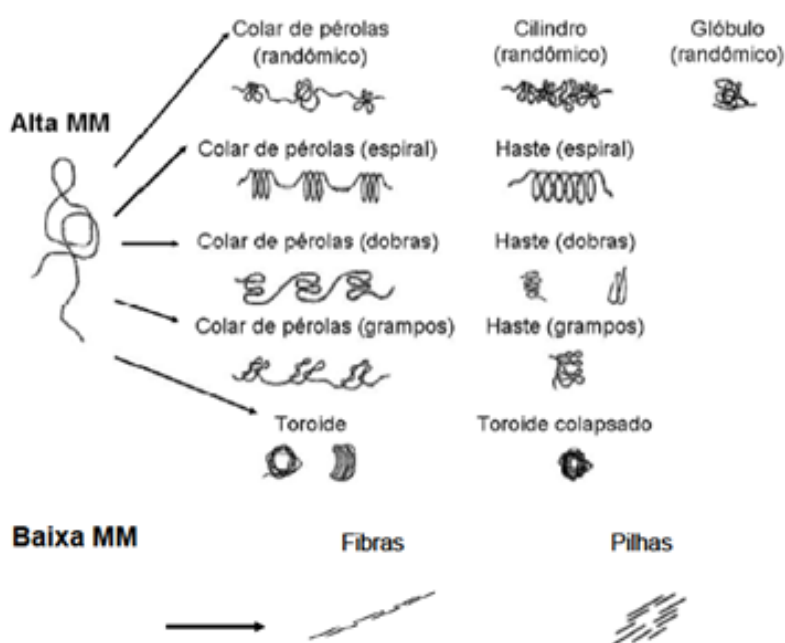
Em soluções aquosas, o AH apresenta consistência gelatinosa com alta viscoelasticidade e alto grau de hidratação, devido às características estruturais da molécula (HARDINGHAM, 2004). O AH interage com a água por pontes de hidrogênio conferindo ao polímero capacidade de retenção de água e rigidez conformacional (CHONG; BLANK, 1998). Por conseguinte, o AH assume uma estrutura enovelada randômica semiflexível, ocupando um grande domínio hidrodinâmico com uma baixa densidade de segmentos de cadeia. Essas propriedades combinadas à alta massa molar fazem com que soluções de AH apresentem um comportamento não Newtoniano (SCOTT, HEATLEY, 1999).

Hardingham (2004) observou que os átomos de hidrogênio axiais formam uma face relativamente hidrofóbica apolar, enquanto as cadeias laterais equatoriais formam uma face hidrofílica de maior polaridade, criando uma estrutura

de fita torcida. Além disso, hélices de AH em solução podem ser energeticamente e estericamente capazes de formar cadeias duplas de AH por meio de interações entre as regiões hidrofóbicas da cadeia. Estas regiões são responsáveis por estabilizar a formação de cadeias duplas e pela formação de redes e agregações laterais de cadeias de AH (WEISSMAN; MEYER, 1954).

Cowman e Matsuoka (2005), através de microscopia de força atômica, elucidaram o comportamento do AH microbiano em faixas de massa molar entre 10^5 a 10^6 Da e descreveram estruturas para estas duas classes de AH, baixa e alta massa molar (Figura 3).

Figura 3 - Modelos de condensação elucidadas por microscopia de força atômica do ácido hialurônico microbiano com massa molar entre 10^5 a 10^6 Da em solução aquosa neutra

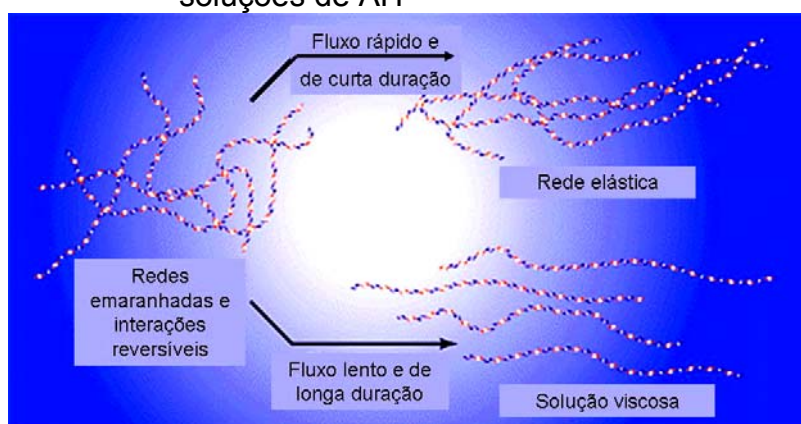


Fonte: Adaptado Cowman et al. (2005)

Em soluções semidiluídas ou concentradas, os domínios hidrodinâmicos das cadeias de AH se sobrepõem. Segundo Fouissac, Milas e Rinaudo (1993), cadeias de AH com massa molar de 3×10^6 Da, por exemplo, começam a se sobrepor em concentrações de $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$. As cadeias se acomodam reduzindo o tamanho do domínio e os movimentos dos segmentos moleculares tornam-se mais restritos, formando uma rede emaranhada de cadeias. Logo, esse sistema molecular compacto apresenta propriedades viscosas e

elásticas significantes, que dependem da estrutura primária e do comprimento da cadeia molecular, de sua conformação e concentração. Propriedades elásticas são observadas quando o sistema pode resistir a um fluxo de fluido rápido de curta duração, distribuindo cargas e forças de cisalhamento dentro da rede. Por outro lado, fluxos de fluido lento e de maior duração podem separar parcialmente e alinhar as moléculas permitindo seu movimento e exibindo propriedades viscosas (WEISSMAN; MEYER, 1954) (Figura 4).

Figura 4 - Modelo demonstrativo das propriedades viscosas e elásticas das soluções de AH



Fonte: Hascall e Laurent (1997)

A propriedade viscoelástica do AH no estado hidratado é uma de suas principais características. Tanto a elasticidade quanto a viscosidade são anômalas, ou seja, não são constantes e variam com a taxa de cisalhamento ou movimento oscilatório. Tal comportamento indica que o AH é um lubrificante biológico ideal, reduzindo a carga de trabalho em movimentos rápidos, sendo, por isso, abundante nos fluidos e bolsas sinoviais e nas bainhas dos tendões. Além disso, a viscosidade e a elasticidade estão positivamente relacionadas à massa molar e à concentração, o que deve ser considerado nas aplicações do AH (FRASER; LAURENT; LAURENT, 1997).

A atividade antioxidante de alguns glicosaminoglicanos, entre eles o AH, são importantes na inibição lipídica por quelarem metais de transição como o Cu^{2+} e Fe^{2+} (ALBERTINI et al., 2000). Alguns pesquisadores verificaram que pessoas com várias doenças, incluindo cirrose e fibrose hepática, apresentavam um aumento nos níveis de AH no plasma (PLEVRIS et al., 2000). Logo, concluíram que este aumento nos níveis de AH representavam uma resposta biológica para

produção de radicais livres (FRASER; LAURENT; LAURENT,1997; CAMPO et al., 2004).

A provável hipótese do mecanismo pelo qual o AH reduz radicais livres está baseada na 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). Rosa, et al. (2008) avaliaram a atividade antioxidante do AH extraído de cristas de galo sobre o radical 2,2-difenil 1-picrilhidrazil (DPPH) que resultou em um efeito sequestrante de 83,9% na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 87,3% na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esses valores mostram que o AH pode ser aplicado como um antioxidante natural.

3.3 FONTES DE ÁCIDO HIALURÔNICO

O AH é amplamente distribuído na natureza onde suas propriedades físicas e biológicas definem as diversas funções (ADAM; GHOSH, 2001). Além de estar presente em todos os vertebrados o AH também se encontra na cápsula de algumas cepas de *Streptococcus* (KOGAN et al., 2007).

Nos animais, de maneira geral, o AH é encontrado na matriz extracelular e matriz pericelular, mas tem também sido mostrada sua ocorrência no espaço intracelular (COWMAN; MATSUOKA, 2005). A Tabela 1 apresenta a ocorrência de AH em diversos tecidos e fluidos animais.

No corpo humano, as maiores concentrações de AH são encontradas no fluido sinovial, cordões umbilicais e no humor vítreo. Aproximadamente metade do AH presente no corpo humano ocorre na pele, sendo grande parte localizada no espaço intracelular, podendo alcançar concentrações de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$. Na cartilagem, onde o AH é encontrado em concentrações mais baixas, o polímero funciona como um elemento estrutural da matriz, formando um centro de agregação para o proteoglicano (condroitina sulfato) que mantém a estrutura macromolecular devido as suas interações específicas. Por fim, no fluido sinovial, altas concentrações de AH de alta massa molar fornecem lubrificação necessária para as articulações, atuando como amortecedor de choques, reduzindo a fricção durante o movimento dos ossos e diminuindo o desgaste das articulações. Sob condições inflamatórias de doenças como osteoartrite ou artrite reumatoide, o AH de

alta massa molar é degradado por espécies reativas de oxigênio e absorvedoras de choques, conduzindo ao movimento deteriorado das articulações e dor (KOGAN et al., 2007).

Tabela 1- Fontes de ácido hialurônico de tecidos e fluidos animais

Tecido ou Fluido	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Observações
Crista de galo	7500	Tecido animal com maior concentração de AH
Cordão umbilical humano	4100	Apresenta AH com alta massa molar
Fluido sinovial humano	1400 – 3600	O volume de fluido sinovial aumenta sob condições inflamatórias, conduzindo a uma diminuição da concentração de AH
Cartilagem nasal bovina	1200	Frequentemente empregada como modelo de cartilagem em estudos experimentais
Humor vítreo humano	140 – 340	Concentração de AH aumenta próximo à maturação deste tecido
Derme humana	200 – 500	Sugerido como agente rejuvenescedor em dermatologia cosmética
Epiderme humana	100	Concentração de AH é muito maior em volta das células que sintetizam ácido hialurônico
Cérebro de coelho	65	Supõe-se que AH atue na redução da probabilidade de ocorrência de tumores cerebrais
Coração de coelho	27	AH é o maior constituinte na matriz patológica que obstrui artérias coronárias
Linha torácica humana	0,2 – 50	A baixa massa molar desse AH é explicada pela captação preferencial de moléculas maiores pelas células endoteliais do fígado
Urina humana	0,1 – 0,3	A urina é também uma importante fonte de hialuronidase
Soro humano	0,01 – 0,1	Concentração de AH aumentam no soro de pessoas idosas assim como em pacientes com artrite reumatóide e cirrose no fígado

Fonte: Kogan et al. (2007)

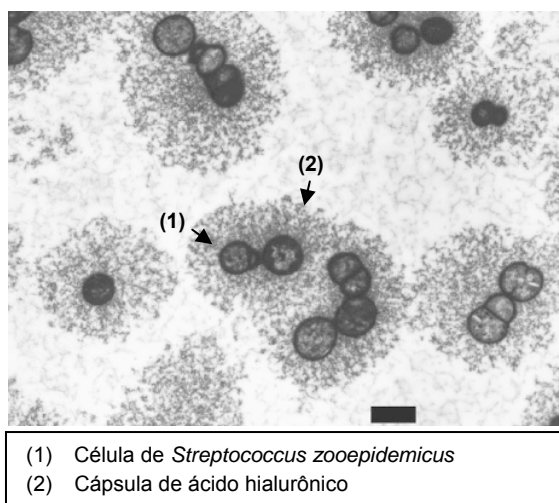
O AH produzido comercialmente pode ser de origem animal ou microbiana. Ambos apresentam a mesma estrutura química do polímero encontrado nos humanos, podendo diferir apenas com relação à massa molar (COONEY et al., 1999). O AH de origem animal é obtido prioritariamente do cordão umbilical e da crista de galo. Nestes se encontra a maior concentração do AH, como pode ser visto na Tabela 1 (KOGAN et al., 2007). No entanto, o processo de extração e purificação do AH de tecidos animais é laborioso, devido a estes estarem complexados a proteoglicanos, podendo causar redução da massa molar e encarecer o produto final. Além disso, tem-se resistência à utilização de materiais de origem animal em produtos biomédicos devido ao risco de infecções virais. Logo, a produção do AH por processos fermentativos vem sendo estudada e proposta como opção aos

processos convencionais de extração, apresentando possibilidades de maiores rendimentos e aplicações (CHONG et al., 2005).

3.4 PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR *STREPTOCOCCUS*

O AH é sintetizado como uma cápsula extracelular por *Streptococcus* dos grupos A e C de Lancerfield, em particular *Streptococcus equi* e *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus*. O grupo A é considerado como patógeno humano e o grupo C, patógeno de animais (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009). Análises microscópicas dessas bactérias sugerem que estas são células esféricas ou ovóides tipicamente arranjadas em pares ou cadeias circundadas por uma cápsula celular (CHONG et al., 2005) (Figura 5).

Figura 5 - Micrografia eletrônica de *Streptococcus zooepidemicus* obtidas no final da fase exponencial de crescimento em microscópio eletrônico de transmissão



Fonte: Chong et al. (2005)

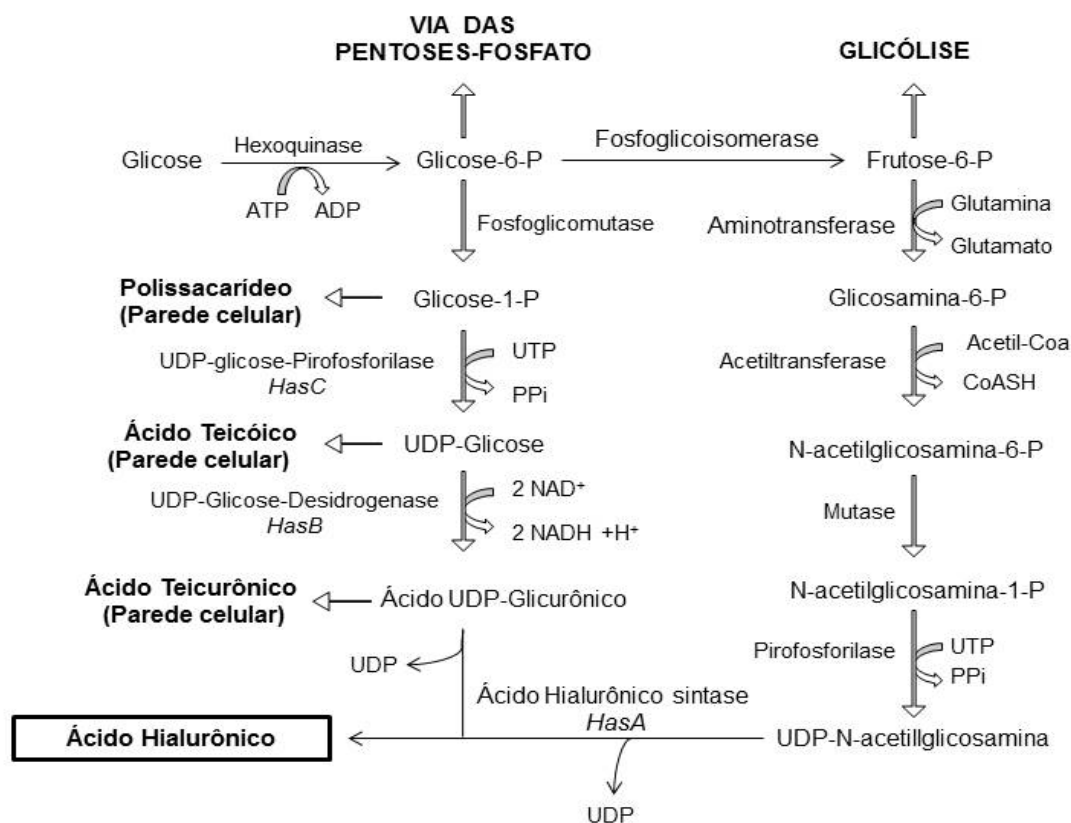
O AH é produzido como um fator de virulência por esses microrganismos, que são bactérias Gram-positivas, catalase negativas, anaeróbias facultativas com algumas estirpes aerotolerantes, que não esporulam e produzem ácido láctico como subproduto do catabolismo da glicose (CHONG et al., 2005). Além disso, são β -hemolíticos por exibirem β -hemólise pela estreptolisina quando cultivados em placas de ágar sangue. Embora a correlação entre a capacidade de produção da estreptolisina e a patogenicidade do microrganismo não seja claramente entendida, o AH para aplicações médicas ou cosméticas não pode estar

contaminado com essa proteína (THONARD; MIGLIORE; BLUSTEIN, 1963; WOOLCOCK, 1974).

A partir da década de 80, mutantes de várias cepas foram isolados com a finalidade de produzir AH livre de hialuronidase, enzima que despolimeriza o AH, e de estreptolisina, facilitando o controle do tamanho do polissacarídeo produzido e garantindo sua qualidade. Logo, a utilização de mutagênese química seguida por um esquema de seleção tem sido realizada com sucesso para a obtenção de mutantes não-hemolíticos e hialuronidase negativa (KIM et al., 1996).

Para a síntese do AH, células bacterianas mobilizam os genes *hasA*, *hasB* e *hasC*, os quais estão arrançados em um único operon denominado de *has*. Estes genes são responsáveis por codificar as enzimas AH sintase, UDP-glicose desidrogenase e UDP-glicose pirofosforilase, respectivamente (YAMADA; KAWASAKI, 2005). A via metabólica de biossíntese do AH por *Streptococcus ssp.* é apresentada na Figura 6.

Figura 6 - Via metabólica de biossíntese do ácido hialurônico por *Streptococcus ssp.*



Fonte: Adaptado de Chong et al. (2005)

As unidades de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina que constituem a molécula de AH são derivadas de glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, respectivamente. A glicose-6-fosfato é um intermediário comum na produção de polissacarídeos de estocagem em muitos organismos. A enzima α -fosfoglicomutase (EC 5.4.2.2) converte glicose-6-fosfato a glicose-1-fosfato em uma reação reversível. A enzima UDP-glicose pirofosforilase (EC 2.7.7.9), por sua vez, catalisa a reação de UTP e da glicose-1-fosfato para produzir o açúcar nucleotídeo UDP-glicose. Por fim, o ácido UDP-glicurônico é obtido por oxidação específica do grupo álcool primário de UDP-glicose pela ação de UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22) (CHONG et al., 2005).

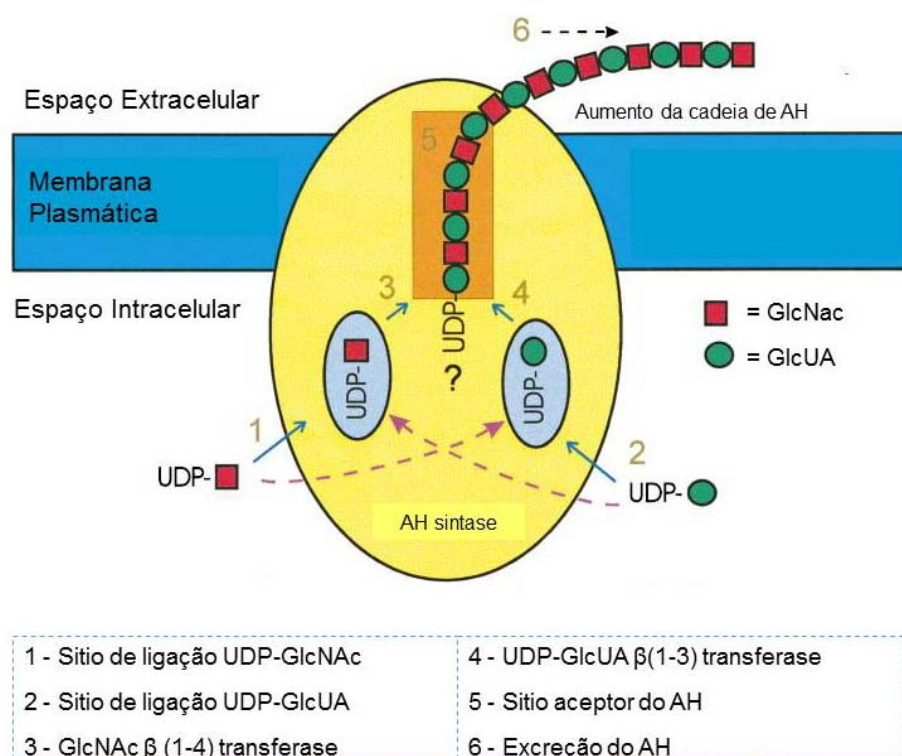
A via originada da frutose-6-fosfato está envolvida na produção de aminoaçúcares. A transferência do grupo amino da glutamina para a frutose-6-fosfato por uma aminotransferase (EC 2.6.1.16) produz glicosamina-6-fosfato. A transferência do grupo acetil por uma acetiltransferase (EC 2.3.1.4) forma N-acetilglicosamina-6-fosfato. Essa etapa consome energia, uma vez que a hidrólise da ligação tioéster na molécula de acetil-CoA libera energia equivalente à hidrólise de ATP. O rearranjo do grupo fosfato por uma mutase (EC 5.4.2.3) gera N-acetilglicosamina-1-fosfato a partir de N-acetilglicosamina-6-fosfato. Logo, a enzima pirofosforilase (EC 2.7.7.23) adiciona UDP para obtenção de UDP-N-acetilglicosamina (CHONG et al., 2005).

Esse processo de síntese do AH requer 4 moles de ATP para produzir 1 mol da unidade dissacarídica de AH, sendo 2 moles consumidos nas duas reações mediadas pela glicoquinase para fornecer as hexoses precursoras fosforiladas para cada ramificação da via biossintética e os outros 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 sintetizado (YAMADA; KAWASAKI, 2005).

A enzima AH sintase, associada à membrana celular, polimeriza as unidades de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina resultando na molécula de AH (DOUGHERTY; RIJN, 1993; CHONG et al., 2005). A elongação do polímero através desta enzima permite que o AH apresente alta massa molar, sendo este exportado através da membrana até o espaço extracelular para formar a cápsula bacteriana (WEIGEL; HASCALL; TAMMY, 1997).

Tlapak-Simmons et al. (1999) apresentaram em seus estudos um modelo teórico para a elongação da cadeia do AH no interior da membrana plasmática (Figura 7). O diagrama apresenta a enzima AH sintase ligada à membrana plasmática e os seis passos requeridos para a produção de AH. A enzima apresenta 2 sítios de ligações distintos, onde 1 recebe a unidade UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc) e 2 o ácido UDP-glicurônico (UDP-GlcUA). Posteriormente, essas unidades são ligadas pela ação das enzimas GlcNAc β (1-4) em 3 e UDP-GlcUA β (1-3) transferase em 4. A unidade dissacarídica do AH é ligada a um terceiro sítio, 5. Esse processo pode ocorrer repetidas vezes podendo o polímero alongar até um comprimento de 40.000 monossacarídeos ou mais. Por fim, o polissacarídeo é excretado através da membrana até o espaço extracelular para formar a cápsula bacteriana, 6 (TLAPAK-SIMMONS et al., 1999).

Figura 7 - Esquema da elongação da cadeia do AH na membrana plasmática



Fonte: Adaptado de Tlapak-Simmons et al. (1999)

A massa molar do AH produzido pode ser alterada pelo tempo de meia vida da AH sintase, redução do crescimento microbiano, aumento do fluxo das fontes para síntese de AH e aumento da eficiência da energia celular. A melhor

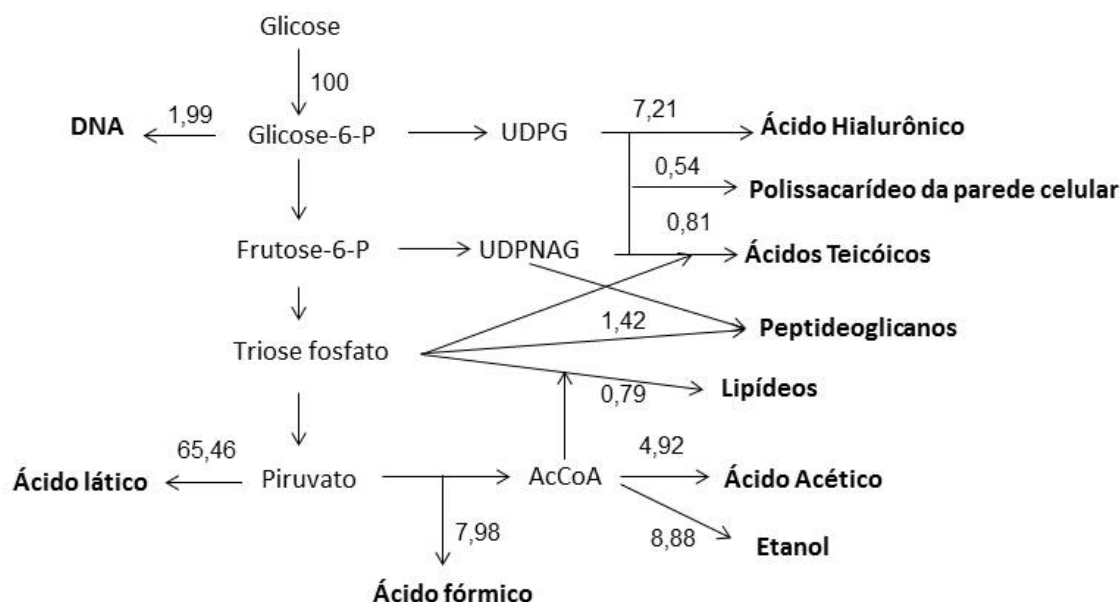
estratégia para o aumento da massa molar, portanto, é a combinação destas possibilidades (CHONG; BLANK, 1998).

Armstrong e Johns (1997) apresentaram dois fatores como determinantes para o controle da massa molar. Primeiro, as células bacterianas podem proceder o alongamento da cadeia sem interrupção até o substrato ou fontes de energia se esgotarem. Segundo, o término pode ser sinalizado por alterações transientes em certos metabólitos. Mausolf (1988) sugere que uma alta concentração de ATP e, ou, uma baixa concentração de UDP-N-acetilglicosamina conduzem a fosforilação do receptor e subsequente liberação de AH para o meio. Além disso, tem-se que o balanço apropriado na síntese das unidades de UDP-N-acetilglicosamina e ácido UDP-glicurônico e o equilíbrio da taxa glicolítica e taxa de síntese de AH também são importantes para obter uma alta massa molar do polímero (JAGANNATH; RAMACHANDRAN, 2010).

Além de fornecer os precursores para a síntese de AH, as vias metabólicas provenientes da glicose-6-fosfato e da frutose-6-fosfato fornecem constituintes estruturais da parede celular bacteriana como peptidoglicanos, ácidos teicóicos e polissacarídeos diversos (YAMADA; KAWASAKI, 2005). Armstrong (1997) observou que a produtividade do AH e sua massa molar foram inversamente proporcionais à taxa de crescimento celular. Contudo, esta relação negativa ocorre somente quando a inibição do crescimento não está associada com assimilação reduzida de glicose. Em condições severas suficientes para inibir o consumo de glicose, primeiro a produtividade e, em seguida a massa molar do AH diminuem (CHONG et al., 2005).

Resultados obtidos por Chong e Nielsen (2003) indicaram que a bactéria do gênero *Streptococcus* apresenta metabolismo heterolático em que converte aproximadamente 85% da glicose em ácidos láctico, fórmico e acético, e etanol, 10% em ácido hialurônico e 5% em biomassa (Figura 8). O crescimento das células compete com a síntese de AH pela fonte de carbono e energia, enquanto que o acúmulo de ácido láctico pode inibir o crescimento microbiano e a síntese de AH (LIU et al., 2011). Chong e Nielsen (2003) observaram que o redirecionamento do fluxo de carbono do ácido láctico para o ácido acético apresenta efeito positivo sobre a síntese de AH, pois a produção de ácido acético gera ATP, necessário para a síntese do polímero.

Figura 8 - Fluxo de carbono baseado em 100 C - mol de glicose consumida. Fluxos foram estimados a partir das alterações nas concentrações de metabólitos durante a fase exponencial de crescimento, utilizando modelo de fluxo metabólico. O balanço de carbono foi próximo de 98,5% e contribuições do metabolismo de aminoácidos foram desconsideradas. UDPG: UDP-ácido glicurônico, UDPNAG: UDP-N-acetilglicosamina, AcCoA: aceti-CoA.



Fonte: adaptado de Chong e Nielsen (2003)

3.4.1 Fatores que Interferem a Produção de Ácido Hialurônico

O processo fermentativo para a produção de AH pode ser afetado pela temperatura, pH, agitação, aeração, entre outros fatores que influenciam significativamente na produção. Tradicionalmente o polímero é produzido por fermentação em batelada, em temperaturas próximas a 37°C e pH 7,0 (LIU et al., 2011).

A fermentação contínua pode ser uma alternativa para aumentar a produção do polímero, reduzir os custos e diminuir a polidispersidade observada durante processos em batelada, devido às mudanças na taxa de crescimento (ARMSTRONG; JOHN, 1997). Contudo, os processos contínuos apresentam restrições no que diz respeito à sua baixa produtividade volumétrica, o que justifica o amplo emprego de processos em batelada na produção industrial do AH (CHONG et al., 2005).

A combinação de um sistema em batelada com batelada alimentada foi testada por Liu et al. (2008b), resultando em um aumento de 32% em relação à

produção em batelada. Esses autores observaram que o sistema em batelada favorece a síntese de AH enquanto em batelada alimentada tem-se um aumento no crescimento celular. Logo, utilizaram o sistema em batelada alimentada durante 0-8 horas com a concentração de 1 g.L^{-1} de sacarose, seguido por um processo em batelada durante 8-20 horas utilizando a concentração de sacarose inicial de 15 g.L^{-1} . Segundo os autores, o aumento na produção de AH quando utilizado um sistema com duas fases, batelada e batelada alimentada, ocorreu em resposta ao decréscimo da inibição do crescimento celular e ao aumento do fluxo de carbono para a síntese de AH.

A temperatura é um fator que influencia no crescimento celular e na produção e características do AH. Armstrong e Johns (1997) observaram aumento no rendimento e massa molar de AH em temperaturas entre 32°C a 35°C , enquanto a velocidade específica de crescimento foi maior em 40°C . Isto pode ser justificado pela competição por fontes de energia entre as vias catabólicas, anabólicas e de síntese de AH, que ocorrem durante a fase exponencial de crescimento. Quando a velocidade de crescimento microbiano é baixa, moléculas precursoras, como glicose e glutamina podem estar disponíveis para a síntese de AH. Kim et al. (1996) observaram ainda que em temperaturas inferiores a 37°C e pH ótimo em torno de 7,0, ocorreu uma redução na massa molar do AH produzido por mutantes de *Streptococcus equi*. Contudo, Khue e Vo (2013) analisaram o efeito da temperatura por metodologia estatística e observaram uma maior produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 43079 a 40°C .

O pH influencia na síntese de AH por *S. zooepidemicus* e foi avaliado por Johns, Goh e Oeggerli (1994), que verificaram maiores produções em pH $6,7 \pm 0,2$, o que pode ser relacionado ao pH ótimo de polimerização da AH sintase, que é próximo de 7,1 (STOOLMILLER; DORFMAN, 1969). Embora o pH exerça uma influência considerável na taxa de produção e rendimento do biopolímero, Armstrong e John (1997) observaram pouca interferência na massa molar do AH produzido em pH variando de 6,3 a 8,0. Liu et al. (2008a) investigaram uma estratégia de cultivo de *S. zooepidemicus* WSH-24 sob estresse alcalino intermitente (pH 7,0-8,5) a 37°C e taxa de aeração 2 L.min^{-1} , o que aumentou a produção do AH de 5 g.L^{-1} (pH 7,0) para $6,5 \text{ g.L}^{-1}$. Este comportamento pode ser explicado pela exposição do microrganismo a condições de estresse, situação em

que as células produzem uma cápsula de AH como uma proteção ao meio ácido ou alcalino (PIRES; SANTANA, 2010).

A agitação vigorosa imposta à produção de AH aumenta a transferência de massa durante o cultivo, ainda que a cadeia polimérica possa ser suscetível à tensão mecânica (ARMSTRONG; JOHN, 1997). Um estudo mostrou que diferentes níveis de agitação (300 a 1000 rpm) não afetaram a massa molar do AH produzido por *S. zooepidemicus*, sugerindo que as moléculas de AH são resistentes as forças cisalhantes (ARMSTRONG; JOHN, 1997). Aroskar, Kamat S. D. e Kamat D. V. (2012a) avaliaram fatores operacionais para a produção do AH por *S. zooepidemicus* ATCC 39920 e descreveram como condições ótimas pH 7,0; 90 rpm e 37°C.

O AH pode ser produzido tanto em anaerobiose quanto em aerobiose, sendo a última condição mais favorável para a obtenção de AH de maior massa molar. Assim como sugerido para as condições de estresse em meio ácido ou alcalino, condições aeróbias estimulam a produção de AH por um mecanismo protetor das células (ARMSTRONG; JOHN, 1997). Em condições anaeróbias, a produção de AH varia na faixa de 0,3 a 1,0 g.L⁻¹ (THONARD; MIGLIORE; BLUSTEIN, 1963). O AH obtido nessas condições geralmente possui massa molar média de 7×10⁵ Da ou menor. Sob condições aeróbias, um produto com maior massa molar (cerca de 2×10⁶ Da ou mais) pode ser obtido com produção equivalente (AKASAKA;KOMASAKI; ARAI, 1989). Huang, Chen S. J. e Chen T. L. (2006) avaliaram a função do oxigênio dissolvido e da agitação na produção de AH por *S. zooepidemicus* ATCC 39920 e sugeriram que a função do oxigênio na síntese de AH não é limitante, mas sim estimulante. Logo, determinaram o nível crítico de oxigênio dissolvido para produção de AH em 5% de saturação do ar.

3.4.2 Meio de Cultivo para Produção de Ácido Hialurônico

Streptococcus são bactérias lácticas que requerem uma alta demanda nutricional para crescimento, principalmente em relação ao nitrogênio orgânico rico em aminoácidos, vitaminas e bases nucleotídicas. De modo geral, os meios de produção incluem extratos de levedura, peptonas ou hidrolisados de caseína como fonte de nitrogênio e sais de magnésio e fosfatos (ARMSTRONG; COONEY; JOHNS, 1997). O rendimento de AH nas fermentações bacterianas são

relativamente baixos (0,1g/g de glicose) e os requerimentos nutricionais influenciam na economia da produção em grande escala (CHONG; BLANK, 1998).

A fonte de carbono mais utilizada para a produção de AH microbiano é a glicose (KIM et al., 1996; ARMSTRONG; COONEY; JOHNS, 1997; OGRODOWSKI; HOKKA; SANTANA, 2005; CHEN et al., 2009; IM et al., 2009; PIRES; SANTANA, 2010). A concentração inicial da glicose foi descrita como o fator que apresentou maior efeito na massa molar do AH produzido por *S. zooepidemicus* (ARMSTRONG; JOHN, 1997). Os autores sugerem que quando as unidades UDP-GlcUA e UDP-GlcNac, derivadas da glicose, estão presentes em alta concentração (40 g.L^{-1}) ocorre um alongamento da cadeia de AH e um crescimento diáuxico observado após 7 horas de cultivo. Embora a massa molar tenha sido maior em concentrações de glicose mais elevadas, o rendimento de AH foi inferior devido às limitações de transferência de massa decorrentes do aumento da viscosidade do meio de cultivo que impedem a homogeneidade do meio no reator.

Pires e Santana (2010) avaliaram a concentração inicial de glicose por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. Baseados nas alterações metabólicas, os autores verificaram que o crescimento celular e a produção de AH são fortemente dependentes da concentração inicial de glicose quando o cultivo é realizado em biorreator com aeração forçada. Contudo, em cultivos realizados em agitador orbital nas concentrações de glicose acima de 5 g.L^{-1} , a produção de ácido hialurônico se manteve constante.

Chong e Nielsen (2003) compararam o metabolismo do *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 em meio contendo glicose e maltose e constataram uma maior eficiência de conversão da fonte de carbono em ácido hialurônico quando utilizaram maltose, 107 mg.g^{-1} , em relação a glicose, 88 mg.g^{-1} . Os autores explicam que em meio contendo maltose ocorreu maior produção de ácido acético, e com isso, houve um acréscimo na taxa de ATP disponível para a síntese de AH. Aroskar, Kamat S. D. e Kamat D. V. (2012b) obtiveram uma produção de $0,92 \text{ g.L}^{-1}$ de AH quando utilizaram maltodextrina comparado a $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ em meio contendo glicose.

Outro fator nutricional bastante estudado são as fontes de nitrogênio orgânico que fornecem grande parte do carbono necessário para a biossíntese celular (ARMSTRONG; COONEY; JOHNS, 1997). Im et al. (2009) avaliaram diferentes fontes de nitrogênio para produção de AH em *Streptococcus sp.* ID102 e

obtiveram maior produção de AH em meio contendo extrato de levedura e peptona de caseína. Chen et al. (2009) avaliaram a concentração de extrato de levedura (5; 10; 15 g.L⁻¹) fixando a glicose em 20 g.L⁻¹ e observaram um aumento na produção de ácido hialurônico na concentração de 10 g.L⁻¹. Lai et al. (2011) investigaram o efeito da razão carbono: nitrogênio (C/N) em pH 7,0 para a produção microbiana de AH e encontraram um meio balanceado com razão ideal de 2,5:1 (50 g.L⁻¹ de glicose : 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g.L⁻¹ de triptona de soja) para o *S. zooepidemicus* ATCC 39920.

Aminoácidos e ácidos orgânicos também influenciam o metabolismo de *Streptococcus* e, conseqüentemente, a produção de ácido hialurônico. A adição de glutamina no meio de cultivo é conhecida por aumentar a produção do polímero (IM et al., 2009; AROSKAR, KAMAT, S. D.; KAMAT, D.V, 2012b; SHAH; BADLE; RAMACHANDRAN, 2013), devido a esta favorecer a síntese de UDP-N-acetilglicosamina, unidade precursora para produção de ácido hialurônico. Aroskar, Kamat S. D. e Kamat D. V. (2012b) observaram um aumento de 0,7 para 1,0 g.L⁻¹ quando adicionado glutamina e arginina na concentração de 2,0 g.L⁻¹. Im et al. (2009) estudaram dezessete aminoácidos e vinte e três ácidos orgânicos e descreveram um aumento de 20% na produção de AH, quando adicionado ao meio 0,04% de glutamina, 0,06% de glutamato e 0,02% de ácido oxálico.

Armstrong, Cooney e Johns (1997) avaliaram os requerimentos nutricionais para o crescimento e síntese de AH por *S. zooepidemicus* ATCC 35246 em condições anaeróbias e definiram 12 aminoácidos essenciais (glutamina, arginina, lisina, cisteína, isoleucina, tirosina, metionina, histidina, valina, fenilalanina, leucina e triptofano). Porém, os autores observaram menor velocidade de crescimento em meio quimicamente definido contendo os 12 aminoácidos do que em meio complexo com extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Segundo os autores, certos aminoácidos competem pelo mesmo sistema de transporte e a presença de peptídeos no extrato de levedura permite rotas alternativas para a assimilação de aminoácidos. O transporte de peptídeos pode ser mais eficiente que o transporte de aminoácido individual.

Adicionalmente, os macronutrientes, tais como magnésio, potássio e elementos-traços como ferro, zinco, manganês, molibdênio, cobalto, cobre e cálcio, são fatores nutricionais importantes para o cultivo de *S. zooepidemicus* (PIRES; EGUSHI; SANTANA, 2010). Conforme descrito na literatura, magnésio e manganês

atuam como cofatores de glicosiltransferases responsáveis pela síntese da cadeia repetida de dissacarídeos (DEANGELIS, 2002). A atividade da maioria das glicosiltransferases depende de um cátion divalente, que contribui para a ligação dos açúcares-nucleotídeos devido à estabilização da conformação da fração pirofosfato (PETROVÁ; KOCA; IMBERTY, 2001). Além disso, cátions divalentes, como o cálcio, são importantes na conformação helicoidal da molécula de AH (WINTER; ARNOTT, 1977). Por outro lado, Tlapak-Simmons, Baron e Weigel (2004) observaram que cátions monovalentes, como sódio e potássio, inibem a atividade da AH sintase prejudicando a produção de AH.

Pires, Eguchi e Santana (2010) estudaram o efeito de diversos íons no meio de fermentação comparando um meio suplementado com um controle não suplementado. Os autores concluíram que a adição dos íons no meio favoreceu apenas o crescimento celular e não a produção de AH por *S. zooepidemicus* ATCC 39920. Im et al. (2009) avaliaram a adição de íons minerais na produção de AH pelo *Streptococcus sp.* ID9102 e obtiveram maiores rendimentos do polímero quando em meio suplementado com $MnSO_4$ e KH_2PO_4 . Aroskar, Kamat S. D. e Kamat D. V. (2012b) observaram efeito positivo na produção do AH por *S. zooepidemicus* ATCC 39920 quando o meio foi suplementado com $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Contudo, a adição de manganês, ferro, cobre e zinco não apresentou efeito significativo.

Na tentativa de reduzir custos, trabalhos recentes preocupam-se em utilizar substratos alternativos como fontes nutricionais para a produção do polímero por fermentação. Pires et al. (2010) utilizaram derivados agroindustriais, tais como hidrolisado de proteína de soja, concentrado proteico de soro de leite, suco de caju e milhocina para a produção de AH por *S. zooepidemicus* ATCC 39920. Dentre estes, têm-se que o suco de caju, suplementado com extrato de levedura, mostrou-se um meio promissor para a produção de AH, atingindo $0,89 \text{ g.L}^{-1}$. Posteriormente, Macedo e Santana (2012) utilizaram o bagaço de caju em fermentação no estado sólido para a produção de AH por *S. zooepidemicus* ATCC 39920, obtendo produtividade de $0,28 \text{ mg.g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Vázquez et al. (2010) estudaram a produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* ATCC 35246 em meio contendo água residual do tratamento de mexilhões e peptona de atum, obtendo $2,46 \text{ g.L}^{-1}$ do polímero e redução de 50% no custo de produção. Izawa et al. (2010) avaliaram a produção de ácido hialurônico por *S. thermophilus* 2084 em fermentação com leite e observaram que a adição de peptona de soja gerou uma produção de $0,21 \text{ g.L}^{-1}$ de

ácido hialurônico. A Tabela 2 apresenta diferentes condições de cultivo para a produção e massa molar de AH por espécies de *Streptococcus zooepidemicus*.

Tabela 2 - Produção e massa molar do AH em diferentes condições de cultivo por espécies de *Streptococcus zooepidemicus*.

Microrganismo	Modo de Fermentação	Meio de Cultivo	Parâmetros de Aeração, pH e Temperatura	Produção de AH e Massa Molar	Referência
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> WSH-24	Batelada 4 L	Extrato de levedura, 25,0 g.L ⁻¹ ; sacarose 70,0 g.L ⁻¹	200rpm; 0,5 vvm; pH 7,0; 37°C	[AH]: 6,70 g.L ⁻¹ MW: n.d	LIU et al., 2009
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada 1,5 L	Glicose, 20 g.L ⁻¹ ; extrato de levedura, 10 g.L ⁻¹	300rpm; 20% OD; pH 7,0; 37°C	[AH]: 2,45 g.L ⁻¹ MW: n.d	CHEN et al., 2009
<i>Streptococcus</i> sp. ID9102 (KCTC1139BP)	Batelada 45 L	Glicose, 40,0 g.L ⁻¹ ; extrato de levedura, 7,5 g.L ⁻¹ ; peptona de caseína, 10,0 g.L ⁻¹	400 rpm; 0,5 vvm; pH 7,0; 36°C	[AH]: 6,94 g.L ⁻¹ MW: 5,90 x 10 ⁶ Da	IM et al., 2009
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada 2 L	Glicose, 20,0 g.L ⁻¹ ; extrato de levedura, 10,0 g.L ⁻¹	300 rpm; 1 vvm; pH 7,0; 37°C	[AH]: 2,15 g.L ⁻¹ MW: n.d	WU et al., 2009
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada 2,5 L	Meio quimicamente definido	400 rpm; 1 vvm; pH 7,0; 37°C	[AH]: 3,66 g.L ⁻¹ MW: 3,80 x 10 ⁶ Da	JAGANNATH; RAMACHANDRAN, 2010
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada 1,5 L	Glicose, 40,0 g.L ⁻¹ ; extrato de levedura, 10,0 g.L ⁻¹	300 rpm; 1,3 vvm; pH 7,0; 37°C	[AH]: 1,80 g.L ⁻¹ MW: 2,52 x 10 ⁶ Da	DON; SHOPARWE, 2010
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada 2,5 L	Glicose, 25,0 g.L ⁻¹ ; extrato de levedura, 60,0 g.L ⁻¹	250 rpm; 2 vvm; pH inicial 7,5; 37°C	[AH]: 1,21 g.L ⁻¹ MW: 4,00 x 10 ⁷ Da	PIRES; SANTANA, 2010
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada 50 mL	Glicose, 25,0 g.L ⁻¹ ; extrato de levedura, 60,0 g.L ⁻¹	150 rpm; pH inicial 7,5; 37°C	[AH]: 1,03 g.L ⁻¹ MW: 3,30 x 10 ⁷ Da	PIRES; EGUCHI; SANTANA, 2010
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada 100 mL	suco de caju, 45 g.L ⁻¹ de glicose; extrato de levedura 54 g.L ⁻¹	150 rpm; pH inicial 7,5; 37°C	[AH]: 0,89 g.L ⁻¹ MW: 1,84 x 10 ⁴ Da	PIRES et al., 2010

<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 35246	Batelada 1,8 L	Água residual do processamento de mexilhões, 50,0 g.L ⁻¹ ; peptona de atum, 8,0 g.L ⁻¹	500 rpm; pH 6,7; 37°C	[AH]: 2,46 g.L ⁻¹ MW: 2,50 x 10 ⁶ Da	VÁZQUEZ et al., 2010
<i>Continuação</i>					
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada 1 L	Glicose, 50,0 g.L ⁻¹ ; extrato de levedura, 10,0 g.L ⁻¹ ; triptona de soja, 10,0 g.L ⁻¹	300 rpm; pH inicial 7,0; 37°C	[AH]: 2,44 g.L ⁻¹ MW: 4,36 x 10 ⁶ Da	LAI et al., 2011
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> MTCC 3523	Batelada 100 mL	Glicose, 40,5 g.L ⁻¹ ; peptona de soja, 51,2 g.L ⁻¹	200 rpm; pH inicial 7,0; 37°C	[AH]: 0,80 g.L ⁻¹ MW: n.d	PATIL, KAMALJA; CHAUDHARI, 2011
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada 50 mL	Glicose, 30,0 g.L ⁻¹ ; peptona bacteriológica, 10,0 g.L ⁻¹ ; extrato de levedura, 5,0 g.L ⁻¹	90 rpm; pH inicial 6,8; 37°C	[AH]: 0,70 g.L ⁻¹ MW: n.d	AROSKAR; KAMAT S, D.; KAMAT D. V., 2012
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada 100 mL	Glicose, 25,0 g.L ⁻¹ ; peptona de soja, 33,5 g.L ⁻¹	150 rpm 37°C	[AH]: 0,30 g.L ⁻¹ MW: n.d	BENEDINI; SANTANA, 2013
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 43079	-	Glicose, 40,0 g.L ⁻¹ ; extrato de levedura, 10,0 g.L ⁻¹ ; extrato de carne, 20,0 g.L ⁻¹	40°C	[AH]: 0,04 g.L ⁻¹ MW: n.d	KHUE; VO, 2013
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada 1,2L	Glicose, 30 g.L ⁻¹ ; extrato de levedura, 10 g.L ⁻¹	1 vvm; 400 rpm; pH 7,0 37 °C	[AH]: 5,0 g.L ⁻¹ MW: 3,0 x 10 ⁶ Da	SHAH; BADLE; RAMACHANDRAN, 2013
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> 3523-7	Batelada 100 mL	Glicose, 60,0 g.L ⁻¹ ; extrato de levedura, 4,0 g.L ⁻¹	pH 7,0	[AH]: 1,39 g.L ⁻¹	KOTRA et al., 2013

3.5 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE AH

Os processos de separação do AH do meio de fermentação envolvem precipitação com álcoois, assim como era praticado nos procedimentos originais de preparo do ácido hialurônico. Um dos protocolos mais utilizados hoje em dia é o sugerido por Nimrod et al. (1988), que descrevem o procedimento de separação e pré-purificação de AH a partir do sobrenadante do meio de cultura com a adição de etanol na relação volumétrica de 1,5 volumes de etanol para 1 volume

de sobrenadante. Após a precipitação e centrifugação, Nimrod et al. (1988) propuseram a ressolubilização do precipitado com NaCl (0,15 M).

Seguindo a inovação de John Scott que sugeriu a utilização de detergentes para a precipitação do AH (LAURENT, 2002), Brown, Ruiz e Rinj (1988) adicionaram, no final da fermentação, lauril sulfato de sódio (LSS) para liberar o AH das células. A adição de um detergente catiônico, brometo de hexadeciltrimetilamônio, precipitou o AH e o LSS inicialmente adicionado. O precipitado foi coletado por centrifugação, solubilizado em cloreto de cálcio e novamente centrifugado para remover os contaminantes celulares e os detergentes. O AH do sobrenadante foi precipitado com etanol e isopropanol, centrifugado e lavado para a obtenção do produto puro.

Laurent (2002) descreveu o procedimento que inclui a precipitação com álcoois ou acetona em uma etapa posterior à de remoção de proteínas por desnaturação ou digestão proteolítica. Este autor ainda afirma que técnicas mais sofisticadas de separação, tais como eletroforese e cromatografia, são muitas vezes aplicados para a separação de ácido hialurônico em escalas menores.

No caso da produção de AH para aplicações médicas, os ácidos nucléicos devem ser removidos da solução de AH, o que é feito por adição de um tensoativo catiônico (cloreto de cetilpiridina), e o precipitado com os ácidos nucléicos são removidos por filtração (ELLWOOD et al., 1995).

Rangaswamy e Jain (2008) propuseram um novo processo de purificação de AH que compreende precipitação com propanol seguido de resuspensão com acetato de sódio, tratamento com sílica gel, tratamento com carvão ativado, ultrafiltração e esterilização por passagem em filtro de 0,22 μm . A remoção de impurezas de proteínas em 96% foi conseguido através do tratamento com gel de sílica e carvão ativado, ao invés de detergentes que requerem várias lavagens pós-tratamento, e a ultrafiltração removeu ainda mais as impurezas gerando um produto com 0,06% de proteína em relação ao AH. Esse sistema obteve um rendimento de 65% e de acordo com os autores a qualidade obtida está em conformidade com as especificações da British Pharmacopeia (BP 2003) para o AH utilizado na área médica.

3.6 APLICAÇÕES

Balazs (2004) classificou as áreas de aplicação clínica de AH conforme sua função. Denomina-se viscocirurgia a área em que o AH apresenta a função de proteger os tecidos delicados e fornecer espaço durante manipulações cirúrgicas. Viscosseparação, quando age separando superfícies do tecido conjuntivo traumatizadas por procedimentos cirúrgicos ou injúrias, no intuito de prevenir adesões e formação excessiva de cicatrizes. Viscossuplementação, quando substitui ou suplementa fluidos de tecidos. Viscoproteção, para proteger superfícies saudáveis, feridas ou injuriadas de desidratação ou agentes ambientais prejudiciais, e promover a cura de tais superfícies.

As especificidades biológicas, como capacidade de retenção de água e o comportamento viscoelástico do AH lhe conferem um perfil peculiar tornando-o apropriado para diversas aplicações médicas e farmacêuticas (KOGAN, et al., 2007).

3.6.1 Cosmético

A maior aplicação de AH está na área cosmética, sendo que em 2006 havia 1,6 milhões de produtos cosméticos contendo AH, representando um mercado de US\$ 850 milhões. Em 2007, estimou-se uma produção de 15 mil toneladas de AH por ano, destinada a esta área. A alta aplicação do AH em cosméticos se deve a suas propriedades hidratante, antioxidante e viscoelástica (KOGAN, et al. 2007; MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009).

O primeiro produto comercializado utilizando AH foi um creme para tratamento de queimaduras e úlceras denominado Hyalgan pela Fidia (Abano Terme, Italy), em 1960. Posteriormente, em 2003, o Hylaform (Genzyme) e Restylane (Q-Med) foram aprovados pela Food and Drugs Administration (FDA) aumentando assim o mercado de cosmético que utiliza esse ativo hidratante. O preço do AH empregado na área de cosmético varia de US\$ 1.000 – 2.000/Kg, dependendo da qualidade do produto (CHONG et al, 2005).

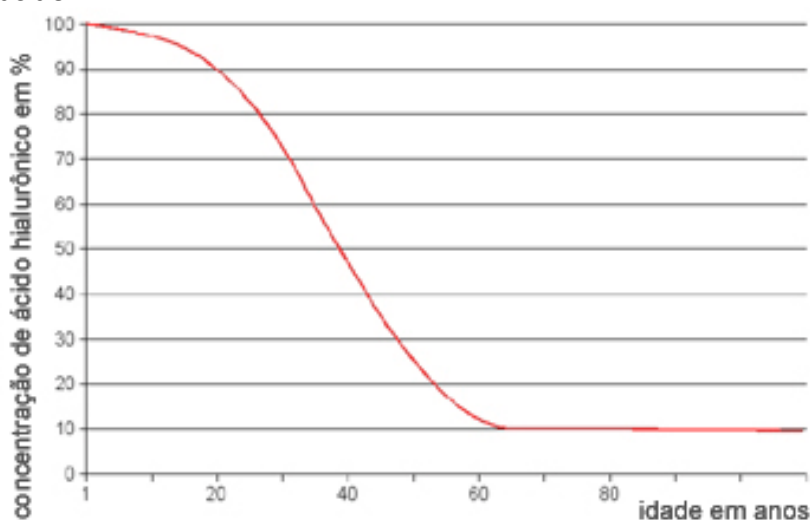
O AH é altamente hidrofílico, fornecendo à pele um aumento na capacidade de hidratação. A perda do AH natural na pele, a qual apresenta 50% do polímero encontrado no corpo humano, é considerada a principal causa de

ressecamento e perda de elasticidade associada ao envelhecimento. Logo, alguns cosméticos denominados anti-idade são formulados com AH com o intuito de evitar o aparecimento de marcas da idade (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009).

O envelhecimento cutâneo é um processo natural que conduz às alterações fisiológicas da pele. A exposição à radiação UV afeta os processos biológicos, acelerando o processo de envelhecimento. A pele velha é, tipicamente, seca e irregular, apresenta rugas e rídulhas, bem como elasticidade reduzida. O envelhecimento extrínseco, aquele que resulta da influência da exposição a fatores ambientais externos, está associado às inúmeras alterações, entre elas a expressão do AH e as suas enzimas de metabolização (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009).

O tecido conjuntivo do recém-nascido contém a maior concentração do ácido hialurônico. Com o passar dos anos esta concentração decai, sendo que na idade de mais ou menos 40 anos, a concentração do ácido hialurônico se reduz a metade da concentração máxima encontrada em recém-nascido. Por fim, aos 60 anos, a pele contém apenas 10% da concentração do AH de um recém-nascido (Figura 9) (ELKA SYSTEM, 2012).

Figura 9 - Concentração de ácido hialurônico do tecido conjuntivo de acordo com a idade



Fonte: Elka System (2012)

A secura cutânea é uma das desordens mais evidentes da pele envelhecida, por isso, um dos gestos diários essenciais para mantê-la saudável é o uso de produtos hidratantes. Hidratante é um produto cosmético capaz de restabelecer e/ou contribuir para a manutenção das características de hidratação do

extrato córneo. Estudos têm demonstrado que a aplicação tópica de um hidratante contendo AH constitui um tratamento eficaz no combate à desidratação cutânea e, por conseguinte, na prevenção do envelhecimento da pele, o que está diretamente relacionado com a sua capacidade de retenção de água e propriedades hidratantes (GUILLAUMIE et al., 2006).

O AH exibe também efeito antioxidante, pois funciona 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).

De acordo com a massa molar, a função do AH pode ser diferente. O AH de alta massa molar promove cicatrização de ferimentos (EDMONDS; FOSTER, 2006). O de baixa massa molar apresenta a capacidade de permear a barreira epidérmica e proteger o tecido granuloso contra as lesões causadas por radicais livres, enquanto o de baixíssima massa molar é altamente hidratante devido a sua alta permeação cutânea (TZELLOS et al., 2009).

3.6.2 Viscosuplementação

A segunda maior aplicação de AH ocorre na viscosuplementação em articulações afetadas por artrite. Pesquisas revelam que, em 2005, esse mercado movimentou US\$ 407 milhões no Japão, US\$ 380 milhões nos Estados Unidos e US\$ 120 milhões na Europa, sendo seu aumento crescente devido à preocupação com o uso de anti-inflamatório não esteroide (KOGAN et al., 2007; MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009).

Dentre as centenas de doenças de artrite, a osteoartrite e a artrite reumatoide são as condições crônicas mais comuns que afetam a população mundial. Embora, não se conheça a causa exata dessas patologias, a degradação de carboidratos poliméricos, principalmente AH, no fluido sinovial é observada durante o desenvolvimento destas doenças (KOGAN et al., 2007).

Buscando por tratamentos eficazes contra a artrite, em 1987, Seikagaku utilizou pela primeira vez o AH em aplicações intra-articulares. A massa molar do AH no fluido sinovial de um adulto saudável encontra-se na faixa de $2 \text{ a } 6 \times 10^6$ Da. Assim, tratamentos com preparações de maior massa molar, normalmente requerem 3 injeções durante 3 semanas enquanto medicamentos de menor massa

molar devem ser aplicados, no mínimo, 5 vezes ao longo de 5 semanas. Desta forma, administrações de preparações de AH têm melhorado os sintomas e diminuído a utilização de anti-inflamatórios em pacientes com artrite (CHONG et al., 2005).

3.6.3 Oftalmologia

O AH é um componente natural do humor vítreo e é uma macromolécula chave em oftalmologia. Devido às suas propriedades viscoelásticas, o AH é empregado em diversas cirurgias como a de catarata, glaucoma, implante de lentes intraoculares, transplante de córnea e cirurgia de retina. Na maioria destas aplicações, o AH tem a função de proteger os tecidos oculares delicados e fornecer espaço durante as manipulações cirúrgicas (KOGAN et al. 2007; MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009). Mundialmente, o valor agregado às cirurgias oftalmológicas, em 2006, foi por volta de US\$ 140 milhões e tende a crescer com o envelhecimento da população (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009).

Devido a suas propriedades viscosas, o AH tem sido incluído também na composição de colírios, aumentando seu tempo de residência no local de aplicação e, conseqüentemente, melhorando a disponibilidade do fármaco. Desta forma, o produto alivia os sintomas do olho seco causado pela redução da produção e qualidade da lágrima (TSUBOTA et al., 1999).

3.6.4 Reparo de Tecidos

Embora o AH esteja presente em quase todo o corpo, encontra-se mais concentrado nos tecidos especializados como cordas vocais, fluido sinovial, cordão umbilical e cartilagem. Nesses tecidos o AH apresenta diferentes funções incluindo viscosidade, fluxo e osmose de tecidos, absorção de impactos, cicatrização de ferimentos e preenchimento de espaço (KOGAN, et al., 2007).

Em 1996, Genzyme (Cambridge, UK) desenvolveu um filme de carboximetilcelulose revestido de AH que forma uma barreira à aderência causada por cirurgias abdominais. Aderências são faixas de tecido cicatricial fibroso que se formam em órgãos do abdômen podendo causar obstruções intestinais, infertilidade, dor pélvica crônica e complicações pós-operatória (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN,

2009). De acordo com Weigel, Hascall e Tammy (1997), o mecanismo sugerido para os efeitos derivados do AH podem ser devido à ligação entre AH e fibrina e fibrogênio, prevenindo a ação da fibrina como uma cola na formação de aderências. Essa técnica é utilizada até os dias atuais e já foi empregada em milhões de casos, sendo um mercado com potencial de movimentar US\$ 300 milhões por ano (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009).

Devido à sua presença nas cordas vocais, o AH apresenta também um amplo espectro de aplicação em otolaringologia. Suas propriedades osmóticas, viscoelásticas e de preenchimento são importantes para a voz, uma vez que afetam a espessura e viscosidade das cordas vocais. Logo, o viscoamento da corda vocal, reparo de cordas vocais injuriadas ou cicatrizadas e tratamento de insuficiência da glote são aplicações adicionais do AH (CHAN; GRAY ; TITZE, 2001).

Na área dermatológica e de cirurgia plástica, preparações de AH com ligações cruzadas são comumente empregadas para preenchimento de rugas faciais e diminuição de cicatrizes. Ao contrário de preparações baseadas em colágeno, o AH é extremamente elástico, fornecendo a elasticidade requerida pelos espaços em que é injetado (NARINS et al., 2003).

3.6.5 Farmacologia e Liberação de Fármacos

Os grupos carboxílicos de AH têm sido utilizados para criar ligações cruzadas na preparação de hidrogéis para aprisionamento de DNA e também para liberação de fármacos. O AH pode ser conjugado diretamente com o fármaco ou utilizado na preparação de microcápsulas para liberação controlada dos produtos. Essas aplicações são facilitadas pelo fato do AH possuir baixa imunogenicidade, solubilidade em água e ser metabolizado pelo corpo humano. Logo, tem sido utilizado para o melhoramento da biocompatibilidade de microesferas de quitosana, para liberação de plasmídeos e anticorpos monoclonais na transferência de genes utilizando microesferas de AH e para o melhoramento da absorção de peptídeos via nasal (ESPOSITO; ENEGATTI; CORTESI, 2005; MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009).

3.7 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO PARA OTIMIZAÇÃO DE PRODUÇÃO

A pesquisa científica tem promovido grandes avanços em todos os campos da ciência, gerando uma gama crescente de dados e informações. Logo, para a devida exploração e o correto entendimento destes resultados, a aplicação de ferramentas estatísticas torna-se indispensável (PEREIRA-FILHO et al., 2002).

Dentre as diversas ferramentas estatísticas, os sistemas de planejamento fatorial destacam-se por permitirem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais (PERALTA-ZAMORA et al., 2005). Box, Hunter W. G. e Hunter J. S. (1987) afirmam que a decisão de adotar um método de planejamento experimental para a realização de um estudo envolvendo muitas variáveis, permite a verificação dos efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre a resposta. O método também permite a modelagem empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas.

A utilização de planejamentos experimentais tem como objetivo extrair o máximo de informações úteis do sistema em estudo, realizando o número mínimo de experimentos e permitindo que o pesquisador faça conclusões apropriadas de sua investigação experimental, podendo determinar a confiabilidade dos resultados. Em trabalhos de otimização de produções microbianas, a metodologia estatística possibilita a otimização da produção dos metabólitos e o estudo da interferência sobre os diferentes fatores a serem estudados, com economia de tempo e custos do processo (BARROS NETO; SARMINO; BRUNS, 1996).

No trabalho de Im et al. (2009) foi utilizada a otimização do meio de fermentação para a produção do AH por *Streptococcus* sp. ID9102 pela metodologia do arranjo ortogonal de Taguchi. As variáveis estudadas foram extrato de levedura, peptona de caseína, K_2HPO_4 e $MgCl_2$, sendo cada componente analisado em 4 concentrações diferentes. Desta forma, utilizando o software MINITAB, os autores puderam concluir através de um planejamento contendo 16 experimentos que dentre os fatores analisados os que mais influenciaram na produção do AH foram $MgCl_2$, extrato de levedura, peptona de caseína e K_2HPO_4 , em ordem decrescente de importância. O planejamento estatístico possibilitou aumentar a produção de AH de $1,98 \text{ g.L}^{-1}$ para $2,51 \text{ g.L}^{-1}$. Logo, as condições ótimas para a produção do AH neste

trabalho foram definidas a 37°C, 150 rpm, 24 h, sendo o meio composto de 4% de glicose, 0,5% de NaCl, 1,0% de extrato de levedura, 0,25% de K₂HPO₄ e 0,05% de MgCl₂.

Patil, Kamalja e Chaudhari (2011) realizaram 2 planejamentos estatísticos. O primeiro contendo 16 experimentos e o segundo contendo 13 experimentos, com o propósito de otimizar a produção de AH utilizando *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523. As variáveis estudadas foram glicose, peptona de soja, MgSO₄.7H₂O e K₂HPO₄ e a variável resposta (AH) foi discutida pela análise de variância (ANOVA) e por superfície de resposta utilizando o software MINITAB. Por este estudo, concluíram que dentre os fatores estudados o que apresentou maior influência na produção do AH foi a glicose seguida de peptona de soja, MgSO₄.7H₂O e K₂HPO₄. Estes planejamentos possibilitaram o aumento da produção do AH em 65%. As condições ótimas de produção foram observadas a 37°C, 200 rpm por 24 h, com o meio de fermentação composto por 4,05% de glicose, 5,12% de peptona de soja, 0,075% de MgSO₄.7H₂O e 0,25% de K₂HPO₄.

Aroskar, Kamat S. D. e Kamat D. V. (2012a) utilizaram delineamento fatorial fracionário para a produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* ATCC 39920 e observaram maior significância nos fatores extrato de levedura, NaHCO₃ e KH₂PO₄, obtendo uma produção ótima de 0,70 g.L⁻¹. Khue e Vo (2013) puderam avaliar o efeito de onze fatores para a produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* ATCC 43079 com apenas 15 ensaios, utilizando o delineamento de Plackett-Burman. Neste trabalho os autores observaram que peptona, citrato de amônio, temperatura e CH₃COONa.3H₂O apresentaram alta influência na produção do polímero, atingindo produção máxima de 42,38 mg.L⁻¹.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Microrganismo

Foi utilizada a bactéria *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 obtida da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – CBMAI.

4.1.2 Reagentes

4.1.2.1 Reagente de carbazol

O reagente colorimétrico carbazol foi utilizado para avaliação da concentração de ácido hialurônico produzido. Este reagente consiste em uma solução alcoólica com 0,1 por cento de carbazol cristalino (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.). Na presença de ácidos hexurônicos previamente tratados com ácidos minerais concentrados (HCl, H₂SO₄) o reagente de carbazol possui coloração rosa que apresenta comprimento de onda máximo em $\lambda = 530$ nm.

4.1.2.2 Hialuronato de sódio

O Hialuronato de sódio, de massa molar 1,5 a $1,8 \times 10^6$ Da, produzido por *Streptococcus equi* foi utilizado como padrão para caracterização do ácido hialurônico produzido. Este foi obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

4.1.2.3 Ácidos orgânicos

Ácidos láctico, fórmico e acético, utilizados neste trabalho, foram todos de padrão analítico (P.A).

4.1.3 Meios de Cultura

4.1.3.1 Meio de preservação e inóculo

O meio de propagação utilizado foi o Brain Heart Infusion (Tabela 3) na concentração de 37 g.L⁻¹ obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

Tabela 3 - Meio Brain Heart infusion (BHI)

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Coração de boi (infusão de 250g)	5
Cérebro de bezerro (infusão de 200g)	12,5
Na ₂ HPO ₄	2,5
Glicose	2
Peptona	10
NaCl	5

4.1.3.2 Meio de fermentação

Tabela 4 - Meio de fermentação

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicose	20
Extrato de levedura	10
K ₂ HPO ₄	2,5
NaCl	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5

Fonte: Chen et al. (2009)

4.1.3.3 Derivados agroindustriais

O caldo de cana-de-açúcar foi obtido de um comerciante local em Londrina- PR, melaço de cana-de-açúcar da COROL (Cooperativa Agroindustrial de Rolândia - PR), melaço de soja da Indústria de processamento de soja IMCOPA - Importação, Exportação e Indústria de Óleos Ltda. (Cambé - PR), proteína de soja do projeto de pesquisa com o grupo Solabiá (Maringá-PR), o soro de leite da CONFEPAR (União de Cooperativas Agropecuárias do Norte do Paraná - Londrina - PR) e a milhocina da Corn Products do Brasil Ltda. (Mogi Guaçu - SP).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preservação do Microrganismo

Streptococcus zooepidemicus foi crescido no meio descrito no item 4.1.3.1 contendo 2% de ágar por 24 h a 37°C. Posteriormente, colônias foram transferidas para Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio descrito no item 4.1.3.1 e incubadas por 24 h a 37°C e 150 rpm. A biomassa foi separada do sobrenadante por centrifugação a 9956 g, 4°C por 15 min, ressuspensa e armazenada em solução salina 0,9%:glicerol 50% (v/v) a temperatura de -80°C (cultura estoque).

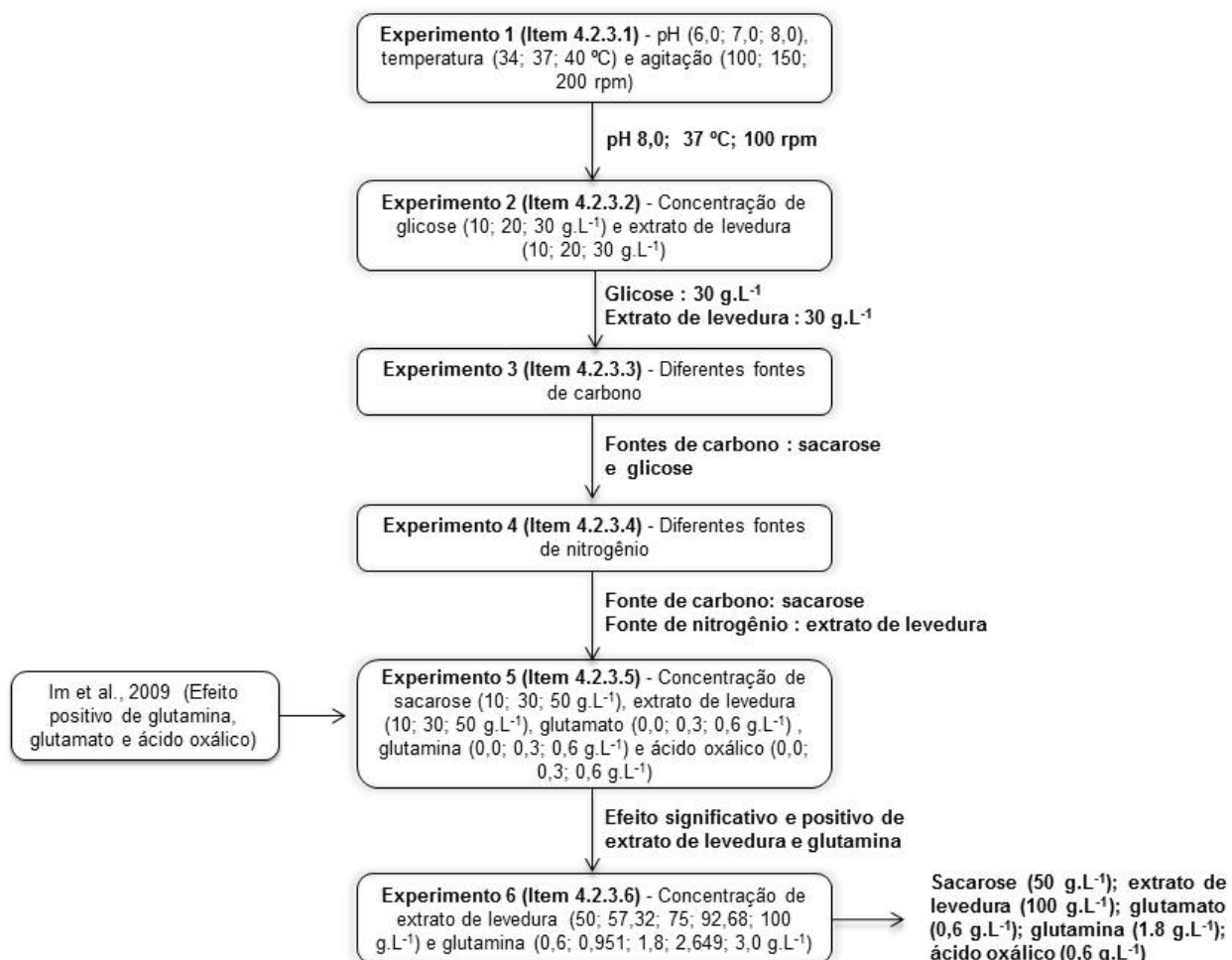
4.2.2 Preparo do Inóculo

O inóculo foi preparado transferindo 1 mL da cultura estoque para Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio descrito no item 4.1.3.1, mantido a 37°C e 150 rpm por 48 h. Para todas as fermentações o inóculo foi de 10% v/v.

4.2.3 Fermentações

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL do meio descrito no item 4.1.3.2, o qual variou de acordo com as condições estudadas, por 24 h. Temperatura, pH e agitação foram definidas de acordo com o item 4.2.3.1. As fontes de carbono foram preparadas e autoclavadas em separado e os aminoácidos esterilizados por filtração em membrana de 0,45 µm (Millipore). O cultivo foi interrompido por centrifugação a 9956 g por 15 min a 4°C. No sobrenadante foram determinados açúcares totais, produções de ácidos hialurônico, láctico, fórmico e acético. A Figura 10 apresenta o fluxograma dos experimentos realizados.

Figura 10 - Fluxograma das fermentações realizadas para produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus*.*



*Os fatores e os níveis das variáveis foram baseados na literatura e em resultados preliminares.

4.2.3.1 Estudo dos parâmetros: pH, temperatura e agitação para a produção de AH

As variáveis (X_1) pH (6,0; 7,0; 8,0), (X_2) temperatura (34; 37; 40°C) e (X_3) agitação (100; 150; 200 rpm) foram avaliadas através de um planejamento de Box-Behken 3^3 com 3 pontos centrais. Os fatores e os níveis das variáveis foram baseados na literatura. As variáveis codificadas e decodificadas estão listadas na Tabela 5. A variável resposta foi a produção de AH, sendo acompanhada a síntese de ácidos láctico, fórmico e acético.

Tabela 5 - Planejamento de Box Behnken 3^3 para avaliação da influência do (X_1) pH, (X_2) temperatura ($^{\circ}\text{C}$), e (X_3) agitação (rpm) do meio na produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus*

Ensaio (ordem padrão)*	Variáveis codificadas			Variáveis Decodificadas		
	x_1	x_2	x_3	(X_1) pH	(X_2) Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	(X_3) Agitação (rpm)
1	-1	-1	0	6,0	34	150
2	+1	-1	0	8,0	34	150
3	-1	+1	0	6,0	40	150
4	+1	+1	0	8,0	40	150
5	-1	0	-1	6,0	37	100
6	+1	0	-1	8,0	37	100
7	-1	0	+1	6,0	37	200
8	+1	0	+1	8,0	37	200
9	0	-1	-1	7,0	34	100
10	0	+1	-1	7,0	40	100
11	0	-1	+1	7,0	34	200
12	0	+1	+1	7,0	40	200
13	0	0	0	7,0	37	150
14	0	0	0	7,0	37	150
15	0	0	0	7,0	37	150

(*) Os ensaios foram aleatorizados

4.2.3.2 Avaliação da concentração de glicose e extrato de levedura para a produção de AH

Uma vez definido pH (8,0), temperatura (37°C) e agitação (100 rpm) (item 4.2.3.1.), realizou-se um estudo da concentração de (X_1) glicose (10; 20; 30 g.L^{-1}) e (X_2) extrato de levedura (10; 20; 30 g.L^{-1}) utilizando planejamento fatorial completo 3^2 com 3 pontos centrais. Os fatores e os níveis das variáveis foram baseados na literatura. As variáveis codificadas e decodificadas estão listadas na Tabela 6. A variável resposta foi a produção de AH, sendo acompanhada a síntese de ácidos láctico, fórmico e acético.

Tabela 6 – Planejamento fatorial completo 3^2 para a avaliação da concentração de (X_1) glicose e (X_2) extrato de levedura para a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus*

Ensaio (ordem padrão)*	Variáveis codificadas		Variáveis Decodificadas	
	x_1	x_2	(X_1) Glicose (g.L ⁻¹)	(X_2) Extrato de levedura (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	10	10
2	-1	0	10	20
3	-1	+1	10	30
4	0	-1	20	10
5	0	0	20	20
6	0	+1	20	30
7	+1	-1	30	10
8	+1	0	30	20
9	+1	+1	30	30
10	0	0	20	20
11	0	0	20	20

(*) Os ensaios foram aleatorizados

4.2.3.3 Influência de diferentes fontes de carbono para a produção de AH

Definida a concentração ótima de glicose em 30 g.L⁻¹ (Item 4.2.3.2), outras fontes de carbono foram testadas nesta mesma condição: sacarose, frutose, maltose, lactose, melaço e caldo de cana-de-açúcar e melaço de soja, em meio contendo 30 g.L⁻¹ de extrato de levedura, concentração definida no item 4.2.3.2. O pH foi ajustado para 8,0; a temperatura fixada em 37°C e a agitação em 100 rpm. Os ensaios foram realizados em triplicata e as variáveis respostas, biomassa, açúcares totais, produções de ácidos hialurônico, láctico, fórmico e acético foram avaliadas pelo teste de Tukey.

4.2.3.4 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio para a produção de AH

Definida a concentração ótima de extrato de levedura em 30 g.L⁻¹ (Item 4.2.3.2) outras fontes de nitrogênio foram testadas nesta mesma condição: proteína de soja, soro de leite e milhocina, em meio contendo glicose ou sacarose na concentração de 30 g.L⁻¹ de açúcares totais. O pH foi ajustado para 8,0; a temperatura fixada em 37°C e a agitação em 100 rpm. Os ensaios foram realizados

em triplicata e as variáveis resposta, biomassa, açúcares totais, produções de ácidos hialurônico, láctico, fórmico e acético foram avaliadas pelo teste de Tukey.

4.2.3.5 Avaliação da concentração de sacarose, extrato de levedura, glutamato, glutamina, e ácido oxálico na produção de AH

Neste experimento, a fonte de carbono e nitrogênio que resultaram em maior produção de AH, item 4.2.3.3 e 4.2.3.4, foram avaliadas juntamente com glutamina, glutamato e ácido oxálico. Os fatores e os níveis das variáveis foram baseados na literatura e em resultados preliminares. As variáveis (X_1) sacarose (10; 30; 50 g.L⁻¹), (X_2) extrato de levedura (10; 30; 50 g.L⁻¹), (X_3) glutamato (0,0 ;0,3; 0,6 g.L⁻¹), (X_4) glutamina (0,0 ;0,3; 0,6 g.L⁻¹) e (X_5) ácido oxálico (0,0; 0,3; 0,6 g.L⁻¹) foram estudadas por um planejamento fatorial fracionário $2^{(5-1)}$ com 4 pontos centrais com objetivo de otimizar a produção do polímero. O pH foi ajustado para 8,0; a temperatura fixada em 37°C e a agitação em 100 rpm. As variáveis codificadas e decodificadas estão listadas na Tabela 7. A variável resposta foi a produção de AH, sendo acompanhada a produção de ácidos láctico, fórmico e acético.

Tabela 7 - Planejamento fatorial fracionário $2^{(5-1)}$ 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 por *Streptococcus zooepidemicus*

Ensaio (ordem padrão)*	Variáveis Codificadas					Variáveis Decodificadas				
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	(X_1)	(X_2)	(X_3)	(X_4)	(X_5)
						Sacarose (g.L ⁻¹)	Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	Glutamato (g.L ⁻¹)	Glutamina (g.L ⁻¹)	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

4.2.3.6 Otimização da concentração de extrato de levedura e glutamina para a produção de AH

A concentração de (X_2) extrato de levedura (50; 57,32; 92,68 e 100 g.L⁻¹) e (X_4) glutamina (0,6; 0,9514; 1,8; 2,6486; 3,0 g.L⁻¹) foram avaliadas através de um delineamento composto central rotacional 2^2 com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais. Os fatores e os níveis das variáveis foram baseados na literatura e em resultados preliminares. A concentração de sacarose (50 g.L⁻¹), glutamato (0,6 g.L⁻¹) e ácido oxálico (0,6 g.L⁻¹) foram fixadas. O pH foi ajustado para 8,0; a temperatura fixada em 37°C e a agitação em 100 rpm. As variáveis codificadas e decodificadas estão listadas na Tabela 8. A variável resposta foi a produção de AH, sendo acompanhada a produção de ácido láctico, fórmico e acético.

Tabela 8 - Delineamento composto central rotacional para a otimização da concentração de (X_2) extrato de levedura e (X_4) glutamina para a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus*

Ensaio (ordem padrão)*	Variáveis Codificadas		Variável Decodificada	
	x_2	x_4	(X_2) Extrato de Levedura (g.L ⁻¹)	(X_4) Glutamina (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	57,32	0,951
2	-1	+1	57,32	2,649
3	+1	-1	92,68	0,951
4	+1	+1	92,68	2,649
5	-1,414	0	50	1,8
6	+1,414	0	100	1,8
7	0	-1,414	75	0,6
8	0	+1,414	75	3
9	0	0	75	1,8
10	0	0	75	1,8
11	0	0	75	1,8

(*) Os ensaios foram aleatorizados

Após análise estatística, foi realizado uma confirmação experimental em triplicata nas coordenadas (+1,41421; -0,707), ou seja, 100 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 1,2 g.L⁻¹ de glutamina.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Quantificação da Biomassa

A biomassa obtida após a centrifugação foi ressuspensa em salina (0,9%), determinada por turbidimetria a $\lambda=620$ nm e relacionada com a curva de biomassa em g.L⁻¹.

Para realização da curva de biomassa foi executado um cultivo em BHI por 48 h e a biomassa obtida após centrifugação, foi ressuspensa em salina 0,9%. Uma alíquota de 1 mL foi submetida a uma série de diluições para a obtenção de leituras de 0,1 a 0,9 de absorvância a $\lambda=620$ nm. Paralelamente, distribuiu-se 3 alíquotas de 1 mL em cadinhos previamente tarados. Estes foram levados à estufa (70°C), até atingir peso constante. Em seguida, os resultados foram plotados relacionando absorvância \times peso seco g.L⁻¹.

4.3.2 Quantificação de Açúcares Totais das Fermentações

Os açúcares totais foram dosados pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e as absorvâncias medidas a $\lambda=490$ nm. Para a confecção da curva padrão, foram utilizados padrões de glicose variando as concentrações entre 20 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.3.3 Quantificação de Nitrogênio Total e Nitrogênio Proteico

A determinação do nitrogênio total e nitrogênio proteico do extrato de levedura, proteína de soja, soro de leite e milhocina, utilizados no ensaio descrito no item 4.2.3.4, foi realizada pela metodologia de Kjeldahl de acordo com a técnica descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (1985) e pela metodologia de Lowry et al. (1951), respectivamente.

Para a avaliação de nitrogênio proteico através da metodologia de Lowry et al. (1951), absorvâncias foram medidas a $\lambda=660$ nm e correlacionadas com a respectiva curva de calibração, utilizando padrão de soro albumina em concentrações variando de 40 a 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.3.4 Quantificação de AH

4.3.4.1 Método colorimétrico de carbazol

O sobrenadante livre de células foi tratado com etanol na proporção de 3:1 v/v (etanol/sobrenadante). A solução foi mantida a 4°C por 24 h, centrifugada a 8784 g por 20 min e o precipitado foi redissolvido em água. A concentração de AH foi obtida utilizando o reagente Carbazol, pelo método modificado de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Em uma amostra de 0,4 mL foi adicionado 40 μL de ácido sulfâmico e 2,4 mL de solução de borato em ácido sulfúrico (0,025 M) a 100°C por 20 min. Posteriormente, 0,1 mL de solução alcoólica de Carbazol 0,1% foi adicionada à solução e novo aquecimento por 20 min a 100°C foi realizado. Após resfriada, a amostra foi lida a $\lambda=530$ nm. Um controle com o meio não fermentado foi realizado. A curva de calibração foi construída com hialuronato de sódio (Sigma-ALdrich Brasil Ltda) em concentrações variando de 50 a 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

4.3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O AH das amostras obtidas no item 4.2.3.5 e 4.2.3.6 foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando um detector de índice de refração (Shimadzu RID – 10A) e coluna OHPak SB-806M HQ 80 × 300 mm (Shodex, Japan). A análise foi conduzida a 40°C utilizando NaNO₃ 0,1 M como fase móvel a uma vazão de 1 mL.min⁻¹. Para esta análise o sobrenadante livre de células foi previamente filtrado em membranas de 0,45 µm (Millipore) e 20 µL foram injetados.

Para a confecção da curva padrão, foi utilizado o método de padronização externa, utilizando hialuronato de sódio nas concentrações entre 100 a 600 µg.L⁻¹.

4.3.5 Quantificação de Ácido Lático, Fórmico e Acético

Para a quantificação de ácidos lático, fórmico e acético, amostras do sobrenadante livre de células foram filtradas em membranas de 0,45 µm (Millipore) e injetadas (20 µL) em cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE), equipado com detector de índice de refração (Shimadzu RID – 10A) e coluna HPX – 87H de ácidos orgânicos 300 × 7,8 mm, mantida a 60°C. A fase móvel foi a solução de H₂SO₄ 0,005 mol.L⁻¹ a 0,7 mL.min⁻¹. A curva de calibração variou de 50 a 500 µg.mL⁻¹ da mistura dos padrões.

4.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram realizadas imagens através de microscopia eletrônica de varredura, por meio do microscópio Modelo Quanta 200 da FEI Philips do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UEL, capaz de chegar a uma aproximação de 50.000 vezes.

4.3.7 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 9.0 (Statsoft, Inc., USA, 2009). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

- 5.1 ARTIGO 1: “AVALIAÇÃO DE FATORES FERMENTATIVOS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS* ATCC 39920 ATRAVÉS DE DELINEAMENTOS ESTATÍSTICOS”, APRESENTADO DE ACORDO COM AS NORMAS DO PERIÓDICO APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY (ANEXO A).

- 5.2 ARTIGO 2: “APROVEITAMENTO DE FONTES AGRÍCOLAS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS* ATCC 39920”, APRESENTADO DE ACORDO COM AS NORMAS DO PERIÓDICO BIORESOURCE TECHNOLOGY (ANEXO B).

- 5.3 ARTIGO 3: “UTILIZAÇÃO DE PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS NO DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS* ATCC 39920”, APRESENTADO DE ACORDO COM AS NORMAS DO PERIÓDICO PROCESS BIOCHEMISTRY (ANEXO C).

- 5.4 RESULTADOS COMPLEMENTARES SÃO APRESENTADOS NO ANEXO G.

5.1 ARTIGO 1

Avaliação de Fatores Fermentativos para a Produção de Ácido Hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 através de delineamentos estatísticos

Nicole Caldas Pan¹; Josiane Alessandra Vignoli¹; Rui Sérgio dos Santos Ferreira da Silva²; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{1*}

Abstract Os fatores fermentativos pH (6,0; 7,0, 8,0), temperatura (34; 37; 40°C) e agitação (100, 150, 200 rpm) foram avaliados por planejamento de Box-Benhken para produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. A maior produção foi de 0,437 g.L⁻¹ em pH 8,0, 37°C e 100 rpm, sendo pH e temperatura fatores significativos (p<0,05). Em pH 6,0 foi observado um desvio do fluxo de carbono para a via heterolática. Definido pH, temperatura e agitação, estudou-se glicose (10, 20, 30 g.L⁻¹) e extrato de levedura (10, 20, 30 g.L⁻¹) por planejamento fatorial completo. A maior produção de ácido hialurônico obtida foi de 0,787 g.L⁻¹ no meio contendo 30 g.L⁻¹ de glicose e 30 g.L⁻¹ de extrato de levedura. O extrato de levedura apresentou efeito significativo (p<0,05) e o aumento de sua concentração gerou maiores produções de ácido hialurônico e ácido láctico.

Palavras-chave: Condições de cultivo. Fatores nutricionais. Ácido hialurônico, *Streptococcus zooepidemicus*. Ácidos orgânicos.

Introdução

O ácido hialurônico é um polissacarídeo linear de alta massa molar que consiste em unidades dissacarídicas polianiónicas de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina (1). As propriedades biológicas, destacando a capacidade de retenção de água e o comportamento viscoelástico lhe conferem um perfil peculiar tornando-o apropriado para diversas aplicações médicas e farmacêuticas. Dentre essas destacam-se a viscocirurgia, na qual tem como função proteger os tecidos delicados e fornecer espaço durante manipulações cirúrgicas; a viscosseparação, onde é utilizado para separar superfícies do tecido conjuntivo traumatizadas por

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 About Solution Ltda, Rua Santos, 488/41 | CEP 86.020-040 | Londrina – PR, Brasil

* Telefone do autor para correspondência +55 43 3371-4270
E-mail: macelligoi@uel.br (Maria Antonia P. C. Celligoi)

procedimentos cirúrgicos ou injúrias, no intuito de prevenir adesões e formação excessiva de cicatrizes; a viscosuplementação, quando substitui ou suplementa fluidos de tecidos e a viscoproteção para proteger superfícies saudáveis ou injuriadas de desidratação, promovendo a cura de tais superfícies (2).

A produção do ácido hialurônico por via microbiana apresenta possibilidades de elevados rendimentos com facilidade de manipulação e redução de custo, sendo assim, estudos por processos fermentativos têm sido uma proposta para a substituição aos processos convencionais de extração de tecidos animais (3,4,5). As bactérias que se destacam com potencial de produção do biopolímero são as *Streptococcus* pertencentes aos grupos A e C de Lancefield (6). Nessas bactérias a cápsula de ácido hialurônico é produzida como um fator de virulência e é excretado para o meio de cultivo possibilitando a recuperação, o controle das características do polímero e o rendimento da produção (7).

Streptococcus apresentam exigências nutricionais em relação as fontes de nitrogênio como, aminoácidos, bases nucleotídicas e vitaminas. Esses requisitos utilizados em meios de cultivo podem ser encontrados em fontes de nitrogênio complexas, como extrato de levedura e peptonas (8). A fonte de carbono é outro fator nutricional importante para a produção do polímero, sendo a mais utilizada a glicose, onde a concentração inicial no meio de cultivo é um parâmetro de relevância na produção (9,10,11,12).

Destaca-se também os parâmetros, pH, temperatura e agitação, que influenciam tanto o crescimento microbiano como a produção de ácido hialurônico (13,14). O pH e a agitação foram estudados por Johns, Goh e Oeggerli (13) que demonstraram grande efeito dessas variáveis na produção em cultivos batelada a 37°C por *S. zooepidemicus*. O pH ótimo foi de $6,7 \pm 0,2$ e taxas de agitação menores que 600 rpm conduziram ao declínio do rendimento e taxa de produção. Embora, a produção em pH neutro possa ser explicada pelo fato da enzima que catalisa a polimerização do ácido hialurônico apresentar atividade ótima em pH 7,1 (15), outros estudos verificaram que o estresse alcalino ou ácido pode aumentar a produção do polímero (4,9).

Os parâmetros físicos e químicos podem alterar o metabolismo celular da bactéria em estudo e conseqüentemente interferir no fluxo de carbono. O estudo das alterações metabólicas contribui para a manipulação das condições a serem testadas e para a compreensão de como otimizar as condições de cultivo, a

fim de aumentar a produção de ácido hialurônico (9). A bactéria *Streptococcus* apresenta metabolismo heterolático em que converte aproximadamente 85% da glicose em ácidos láctico, acético e fórmico, e etanol, 10% em ácido hialurônico e 5% em biomassa (16). O crescimento microbiano compete com a síntese de ácido hialurônico pelas fontes de carbono, enquanto o acúmulo de ácido láctico pode inibir o crescimento celular e a produção do polímero. Por outro lado, o ácido acético gerado no metabolismo libera 1 mol de ATP que é utilizado na síntese do ácido hialurônico (17).

Considerando que as condições de fermentação podem alterar o metabolismo celular levando a um aumento de produção, a otimização das condições experimentais tem sido foco de diferentes estudos que empregam os planejamentos experimentais para atingir este objetivo (18,19,20,21). Essa técnica tem como finalidade extrair o máximo de informações úteis ao sistema em estudo, realizando o menor número de experimentos e permitindo que as conclusões da investigação experimental possam ter confiabilidade dos resultados (22).

Com as inúmeras aplicações de ácido hialurônico, este trabalho teve como objetivo a produção por *S. zooepidemicus* ATCC 39920 através de delineamentos estatísticos e acompanhar a síntese dos ácidos láctico, fórmico e acético. O trabalho foi desenvolvido avaliando, pH, temperatura e agitação, e posteriormente, concentração de glicose e extrato de levedura para aumentar a produção de ácido hialurônico.

Materiais e Métodos

Microrganismo

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

Preservação do Microrganismo e Pré-inóculo

A cultura estoque foi mantida em solução salina contendo 50% de glicerol a -80°C. O pré-inóculo foi preparado transferindo 1 mL desta cultura para

Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio Brain Heart Infusion (BHI), incubado a 37°C e 150 rpm por 48 h. O inóculo foi de 10% v/v em todos os ensaios.

Fermentações para Produção de Ácido Hialurônico

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL contendo (g.L^{-1}): glicose, 20; extrato de levedura, 10; K_2HPO_4 , 2,5; NaCl, 2,0 e MgSO_4 , 1,5, por 24 h. A glicose foi autoclavada separadamente. O pH inicial do meio (6,0; 7,0; 8,0) foi ajustado antes de autoclavar, as temperaturas testadas foram de 34; 37 e 40°C e as agitações de 100; 150 e 200 rpm. Estes parâmetros foram avaliados através de planejamento de Box-Benhken. Com pH, temperatura e agitação definidos, um segundo planejamento, fatorial completo, com glicose a 10; 20 e 30 g.L^{-1} e extrato de levedura a 10; 20; 30 g.L^{-1} foi testado. Os fatores e os níveis das variáveis foram baseados na literatura. As fermentações foram interrompidas por centrifugação a 9956 g por 15 min a 4°C e do sobrenadante foram quantificados os ácidos hialurônico, láctico, fórmico e acético.

Determinações Analíticas

Concentração de Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico foi precipitado do sobrenadante com etanol na proporção de 1:3 (v/v) a 4°C por 24 h, posteriormente centrifugado a 8784 g por 20 min e do precipitado redissolvido em água foi determinada a concentração de ácido hialurônico pelo reagente de Carbazol (Filisetti-Cozzi e Carpita, modificado) (23). Em uma amostra de 0,4 mL foi adicionado 40 μL de ácido sulfâmico e 2,4 mL de solução de borato em ácido sulfúrico (0,025 M), incubada a 100°C por 20 min, resfriada e adicionado 0,1 mL de solução de Carbazol, aquecida novamente por 20 min a 100°C, resfriada e lida a 530 nm. A curva de calibração foi construída com hialuronato de sódio (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) variando de 50 a 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Concentração de Ácido Lático, Fórmico e Acético

Para a quantificação de ácidos lático, fórmico e acético, amostras do sobrenadante foram filtradas em membranas de 0,45 µm (Millipore) e injetadas (20 µL) em cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE), equipado com detector de índice de refração (Shimadzu RID – 10A) e coluna HPX – 87H de ácidos orgânicos 300 × 7,8 mm, mantida a 60°C. A fase móvel foi a solução de H₂SO₄ 0,005 mol.L⁻¹ a 0,7 mL.min⁻¹. A curva de calibração variou de 50 a 500 µg.mL⁻¹ da mistura dos padrões.

Análise Estatística

A resposta, concentração de ácido hialurônico em g.L⁻¹, foi analisada pelo programa Statistica 9.0 (Statsoft, Inc., USA, 2009) (24) para análise de variância (ANOVA) ao nível de significância de 5%, e por metodologia de superfície de resposta (MRS).

Ambos os planejamentos realizados foram baseados no modelo quadrático (Eq. 1):

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_{ii}^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (\text{Eq. 1})$$

onde Y é a variável resposta (ácido hialurônico), b₀ é o intercepto, b_i é o coeficiente para efeito linear, b_{ii} é o coeficiente para efeito quadrático, b_{ij} é o coeficiente para o efeito interação e x é o nível codificado da variável (25).

Resultados e Discussão

Avaliação do pH, Temperatura e Agitação para Produção de Ácido Hialurônico por *S. zooepidemicus*

A Tabela 1 apresenta os resultados de produção do ácido hialurônico e dos ácidos orgânicos, lático, fórmico e acético, obtidos por *S. zooepidemicus* em diferentes valores de pH, temperatura e agitação.

(Tabela 1)

A maior produção de ácido hialurônico obtida foi de 0,437 g.L⁻¹ em pH 8,0, 37°C e 100 rpm (Ensaio 6 - Tabela 1). Nos cultivos com valores de pH 6,0 (Ensaio 1; 3; 5 e 7 - Tabela 1) ocorreu uma baixa produção do polímero com 0,054; 0,024; 0,168 e 0,112 g.L⁻¹, respectivamente. Nestes ensaios não houve produção de ácido láctico, o que demonstra um desvio na via de fluxo de carbono do metabolismo homolático para a síntese de ácido fórmico e acético. Este desvio, segundo Garrigues et al. (26), ocorre para compensar uma redução na produção de energia celular (ATP). Também foi observado nos ensaios 11 e 12, impostos a pH 7,0 e 200 rpm, produção nula de ácido láctico. Liu et al. (4), em biorreator, descreveram um aumento na produção de ácido hialurônico quando *S. zooepidemicus* WSH-24 foi exposto a estresse alcalino intermitente (pH 7,0- 8,5) a 37°C. Este comportamento pode ser consequência da exposição do microrganismo sobre uma condição de estresse, no qual se produz a cápsula de ácido hialurônico como uma barreira contra o pH ácido ou alcalino do meio (9).

O efeito da temperatura sobre a produção de ácido hialurônico é observada em condições fixadas de 100 rpm e pH 7,0, em que o aumento de 34°C para 40°C diminuiu a produção do polímero de 0,409 g.L⁻¹ para 0,240 g.L⁻¹ (Ensaio 9 e 10 – Tabela1). Porém esse decréscimo não ocorre em condições de pH 7,0 e 200 rpm (Ensaio 11 e 12 – Tabela 1) ou pH 8,0 e 150 rpm (Ensaio 2 e 4 – Tabela 1). Os autores Khue e Vo (18) avaliando a produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* ATCC 43079 por ferramentas estatísticas observaram o aumento na produção de ácido hialurônico em temperatura de 40°C, tendo sido este um fator de alto impacto na produção do polímero. Trabalhos realizados com mutantes de *Streptococcus equi* afirmam que 37°C foi a temperatura ideal para o crescimento e produção de ácido hialurônico (14).

O aumento da agitação de 100 para 200 rpm não alterou a produção do polímero em pH e temperatura constantes. O efeito foi observado comparando o ensaio 5 (0,168 g.L⁻¹) com o 7 (0,112 g.L⁻¹) em pH 6,0 e 37°C, e o ensaio 6 (0,437 g.L⁻¹) com o 8 (0,434 g.L⁻¹) em pH 8,0 e 37°C. Aroskar et al. (21) avaliaram a agitação de 50 a 150 rpm e relataram um ótimo em 90 rpm para a produção do polímero por *S. zooepidemicus* ATCC 39920.

A análise de variância (Tabela 2) mostrou que o pH ($p=0,00002$) e a temperatura ($p=0,046$) são as variáveis relevantes, juntamente com a interação temperatura \times agitação ($p = 0,043$). O modelo quadrático explica 98% dos dados experimentais e a falta de ajuste não foi significativa ($p=0,062$).

(Tabela 2)

A resposta para a produção de ácido hialurônico em função do pH, temperatura e agitação pode ser estimada pela equação (2):

$$Y = 0,400 + 0,159x_1^* - 0,117x_1^{2*} - 0,028x_2^* - 0,073x_2^{2*} - 0,004x_3 + 0,005x_3^2 + 0,004x_1x_2 + 0,013x_1x_3 + 0,04x_2x_3^* \quad (\text{Eq. 2})$$

onde Y é a resposta para a produção de ácido hialurônico e x_1 , x_2 e x_3 são os valores codificados de pH, temperatura e agitação, respectivamente.

A superfície de resposta (Figura 1) demonstrou máxima produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* nas condições de pH 8,0 e temperatura de 37°C. A agitação foi fixada em 100 rpm por economia, considerando que seu aumento não resultou em maiores produções.

(Figura 1)

Avaliação da Concentração de Glicose e Extrato de Levedura para Produção de Ácido Hialurônico por S. zooepidemicus

Definidas as condições pH 8,0, 37°C e 100 rpm como as melhores para a produção de ácido hialurônico, estas foram fixadas e variada a concentração de glicose e extrato de levedura. Os resultados dos ácidos hialurônico, láctico, fórmico e acético estão apresentados na Tabela 3.

A maior produção de ácido hialurônico foi de $0,787 \text{ g.L}^{-1}$ em 30 g.L^{-1} de glicose e 30 g.L^{-1} de extrato de levedura (Ensaio 9 - Tabela 3). Valores elevados também foram encontrados nos ensaios 3 ($0,561 \text{ g.L}^{-1}$) e 6 ($0,647 \text{ g.L}^{-1}$) (Tabela 3), nos quais a concentração de extrato de levedura foi de 30 g.L^{-1} . O aumento na concentração de glicose de 10 g.L^{-1} (Ensaio 3) para 20 g.L^{-1} (Ensaio 6) e 30 g.L^{-1} (Ensaio 9) levou a maiores produções de ácido hialurônico. Nestes ensaios a concentração dos ácidos orgânicos se manteve constante. Os autores Pires e Santana (9) avaliaram a concentração inicial de glicose de 0 a 45 g.L^{-1} para a produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* ATCC 39920 e demonstraram que a produção do polímero não foi influenciada pelo aumento da concentração de glicose acima de 5 g.L^{-1} e a síntese de ácido láctico se manteve constante a partir de 10 g.L^{-1} . Em biorreator, Don e Shoparwe (10) avaliaram o efeito da glicose em concentrações variando de 10 a 60 g.L^{-1} e obtiveram maior produção de ácido hialurônico em meio contendo 40 g.L^{-1} de glicose.

(Tabela 3)

Quanto ao extrato de levedura, conclui-se que o aumento da concentração leva a uma maior produção de ácido hialurônico e ácido láctico, o que sugere um desvio do fluxo de carbono para a via homolática e para a produção do polímero. Este efeito pode ser observado quando fixada a concentração de glicose em 30 g.L^{-1} (Ensaio 7, 8 e 9 - Tabela 3). O aumento na concentração de extrato de levedura de 10 para 20 g.L^{-1} elevou a produção dos ácidos hialurônico e láctico de $0,278$ e $1,332 \text{ g.L}^{-1}$ para $0,580$ e $4,984 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente (Ensaio 7 e 8 - Tabela 3). Comparando o ensaio 8 e 9 (Tabela 3) o aumento na concentração de 20 para 30 g.L^{-1} de extrato de levedura gerou um acréscimo de 35% na produção do polímero e 11,1% para o ácido láctico. Observa-se também que a síntese de ácido acético foi menor na concentração de 10 g.L^{-1} de extrato de levedura, o que diminui a formação de ATP prejudicando a produção de ácido hialurônico. Chen et al. (27) avaliaram a concentração inicial de extrato de levedura ($5; 10; 15 \text{ g.L}^{-1}$), em biorreator, fixando a glicose em 20 g.L^{-1} e observaram um aumento na produção de ácido hialurônico na concentração de 10 g.L^{-1} , porém, a produção de ácido láctico não variou. Patil, Kamalja e Chaudhari (19) avaliaram a concentração de glicose e peptona de soja

para a produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* MTCC 3523 através de um delineamento composto central e estimaram uma produção ótima de 0,798 g.L⁻¹ em meio contendo 40,5 g.L⁻¹ de glicose e 51,2 g.L⁻¹ de peptona de soja.

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 4) concluiu que somente o extrato de levedura foi significativo (p=0,0006), sendo que o modelo explicou 94% dos dados experimentais e a falta de ajuste não foi significativa (p=0,379). Análises estatísticas utilizando peptonas também apresentaram uma maior significância da fonte de nitrogênio em relação à fonte de carbono glicose (18,19).

(Tabela 4)

A resposta para a produção de ácido hialurônico em função da concentração de glicose e extrato de levedura pode ser estimada pela equação (3):

$$Y = 0,608 + 0,059x_1 - 0,043x_1^2 + 0,200x_2^* - 0,144x_2^{2*} + 0,029x_1x_2 \quad (\text{Eq.3})$$

onde Y é a resposta para a produção de ácido hialurônico e x₁ e x₂ são os valores codificados de glicose e extrato de levedura, respectivamente.

A Figura 2 apresenta a superfície de resposta de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* em função dos valores originais da concentração de glicose e extrato de levedura. A produção do polímero é favorecida com o incremento da concentração de extrato de levedura em qualquer condição de glicose estudada.

(Figura 2)

Conclusões

A melhor condição para a produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* foi pH 8,0; temperatura de 37°C, agitação de 100 rpm, no meio contendo 30 g.L⁻¹ de glicose e 30 g.L⁻¹ de extrato de levedura, onde a máxima produção foi de 0,787 g.L⁻¹. As variáveis significativas estudadas por planejamento

de Box-behken foram pH e temperatura, e no planejamento fatorial completo, extrato de levedura. Através da avaliação dos ácidos orgânicos, observou-se que em pH 6,0 não houve produção de ácido láctico e que o incremento do extrato de levedura aumentou a síntese do mesmo.

Agradecimentos Os autores agradecem pelo suporte financeiro fornecido pela Capes – Brasil e ao professor Dr. Dionisio Borsato por permitir processar os dados no software empregado.

Referências

1. Laurent, T. C. & Fraser, J. R. E. (1992). *Faseb Journal*. 6, 2397-2404.
2. Balazs, E. A. (2004) in *Chemistry and biology of hyaluronan*, 1 ed. (Garg, H. G. & Hales, C. A.) Oxford: Elsevier, pp.415-455.
3. Vázquez, J. A., Montemayor, M I. & Murado, M. A. (2010). *Microbial Cell Factories*. 9:46.
4. Liu, L., Wang, M., Du, G. & Chen, J. (2008). *Letters in applied Microbiology*. 46, 383 – 388.
5. Ferrari, F. A., Motta, F.L., Bastos, R. G. & Santana, M. H. A. (2013). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 170, 1491-1502.
6. Kendall, F.E., Heidelberger, M. & Dawson, M. A. (1937). *The Journal of Biological Chemistry*. 118, 61-69.
7. Chong, B.F., Blank, L. M., Mclaughlin, R. & Nielsen, L.K. (2005). *Applied Microbiology Biotechnology*. 66 (4), 341-351.
8. Marcellin, E., Chen, W. & Nielsen, L. K. (2009). In: *Microbial Production of Biopolymers* (Rehm B.H.A.) Caister Academic Press. 163-180.
9. Pires A. & Santana, M.H.A. (2010). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 162, 1751 – 1761.
10. Don M. M. & Shoparwe N. F. (2010). *Biochemical Engineering Journal*. 49, 95-103.
11. Armstrong, D.C. & Johns M. R. (1997). *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (7), 2759-2763.
12. Lai, Z., Rahim, R. A., Ariff, A. & Mohamad, R. (2011). *African journal of microbiology research*. 5(15), 2114-2123.

13. Johns, M.R., Goh, L.T. & Oeggerli, A. (1994). *Biotechnology Letters*. 16 (5), 507-512.
14. Kim, J., Yoo, S., Oh, D. Kweon, Y., Park, D., Lee, C. & Gil, G. (1996) *Enzyme and Microbial Technology*. 19, p.440 - 445, 1996.
15. Stoolmiller, A. C. & Dorfman, A. (1969). *Journal of Biological Chemistry*. 244, 236- 246.
16. Chong, B. F. & Nielsen, L.K. (2003) *Biochemical Engineering Journal*.16,153–162.
17. Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G. & Chen, J. (2011). *Microbial Cell Factories*. 10:99.
18. Khue, N. T. H. & Vo M. T. P. (2013). *Journal of applied Pharmaceutical Science*. 3 (5), 12-15.
19. Patil K. P.; Kamalja K. K. & Chaudhari B. L. (2011). *Carbohydrate Polymers*. 86, 1573–1577.
20. Im J.H., Song J. M., Kang J.H. & Kang D. J. (2009). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36, 1337-1344.
21. Aroskar, V.J, Kamat, S.D. & Kamat, D. V. (2012). *Institute of Integrative Omics and Applied letters*. 2, X – XX .
22. Barros Neto, B., Scarminio, I. S. & Bruns, E. R. (1996). *Planejamento e Otimização de Experimentos*, 2nd ed., Editora Unicamp, São Paulo.
23. Filisetti-cozzi, T. M.& Carpita, N. C.(1991). *Analytical Biochemistry*. 197 (1),157-62.
24. *Statistica for Windows v.9.0*, Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA (2009)
25. Box G.E.P. & Draper, N. R. (1987) *Empirical Model Building and Response Surfaces*. (John Wiley & Sons: New York, USA) pp 205 – 230 and pp 515 -520.
26. Garrigues, C., Mercade, M., Cocaign-Bousquet, M., Lindley, N. D., & Loubiere, P. (2001). *Biotechnology and Bioengineering*, 74(2), 108-115.
27. Chen S.-J., Chen J.-L., Huang W.-C. e Chen H.-L. (2009). *Korean Journal of Chemical Engineering*. 26(2), 428-432, 2009.

Legendas de Figuras

Figura 1 - Superfície de resposta para a produção de ácido hialurônico em função do pH e temperatura tendo fixado a agitação à 100 rpm

Figura 2 - Superfície de resposta para a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* em função da concentração de glicose e extrato de levedura

Tabelas

Tabela 1 - Produção de ácido hialurônico e ácidos orgânicos por *Streptococcus zooepidemicus* em diferentes valores de pH, temperatura e agitação por planejamento de Box Behnken 3³

Ensaio (ordem padrão)*	Níveis dos Fatores			Respostas			
	x ₁	x ₂	x ₃	Ácido hialurônico (g.L ⁻¹)	Ácido lático (g.L ⁻¹)	Ácido fórmico (g.L ⁻¹)	Ácido acético (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	0	0,054	0,000	13,981	1,085
2	+1	-1	0	0,387	2,991	6,451	1,003
3	-1	+1	0	0,024	0,000	5,435	1,876
4	+1	+1	0	0,372	2,752	6,678	1,176
5	-1	0	-1	0,168	0,000	5,652	0,585
6	+1	0	-1	0,437	3,025	6,541	0,945
7	-1	0	+1	0,112	0,000	6,869	1,922
8	+1	0	+1	0,434	3,870	8,833	1,177
9	0	-1	-1	0,409	2,061	6,248	0,634
10	0	+1	-1	0,240	2,662	6,610	0,758
11	0	-1	+1	0,344	0,000	6,785	1,744
12	0	+1	+1	0,336	0,000	7,158	2,800
13	0	0	0	0,410	2,554	7,877	0,767
14	0	0	0	0,399	2,788	6,274	0,816
15	0	0	0	0,390	3,104	9,144	0,991

Códigos	Fatores	Níveis		
		-1	0	+1
(X ₁)	pH inicial	6,0	7,0	8,0
(X ₂)	Temperatura (°C)	34	37	40
(X ₃)	Agitação (rpm)	100	150	200

(*) Os ensaios foram aleatorizados

Tabela 2 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus*

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	P-valor
pH (L)	0,202324	1	0,202324	228,3834	0,000023*
pH (Q)	0,050961	1	0,050961	57,5247	0,000632*
Temperatura (L)	0,006157	1	0,006157	6,9501	0,046181*
Temperatura (Q)	0,019643	1	0,019643	22,1726	0,005295*
Agitação (L)	0,000114	1	0,000114	0,1288	0,734303
Agitação (Q)	0,000110	1	0,000110	0,1247	0,738371
x ₁ x ₂	0,000053	1	0,000053	0,0601	0,816155
x ₁ x ₃	0,000706	1	0,000706	0,7969	0,412919
x ₂ x ₃	0,006437	1	0,006437	7,2662	0,043011*
Erro	0,004429	5	0,000886		
Total SS	0,287706	14			

Lack of fit: p=0,062386; R²=0,9846; *Significativos para valores de p<0,05; L=linear; Q=quadrático

Tabela 3 - Produção de ácido hialurônico e ácidos orgânicos por *Streptococcus zooepidemicus* variando a concentração de glicose e extrato de levedura por planejamento fatorial 3^2

Ensaio (ordem padrão)*	Níveis dos fatores		Respostas			
	x_1	x_2	Ácido hialurônico (g.L ⁻¹)	Ácido lático (g.L ⁻¹)	Ácido fórmico (g.L ⁻¹)	Ácido acético (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	0,167	1,145	8,199	0,845
2	-1	0	0,560	3,846	9,150	1,370
3	-1	+1	0,561	5,531	9,493	1,496
4	0	-1	0,350	1,215	8,735	0,636
5	0	0	0,666	3,890	8,102	1,128
6	0	+1	0,647	5,982	9,399	1,334
7	+1	-1	0,278	1,332	9,888	0,819
8	+1	0	0,580	4,984	9,930	1,371
9	+1	+1	0,787	5,581	9,187	1,316
10	0	0	0,565	4,496	9,427	1,245
11	0	0	0,584	4,594	9,381	1,263

Códigos	Fatores	Níveis		
		-1	0	+1
(X ₁)	Glicose (g.L ⁻¹)	10	20	30
(X ₂)	Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	10	20	30

(*) Os ensaios foram aleatorizados

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus*

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	P-valor
Glicose (L)	0,021164	1	0,021164	5,01024	0,075370
Glicose (Q)	0,004725	1	0,004725	1,11852	0,338634
Extrato de Levedura (L)	0,239929	1	0,239929	56,79811	0,000651*
Extrato de Levedura (Q)	0,033097	1	0,033097	7,83505	0,038033*
$x_1 \times x_2$	0,003314	1	0,003314	0,78455	0,416313
Erro	0,021121	5	0,004224		
Total SS	0,333427	10			

Lack of fit: $p=0,379102$; $R^2 = 0,93665$ * Significativos para valores de $p < 0,05$; L=linear; Q=quadrático.

Figuras

Figura 1

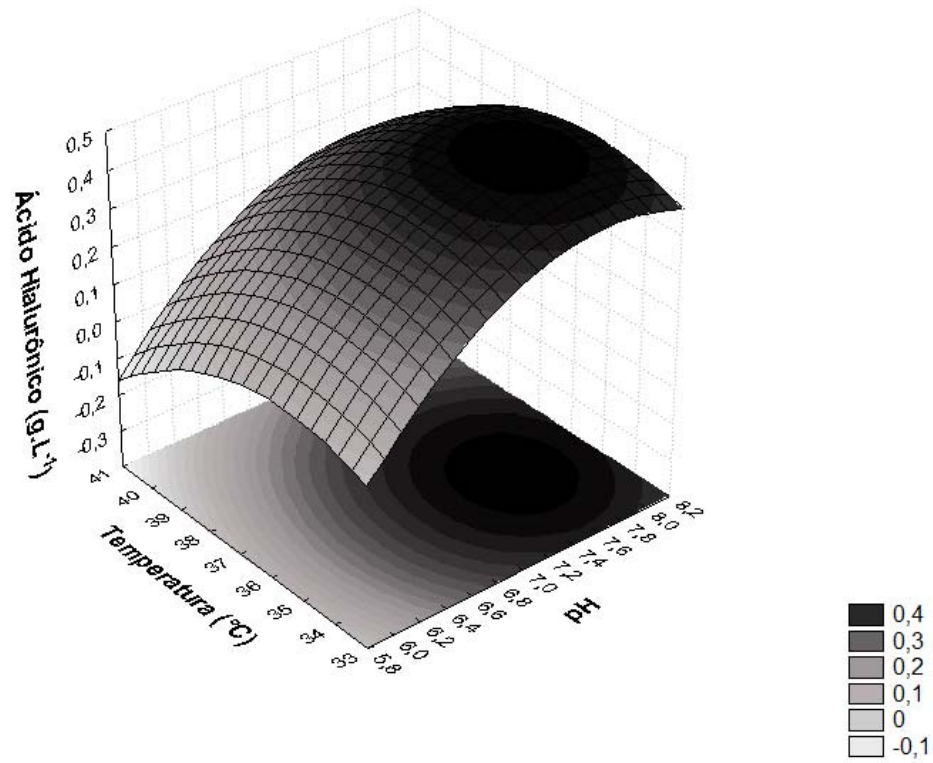
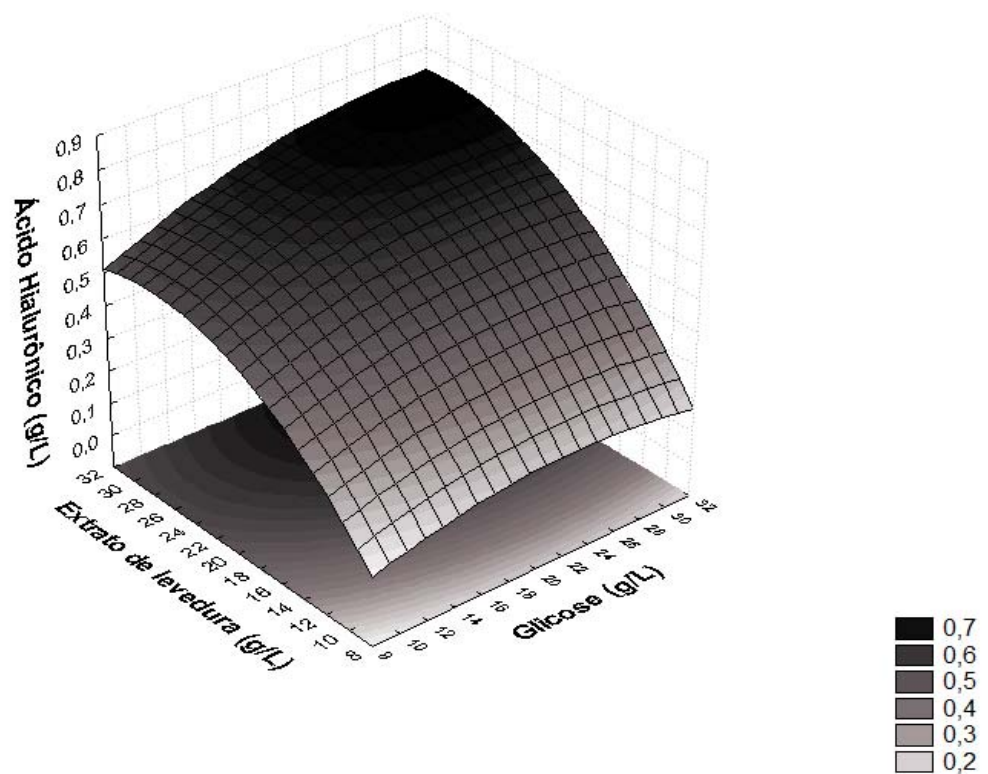


Figura 2



5.2 ARTIGO 2

Aproveitamento de Fontes Agrícolas para a Produção de Ácido Hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920

Nicole Caldas Pan¹; Josiane Alessandra Vignoli¹; Rui Sérgio dos Santos Ferreira da Silva²; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{2*}

E-mail dos autores

nicolepan.eq@gmail.com

javignoli@uel.br

fabrui@gmail.com

*macelligoi@uel.br

Highlights

- Melaço e caldo de cana-de-açúcar para a produção de ácido hialurônico microbiano.
- Aplicação de proteína de soja como fonte vegetal para *Streptococcus zooepidemicus*.
- Aumento da síntese de ácido hialurônico por extrato de levedura.

Abstract Derivados agroindustriais são fontes nutricionais alternativas empregadas em bioprocessos que reduzem custos e colaboram com a sustentabilidade social. Fontes alternativas de carbono (caldo e melaço de cana-de-açúcar e melaço de soja) e de nitrogênio (milhocina, proteína de soja e soro de leite) foram avaliadas para a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. No meio de caldo e melaço de cana-de-açúcar a 30 g.L⁻¹ de açúcares totais, com extrato de levedura a 30 g.L⁻¹, a produção foi de 0,266 g.L⁻¹ e 0,376 g.L⁻¹, respectivamente, revelando que essas fontes foram promissoras. Para as fontes alternativas de nitrogênio estudadas a maior produção foi de 0,219 g.L⁻¹ quando utilizou proteína de soja a 30 g.L⁻¹ em meio contendo sacarose (30 g.L⁻¹ de açúcares totais). A síntese dos ácidos láctico, fórmico e acético foi acompanhada e observou-se variações significativas no fluxo de carbono em função da fonte de carbono e nitrogênio utilizada.

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 About Solution Ltda, Rua Santos, 488/41 | CEP 86.020-040 | Londrina – PR, Brasil

Palavras-chave: Fontes de carbono. Fontes de nitrogênio. Substratos agroindustriais. Ácido hialurônico. Ácidos orgânicos.

1 Introdução

De acordo com a FAO (2010) a economia brasileira é fortemente dependente dos produtos agrícolas, sendo o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e laranja, o segundo maior de soja e o terceiro maior de milho (Meyer et al., 2013). Contudo, esta elevada produção é responsável por uma alta geração de resíduos que causam problemas ambientais. A aplicação de resíduos agroindustriais provém substratos alternativos em bioprocessos e ajudam a solucionar problemas de poluição (Soccol e Vandenberghe, 2003).

Caldo e melaço de cana-de-açúcar, melaço de soja, proteína de soja, milhocina e soro de leite são alguns dos substratos agroindustriais utilizados na área de bioprocessos. O caldo de cana-de-açúcar é a matéria-prima utilizada para a produção do açúcar nas usinas sucroalcooleiras e o melaço de cana-de-açúcar o co-produto líquido desse processo. Ambos são substratos complexos que apresentam alta concentração de sacarose e sais, que podem ser aproveitados durante a produção de metabólitos de interesse (Oliveira et al., 2007). Estas matérias-primas foram relatadas como fontes de carbono para a produção de pululana (Srikanth et al., 2013) ácido γ -poliglutâmico (Zhang et al., 2012), goma xantana (Faria et al., 2011) e levana (Oliveira et al., 2007). O melaço de soja, que tem sido utilizado na produção de butanol, é um subproduto gerado durante o processamento industrial da soja e apresenta em sua composição carboidratos, como sacarose, glicose, rafinose, pinitol, estaquiose e verbascose, gorduras, flavanóides, proteínas e minerais (Qureshi et al., 2001).

Algumas matérias-primas de origem agroindustrial, como a proteína de soja, apresentam alta concentração de nitrogênio. A proteína de soja hidrolisada foi avaliada como uma fonte de nitrogênio economicamente viável na produção de ácido láctico (Hsieh et al., 1999). A água de maceração do milho, conhecida como milhocina, é um subproduto de baixo custo gerado em grandes quantidades pelas indústrias produtoras de amido de milho. Em sua composição tem-se 40% de proteína, além de ácido láctico, nitrogênio livre, aminoácidos e vitaminas, o que a torna uma excelente fonte nutricional para o crescimento microbiano. Porém, são

poucos os trabalhos publicados que utilizam a milhocina para produção de exopolissacarídeos (Sharma et al., 2013). O soro de leite é um subproduto da indústria de laticínios, particularmente obtido durante a coagulação da caseína do leite para a fabricação de queijo ou na produção de caseína. Sua geração em elevadas quantidades representa um problema ambiental, devido sua carga poluente. Por outro lado, o soro retém os principais nutrientes do leite, como proteínas, peptídeos funcionais, lipídios, lactose, vitaminas e minerais. Logo, apresenta um elevado potencial como substrato para a produção de biomoléculas, desafiando a indústria a utilizar o excedente de soro de leite como um recurso, e não apenas como um resíduo (Guimarães et al., 2010). Estas matérias-primas, relativamente de baixo custo, podem ser empregadas no meio de cultivo, viabilizando o custo de produção e podendo gerar polímeros de alto valor agregado.

Entre esses polímeros destaca-se o ácido hialurônico, que tem seu valor agregado dependente da sua massa molar e pureza (Yamada e Kawasaki, 2005). Sua propriedade viscoelástica, combinada a não imunogenicidade, faz do ácido hialurônico um produto com inúmeras aplicações biomédicas e farmacêuticas (Chen et al., 2014).

O ácido hialurônico pode ser produzido por *Streptococcus zooepidemicus*, que requer meio de cultivo rico em aminoácidos, bases nucleotídicas e vitaminas, necessárias ao crescimento microbiano e produção do polímero (Marcelling et al., 2009). 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 et al., 1997).

A alta demanda nutricional exigida por *Streptococcus* e o contínuo aumento do custo das matérias-primas sintéticas, enfraquecem a competitividade do ácido hialurônico microbiano em relação ao obtido por extração de tecidos animais (Liu et al., 2011). Contudo, a resistência à utilização de produtos de origem animal nas áreas médica e farmacêutica, devido ao risco de contaminação viral, impulsiona a produção do ácido hialurônico de origem microbiana (Chong et al., 2005).

De acordo com a composição do meio de cultivo empregado na produção do ácido hialurônico a bactéria pode direcionar o fluxo de carbono para a síntese de outros ácidos orgânicos, o que reduziria a produção de ácido hialurônico. O estudo do fluxo de carbono contribui para o entendimento do metabolismo

bacteriano, visando direcionar a produção para o polímero de interesse (Pires e Santana, 2010). A biossíntese do ácido hialurônico compete pela fonte de carbono com o crescimento microbiano, síntese de ácido láctico (via glicolítica) e via da pentose fosfato (Shah et al., 2013).

Destacando a grande geração de subprodutos agroindustriais no Brasil e considerando que esses são ricos em açúcares, nitrogênio e sais, exigidos pelo *Streptococcus zooepidemicus*, o objetivo deste trabalho foi testar diferentes substratos agroindustriais, como caldo e melaço de cana-de-açúcar, melaço de soja, milhocina, proteína de soja e soro de leite, para a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 3992 e acompanhar a síntese de ácido láctico, fórmico e acético.

2 Materiais e Métodos

2.1 MICRORGANISMO E MATÉRIA-PRIMA

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

O caldo de cana-de-açúcar foi obtido de um comerciante local em Londrina- PR, melaço de cana-de-açúcar da COROL (Cooperativa Agroindustrial de Rolândia-PR), melaço de soja da Indústria de processamento de soja IMCOPA - Importação, Exportação e Indústria de Óleos Ltda. (Cambé-PR), proteína de soja do projeto de pesquisa com o grupo Solabiá (Maringá-PR), o soro de leite da CONFEPAR (União de Cooperativas Agropecuárias do Norte do Paraná - Londrina – PR) e a milhocina da Corn Products do Brasil Ltda (Mogi Guaçu – SP).

2.2 PRESERVAÇÃO DO MICRORGANISMO E PRÉ-INÓCULO

A cultura estoque foi mantida em solução salina contendo 50% de glicerol a -80°C. O pré-inóculo foi preparado transferindo 1 mL desta cultura para Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C e 150 rpm por 48 h.

2.3 MEIOS DE CULTIVO – MATÉRIAS-PRIMAS SINTÉTICAS E AGROINDUSTRIAIS

Fontes de carbono: glicose, sacarose, frutose, lactose, maltose, caldo e melaço de cana-de-açúcar e melaço de soja na concentração de 30 g.L^{-1} de açúcares totais foram acrescidos de extrato de levedura na concentração de 30 g.L^{-1} .

Fontes de nitrogênio: extrato de levedura, proteína de soja, milhocina e soro de leite na concentração de 30 g.L^{-1} foram acrescidos de glicose ou sacarose na concentração de 30 g.L^{-1} de açúcares totais. A concentração de nitrogênio total (Instituto Adolfo Lutz, 1985) e proteico (Lowry et al., 1951) das fontes de nitrogênio estudadas foram determinadas (Tabela 1).

Todos os meios foram suplementados em g.L^{-1} com: K_2HPO_4 , 2,5; NaCl , 2,0 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 e o pH foi ajustado em 8,0. As fontes de carbono foram autoclavadas em separado.

(Tabela 1)

2.4 FERMENTAÇÕES

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL dos meios descritos (item 2.3), incubados em shaker a 100 rpm, 37°C por 24 h. Os meios foram inoculados com 10% (v/v) do pré-inóculo. As fermentações foram conduzidas em triplicata. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 9956 g por 15 min a 4°C . A biomassa foi quantificada e do sobrenadante foram determinadas as concentrações de ácidos hialurônico, láctico, fórmico e acético, e açúcares totais (Dubois et al., 1956). As análises foram realizadas em triplicata.

2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.5.1 Crescimento celular

O crescimento celular foi determinado por turbidimetria a 620 nm e correlacionada a curva de biomassa em g.L^{-1} .

2.5.2 Concentração de Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico foi precipitado do sobrenadante com etanol na proporção de 1:3 (v/v) a 4°C por 24 h, posteriormente centrifugado a 8784 g por 20 min e do precipitado redissolvido em água foi determinada a concentração de ácido hialurônico pelo reagente de Carbazol (Filisetti-Cozzi e Carpita, modificado). Em uma amostra de 0,4 mL foi adicionado 40 μL de ácido sulfâmico e 2,4 mL de solução de borato em ácido sulfúrico (0,025 M), incubada a 100°C por 20 min, resfriada e adicionado 0,1 mL de solução de Carbazol, aquecida novamente por 20 min a 100°C, resfriada e lida a 530 nm. A curva de calibração foi construída com hialuronato de sódio (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) variando de 50 a 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

2.5.3 Concentração de ácido láctico, fórmico e acético

Para a quantificação de ácidos láctico, fórmico e acético, amostras do sobrenadante foram filtradas em membranas de 0,45 μm (Millipore) e injetadas (20 μL) em cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE), equipado com detector de índice de refração (Shimadzu RID – 10A) e coluna HPX – 87H de ácidos orgânicos 300 \times 7,8 mm, mantida a 60°C. A fase móvel foi a solução de H_2SO_4 0,005 mol.L^{-1} a 0,7 mL.min^{-1} . A curva de calibração variou de 50 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da mistura dos padrões.

2.5.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, usando o programa Statistica 9.0 (Statsoft, Inc., USA, 2009).

3 Resultados e discussão

3.1 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO

A produção de ácido hialurônico e ácidos orgânicos foi avaliada em diferentes meios de cultivo e os resultados estão descritos na Tabela 2.

(Tabela 2)

As maiores produções foram 0,488; 0,429 e 0,376 g.L⁻¹ nos meios de sacarose, glicose e melão de cana-de-açúcar, respectivamente. O caldo de cana-de-açúcar produziu 0,266 g.L⁻¹, não diferindo da maltose, 0,295 g.L⁻¹, e em frutose, lactose e melão de soja, a produção foi desprezível. Caldo e melão de cana-de-açúcar são substratos nutricionais complexos com alta concentração de sacarose e também de glicose e frutose, com variedade de sais minerais e algumas fontes de nitrogênio, que são necessárias para o metabolismo do microrganismo (Oliveira et al., 2007; Xu e Xu, 2014). Estes substratos são de grande interesse industrial, o que justifica a produção de ácido hialurônico com a utilização destas fontes de carbono para viabilizar a produção, reduzindo com isto o custo. Mesmo com a grande importância da utilização de derivados agrícolas como substratos em bioprocessos, poucos são os estudos voltados para a produção de ácido hialurônico utilizando estas matérias-primas. Pires et al. (2010) avaliaram o suco de caju como uma fonte de carbono promissora para a produção do polímero por *S. zooepidemicus* e Macedo e Santana (2012) utilizaram o bagaço de caju em fermentação no estado sólido, obtendo produtividade de 0,28 mg.g⁻¹.h⁻¹.

A tabela 2 detalha os ácidos orgânicos produzidos por *S. zooepidemicus* nas diferentes fontes de carbono estudadas. Os resultados indicam que o fluxo de carbono no metabolismo é direcionado para a produção de ácido

fórmico nos meios com glicose, sacarose, maltose, caldo e melaço de cana-de-açúcar e melaço de soja. Nos meios com frutose e lactose, obteve-se maior produção de ácido láctico. Shah et al. (2013) também avaliaram o fluxo metabólico e mostraram que a concentração e a massa molar do ácido hialurônico aumentaram com a redução do fluxo de carbono direcionado para a via glicolítica e via da pentose fosfato, pois o fluxo leva o aumento para a biossíntese de precursores do ácido hialurônico, e que a taxa de crescimento celular foi relacionada positivamente na produção de ácido hialurônico e negativamente à massa molar. Chong e Nielsen (2003) desenvolveram um modelo de fluxo metabólico para *Streptococcus zooepidemicus* para comparar o metabolismo da glicose e da maltose durante cultivo aeróbio em batelada. Os autores verificaram uma maior produção de ácido láctico quando a fonte de carbono era glicose e de ácido acético quando utilizado maltose, porém a produção de ácido hialurônico não sofreu influência das fontes de carbono utilizadas.

O crescimento microbiano foi determinado pela biomassa (g.L^{-1}). A tabela 2 demonstra que nos meios com glicose, sacarose, frutose e caldo de cana-de-açúcar o crescimento foi superior a $6,0 \text{ g.L}^{-1}$. O meio de melaço de soja apresentou baixo crescimento celular ($0,524 \text{ g.L}^{-1}$) e os ácidos produzidos foram fórmico e acético.

3.2 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

As fontes de nitrogênio alternativas, milhocina, proteína de soja e soro de leite, foram avaliadas e comparadas ao extrato de levedura. Devido à alta produção de ácido hialurônico em sacarose e glicose, as fontes de nitrogênio foram estudadas em ambas as fontes de carbono. As Tabelas 3 e 4 apresentam os resultados das fermentações nas diferentes fontes de nitrogênio, em glicose, Tabela 3 e em sacarose, Tabela 4.

(Tabela 3)

(Tabela 4)

Para as fontes de nitrogênio avaliadas, observou-se que em sacarose (Tabela 4) a produção de ácido hialurônico foi maior do que em glicose (Tabela 3), exceção ao meio com milhocina em que a produção foi nula, tanto em sacarose como em glicose. No meio com extrato de levedura ocorreu uma maior produção do ácido hialurônico, seguido do meio com proteína de soja e de soro de leite para as duas fontes de carbono estudadas. As principais contribuições do extrato de levedura para a produção de ácido hialurônico são bases de purina e pirimidina e vitamina B, essenciais para o cultivo de *Streptococcus* (Amrane e Prigent, 1994). A proteína de soja apresenta uma concentração de nitrogênio proteico (Tabela 1) maior do que em soro de leite e milhocina, o que pode ser uma justificativa para que esta tenha apresentado a segunda maior produção de ácido hialurônico. Assim, a proteína de soja seria uma opção ao processo. Além disso, é uma fonte de nitrogênio na qual *Streptococcus* tem um bom crescimento e outro ponto a destacar é o custo e a substituição por produtos vegetais, que é uma exigência para aplicação em cosmetologia (Benedini e Santana, 2013).

Pires et al. (2010) substituíram o extrato de levedura por um concentrado proteico de soro de leite e proteína de soja hidrolisada, nos quais obtiveram produção de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,17 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Os autores também estudaram estes meios suplementados com milhocina e verificaram que esta não influenciou na produção do ácido hialurônico. Lai et al. (2011) avaliaram a produção do polímero por *S. zooepidemicus* ATCC 39920 em meio contendo extrato de levedura, triptona e $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ e obtiveram uma maior produção quando utilizaram as três fontes de nitrogênio em associação. Vázquez et al. (2010) estudaram a produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* ATCC 35246 em meio contendo água residual do tratamento de mexilhões e peptona de atum e obtiveram uma redução de 50% no custo de produção.

Considerando a produção de ácidos orgânicos (Tabela 3 e 4), a fonte de nitrogênio foi um fator que influenciou o metabolismo microbiano. Somente no meio contendo extrato de levedura houve produção de ácido acético, o que contribui com o aumento na produção de ácido hialurônico, visto que para cada mol de ácido acético produzido 1 mol de ATP, necessário para produção do polímero, é gerado (Chong e Nielsen, 2003). Além disso, nos experimentos contendo soro de leite, observou-se um decréscimo na produção de ácido láctico, enquanto que em

milhocina o metabolismo microbiano apresentou um desvio para a produção de ácido fórmico.

No meio contendo proteína de soja obteve-se um elevado crescimento microbiano, não acompanhado de aumento na produção de ácido hialurônico. Este fato também foi observado por Pires et al. (2010). Liu et al. (2011) descreveram uma relação inversa entre a taxa de crescimento microbiano e a produção de ácido hialurônico, devido a competição por fontes nutricionais. Quanto aos açúcares totais, ocorreu maior consumo em extrato de levedura e soro de leite, seguido dos meios contendo proteína de soja e milhocina.

4 Conclusões

Neste trabalho foi possível avaliar diferentes fontes alternativas de carbono e nitrogênio para a produção de ácido hialurônico. O meio com sacarose e extrato de levedura atingiu a maior produção, 0,592 g.L⁻¹. No entanto, meios com caldo e melaço de cana-de-açúcar apresentaram produção de 0,376 g.L⁻¹ e 0,266 g.L⁻¹, respectivamente. Em relação às fontes de nitrogênio estudadas, a proteína de soja, em meio contendo sacarose, foi promissora, obtendo 0,219 g.L⁻¹ do polímero. Sendo assim, a utilização de fontes renováveis, como derivados agrícolas, para a produção de ácido hialurônico, podem reduzir o custo de produção e agregar valor econômico ao produto.

Agradecimentos Os autores agradecem pelo suporte financeiro fornecido pela Capes – Brasil, ao professor Dr. Dionisio Borsato por permitir processar os dados no software empregado e ao professor Dr. André Ferraz da Escola de Engenharia de Lorena/USP por ceder a milhocina.

Referências

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 preculture assessment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40 (5), 644-649.

Armstrong, D.C., Cooney, M. J., Johns M. R., 1997. Growth and amino acid requirement of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 309-312.

- Benedini, L. J., Santana, M. H. A., 2013. Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of hyaluronic acid. *Bioresour. Technol.* 130, 798–800.
- Chen, W. Y., Marcellin, E., Steen, J. A., Nielsen, L. K., 2014. The role of hyaluronic acid precursor concentrations in molecular weight control in *Streptococcus zooepidemicus*. *Mol. Biotechnol.* 56, 147-156.
- Chong, B. F., Blank, L. M., McLaughlin, R., Nielsen, L. K., 2005. Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 341 -351.
- Chong, B. F., Nielsen, L.K., 2003. Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. *Biochem. Eng. J.* 16, 153–162.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., 1956. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28(3), 350-356.
- Faria, S., Petkowicz, C. L. O., Morais, S. A. L., Terrones, M. G. H., Resende, M. M., França, F. P., Cardoso, V. L., 2011. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. *Carbohydr. Polym.* 86, 469-476.
- Filisetti-Cozzi, T. M., CARPITA, N. C., 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Biochem.* 197(1), 157-62.
- Guimarães, P. M. R., Teixeira, J. A., Domingues, L., 2010. Fermentation of Lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol. Adv.* 28, 375-384.
- Hsieh, C. M., Yang, A.-C., Iannotti, E. L., 1999. The effect of soy protein hydrolyzates on fermentation by *Lactobacillus amylovorus*. *Process. Biochem.* 34, 173-179.
- Instituto Adolfo Lutz., 1985. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, terceira edição, São Paulo.
- Lai, Z., 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. *Afr. J. of Microbiol. Res.* 5 (15), 2114-2123.
- Liu, L., Liu, Y., Li, J.; Du, G., Chen, J., 2011. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microb. Cell Fact.* 10:99.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Macedo, A. C., Santana, M. H. A., 2012. Hyaluronic acid depolymerization by ascorbate effects on solid state cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in cashew apple fruit bagasse. *World J. of Microb. and Biotechnol.* 28, 2213 - 2219.
- Marcellin, E., Chen, W., Nielsen, L. K., 2009. Microbial hyaluronic acid biosynthesis. In: *Microbial Production of Biopolymers*, Rehm BHA (Eds.). Caister Academic Press, 163-180.

- Meyer, P. M., Rodrigues, P.H.M., Millen, D.D., 2013. Impact of biofuel production in Brazil on the economy, agriculture, and the environment. *Anim. Front.* 3 (2), 28-37.
- 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. *Biochem. Eng. J.* 37, 177–183.
- Pires, A. M. B., Santana M. H. A., 2010. Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 1751–1761.
- Pires A. M. B., Macedo A. C, Eguchi S. Y, Santana M. H. A., 2010. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresour. Technol.* 101, 6506-6509.
- Qureshi, N. Lolas, A. Blashek, H. P., 2001. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA101. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26, 290-295.
- 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. *Biochem. Eng. J.* 80, 53-60.
- Sharma, N. Prasad, G. S., Choudhury, A. R., 2013. Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide. *Carbohydr. Polym.* 93, 95-101.
- Soccol, C., Vandenberghe, P. S., 2002. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochem. Eng. J.* 13, 205-218.
- Srikanth, S. Swathi, M. Tejaswini, M., Sharmila, G., Muthukumaran, C. Jaganathan, M. K., Tamilarasan, K., 2013. Statistical optimization of molasses based exopolysaccharide and biomass production by *Aureobasidium pullulans* MTCC 2195. *Biocat. Agric. Biotechnol.* DOI 10.1016/j.bcab. 2013.11.011.
- Statistica for Windows v.9.0, Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA (2009).
- Vázquez, J. A., Montemayor, M. I. , Murado, M. A., 2010. Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. *Microb. Cell Fact.* 9:46.
- Xu, K., Xu, P., 2014. Efficient production of L-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources. *Bioresour. Technol.* 153, 23-29.
- Yamada, T.; Kawasaki, T., 2005. Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: new approaches. *J. Biosci. Bioeng.* 99, 521-528.
- Zhang, D., Feng, X., Zhou, Z. Zhang, Y., Xu, H., 2012. Economical production of poly(γ -glutamic acid) using untreated cane molasses and monosodium glutamate waste liquor by *Bacillus subtilis* NX-2. *Bioresour. Technol.* 114, 583-588

Tabelas

Tabela 1 - Concentração de nitrogênio total e proteico nas fontes de carbono estudadas

Fonte de Nitrogênio	Nitrogênio total g.Kg ⁻¹	Nitrogênio Proteico g.L ⁻¹
Extrato de levedura	117,792±9,809	345,970±13,939
Milhocina	45,808±7,198*	299,319±2,414
Proteína de soja	128,848±0,118	719,170±4,639
Soro de leite	17,344±0,152	95,086±1,534

*g.L⁻¹

Tabela 2 - Produção de ácido hialurônico, láctico, fórmico e acético, biomassa e açúcares consumidos por *Streptococcus zooepidemicus* em diferentes fontes de carbono

Fonte de Carbono	Ácido hialurônico (g.L ⁻¹)	Ácido láctico (g.L ⁻¹)	Ácido fórmico (g.L ⁻¹)	Ácido acético (g.L ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)	Açúcares consumidos (g.L ⁻¹)
Glicose	0,429±0,028 ^b	4,766±0,299 ^a	6,848±0,362 ^b	1,079±0,062 ^c	6,239±0,076 ^a	8,324±0,919 ^b
Sacarose	0,488±0,002 ^a	4,974±0,623 ^a	6,767±0,397 ^b	1,129±0,196 ^{b,c}	6,564±0,104 ^a	7,914±1,819 ^{b,c}
Frutose	0,032±0,021 ^e	5,262±0,178 ^a	3,465±0,186 ^c	0,547±0,012 ^d	6,507±0,488 ^a	7,886±1,161 ^{b,c}
Lactose	0,006±0,009 ^e	2,997±0,158 ^c	0,764±0,124 ^d	1,546±0,027 ^a	4,741±0,151 ^b	13,448±1,625 ^a
Maltose	0,295±0,020 ^d	3,897±0,329 ^b	7,771±0,311 ^a	1,386±0,177 ^{a,b}	5,701±0,146 ^a	4,462±1,474 ^{c,d}
Melaço de Soja	0,000±0,000 ^e	0,000±0,000 ^d	7,805±0,418 ^a	0,360±0,016 ^d	0,524±0,055 ^c	2,734±0,251 ^d
Melaço de Cana	0,376±0,020 ^c	5,544±0,247 ^a	6,473±0,201 ^b	0,040±0,003 ^e	4,652±0,671 ^b	5,723±0,266 ^{b,d}
Caldo de Cana	0,266±0,017 ^d	5,062±0,070 ^a	6,618±0,112 ^b	1,008±0,067 ^c	6,479±0,399 ^a	12,139±1,311 ^a

Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância (p<0,05)

Tabela 3 - Produção de ácido hialurônico, láctico, fórmico e acético, biomassa e açúcares consumidos por *Streptococcus zooepidemicus* em diferentes fontes de nitrogênio com glicose

Fonte de Nitrogênio	Ácido Hialurônico (g.L ⁻¹)	Ácido Láctico (g.L ⁻¹)	Ácido Fórmico (g.L ⁻¹)	Ácido Acético (g.L ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)	Açúcares Consumidos (g.L ⁻¹)
Ext.de Levedura	0,534±0,012 ^a	4,580±0,165 ^a	6,261±0,241 ^a	1,074±0,061 ^a	6,513±0,432 ^b	10,201±0,806 ^a
Milhocina	0,000±0,000 ^c	0,011±0,012 ^c	6,197±0,339 ^a	0,000±0,000 ^b	0,951±0,133 ^c	3,613±0,441 ^c
Proteína de Soja	0,192±0,047 ^b	4,099±1,212 ^a	7,105±2,138 ^a	0,000±0,000 ^b	33,510±3,644 ^a	6,408±0,294 ^b
Soro de Leite	0,062±0,003 ^c	1,764±0,271 ^b	5,592±0,090 ^a	0,000±0,000 ^b	10,793±0,024 ^b	12,326±1,439 ^a

Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância (p<0,05);

Tabela 4 - Produção de ácido hialurônico, láctico, fórmico e acético por *Streptococcus zooepidemicus* em diferentes fontes de nitrogênio com sacarose

Fonte de Nitrogênio	Ácido Hialurônico (g.L ⁻¹)	Ácido Láctico (g.L ⁻¹)	Ácido Fórmico (g.L ⁻¹)	Ácido Acético (g.L ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)	Açúcares Consumidos (g.L ⁻¹)
Ext. de Levedura	0,592±0,034 ^a	4,533±0,357 ^a	5,668±0,280 ^a	1,085±0,071 ^a	6,425±0,208 ^b	9,935±1,601 ^a
Milhocina	0,000±0,000 ^d	0,000±0,000 ^c	6,131±0,186 ^a	0,000±0,000 ^b	1,362±0,406 ^b	4,420±0,926 ^b
Proteína de Soja	0,219±0,049 ^b	3,834±0,615 ^a	6,455±1,103 ^a	0,000±0,000 ^b	29,888±6,378 ^a	5,251±0,064 ^b
Soro de Leite	0,120±0,011 ^c	1,594±0,205 ^b	5,480±0,364 ^a	0,000±0,000 ^b	9,635±1,010 ^b	8,255±1,041 ^a

Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância (p<0,05).

5.3 ARTIGO 3

Utilização de Planejamentos Experimentais no Desenvolvimento do Meio de Cultivo para Produção de Ácido Hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus*

Nicole Caldas Pan⁵; Josiane Alessandra Vignoli¹; Rui Sérgio dos Santos Ferreira da Silva⁶; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{1*}

E-mail dos autores

nicolepan.eq@gmail.com

javignoli@uel.br

fabrui@gmail.com

*macelligoi@uel.br

Abstract Este trabalho buscou a otimização da produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. Inicialmente, avaliou-se a concentração de sacarose (10; 30; 50 g.L⁻¹), extrato de levedura (10; 30; 50 g.L⁻¹), glutamina (0; 0,3; 0,6 g.L⁻¹), glutamato (0; 0,3; 0,6 g.L⁻¹) e ácido oxálico (0; 0,3; 0,6 g.L⁻¹) através de planejamento fatorial fracionário 2⁽⁵⁻¹⁾. Concentrações de extrato de levedura e glutamina foram significativas (p<0,05), sendo as demais variáveis importantes pelas interações na produção do ácido hialurônico. A partir destes resultados, fixou-se as variáveis sacarose (50 g.L⁻¹), glutamato (0,6 g.L⁻¹) e ácido oxálico (0,6 g.L⁻¹) avaliando as concentrações de extrato de levedura (50; 57,32; 92,68 e 100 g.L⁻¹) e glutamina (0,6; 0,9514; 1,8; 2,6486; 3,0 g.L⁻¹) por delineamento composto central rotacional. Somente o extrato de levedura foi significativo (p<0,05). A maior produção de ácido hialurônico foi de 0,654 g.L⁻¹ em meio contendo em g.L⁻¹: extrato de levedura, 100; sacarose, 50; glutamato, 0,6; glutamina, 1,8 e ácido oxálico, 0,6. Aumento na concentração de extrato de levedura exerceu efeito positivo na síntese de ácido lático.

Palavras-chave: Ácido hialurônico. *Streptococcus zooepidemicus*. Fontes nutricionais. Planejamento estatístico. Metabolismo microbiano.

⁵ 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.

⁶ About Solution Ltda, Rua Santos, 488/41 | CEP 86.020-040 | Londrina – PR, Brasil

* Autor para correspondência:

Telefone: +55 43 3371-4270

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

Introdução

Ácido hialurônico, um polissacarídeo de alta massa molar constituído de unidades dissacarídicas de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina [1], apresenta propriedades hidrofílicas e viscoelásticas que permitem sua utilização na área médica e farmacêutica, como viscosuplementação de fluidos sinoviais de pacientes com artrite, reparo tecidual, cirurgias oftalmológicas, preparações de microcápsulas para liberação controlada de fármacos e em cosméticos como um ativo eficaz no combate à desidratação cutânea e, por conseguinte, na prevenção do envelhecimento da pele [2; 3].

O polímero disponível comercialmente pode ser obtido por extração animal ou produção microbiana. O ácido hialurônico microbiano é comumente produzido como um fator de virulência por *Streptococcus*, em particular *Streptococcus equi* e *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* [4].

Na extração animal o polímero se encontra complexado com proteoglicanos, necessitando de processos de extração e purificação que podem encarecer o produto final [5]. 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 produção microbiana vem como uma alternativa para o ácido hialurônico de tecidos animais [4]. Durante a produção microbiana por *Streptococcus*, a composição do meio afeta o metabolismo e conseqüentemente o desempenho do microrganismo [6].

A composição de um meio de fermentação consiste em fontes de carbono, nitrogênio, sais minerais, elementos traços, peptídeos, aminoácidos, vitaminas e outros fatores de crescimento determinantes para o desenvolvimento celular e síntese do produto de interesse. Contudo, a diversidade dos componentes nutricionais e a interação combinatória destes com o metabolismo celular, dificultam a elaboração de um modelo matemático preciso para descrever todo o processo. O objetivo de otimizar as condições de cultivo de um sistema biológico, visa maximizar a concentração do produto e o rendimento, reduzindo o custo da matéria prima. Devido às inúmeras variáveis que envolvem este processo e a complexidade metabólica dos microrganismos, delineamentos estatísticos são utilizados para otimizar a composição de meios para fermentações [7].

Delineamentos estatísticos têm sido utilizados por várias décadas [8; 9]. Estes experimentos podem ser adotados em várias fases de um processo, como em triagens ou na busca por melhores condições para os resultados almejados [10]. Em geral, delineamentos experimentais adotados para a otimização de meios de fermentação podem ser subdivididos em quatro etapas: (i) identificação dos componentes mais importantes ("screening"), (ii) a identificação do intervalo ideal das variáveis ('estreitamento'), (iii) identificação da produção ótima, e (iv) verificação experimental do ponto ótimo identificado [7].

Para identificação dos componentes importantes frequentemente utiliza-se delineamento de Plackett-Burman, e para identificação das faixas ideais, delineamentos fatoriais. Para encontrar a região ótima de produção (ponto ótimo) utiliza-se o método de superfície de resposta [7], que é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas úteis para a modelagem e análise de problemas em que a resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis [11].

Patil, Kamalja e Chaudari [11] concluíram por planejamentos estatísticos que glicose e peptona de soja são fatores significativos na produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* MTCC 3523. Khue e Vo [12] descreveram o efeito de onze fatores para a produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* ATCC 43079 utilizando o delineamento de Plackett- Burman e observaram que peptona, citrato de amônio e a temperatura apresentaram alto impacto na produção do polímero. Aroskar, Kamat S. D. e Kamat D. V. [13] aplicaram planejamento fatorial fracionário para estudar a produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* ATCC 39920 e observaram maior relevância nos fatores extrato de levedura, NaHCO_3 e KH_2PO_4 , obtendo uma produção ótima de $0,7 \text{ g.L}^{-1}$.

Além dos componentes acima mencionados, foi descrito que aminoácidos e ácidos orgânicos apresentam interferência no metabolismo de *Streptococcus*. A adição de glutamina no meio de cultivo é conhecida por aumentar a produção do polímero [14-16], devido a esta favorecer a síntese de UDP-N-acetilglicosamina, unidade precursora para a produção de ácido hialurônico [4]. Aroskar, Kamat S. D. e Kamat D. V. [15] observaram um aumento de $0,7$ para 1 g.L^{-1} de ácido hialurônico quando adicionado glutamina e arginina na concentração de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$. A arginina foi reportada como aminoácido essencial para o crescimento microbiano e produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 [17]. Im et al. [14] avaliaram dezessete aminoácidos e vinte e três ácidos

orgânicos, obtendo que glutamina, glutamato e ácido oxálico influenciam positivamente na produção do polímero.

Desta maneira, este trabalho teve como objetivo identificar os componentes importantes do meio de cultivo, através de planejamento fatorial fracionário e delineamento composto central rotacional, e otimizar, por metodologia de superfície de resposta, a biossíntese de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* ATCC 39920. Utilizou-se como variáveis sacarose, extrato de levedura, glutamina, glutamato e ácido oxálico. A produção dos ácidos orgânicos, láctico, fórmico e acético, foi acompanhada para analisar os fluxos metabólicos nas condições experimentais.

Material e Métodos

Microrganismo

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

Preservação do microrganismo e pré-inóculo

A cultura estoque foi mantida em solução salina contendo 50% de glicerol a -80°C . O pré-inóculo foi preparado transferindo 1 mL desta cultura para Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C e 150 rpm por 48 h.

Meio de Cultivo e Fermentação

Os diferentes meios descritos nos delineamentos experimentais (Tabelas 1 e 3) foram suplementados em g.L^{-1} com: K_2HPO_4 , 2,5; NaCl, 2,0 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 e o pH foi ajustado em 8,0. A glicose foi autoclavada em separado e os aminoácidos esterilizados por filtração em membrana de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore).

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL dos diferentes meios, incubados em shaker a 100 rpm e 37°C por 24 h. O inóculo foi de 10% (v/v) do pré-inóculo. O cultivo foi interrompido por

centrifugação a 9956 g por 15 min a 4°C. No sobrenadante foram quantificados os ácidos hialurônico, láctico, acético e fórmico.

Delineamento Experimental

Avaliação da concentração de sacarose, extrato de levedura, glutamina, glutamato e ácido oxálico na produção de ácido hialurônico

As variáveis, concentrações de (X_1) sacarose (10; 30; 50 g.L⁻¹), (X_2) extrato de levedura (10; 30; 50 g.L⁻¹), (X_3) glutamato (0;0,3; 0,6 g.L⁻¹), (X_4) glutamina (0;0,3; 0,6 g.L⁻¹) e (X_5) ácido oxálico (0;0,3; 0,6 g.L⁻¹) foram estudadas através de planejamento fatorial fracionário 2⁽⁵⁻¹⁾ com 4 pontos centrais (Tabela 1). Os fatores e os níveis das variáveis foram baseados na literatura e em experimentos preliminares (dados não apresentados). Esse experimento teve como objetivo identificar as variáveis significativas em estudo e otimizar a produção da variável resposta, ácido hialurônico, sendo acompanhada a produção dos ácidos láctico, acético e fórmico.

Otimização da concentração de extrato de levedura e glutamina

Após análise dos resultados do planejamento anterior, as concentrações de extrato de levedura (X_2) (50; 57,32; 92,68 e 100 g.L⁻¹) e glutamina (X_4) (0,6; 0,9514; 1,8; 2,6486; 3,0 g.L⁻¹) foram avaliadas por delineamento composto central rotacional 2² com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais (Tabela 3). As concentrações de sacarose, glutamato e ácido oxálico foram definidas através do estudo preliminar e mantidas fixas. Após análise estatística deste experimento, foi realizada uma confirmação experimental em triplicata nas coordenadas (+1,41421; -0,707), ou seja, 100 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 1,2 g.L⁻¹ de glutamina. A variável resposta objetivo da otimização foi o ácido hialurônico, sendo acompanhada a produção dos ácidos láctico, acético e fórmico.

Métodos Analíticos

Para a quantificação dos ácidos hialurônico, láctico, fórmico e acético, amostras do sobrenadante foram filtradas em membranas de 0,45 µm (Millipore) e injetadas (20 µL) em cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE), equipado com detector de índice de refração (Shimadzu RID – 10A). 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 e fórmico foram estudados utilizando coluna Aminex HPX – 87H de ácidos orgânicos 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. A curva de calibração do ácido hialurônico foi construída com hialuronato de sódio (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) variando de 100 a 600 µg.mL⁻¹ e para os ácidos orgânicos utilizou uma mistura dos padrões de 50 a 500 µg.mL⁻¹.

Análise estatística

A resposta concentração de ácido hialurônico em g.L⁻¹ obtida nos experimentos realizados foi analisada pelo programa Statistica 9.0 [18] para análise de variância (ANOVA) ao nível de significância de 5%, e metodologia de superfície de resposta (MRS) para otimização da produção. A otimização, quando aplicada, fez uso da função desejabilidade que é uma transformada da resposta tal que corresponde a 0,0 para resposta indesejável e 1,0 para mais desejável [19]. Os resultados obtidos nos experimentos foram analisados pela equação (1):

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_i b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=2}^n b_{ij} x_i x_j \quad (i < j) \quad (1)$$

onde Y é a variável resposta, b₀ é o intercepto, b_i é o coeficiente para o efeito linear, b_{ii} é o coeficiente para o efeito quadrático e b_{ij} é o coeficiente para o efeito da interação, e x é o nível codificado da equação.

Resultados e discussão

Avaliação da Concentração de Sacarose, Extrato de Levedura, Glutamato, Glutamina e Ácido Oxálico na Produção de Ácido Hialurônico

A concentração das fontes de carbono e nitrogênio e outros suplementos do meio de cultivo já foram descritas como importantes variáveis para obtenção do polímero [11-16]. Portanto, as concentrações de sacarose, extrato de levedura, glutamato, glutamina e ácido oxálico foram avaliados por planejamento fatorial $2^{(5-1)}$ (Tabela 1). As maiores produções do polímero obtida neste planejamento foram nos ensaios 3 e 16 (Tabela 1), atingindo $0,608 \text{ g.L}^{-1}$. As condições destes ensaios correspondem a 10 g.L^{-1} de sacarose e 50 g.L^{-1} de extrato de levedura (ensaio 3) e 50 g.L^{-1} de sacarose e de extrato de levedura e $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina, glutamato e ácido oxálico (ensaio 16). Comparando os resultados dos ácidos orgânicos nestes dois ensaios, observa-se que as produções de ácido láctico, fórmico e acético também foram similares, indicando um mesmo fluxo de carbono na via metabólica.

(Tabela 1)

Com exceção aos ensaios 13 e 14 (Tabela 1), os quais continham $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamato e glutamina e que obtiveram uma produção de $0,578 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,566 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido hialurônico, respectivamente; os ensaios contendo extrato de levedura a 10 g.L^{-1} (Ensaio 1; 2; 5; 6; 9; 10 – Tabela 1) obtiveram baixa produção do polímero, variando de $0,290$ a $0,371 \text{ g.L}^{-1}$. Contudo, analisando a síntese dos ácidos orgânicos, observa-se que a glutamina e o glutamato (ensaio 13 e 14 - Tabela 1) não interferiram no fluxo de carbono para a via heterolática, e sim somente na produção do ácido hialurônico. Em biorreator, Shah, Badle e Ramachandran [16] também observaram uma influência positiva da adição de glutamina na produção de ácido hialurônico, porém, a concentração de ácido láctico diminuiu. Estes autores descrevem que a glutamina aumenta a síntese de N-acetilglicosamina, o que é justificado pelo fato deste aminoácido ser doador de um grupo amino.

Im et al. [14] estudaram a adição de diversos aminoácidos e ácidos orgânicos no meio de cultivo para a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus* sp. ID9102 e observaram que a adição de 0,04% de glutamina, 0,06% de glutamato e 0,02% de ácido oxálico aumentou a produção em 20%. Contudo, Armstrong, Cooney e John [17] descreveram que a utilização de um meio quimicamente definido com 11 aminoácidos e glutamina, como principal fonte de nitrogênio, causou um decréscimo na velocidade específica celular de *S. zooepidemicus* ATCC 35246 e na produtividade do ácido hialurônico, quando comparado ao meio contendo somente extrato de levedura como fonte de nitrogênio e aminoácidos. Segundo os autores esse fato ocorre devido a alguns aminoácidos competirem pelo mesmo sistema de transporte e a presença de peptídeos no extrato de levedura permitir rotas alternativas para a assimilação dos aminoácidos.

A concentração de extrato de levedura provocou um efeito positivo sobre 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} (Tabela 1). Estes resultados indicam que o aumento na concentração de extrato de levedura favorece o fluxo de carbono para a via homolática, uma vez que na síntese dos demais ácidos esta relação não foi observada. Diferente deste, estudo realizado em biorreator obteve produção constante de ácido láctico em extrato de levedura variando de 5 a 15 g.L^{-1} [20].

Após avaliação do efeito das variáveis em estudo através do gráfico de probabilidade normal (Figura 1), determinou-se que os fatores que apresentaram maiores efeitos na produção do polímero foram extrato de levedura, glutamato, glutamina e os interceptos x_1 e x_3 , x_2 e x_3 , x_3 e x_4 , x_3 e x_5 e x_4 e x_5 , sendo estes considerados para a análise de variância (Tabela 2). Através desta identificou-se o extrato de levedura, a glutamina e os interceptos x_1 e x_3 , x_2 e x_3 e x_2 e x_4 como variáveis significativas ($p < 0,05$) para a produção de ácido hialurônico. O modelo explicou 87% ($R^2 = 0,87$) dos resultados esperados e a falta de ajuste e o efeito de curvatura não foram significativos ($p > 0,05$).

O efeito significativo da fonte de nitrogênio também foi observado por Aroskar, Kamat, S. D e Kamat, D.V. [13], Im et al. [14] e Kotra et al [21] que utilizaram extrato de levedura; Patil, Kamalja e Chaudari [11] com peptona de soja e Khue e Vo [12] que utilizaram extrato de levedura, peptona e extrato de carne.

(Figura 1)

(Tabela 2)

A resposta para a produção de ácido hialurônico pode ser estimada pela equação (2):

$$Y = 0,453 + 0,051x_2^* + 0,024x_3 + 0,059x_4^* + 0,029x_1x_3 - 0,037x_2x_3^* + 0,041x_3x_4 + 0,023x_3x_5 + 0,023x_4x_5 \quad (2)$$

onde Y é a resposta para a produção de ácido hialurônico e x_1 , x_2 , x_3 , x_4 e x_5 são os valores codificados de sacarose, extrato de levedura, glutamato, glutamina e ácido oxálico, respectivamente.

Pela Figura 2, a qual mostra as melhores condições para a produção de ácido hialurônico, dentre as estudadas, observa-se que as concentrações de 50 g.L⁻¹ de sacarose, 50 g.L⁻¹ 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 são as ideais para a produção de ácido hialurônico. Essa análise é confirmada pelo ensaio 16 (Tabela 1), no qual se obteve a maior produção do polímero.

Poucos são os trabalhos que utilizam delineamentos estatísticos para a otimização do meio de cultivo na produção de ácido hialurônico [13]. Patil, Kamalja e Chaudari [11], através de um delineamento fatorial completo e, posteriormente, delineamento composto central, estimaram uma produção de 0,798 g.L⁻¹ em meio contendo, 4,05% de glicose, 5,12% de peptona de soja, 0,075% de MgSO₄.7H₂O e 0,25% de K₂HPO₄. Ferrari et al. [22] avaliaram a concentração inicial de glicose e a aeração imposta ao biorreator por delineamento composto central rotacional e descreveram produtividade de 6,05 g.g⁻¹ em 15 g.L⁻¹ de glicose e aeração de 0,53 L.min⁻¹. Utilizando uma cepa mutante, *Streptococcus zooepidemicus* 3523-7, Kotra et al [21] obtiveram um aumento na produção do polímero de 0,738 g.L⁻¹ para 1,386 g.L⁻¹ através da otimização do meio de cultivo por arranjos ortogonais de Taguchi seguido de delineamento composto central rotacional.

Visando otimizar as condições de cultivo para maximizar a produção de ácido hialurônico e considerando que os resultados (Figura 2) indicaram um possível aumento na concentração do polímero com o incremento das variáveis significativas, extrato de levedura e glutamina, um segundo planejamento foi realizado (Tabela 3).

(Figura 2)

Otimização da Concentração de Extrato de Levedura e Glutamina

A Tabela 3 apresenta a produção de ácido hialurônico, acompanhada dos ácidos orgânicos, em função da concentração de extrato de levedura e glutamina em meio contendo sacarose (50 g.L^{-1}), glutamato ($0,6 \text{ g.L}^{-1}$) e ácido oxálico ($0,6 \text{ g.L}^{-1}$). A produção dos ácidos hialurônico, láctico, fórmico e acético apresentou menores variações quando comparado ao planejamento anterior, o que indica que as condições em estudo estão próximas ao ótimo. Resultado semelhante foi observado por Patil, Kamalja e Chaudari [11], em que o estudo da concentração de glicose e peptona de soja por delineamento composto central sugeriu um aumento na concentração de peptona de soja, porém quando esta foi aumentada de 50 g.L^{-1} para 55 g.L^{-1} não houve acréscimo na produção do polímero. A maior produção observada nesse experimento foi de $0,654 \text{ g.L}^{-1}$ em 100 g.L^{-1} de extrato de levedura e $1,8 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina (Ensaio 6 – Tabela 3). Aroskar, Kamat S. D. e Kamat D. V. [15] também avaliaram a adição de glutamina no meio em concentrações variando de $0,1$ a $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ e obtiveram maior produção do polímero em $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ do aminoácido, resultado próximo ao obtido nesse estudo.

(Tabela 3)

A análise de variância (Tabela 4) demonstrou que somente o termo linear do extrato de levedura foi significativo ao nível de 5% de confiança. O modelo explicou 67% ($R^2=0,669$) dos resultados e a falta de ajuste não foi significativa ($p>0,05$).

(Tabela 4)

A resposta para a produção de ácido hialurônico pode ser estimada pela equação (3):

$$y = 0,5595 + 0,0380x_2 + 0,0088x_2^2 - 0,0067x_4 + 0,0079x_4^2 - 0,0245x_2x_4 \quad (3)$$

onde Y é a resposta para a produção de ácido hialurônico e x_2 e x_4 são os valores codificados de extrato de levedura e glutamina, respectivamente. A curva de contorno gerada pela equação do modelo está apresentada na Figura 3.

(Figura 3)

Através de uma análise de tendência junto a um ajustamento spline e um sistema refinado de rede de pontos, estimou-se uma sub-região com produção ótima de $0,664 \text{ g.L}^{-1}$ em 100 g.L^{-1} de extrato de levedura e $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina, o que equivale aos níveis codificados de $+1,41421$ e $-0,707$, respectivamente. Para validar este modelo, foi realizado 3 ensaios nestas condições, na qual obteve-se produção de $0,569 \pm 0,005 \text{ g.L}^{-1}$. O valor obtido apresentou-se próximo ao valor predito com 95% de confiança. A produção de ácido láctico, fórmico e acético foi de $9,601 \pm 0,423 \text{ g.L}^{-1}$; $4,590 \pm 0,556 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,805 \pm 0,271 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente.

Concluiu-se que dentre as condições estudadas neste trabalho, a maior produção foi de $0,654 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido hialurônico em meio contendo (g.L^{-1}): extrato de levedura, 100; sacarose, 50; glutamina 1,8; glutamato, 0,6 e ácido oxálico, 0,6. Extrato de levedura foi definido como variável significativa para a produção de ácido hialurônico, no planejamento fatorial fracionário e delineamento composto central, e glutamina foi significativa somente no planejamento fatorial fracionário. A adição de $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamato e ácido oxálico e 50 g.L^{-1} de sacarose foram favoráveis a produção do polímero e a avaliação dos ácidos orgânicos indicou que o aumento na concentração de extrato de levedura, favoreceu a produção de ácido láctico.

Agradecimentos Os autores agradecem pelo suporte financeiro fornecido pela Capes – Brasil e ao professor Dr. Dionisio Borsato por permitir processar os dados no software empregado.

Referências

- [1] Laurent, T. C., Fraser, J. R. E. (1992). Hyaluronan. *Faseb J* 1992; 6:2397:2404.
- [2] Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R., Gemeiner, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial application. *Biotechnol Lett* 2007;29:17-25.
- [3] Marcellin, E., Chen, W., Nielsen, L. K. Microbial hyaluronic acid biosynthesis. In: Rehm BHA (Eds.), *Microbial Production of Biopolymers*. Caister Academic Press; 2009, p. 163-180.
- [4] Chong, B. F., Blank, L. M., Mclaughlin, R., Nielsen, L. K. Microbial Hyaluronic Acid Production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;66:341-351.
- [5] Yamada, T., Kawasaki, T. Microbial Synthesis of Hyaluronan and Chitin: New Approaches. *J Biosci Bioeng* 2005;99:521-528.
- [6] Pires, A. M. B., Santana M. H. A. Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;162:1751–1761.
- [7] Weuster-Botz, D. Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search?. *J Biosci Bioeng* 2000;90(5):473-483.
- [8] Box, G. E. P., Behnken, D. W. Some new three level design for the study of quantitative variables. *Technometrics* 1970;2(4):455-475.
- [9] Plackett, R.L., Burman, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 1964;2(4):305-325.
- [10] Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, M., Ramachandran, S., Ghosh, S., Szakacs, G., Pandey, A. Use of response methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochem Eng J* 2003;15:107-115.
- [11] Patil K. P., Kamalja K. K., Chaudhari B. L. (2011). Optimization of medium components for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 using a statistical approach. *Carbohydr Polym* 2011;86:1573-1577.
- [12] Khue, N. T. H., Vo, P. T. M. Study of complex nutrients, temperature and salts on hyaluronic acid production In *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 43079. *J Appl Pharm Sci* 2013;3 (5):12-15.

- [13] Aroskar, V.J, Kamat, S.D., Kamat, D. V. Effect of Various Physical Parameters and Statistical Medium Optimization on Production of Hyaluronic Acid Using *S. equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920. IIOAB letters 2012;2:x –xx.
- [14] 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. J Indust Microbiol Biotechnol 2009;36:1337-1344.
- [15] Aroskar, V.J, Kamat, S.D., Kamat, D. V. Effect of various nutritional supplements on hyaluronic acid production. IIOAB Letters 2012;2:16-24.
- [16] Shah, M. V., Badle, S. S., Ramachandran. Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. Biochem Eng J 2013;80:53-60.
- [17] Armstrong, D.C., Cooney, M. J., Johns M. R. Growth and amino acid requirement of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. Appl Microbiol Biotechnol 1997;47:309-312.
- [18] Statistica for Windows v.9.0, Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA, 2009.
- [19] Box, G.E.P., Draper, N. R. Empirical model building and response surfaces, John Wiley & Sons: New York, USA, 1987, p. 205 – 230 and p. 515 -520.
- [20] Chen, S.-J., Chen, J.L., Huang, W.-C., Chen, H.-L. Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. Korean J Chem Eng 2009;26(2):428-432.
- [21] Kotra S. R., Venkateswarulu, T.C., Babu, D. J., Sudheer, Y., Reddy, K. S., Reravali, J.B., Pulicherla, K. K. Cost effective media optimization for the enhanced production of hyaluronic acid using a mutant strain *Streptococcus zooepidemicus* 3523-7:A statistical approach. Int J Sci Technol 2013;60:83-96.
- [22] Ferrari, F.A, Motta, F.L., Bastos, R.G., Santana, M. H. A. The solid cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in polyurethane foam as a strategy for the production of hyaluronic acid. Appl Biochem Biotechnol 2013;170:1491-1502.

Legendas de Figuras

Figura 1 - Efeito dos fatores estudados em função da probabilidade normal

Figura 2 - Parâmetro de desejabilidade estimado na condição máxima de produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus*

Figura 3 - Curva de contorno da produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* em função da concentração de glutamina e extrato de levedura

Tabelas

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

Ensaio (ordem padrão)*	Níveis dos Fatores					Respostas			
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	Ácido hialurônico (g.L ⁻¹)	Ácido lático (g.L ⁻¹)	Ácido fórmico (g.L ⁻¹)	Ácido acético (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	+1	0,302	2,611	6,095	1,002
2	+1	-1	-1	-1	-1	0,320	3,547	6,959	0,836
3	-1	+1	-1	-1	-1	0,608	7,619	6,446	1,528
4	+1	+1	-1	-1	1	0,367	8,691	7,003	1,355
5	-1	-1	+1	-1	-1	0,290	3,578	6,824	0,995
6	+1	-1	+1	-1	+1	0,371	2,781	6,320	1,091
7	-1	+1	+1	-1	+1	0,380	9,688	8,146	1,581
8	+1	+1	+1	-1	-1	0,415	8,226	6,619	1,154
9	-1	-1	-1	+1	-1	0,350	3,175	6,761	0,870
10	+1	-1	-1	+1	+1	0,344	2,931	6,511	0,960
11	-1	+1	-1	+1	+1	0,547	8,484	7,276	1,467
12	+1	+1	-1	+1	-1	0,501	4,103	7,564	1,756
13	-1	-1	+1	+1	+1	0,578	3,821	7,215	1,887
14	+1	-1	+1	+1	-1	0,563	3,707	7,072	1,245
15	-1	+1	+1	+1	-1	0,512	8,054	6,990	1,239
16	+1	+1	+1	+1	+1	0,608	7,105	5,407	1,294
17	0	0	0	0	0	0,481	6,009	6,566	1,167
18	0	0	0	0	0	0,562	5,678	6,393	1,038
19	0	0	0	0	0	0,491	6,081	6,067	0,976
20	0	0	0	0	0	0,463	5,919	6,608	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

Tabela 2 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial fracionário

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F	P-valor
X ₂	0,042071	1	0,042071	16,90948	0,001724*
X ₃	0,008933	1	0,008933	3,59044	0,084686
X ₄	0,056349	1	0,056349	22,64814	0,000591*
X ₁ × X ₃	0,013921	1	0,013921	5,59524	0,037453*
X ₂ × X ₃	0,022039	1	0,022039	8,85791	0,012604*
X ₃ × X ₄	0,027048	1	0,027048	10,87125	0,007114*
X ₃ × X ₅	0,008785	1	0,008785	3,53076	0,086979
X ₄ × X ₅	0,008298	1	0,008298	3,33498	0,095060
Erro	0,027368	11	0,002488		
Total SS	0,214813	19			

Lack of fit: p=0,421509; R² = 0,87259; *Significativo para valores de p<0,05.

Tabela 3 - Produção de ácido hialurônico e ácidos orgânicos por *Streptococcus zooepidemicus* variando a concentração de extrato de levedura e glutamina por delineamento composto central rotacional

Ensaio (ordem padrão)*	Variáveis Codificadas		Respostas			
	X ₂	X ₄	Ácido hialurônico (g.L ⁻¹)	Ácido láctico (g.L ⁻¹)	Ácido fórmico (g.L ⁻¹)	Ácido acético (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	0,536	6,924	4,953	1,179
2	-1	+1	0,594	7,578	5,739	1,583
3	+1	-1	0,620	9,473	5,669	1,402
4	+1	+1	0,580	9,740	5,640	1,442
5	-1,41421	0	0,488	5,935	4,663	1,154
6	+1,41421	0	0,654	9,014	4,697	1,259
7	0	-1,41421	0,594	8,776	5,737	1,458
8	0	+1,41421	0,544	8,315	5,498	1,444
9	0	0	0,553	10,443	6,554	1,498
10	0	0	0,599	9,053	5,502	1,422
11	0	0	0,526	8,392	5,692	1,561
Códigos	Fatores	Níveis				
		-1,41421	-1	0	+1	+1,41421
(X ₂)	Extrato de Levedura (g.L ⁻¹)	50	57,32	75	92,68	100
(X ₄)	Glutamina (g.L ⁻¹)	0,6	0,9514	1,8	2,6486	3,0

(*) Os ensaios foram aleatorizados

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) do delineamento composto central rotacional

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F	P-valor
x ₂ (L)	0,011531	1	0,011531	7,842047	0,037977*
x ₂ (Q)	0,000440	1	0,000440	0,299117	0,607950
x ₄ (L)	0,000355	1	0,000355	0,241106	0,644200
x ₄ (Q)	0,000357	1	0,000357	0,242529	0,643247
x ₂ × x ₄	0,002399	1	0,002399	1,631631	0,257574
Erro	0,007352	5	0,001470		
Total SS	0,022253	10			

Lack of Fit: p=0,494931; R²= 0,66962, *Significativo para valores de p<0,05 ; L=linear ; Q=quadrático

Figuras

Figura 1

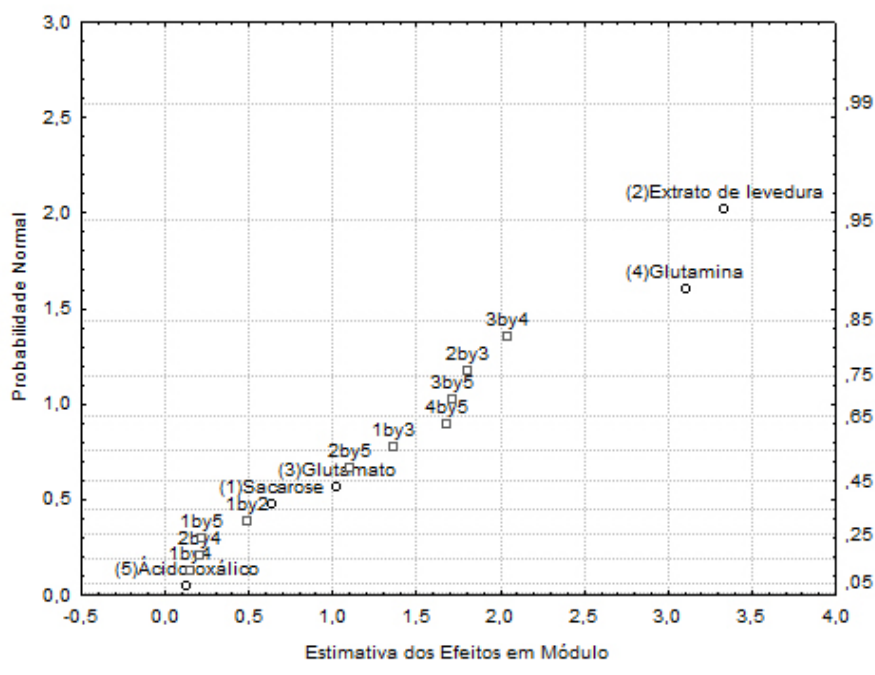


Figura 2

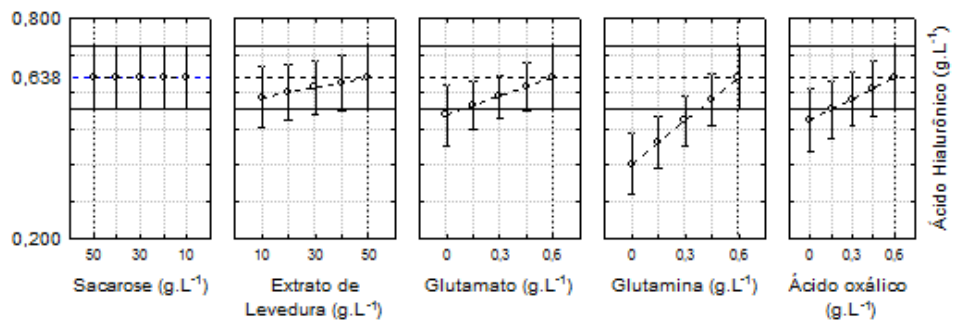
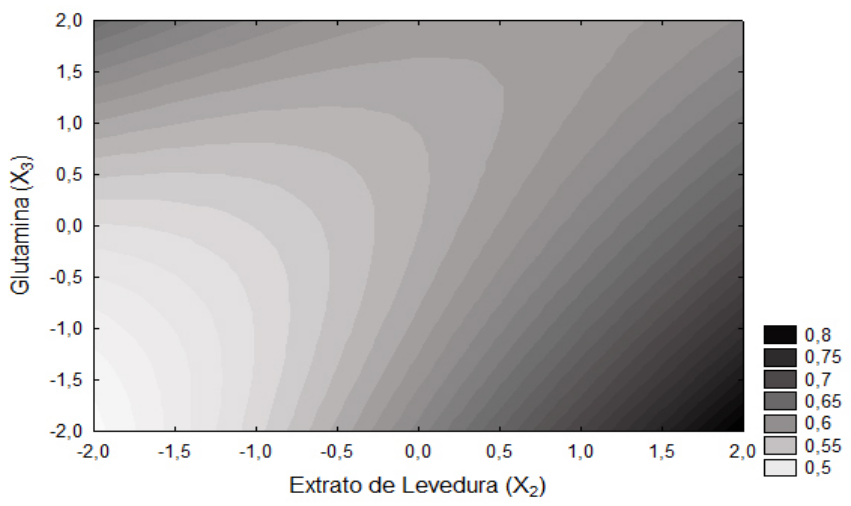


Figura 3

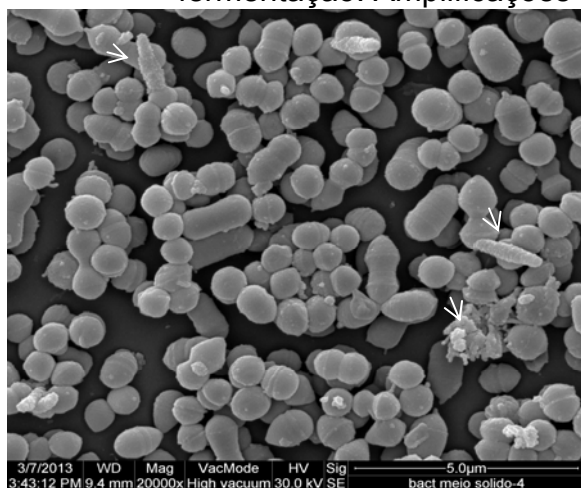


5.4 RESULTADOS COMPLEMENTARES

1 Caracterização da Morfologia Celular e Presença do AH na Célula

Uma análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada a fim de verificar a morfologia celular da bactéria *Streptococcus zooepidemicus* e observar a presença de ácido hialurônico na célula. As Figuras (a) e (b) foram obtidas de células crescidas em BHI agar e ressuspensas em salina 0,9%. As Figuras (d) e (e) foram obtidas de amostras do ensaio 13 da fermentação descrita no item 4.2.3.1, otimização de parâmetros físicos para produção de AH.

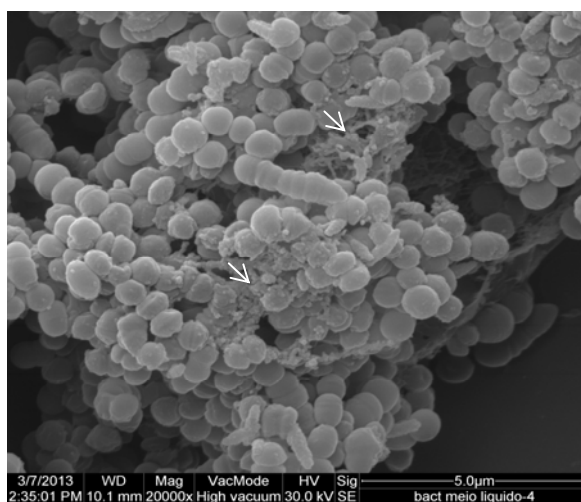
Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura do microrganismo *Streptococcus zooepidemicus* crescido em (a) e (b) BHI agar (c) e (d) meio líquido de fermentação. Amplificações (a) 20000x (b) 40000x (c) 20000 e (d) 10000



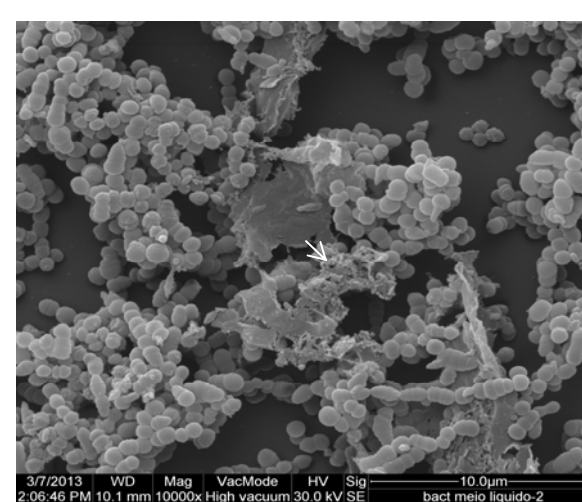
(a)



(b)



(c)



(d)

Através destas imagens pode-se observar que as células bacterianas de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 são ovóides e encontram-se comumente arranjadas em pares ou cadeias. Além disso, as micrografias mostram um acúmulo de ácido hialurônico na superfície da célula, como pode ser observado nas figuras (a) e (b). Após 24 horas de fermentação observa-se pela figura (c) e (d) que o aumento na produção do polímero faz com que o ácido hialurônico seja liberado no espaço extracelular.

2 Cromatograma do Padrão de Ácido Hialurônico

Figura 2 – Cromatograma do padrão de ácido hialurônico na concentração de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

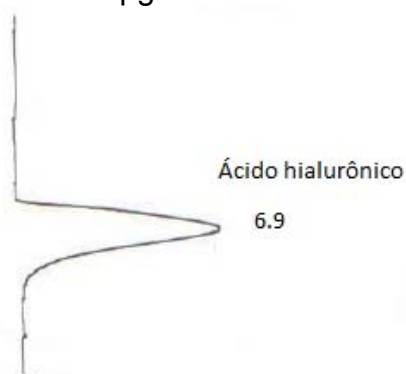
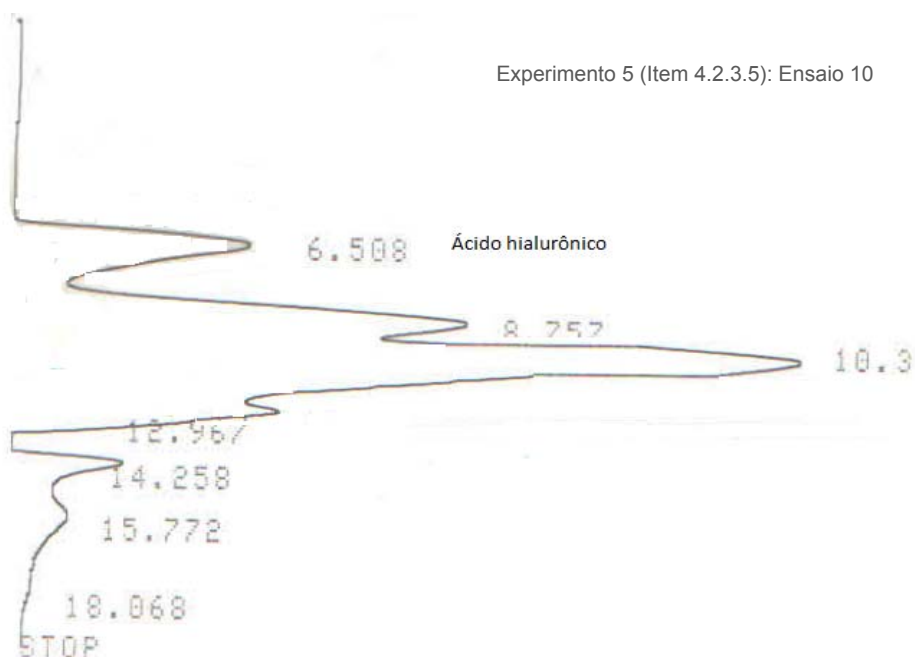


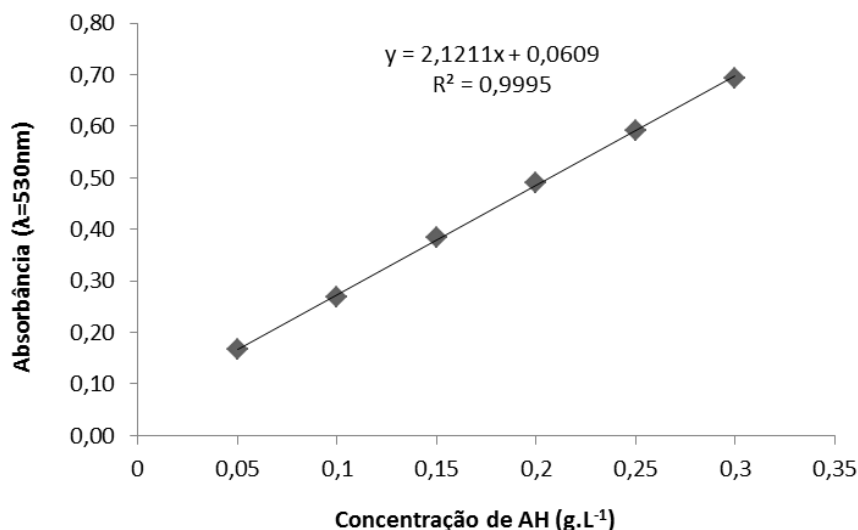
Figura 3 – Cromatograma de uma amostra da fermentação.



3 Curvas de Calibração do Ácido Hialurônico e dos Ácidos Orgânicos

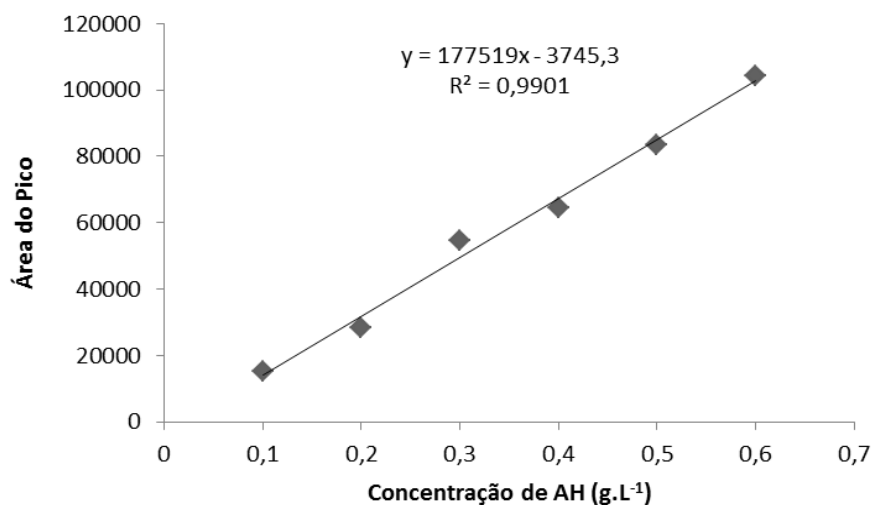
3.1 CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO ATRAVÉS DO MÉTODO COLORIMÉTRICO DE CARBAZOL

Figura 4 - Curva padrão para determinação da concentração de ácido hialurônico através do método colorimétrico de Carbazol



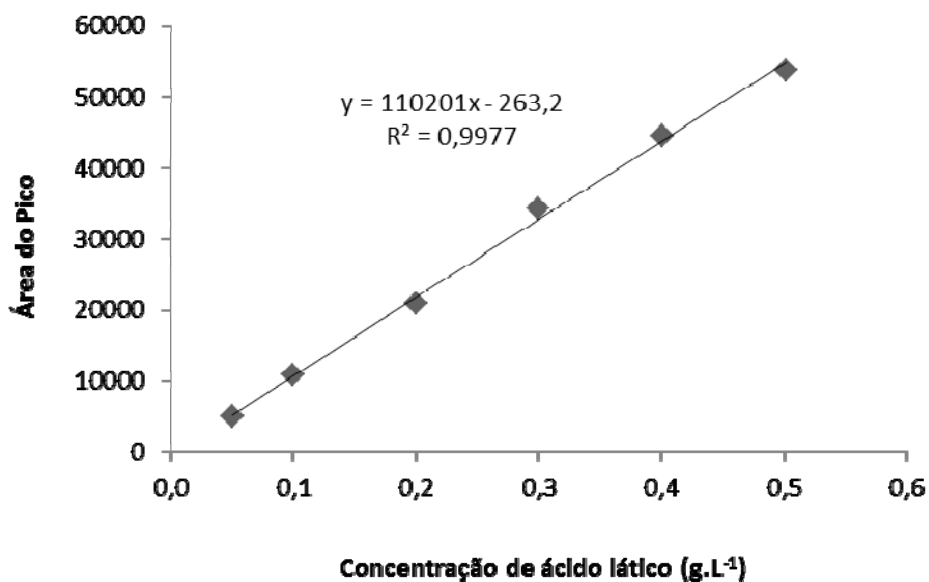
3.2 CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR CLAE

Figura 5 - Curva padrão para determinação da concentração de ácido hialurônico por CLAE



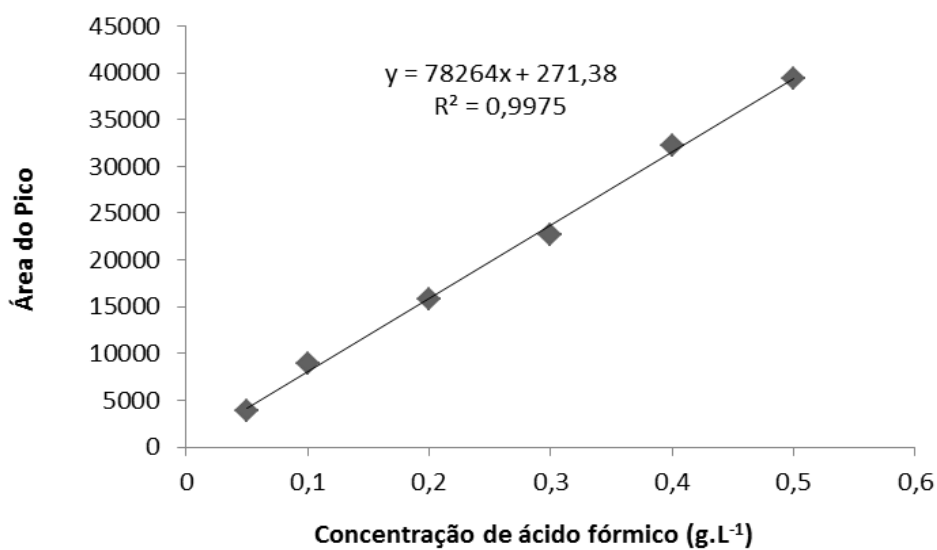
3.3 CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO POR CLAE

Figura 6 - Curva padrão para determinação da concentração de ácido láctico por CLAE



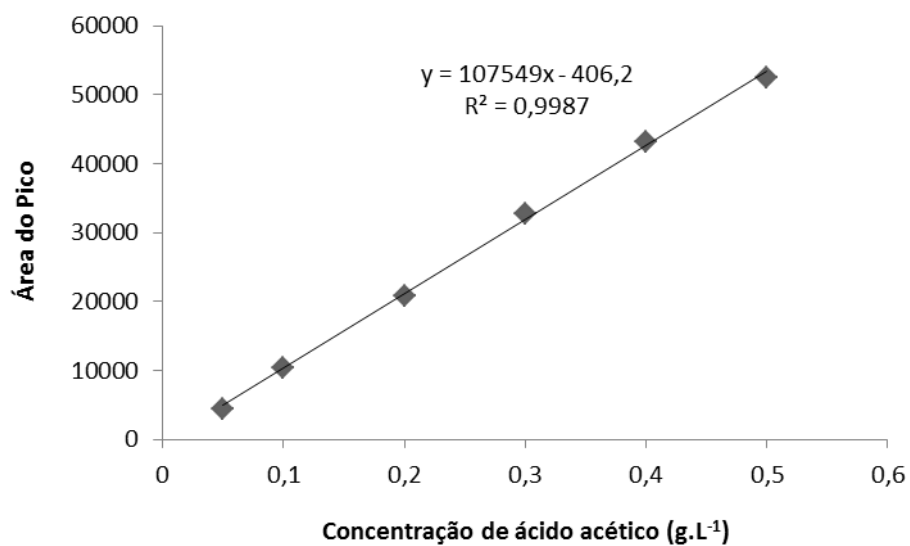
3.4 CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO POR CLAE

Figura 7 - Curva padrão para determinação da concentração de ácido fórmico por CLAE



3.5 CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO POR CLAE

Figura 8 - Curva padrão para determinação da concentração de ácido acético por CLAE



6 CONCLUSÕES

- Os resultados desse trabalho indicaram que para a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* o pH e a temperatura, e os parâmetros nutricionais, extrato de levedura e glutamina, apresentaram efeitos significativos, sendo as demais variáveis estudadas, agitação, glicose, sacarose, glutamato e ácido oxálico, importantes pelas interações na produção do polímero.
- Melaço e caldo de cana-de-açúcar e proteína de soja revelaram-se como fontes promissoras para a redução de custos de produção.
- A produção do polímero foi otimizada através de metodologias estatísticas e as descrições das alterações metabólicas decorrentes das condições avaliadas permitiram um maior entendimento do metabolismo.

REFERÊNCIAS

- ADAM, N.; GHOSH, P. Hyaluronan molecular weight and polydispersity in some commercial intra-articular injectable preparations and in synovial fluid. **Inflammation Research**, v. 50, p. 294-299, 2001.
- AKASAKA, H.; KOMASAKI, H. ARAI, T. **Fermentation method for production hyaluronic acid**. United Patent n. 4, 801, 539, 1989.
- ALBERTINI, R.; PASSI, A.; ABUJA, P.; LUCA, G. The effect of glycosaminoglycans and proteoglycans on lipid peroxidation. **International Journal Molecular Medicine**, v. 6, n.2, p. 129-136, 2000.
- ARMSTRONG, D.C. The molecular weight properties of hyaluronic acid produced *Streptococcus zooepidemicus*. Queensland: University of Queensland, 1997. (PhD. Thesis). In: CHONG, B. F; BLANK, L. Metabolic engineer of hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n.4, p. 341-351, 2005.
- ARMSTRONG, D. C.; JOHNS, M. R. Culture condition affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2759-2764, 1997.
- ARMSTRONG, D.C.; COONEY, M. J.; JOHNS M. R. Growth and amino acid requirement of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p.309-312, 1997.
- AROSKAR, V. J.; KAMAT, S. D.; KAMAT, D. V. effect of various physical parameters and statistical medium optimization on production of hyaluronic acid using *S. equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920. **Institute of Integrative Omics and Applied letters**, v.2, p. x –xx, 2012a
- AROSKAR, V.J; KAMAT, S.D.; KAMAT, D. V. Effect of various nutritional supplements on hyaluronic acid production. **Institute of Integrative Omics and Applied letters**, v.2, p. 16-24, 2012b.
- BALAZS, E. A. Viscoelastic properties of hyaluronan and its therapeutic use. In: GARG, H. G.; HALES, C. A. **Chemistry and biology of hyaluronan**. 1. Ed. Oxford: Elsevier, p. 415-455, 2004.
- BARROS NETO, B; SCARMINIO, I.S.; BRUNS,E.R. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2ªed. São Paulo: Editora Unicamp, 1996.
- BROWN, K. K.; RUIZ, L. C.; RINJ, I. **Ultrapure hyaluronic acid and method of making it**. United States Patent n. 4, 782, 046,1988.
- BOX, G. E. P; DRAPER, N. R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: John Wiley & Sons, 1987.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building**. New York: Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, 1987.

CAMPO, G. et al. The antioxidant and antifibrogenic effects of the glycosaminoglycans hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in subchronic rat modelo of carbon tetrachloride-induced liver fibrogenesis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 148, p. 125-138, 2004.

CHAN, R. W.; GRAY, S. D.; TITZE, I. R. The importance of hyaluronic acid in vocal fold biomechanics. **Otolaryngology - Head Neck Surgery**, v. 124, p. 607-614, 2001.

CHEN S.-J. et al. Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 2, p. 428-432, 2009.

CHONG, B.F.; BLANK, L. **metabolic engineering of hyaluronic acid production**. The Department of Chemical Engineering, University of Queensland, St. Lucia, Australia, 1998. Disponível em: <<http://web.aibn.uq.edu.au/cssb/Projects/HA.html>>. Acesso em: 28 de julho de 2012.

CHONG, B. F. et al. Microbial Hyaluronic Acid Production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, 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, p. 153–162, 2003.

COONEY, M. J. et al. Structured model-based analysis and control of the hyaluronic acid fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*: Physiological implications of glucose and complex-nitrogen-limited growth. **Biotechnology Progress**, v. 15, n.5, p. 898-910, 1999.

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

DEANGELIS, P. L. Microbial glycosaminoglycan glycotransferases. **Glycobiology**, v.12. n.1, p.9R-16R, 2002.

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

DOUGHERTY, B. A.; RIJN, I. Molecular characterization of hasB from na operon required for hyaluronic acid synthesis in group a Strptococci. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 10, p. 7118-7124, 1993.

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

EDMONDS, M. E.; FOSTER, A. V. Diabetic foot ulcers. **British Medicine Journal**, v. 332, p. 407-410, 2006.

ELKA SYSTEM. **Ácido hialurônico no nosso corpo**. Disponível em: <<http://www.elkasystems.de/pt/behandlung.php>>. Acesso em: 24 de novembro 2012.

ELWOOD, D. C. et al. **Production of hyaluronic acid**. United States Patent n. 5, 411, 874, 1995.

ESPOSITO, E.; MENEGATTI E.; CORTESI, R. Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.288, p. 35-49, 2005.

FILISSETTI-COZZI, T. M.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, n.1, p.157-162, 1991.

FOUISSAC, E. ; MILAS, M.; RINAUDO, M. Shear-rate, concentration, molecular weight, and temperature viscosity, dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte. **Macromolecules**, v. 26, n.25, p.6945-6951, 1993.

FRASER, J.; LAURENT, T.; LAURENT, U. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **Journal of Internal Medicine**, v. 242, p. 27-33, 1997.

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.

HARDINGHAM, T. Solution properties of hyaluronan. In: GARG, H. G.; HALES, C. A. (Eds) **Chemistry and biology of hyaluronan**. 1. Ed. Oxford: Elsevier, p. 1-19, 2004.

HASCALL, V.C.; LAURENT, T.C. **Hyaluronan**: structure and physical properties. In: HASCALL, V.C.; YANAGISHITA, M. (Eds) **Hyaluronan Today**, 1997. Disponível em: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>. Acesso em: 25 de out. de 2012.

HUANG, W. C.; CHEN, S.J.; CHEN, T.L. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, 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 and Biotechnology**, v. 36, p.1337-1344, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, v.1. cap.4, p.44-45, 1985.

IZAWA, N.; et al. 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, 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, p.148-158, 2010.

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

KENDALL, F.E.; HEIDELBERGER, M.; DAWSON, M. A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic *Streptococcus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.118, p. 61-69, 1937.

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

KOGAN, G. et al. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial application. **Biotechnology Letters**, v. 29, p.17-25, 2007.

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.

KOTRA S. R. et al. Cost effective media optimization for the enhanced production of hyaluronic acid using a mutant strain *Streptococcus zooepidemicus* 3523-7:A statistical approach. **International Journal Science and Technology**, v.60, p. 83-96, 2013.

LAURENT, T. C.; FRASER J. R. E. Hyaluronan. **Faseb Journal**, v. 6, p. 2397-2404, 1992.

LAI, Z. et al. Medium formulation and impeller design on the biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. **African journal of microbiology research**, v.5, n.15, p. 2114-2123, 2011.

LAURENT, T.C. **Hyaluronan before 2000**. In: Hyaluronan. Proceedings of the Hyaluronan 2000 conference, Wrexham: Wales, UK, September 3-8, 2000 (Kennedy JF, Phillips GO, Williams PA, eds.), Woodhead Publishing, Abington, Cambridge, 2002.

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, p.383-388, 2008a.

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

LIU, L. et al. Modeling and optimization of microbial hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* using radial basis function neural network coupling quantum-behaved particle swarm optimization algorithm. **Biotechnology Progress**, v. 25, p. 1819-1825, 2009.

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

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951

MACEDO, A. C.; SANTANA, M. H. A. Hyaluronic acid despolymerization by ascorbate effects on solid state cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in cashew apple fruit bagasse. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 2213 - 2219, 2012.

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

MAUSOLF, A. Das hyaluronat synthesesierende system bei *Streptokokken*. Reihe: Wissenschaftliche Forschungsbeiträge Biologie/Biochemie/Chemie 20. Internann, Gauting bei Munchen, Germany, 1988. In: 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.

MCDONALD, J.; HASCALL V. C. Hyaluronan minireview series. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n.7, p.4575-4579, 2002.

MEYER, K; PALMER, J.W., The polysaccharide of the vitreous humor. **Journal of Biological Chemistry**., v.107, p.629–634, 1934.

NARINS, R.S. et al A randomized, Double-blind, multi-center comparison of the efficacy and tolerability of Restylane versus Zyplast for the correction of nasolabial folds. **Dermatologic Surgery**, v.29, p.588-595, 2003.

NIMROD, A. et al. **Method of production high molecular weight sodium hyalluronate by fermentation of streptococcus**. United State Patent: 4, 780, 414, 1988.

OGRODOWSKI, C. S. et al. Production of hyaluronic acid by *Streptococcus*: the effects of the addition of lysozyme and aeration on the formation and the rheological properties of the product. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 5, p. 121–124, 2005.

PATIL, K. P. et al. Optimization of medium components for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 using a statistical approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p.1573-1577, 2011.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada?. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.10, n.2, p.106-110, 2005.

PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Employment of factorial design for optimization of pirolisys and atomization temperatures for Al, Cd, Mo and Pb determination by ETAAS. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p.246-253, 2002.

PETROVÁ, P.; KOCA, J.; IMBERTY, A. Molecular dynamics simulation of solvated UDP-glucose in interaction with Mg^{2+} cation. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 5365-5374, 2001.

PIRES, A. M. B.; EGUSHI, S.Y.; SANTANA M. H. A. The influence of Mineral Ions on the Microbial Production and Molecular Weight of Hyaluronic Acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 2125-2135, 2010.

PIRES, A. M. B. et al. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6506-6509, 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, p. 1751–1761, 2010.

PLEVRIS, J. N. et al. Serum hyaluronan: a non-invasive test for diagnosing liver cirrhosis. **European Journal of Gastroenterology and hepatology**, v.12, p. 1121–1127, 2000.

RANGASWAMY, V.; JAIN, D. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. **Biotechnology Letters**, v.30, p. 493-496, 2008.

ROSA, C. S. et al. Antioxidant activity of hyaluronic acid extracted from chicken crest. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 38, n.9, p.2593-2598, 2008.

SCOTT, J. E.; HEATLEY, F. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: A ^{13}C NMR study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 4850 – 4855, 1999.

SHAH, M. V.; BADLE, S. S.; RAMACHANDRAN. 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.

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

STATISTICA FOR WINDOWS v.9.0, Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA ,2009.

STOOLMILLER, A. C.; DORFMAN, A. The biosynthesis of hyaluronic acid by *Streptococcus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p.236-246, 1969.

THONARD, J. C.; MIGLIORE, S. A.; BLUSTEIN, R. Isolation of hyaluronic acid from broth cultures of Streptococci. **Journal of Biological Chemistry**, v.239, p. 726-728,1963.

TLAPAK-SIMMONS, V. L. et al. 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.

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

TSUBOTA, K. et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome. **British Journal of Ophthalmology**, v. 83, p. 390-395, 1999.

TZELLOS T. G. et al. Extrinsic aging in the human skin is associated with alterations in the expression of hyaluronic acid and its metabolizing enzymes. **Experimental Dermatology**, v. 18, n.12, p. 1028-1035, 2009.

VÁZQUEZ, J. A.; MONTEMAYOR, M. I.; 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

WEIGEL, P. H.; HASCALL, V. C.; TAMMY, M. Hialuronan synthases. **American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, v. 272, n. 22, p. 13997-14000, 1997.

WEISSMAN, B.; MEYER, K. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, p. 1753-1757, 1954.

WINTER, W. T.; ARNOTT, S. Hyaluronic acid: the role of divalent cations in conformation and packing. **Journal of Molecular Biology**, v.117, n.3, p. 761-784, 1977.

WOOLCOCK, J. B. The capsule of *Streptococcus equi*. **Journal of General Microbiology**, v. 85, p. 372 -375, 1974.

WU, T.-C. **Mixture of hyaluronic acid for treating and preventing inflammatory bowel disease**. European Patent Application: EP2292243 A1, 2011.

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

ANEXOS

ANEXO A

Normas para a submissão do artigo para o periódico Applied Biochemistry and Biotechnology

APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



Applied Biochemistry and Biotechnology

Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology

Editor-in-Chief: Ashok Mulchandani

ISSN: 0273-2289 (print version)

ISSN: 1559-0291 (electronic version)

Journal no. 12010

Impact factor: 1.893



INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Submissions may be made online using Springer's Editorial Manager electronic submission site at <http://abab.edmgr.com>. First-time users will need to Register before submitting a manuscript. If you experience any problems, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

Manuscripts

- Type manuscript in English, double-spaced on numbered pages with 1- to 1.5- inch margins. Please prepare the article as a Microsoft Word document. See the Computer Graphics section for figure specifications.
- A cover letter must accompany the submission giving the rationale for publication in Applied Biochemistry and Biotechnology, particularly with respect to the originality, scientific merit and importance to the field of Applied Biochemistry and Biotechnology. Author(s) also are required to provide names and contact information (mailing address, phone and fax numbers, and e-mail address) of at least three experts in the field as potential reviewers for the manuscript. Please do not suggest anyone who may have a conflict of interest in reviewing your manuscript, such as former advisors, students, or recent collaborators.

Abstracts

Abstracts should be 100–200 words.

Index Entries

Include 5–10 index entries/key words.

Artwork

- Number figures consecutively with Arabic numerals, callouts (if any) should be lowercase letters. Include figure captions. All figures must be cited in text; figures will be placed as close as possible to the first text citation. Include figure captions on a separate, numbered manuscript sheet. Define all symbols and abbreviations used in the figure. All illustrations, including chemical structures, must be provided in professional-quality, finished form ready for direct reproduction without revision by us.
- Photographs should be of high quality and with strong contrasts to withstand some reduction. Please indicate the magnification by a rule on the photograph. Additional specifications apply regarding Computer Graphics and Color Art.
- Computer Graphics: If your submission includes Computer Graphics, acceptable software formats are: Adobe Illustrator and Adobe Photoshop v5 and up. File formats are as follows: EPS (Encapsulated Postscript), TIFF, JPEG (high-quality, low-compression) and those native software formats listed above. Unfortunately we cannot accept Microsoft PowerPoint files at this time. dpi specifications: line art should be no less than 1200 dpi; halftone scans should be 300 dpi.
- Color Art: Color art cannot be accepted unless the author is willing to assume the additional production costs involved; quotes given on request.

Nomenclature

Authors should follow the recommendation of the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. All abbreviations should be fully defined in the text

Tables

Type on separate pages. Number consecutively with Arabic numerals in order of mention in the text. Provides titles for all tables.

References

Cite in the text by italic Arabic numerals in parentheses, set on the text line, numbered in the order they appear. List at the end of the paper in consecutive order. Please follow the style indicated below:

- Journal reference: 1. Haselbeck, A. and Hösel, W. (1993) Appl. Biochem. Biotechnol. 42, 207–219.

- Chapter in book: 2. Gaastra, W. (1984), in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2: Nucleic Acids (Walker, J. M., ed.), Humana, Totowa, NJ, pp. 333–341.
- Book reference: 3. Franks, F. (1993) *Protein Biotechnology*, 2nd ed., Humana, Totowa, NJ.
- Report/Document: 4. Macgregor, S. (1993), PhD thesis, University of Hertfordshire, Hatfield, UK.
- Online: 5. Cancer Facts and Figures 2006. Available from: www.cancer.org. Accessed December 31, 2006.

Page Charges

There are NO page charges for accepted articles.

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

ANEXO B

Normas para a submissão do artigo para o periódico Bioresource Technology

BIORESOURCE TECHNOLOGY



Bioresource Technology

Editor-in-Chief: A. Pandey

ISSN: 0960-8524

Impact factor: 4.750



DESCRIPTION

Bioresource Technology publishes original articles, review articles, case studies and short communications on the fundamentals, applications and management of **bioresource technology**.

The journal's aim is to advance and disseminate knowledge in all the related areas of **biomass**, **biological waste treatment**, **bioenergy**, **biotransformations** and **bioresource systems analysis**, and **technologies** associated with conversion or production.

Topics include:

- Biofuels: liquid and gaseous biofuels production, modeling and economics
- Bioprocesses and bioproducts: biocatalysis and fermentations
- Biomass and feedstocks utilization: bioconversion of agro-industrial residues
- Environmental protection: biological waste treatment
- Thermochemical conversion of biomass: combustion, pyrolysis, gasification, catalysis.

For more details, authors should consult the Subject Classifications in the Guide for Authors.

The Journal does not consider articles dealing with crop cultivation, breeding and agronomy, plant extracts and enzymes, composites, marine organisms (except microorganisms and algae for bioprocesses), soil and air pollution, and performance of fuel combustion in engines.

Bioresource Technology does not consider part papers.

AUDIENCE

Biotechnologists, applied microbiologists, chemical and biochemical engineers, process technologists, agro-industrial waste management technologists.

IMPACT FACTOR

2012: 4.750 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2013

ABSTRACTING AND INDEXING

AGRICOLA

Agricultural Engineering Abstracts

Analytical Abstracts (Royal Society of Chemistry Information Services)

BIOSIS

Biology and Environmental Sciences

CAB Abstracts

Cambridge Scientific Abstracts

Chemical Abstracts

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences

EMBASE

Ecological Abstracts

Energy Information Abstracts

Energy from Biomass and Municipal Wastes

Engineering Index

Environmental Periodicals Bibliography

Forestry Abstracts

Fuel and Energy Abstracts

GEOBASE

Gas Abstracts

SCISEARCH

Science Citation Index

Scopus

Selected Water Resources Abstracts

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

A. Pandey, Biotechnology Division, National Inst. for Interdisciplinary Science & Technology, CSIR, Trivandrum
695 019, India, Fax: +91 471 2 49 17 12, Phone +91 471 2 51 52 79

Editors

C. Larroche, Université Blaise Pascal, Aubière, France
H.H. Ngo, University of Technology Sydney, Ultimo, NSW, Australia

Associate Editors

R. Anderson, Southern Plains Agricultural Research Center, College Station, TX, USA
R. Boopathy, Nicholls State University, Thibodaux, LA, USA
D.-J. Lee, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC
J.M. Park, Pohang University of Science and Technology, Pohang, South Korea
M.A. Sanromán, Universidad de Vigo, Vigo, Spain

Editorial Board

R.D. Ashby, U.S. Department of Agriculture (USDA), Wyndmoor, PA, USA
A.S. Ball, RMIT University, Bundoora, VIC, Australia
A. Bergel, Laboratoire de Génie Chimique, Toulouse, France
R.G. Berger, Leibniz Universität Hannover, Hannover, Germany
C.A. Cardona, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, Manizales, Caldas, Colombia
G.R. Castro, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina
P. Champagne, Queen's University, Kingston, ON, Canada
J.-S. Chang, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, ROC
C. Dosoretz, Technion - Israel Institute of Technology, Haifa, Israel
C.-G. Dussap, Université Blaise Pascal, Aubiere, France
E. Favela-Torres, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F., Mexico
E. Gnansounou, École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland
P.C. Hallenbeck, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada
H. Insam, Leopold-Franzens-Universität Innsbruck, Hötting, Austria
J.V. Jegatheesan, Deakin University, Geelong, VIC, Australia
S.V. Kalyuzhnyi, Russian Corporation of Nanotechnology, Moscow, Russian Federation
A. Kondo, Kobe University, Kobe, Japan
M.R. Ladisch, Purdue University, West Lafayette, IN, USA
J.-S. Lee, Korea Institute of Energy Research, Daejeon, South Korea
K.T. Lee, Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang, Malaysia
D. Madamwar, Sardar Patel University, Vallabh Vidyanagar, India
J.C. Parajó, Universidad de Vigo, Lagoas, Ourense, Spain
J. Pruvost, Université de Nantes, Saint-Nazaire Cedex, France

- K.B. Ramachandran**, Indian Institute of Technology Madras, Chennai, India
H.W. Ryu, Chonnam National University, Gwangju, South Korea
S. Saka, Kyoto University, Kyoto, Japan
A. Sánchez Ferrer, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain
E. Santacesaria, Università di Napoli "Federico II", Napoli, Italy
T. Satyanarayana, University of Delhi, New Delhi, India
M.W. Schlömann, Technische Universität Bergakademie Freiberg, Freiberg, Germany
P. Singh-Nigam, University of Ulster, Coleraine, Co. Londonderry, UK
C.R. Soccol, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil
M. Taherzadeh, University of Borås, Borås, Sweden
R.D. Tyagi, INRS, Quebec, QC, Canada
C. Visvanathan, Asian Institute of Technology, Klongluang, Pathumthani, Thailand
P. Weimer, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), West Madison, WI, USA
J.W.C. Wong, Hong Kong Baptist University, China
H.-Q. Yu, University of Science & Technology of China, Anhui, China

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Bioresource Technology publishes original articles, review articles, case studies and short communications on the fundamentals, applications and management of bioresource technology.

The journal's aim is to advance and disseminate knowledge in all the related areas of biomass, biological waste treatment, bioenergy, biotransformations and bioresource systems analysis, and technologies associated with conversion or production.

Topics include:

- Biofuels: liquid and gaseous biofuels production, modeling and economics
- Bioprocesses and bioproducts: biocatalysis and fermentations
- Biomass and feedstocks utilization: bioconversion of agro-industrial residues
- Environmental protection: biological waste treatment
- Thermochemical conversion of biomass: combustion, pyrolysis, gasification, catalysis

For more details, authors should consult the Subject Classifications in the Guide for Authors.

The journal does not consider articles dealing with crop cultivation, breeding and agronomy, plant extracts and enzymes, composites, marine organisms (except microorganisms and algae for bioprocesses), soil and air pollution, and performance of fuel combustion in engines.

Bioresource Technology does not consider part papers.

Types of paper

When submitting a manuscript to the journal, authors must choose one or more classifications that best describe their manuscript. A list of classifications can be found here

Submission of papers:

Papers from all over the World: Please use Elsevier's online submission system to submit to the journal. The direct link is <http://ees.elsevier.com/bite/>

Covering letter to the editor:

When submitting the manuscript, it is mandatory to include a covering letter to the editor. The covering letter must state:

- (1) Subject Classification selected from the list (see guide for authors and select the most suitable ONE ONLY).
- (2) That all the authors mutually agree that it should be submitted to BITE.
- (3) It is the original work of the authors.
- (4) That the manuscript was not previously submitted to BITE.
- (5) State the novelty in results/findings, or significance of results.

Types of contributions: Original research papers, review articles, case studies, short communications, book reviews. Review articles would be generally solicited by the editors from the experts. However, these can be contributed by others also. In this case, authors must consult the editor by sending the extended summary (300-400 words), outline and the list of publications of authors on the topic.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

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

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

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see

<http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

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

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$3300**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). The Editors suggest avoidance of usage of first person (we, us, our) in the text. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and postsubmission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

Please note that poor language may cause the rejection of the manuscript.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/bite>.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 5 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

The Executive Editor first evaluates all manuscripts on technical aspects such as compliance to the Guide For Authors, quality of grammar or English language. Revision can be requested. Manuscripts accepted at this stage are passed to the handling editor who can also reject on the basis of insufficient originality, serious scientific flaws, or because the work is considered outside the aims and

scope of the journal. Those that meet the minimum criteria are passed on to experts for review. Referees advise the editor, who is responsible for the final decision to accept or reject the article. **Please note:** Any Editor's decision is final.

Manuscripts previously rejected by the Journal will not be re-considered by the Editors, and therefore will be rejected without review.

PREPARATION

Manuscript Preparation

General:

Authors must follow guide for authors strictly, failing which the manuscripts would be rejected without review. Editors reserve the right to adjust the style to certain standards of uniformity.

Structure:

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Figure Captions, Tables and Figures. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be avoided. Collat acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

Text Layout:

Use double spacing and wide (3 cm) margins on white paper. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively, use 12 pt font size and standard fonts.

Page length: Maximum page length should be 15, 35 and 40 pages for Short Communication, Original article/case study and review paper, including text, references, tables and figures. Each figure and table must be put separately on a single page.

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

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

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier 'elsarticle' LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start. For information about reference management please go to the document at http://cdn.elsevier.com/assets/pdf_file/0011/109388/elsdoc.pdf and click on the section 'bibliography'.

Article structure

Subdivision - numbered sections

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

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results and Discussion

Results should be clear and concise, and be part of a single section, discussing the significance of the results of the work, not repeat them. Extensive citation and discussion of the published literature should be avoided.

Conclusions

The main conclusions drawn from results should be presented in a short Conclusions section (**maximum 100 words**).

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. Each paper should be provided with an abstract of about 100-150 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords to be included in an article, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

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

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

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

Formats

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

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

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

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

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

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

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

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

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. Multiple figures can be expressed as one figure (for e.g. 1a, 1b, 1c etc...), while retaining the maximum limit of 6. The Journal discourages publication of simple one line graphs/figures, pattern figures, conventional spectra (X-ray, FTIR, UV, NMR, etc) and SEM photographs of a routine nature.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. The Journal discourages publication of simple one parameter tables; such information should be preferably described in the text itself.

References

Maximum 20, 35 and 75 references for short communication, original research paper/case study and review papers, respectively.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

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

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically).

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically, THEN NUMBERED NUMERICALLY, and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

References in the list should be placed first alphabetically, then numbered chronologically.

1. Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.
2. Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.
3. Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.
- 4....

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>.

Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

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

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the Publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Publication of Articles

After acceptance the Journal will publish articles quickly both online and in print. Requests for delayed publication of the accepted articles are generally not acceptable.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with

permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via email (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

ANEXO C

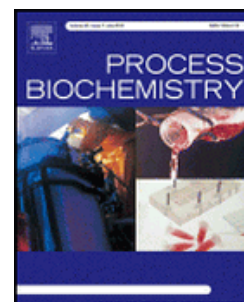
Normas para a submissão do artigo para o periódico Process Biochemistry

PROCESS BIOCHEMISTRY



Process Biochemistry

Editors-in-Chief: J. Boudrant; J.J. Zhong
ISSN: 1359-5113
Impact factor: 2.414



DESCRIPTION

Process Biochemistry is an application-orientated research journal devoted to reporting advances with originality and novelty, in the science and technology of the processes involving bioactive molecules and living organisms. These processes concern the production of useful metabolites or materials, or the removal of toxic compounds using tools and methods of current biology and engineering. Its main areas of interest include novel bioprocesses and enabling technologies (such as nanobiotechnology, tissue engineering, directed evolution, metabolic engineering, systems biology, and synthetic biology) applicable in food (nutraceutical), healthcare (medical, pharmaceutical, cosmetic), energy (biofuels), environmental, and biorefinery industries and their underlying biological and engineering principles.

Main topics covered include, with most of possible aspects and domains of application:

- Fermentation, biochemical and bioreactor engineering
- Biotechnology processes and their life science aspects
- Biocatalysis, enzyme engineering and biotransformation
- Downstream processing
- Modeling, optimization and control techniques.

Particular aspects related to the processes, raw materials and products, also include:

- Quantitative microbial physiology, stress response, signal transduction
- Genetic engineering and metabolic engineering
- Proteomics, functional genomics, metabolomics, and bioinformatics
- Chiral compounds production, cell free protein system, high-throughput screening, in-vivo/in-vitro evolution, enzyme immobilization, enzyme reaction in non-aqueous media
- Mass transfer, mixing, scale-up and scale-down, bioprocess monitoring, bio-manufacturing

- Cell, tissue and antibody engineering: animal and plant cells/tissues, algae, micro-algae, extremophile, antibody screening and production
- Environmental biotechnology: biodegradation, bioremediation, wastewater treatment, biosorption and bioaccumulation
- Bio-commodity engineering: biomass, bio-refinery, bio-energy
- Bioseparation, purification, protein refolding.
- Other new bioprocess and bioreactor related topics especially on application to healthcare sectors

IMPACT FACTOR

2012: 2.414 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2013

ABSTRACTING AND INDEXING

Agricultural and Environmental Biotechnology Abstracts

Aqualine Abstracts

BIOSIS

Biocommerce Data

CAB Abstracts

Chemical Abstracts

Chemical Engineering Abstracts

Current Biotechnology Abstracts

Current Contents

Current Technology Index

Dairy Science Abstracts

EMBiology

Elsevier BIOBASE

Food Science and Technology Abstracts

Nutrition Abstracts

Research Alert

SCISEARCH

Science Citation Index

Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief:

J. Boudrant, Université de Lorraine, Vandoeuvre Cedex, France

J.J. Zhong, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China

Reviews Associate Editor:

E.J. Vandamme, Universiteit Gent, Gent, Belgium

Associate Editors:

U.T. Bornscheuer, Ernst-Moritz-Arnd Universität Greifswald, Greifswald, Germany

R. Fernandez-Lafuente, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain

X-Y. Li, The University of Hong Kong, Hong Kong, China

K. Shimizu, Kyushu National Inst. of Technology, Iizuka, Fukuoka, Japan

S-T. Yang, Ohio State University, Columbus, OH, USA

Editorial Board:

Z. Aksu, Hacettepe University, Ankara, Turkey

F. Aulenta, National Research Council of Italy (CNR), Monterotondo (RM), Italy

V.S. Bisaria, Indian Institute of Technology-Delhi, Delhi, India

R. Borja, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Sevilla, Spain

D. Cantero, Universidad de Cadiz, Puerto Real (Cadiz), Spain

H.J. Cha, Pohang University of Science and Technology, Pohang, South Korea

F. Chen, The University of Hong Kong, Hong Kong

J. Chen, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu Province, China

A. D'Annibale, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo, Italy

A.L. Demain, Drew University, New Jersey, NJ, USA

Z. Deng, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China

E. Doyle, University College Dublin, Dublin, Ireland

A. Durand, INRA Centre d'Orléans, Dijon, France

F. Fatone, Università degli Studi di Verona, Verona, Italy

F. Fava, Alma Mater Studiorum-University of Bologna, Bologna, Italy

A. Gildberg, Norwegian Institute of Fisheries and Aquaculture Research, Tromsø, Norway

E. Guedon, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Vandoeuvre-les-Nancy, France

J.M. Guisan, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain

M. N. Gupta,

J.Y. Hu, National University of Singapore, Singapore, Singapore

W.-S. Hu, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA

A. Illanes, Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

S.V. Kalyuzhnyi, Russian Corporation of Nanotechnology, Moscow, Russian Federation

B-G. Kim, Seoul National University (SNU), Seoul, South Korea

Y-M. Koo, Inha University, Incheon, South Korea

S.Y. Lee, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), Daejeon, South Korea

- M. Linder**, Inst. Nat. Polytechnique de Lorraine (INPL), Vandoeuvre Les Nancy, France
- E. Martin Del Valle**, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain
- B. McNeil**, University of Strathclyde, Glasgow, UK
- U. Mehmetoglu**, Ankara University, Tandoğan-Ankara, Turkey
- M. Nasri**, University of Sfax, Sfax, Tunisia
- H. Ohtake**, Osaka University, Osaka, Japan
- K-Y. Paek**, National University Cheongju, Cheong-ju, South Korea
- A. Pandey**, National Inst. for Interdisciplinary Science & Technology, Trivandrum, India
- A. Rapoport**, University of Latvia, Riga, Latvia
- B.C. Saha**, National Centre for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL, USA
- T. Scheper**, Leibniz Universität Hannover, Hannover, Germany
- H. Shimizu**, Osaka University, Osaka, Japan
- R.Y. Surampalli**, U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Kansas City, KS, USA
- J. Thibault**, University of Ottawa, Ottawa, ON, Canada
- R.D. Tyagi**, INRS, Quebec, QC, Canada
- J. Vioque**, Instituto de la Grasa, Sevilla, Spain
- J. Wang**, Tsinghua University, Beijing, China
- V.F. Wendisch**, Universität Bielefeld, Bielefeld, Germany
- J.H. Xu**, East China University of Science and Technology, Shanghai, China
- P. Xu**, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China
- L.R. Yang**, Zhejiang University, Hangzhou, China
- A-P. Zeng**, Technische Universität Hamburg-Harburg (TUHH), Hamburg, Germany
- W. Zhang**, Flinders University, Adelaide, SA, Australia
- Y.-H. Zhang**, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA

MAIN POINTS OF GUIDE FOR AUTHORS

The text must be double spaced. The lines and pages must be numbered. Highlights: Use short and very concise sentences. Not more than one line per item of highlight is recommended. Generally 3-5 items of highlight are acceptable. Two parts "Results" and "Discussion" which could be merged into one part "Results and discussion". Reproducibility data are required. Illustrations must have high quality of resolution. Reference list must be written as indicated in the PRBI GfA Legends must be detailed as indicated in the PRBI GfA All the legends must be gathered on specific pages placed after the text and before the Tables and Figures Five referees of international standing should be suggested, either whose work is cited in the submitted work or who have been working on the topic(s). Language should be carefully checked by one English Language Editing Service (or at least by a professional colleague whose technical English is fluent).

INTRODUCTION

Process Biochemistry is an application-orientated research journal devoted to reporting advances with originality and novelty, in the science and technology of the processes involving bioactive molecules and living organisms. These processes concern the production of useful metabolites or materials, or the removal of toxic compounds using tools and methods of current biology and engineering. Its main areas of interest include novel bioprocesses and enabling technologies (such as nanobiotechnology, tissue engineering, directed evolution, metabolic engineering, systems biology, and synthetic biology) applicable in food (nutraceutical), healthcare (medical, pharmaceutical, cosmetic), energy (biofuels), environmental, and biorefinery industries and their underlying biological and engineering principles.

Main topics covered include, with most of possible aspects and domains of application: cell culture and fermentation, biochemical and bioreactor engineering; biotechnology processes and their life science aspects; biocatalysis, enzyme engineering and biotransformation; and downstream processing.

Manuscripts and data using response surface methodology (RSM) which are mainly descriptive, without any physiological or systemic explanation or correlations are not suitable for submission to the journal.

Types of paper

Process Biochemistry accepts three types of manuscripts: Full length articles, Short communications and Reviews.

Full length articles (FLA) should not generally exceed 25 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 15 figures and/or tables.

Short communications (SCO) should not exceed 10 double-spaced pages of text (not including the references) and no more than 5 figures and/or tables.

Reviews (REV) should not generally exceed 20 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 10 figures and/or tables.

Accelerated publications can sometimes be taken into consideration. The authors should clearly explain their request for accelerated handling in the cover letter.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

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

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

For Subscription articles Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

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

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open

access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see

<http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy: Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH award number, as well as the name and e-mail address of the Prime Investigator) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the formal publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non- commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation),

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Feb 2014 www.elsevier.com/locate/procbio 7

to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

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

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is \$2,200, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

A cover letter should be submitted on-line by the authors together with the manuscript, which includes the following points: 1) all authors agree to submit the work to Process Biochemistry, 2) the work has not been published/submitted or being submitted to another journal, 3) the novelty and significant contribution of the submitted work are briefly described.

In their on-line submission, authors are required to suggest at least three independent referees (and preferably up to five, outside their own institution) with their position, institution, and email address; and preferably the suggested referees are of international standing and are working on the same or similar topics. The final choice of referees is up to the Editors. All submissions will be reviewed by at least two referees. But, manuscripts will be pre-screened for suitability and may be returned to the authors without peer review if they do not meet the criteria for originality and novelty or cause misunderstanding.

When a manuscript is rejected by an editor, generally it should not be resubmitted in its original version, but may be resubmitted after substantial modifications and/or addition of significant

experimental data. It is up to the discretion of the editors to reconsider such resubmitted manuscripts as new submissions. Please include a letter of transmittal explaining why a resubmitted manuscript should be reconsidered by the editors, a detailed response to the issues raised by the editors/reviewers and the editor for the original version, and a concise outline of the revisions. Any corresponding author or co-author of one manuscript which has been rejected (without resubmission encouragement) must not resubmit a similar manuscript. If so, these authors will have a punishment of two years of prohibition to submit.

It is highly recommended to validate the pertinent and main data of the manuscripts by reproducibility assays, that is to say, to give in the corresponding (parts of the) Tables their mean values and standard deviations, and in the corresponding (parts of the) Figures their error bars. These data should be then obtained with a minimum of triplicate assays.

Moreover the authors must give a list of all related manuscripts/papers, whether in submission or in press

PREPARATION

Use of word processing software

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

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

Article structure

The texts should be double-spaced with all lines numbered and be as concise as possible. All manuscripts must be submitted in the following format: Title page; second page contains the Abstract and keywords; subsequent pages include the Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgement(s), References, Figure legends, Tables, and Figures. Figure legends should be gathered on a separate page(s), followed by Tables and Figures with a separate page for

each one. For experimental design results, as they are scientifically not usable, 3D figures are generally discouraged. Indicate then only the pertinent data in 2D diagrams. Page numeration starts from the first page. The Results and Discussion sections may be combined but should be thorough in the discussion about the novelty and impact of the submitted work. Articles without sufficient discussion will be systematically rejected. Legends for tables and figures should be complete and concise: one figure or one table should be perfectly understandable with its own legend, and incomplete legends will not be accepted. It is recommended to use a concise and short title, followed by another sentence(s) including specific details.

Introduction

Should be concise in the related background description and lead to the objectives and novelty of the work.

Material and methods:

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced, including the information about suppliers and catalogue numbers when appropriate. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results and discussion

These two parts can be separated as "Results" and "Discussion" or combined into one section. The discussion about each major point of the results is very important, and should not repeat the experimental results; generally citation of related references is necessary.

Conclusions

This section is not obligatory and can exist as a short paragraph at the end of "Results and Discussion" section. When it exists as a section, it should be short and concise but should not repeat the Abstract. Generally the Conclusion does not cite references, and it is different from the discussion.

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after

the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

Present/ permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words for Short Communications and 150-200 words for Full Length Articles and Reviews, reporting concisely on the purposes and results of the paper.

Keywords.

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

Abbreviations

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and / should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Nomenclature and Units

The SI system should be used for all scientific and laboratory data: if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion': 10^9 in America (ten to the power 9), and 10^{12} in Europe (ten to the power 12), is ambiguous and should not be used.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Footnotes

Footnotes should be avoided especially if they contain information which could equally well be included in the text. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

Artwork

Electronic artwork

General points

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

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

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

Formats

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

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

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

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

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.
TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

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

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

References

References should be cited at the appropriate point in the text by a number in square brackets. A list of references, in numerical order, should appear at the end of the paper. All references in this list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished data or private communications **AND WEBSITE ADDRESSES** should not appear in the list. Examples of layout of references are given below.

- [1] Hsieh C, Hsu TH, Yang FC. Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage. *Process Biochem* 2005;40:909-916.
- [2] Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen JE. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. New York: Academic Press; 1998. p. 494

- [3] Zhong JJ, Yoshida T. Rheological characteristics of suspended cultures of *Perilla frutescens* and their implications in bioreactor operation for anthocyanin production. In: Ryu DDY, Furusaki S editors. *Advances in Plant Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994. p. 255-279.
- [4] Lima R, Salcedo, RL. An optimized strategy for equation-oriented global optimization. In: Grievink J, Schijndel JV. editors. *10th European Symposium on Computer Aided Chemical Engineering*. New York: Academic Press; 2002. p. 913-918.
- [5] Curtin CD. Towards molecular bioprocessing as a tool to enhance production of anthocyanins in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. Australia: Flinders University; Ph.D. thesis; 2004. p.250.
- [6] Snow-Brand-Milk-Prod. Lysozyme purification by affinity chromatography on crosslink chitosan sulfate. Jpn. Patent. JP 05260-966. 92.03.24.
- [7] Enfors SO, editor. Physiological stress responses in bioprocesses. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 244.
- [8] Schweder T, Hecker M. Monitoring of stress response, In: Enfors SO, editor. *Physiological stress responses in bioprocesses*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 47-71.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

References in a special issue

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

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

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

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Supplementary material captions

Each supplementary material file should have a short caption which will be placed at the bottom of the article, where it can assist the reader and also be used by search engines.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address • Full postal address
- Phone numbers All necessary files have been uploaded, and contain:
- Keywords • All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
 - Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online Proofs Correction

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

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>