

## Hyaluronic acid: characteristics, microbial production and industrial applications

### Ácido hialurônico: características, produção microbiana e aplicações industriais

Título abreviados:

*Production and applications of hyaluronic acid*

*Produção e aplicações do ácido hialurônico*

Nicole Caldas Pan, Josiane Alessandra Vignoli, Cristiani Baldo, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi \*<sup>1</sup>

#### ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA) is a high molecular mass polysaccharide formed from disaccharide units containing D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine. The microbial production is replacing the HA from animal tissues, and the literature has focused on increasing the yield and molecular weight of this biopolymer. Due to its hydrophilic and viscoelastic properties, HA has been extensively used in viscosupplementation of synovial fluid of patients with arthritis, tissue repair, ophthalmological surgery, and drug delivery. Likewise, HA constitutes an essential component in a wide variety of cosmetics. In this review, we present some structural properties, nutritional and physical factors of production by *Streptococcus zooepidemicus* and some industrial applications of this attractive biopolymer.

**Keywords:** hyaluronic acid, *Streptococcus zooepidemicus*, fermentation, industrial applications

#### RESUMO

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo de alta massa molar constituído de unidades dissacarídicas de ácido D- glicurônico e N- acetilglicosamina. A produção microbiana vem substituindo o AH de tecidos animais, e os trabalhos descritos na literatura concentram-se na busca do aumento do rendimento e massa molar deste biopolímero. Devido às propriedades hidrofílicas e viscoelásticas, o AH tem sido extensivamente utilizado na viscosuplementação de fluido sinovial de pacientes com artrite, reparo tecidual, cirurgias oftalmológicas, e em preparações de microcápsulas para liberação controlada de fármacos. Além disso, o AH constitui-se um componente indispensável em uma grande variedade de cosméticos. Nesta revisão descrevemos algumas propriedades estruturais, fatores nutricionais e físicos do processo de produção por *Streptococcus zooepidemicus* e algumas aplicações industriais deste importante biopolímero.

**Palavras-chave:** ácido hialurônico, *Streptococcus zooepidemicus*, fermentação, aplicações industriais.

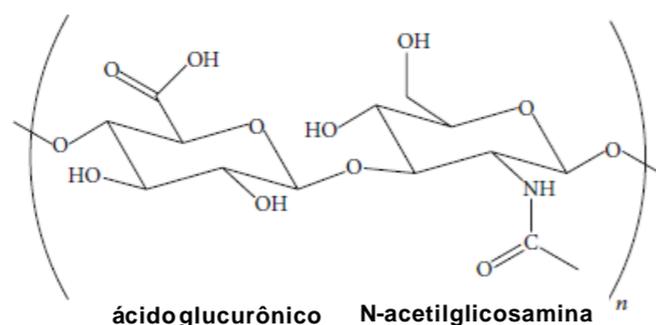
<sup>1</sup> Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia. Londrina, Pr, Brasil.

\*Autor para correspondência: [macelligoi@uel.br](mailto:macelligoi@uel.br)

## INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear de alta massa molar que consiste em unidades dissacarídicas polianiónicas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidos alternadamente por ligações  $\beta$  (1  $\rightarrow$  3) e  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) (LAURENT; FRASER, 1992) (Figura 1).

**Figura 1** Unidade repetitivas dissacarídicas do ácido hialurônico. Fonte: Adaptado de Boeriu et al, 2013.



O AH é amplamente encontrado na natureza (ADAM; GHOSH, 2001). Nos animais, de maneira geral, o AH é encontrado na matriz extracelular e matriz pericelular, mas sua ocorrência no espaço intracelular também foi relatada (COWMAN; MATSUOKA, 2005). O AH desempenha diferentes funções, tais como lubrificação, hidratação e manutenção da estrutura tecidual. Além disso, está envolvido em eventos de proliferação e migração celular, bem como angiogênese (SCHIRALDI; GATTA; ROSA, 2010). O AH é o principal constituinte do humor vítreo do olho humano (0,1 mg.mL<sup>-1</sup> de massa úmida), e do fluido sinovial (3-4 mg.mL<sup>-1</sup> de massa úmida). No entanto, a maior quantidade de AH localiza-se na pele (0,5 mg.g<sup>-1</sup> de tecido úmido). O AH também está presente em tecidos embrionários, como o cordão umbilical (4 mg.mL<sup>-1</sup>). Curiosamente, as cristas de galo, uma porção especializada da pele, também contém grandes quantidades de AH (até 7,5 mg.mL<sup>-1</sup>) (SCHIRALDI; GATTA; ROSA, 2010).

Além de estar presente em todos os vertebrados, o AH também pode ser encontrado na cápsula de algumas cepas de *Streptococcus* (KOGAN *et al.*, 2007). O AH produzido comercialmente pode ser de origem animal ou microbiana, sendo que ambos apresentam a mesma estrutura química do polímero encontrado em 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 de cristas de galo (KOGAN *et al.*, 2007). No entanto, o processo de extração do AH de tecidos animais apresenta desvantagens em relação à obtenção por via microbiana, devido ao processo laborioso de extração e purificação que pode causar redução da massa molar e encarecer o produto final (Chong *et al.*, 2005). Além disso, a utilização de substâncias de origem animal em produtos biomédicos encontra resistências devido ao risco de infecções virais. Desta forma, a produção de AH por processos fermentativos tem se tornado uma alternativa cada vez mais atrativa e confiável. Nesta revisão descrevemos um breve histórico, algumas propriedades estruturais, fatores nutricionais e físicos do processo de produção por *Streptococcus zooepidemicus* e algumas aplicações industriais e biomédicas deste importante biopolímero.

## HISTÓRICO

Em 1934 iniciou-se o estudo de uma molécula versátil, o AH. Seu estudo teve início no laboratório de Bioquímica do Departamento de Oftalmologia da Universidade de Columbia, onde Karl Meyer e seu assistente, John Palmer, descreveram o procedimento para isolamento desta substância, até então desconhecida, a partir do humor vítreo bovino (MEYER; PALMER, 1934).

Na década seguinte, Meyer e colaboradores se dedicaram a isolar o AH presente na pele, articulações, cordão umbilical e crista de galo (LAURENT, 2002). Em 1937, Kendall, Heidelberger e Dawson observaram semelhança entre um polissacarídeo da cápsula de bactérias do gênero *Streptococcus*

do grupo A hemolítica e o AH, dando início assim ao estudo do AH de origem microbiana. 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 compõem. Nos dias atuais, o AH é frequentemente referenciado como *hialuronato* por estar presente na natureza ou em condições fisiológicas, na forma de um poliânion e não na forma de ácido (LAURENT 2002; KAKEHI; YASUEDA; KINOSHITA, 2003; YAMADA; KAWASAKI, 2005).

### ESTRUTURA E PROPRIEDADES

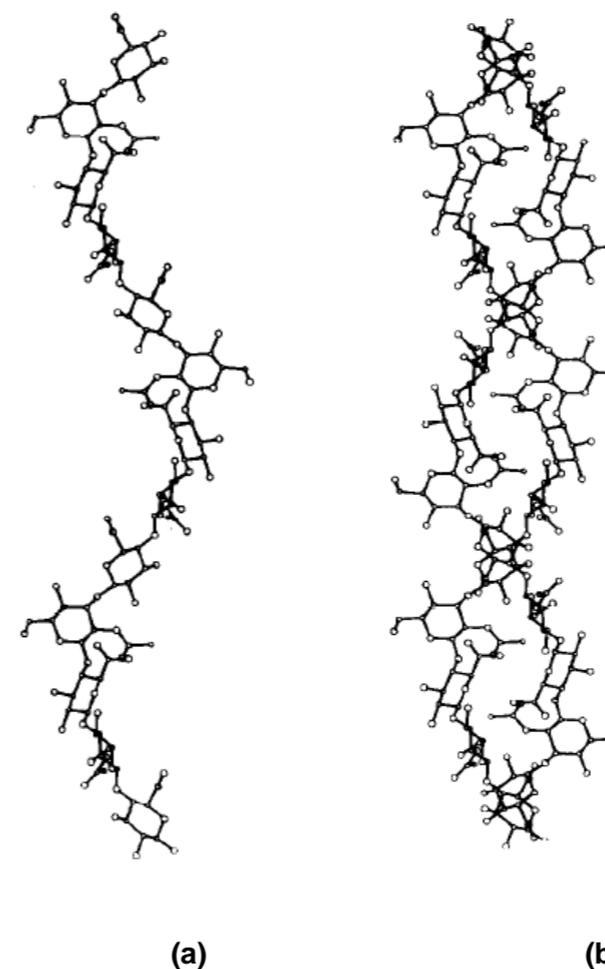
O AH pertence a um grupo de polissacarídeos denominados polissacarídeos do tecido conjuntivo, mucopolissacarídeos ou glicosaminoglicanos. O AH pode conter em torno de 30.000 unidades dissacarídicas repetidas na molécula extraída de tecidos animais, o que significaria uma massa superior a  $10^7$  Da (WEIGEL; HASCALL; TAMMY, 1997). Além disso, o AH é o único glicosaminoglicano que não é sulfatado e não está ligado covalentemente a uma proteína central. Quando estendida, a molécula de ácido hialurônico pode apresentar comprimento de aproximadamente 15  $\mu$ m e diâmetro de 0,5 nm (COWMAN; MATSUOKA, 2005).

As funções biológicas do AH estão diretamente relacionadas com suas conformações e interações específicas que dependem da massa molar, concentração, ambiente local, força iônica, constante dielétrica, exposição a 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 de raios-x, revelou uma conformação helicoidal simples contendo de 2 a 4

dissacarídeos por volta, dependendo do íon presente ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ , entre outros). Uma dupla hélice, contendo 4 dissacarídeos por volta, foi também observada sob condições iônicas não usuais ( $H^+/K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $NH_4^+$ ). Todas estas estruturas são estabilizadas por pontes 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 solução, 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 alta 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 (SCOOT *et al.*, 1999).

Hardingham (2004) afirmou 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 não apenas por estabilizar a formação de cadeias duplas, como também pela formação de rede e agregação lateral de cadeias de AH (WEISSMAN; MEYER, 1954).

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 (FRASER; LAURENT; LAURENT, 1997).

### PRODUÇÃO MICROBIANA DE AH POR *Streptococcus zooepidemicus*

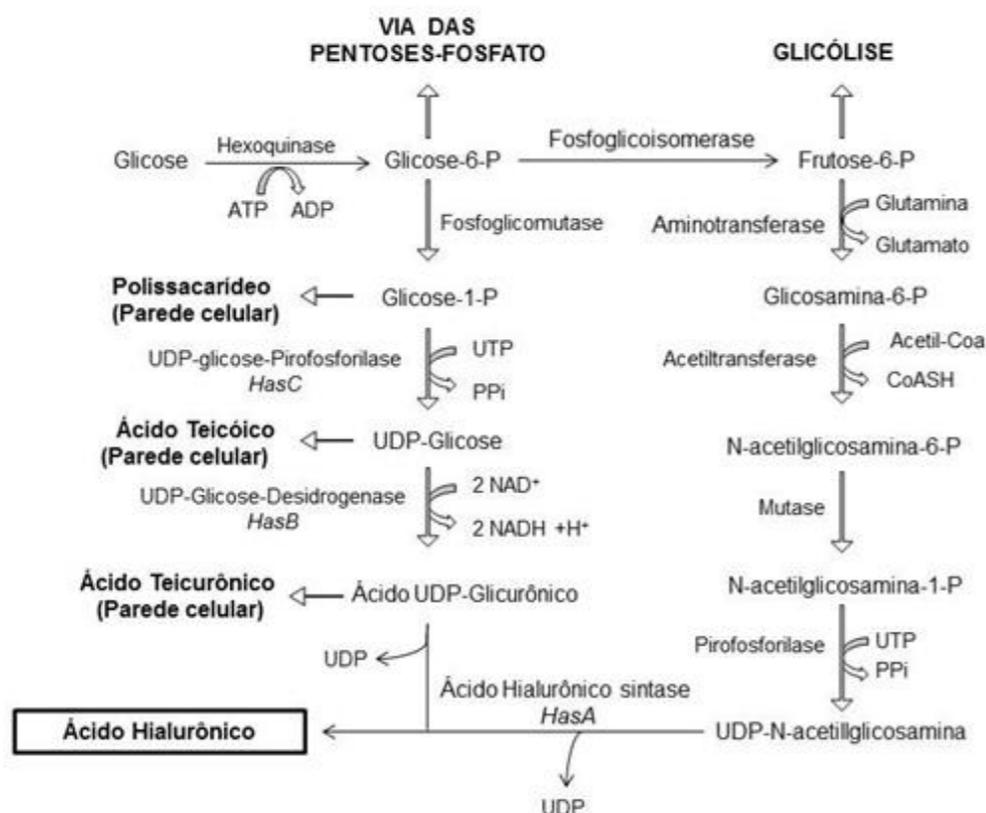
A produção do AH por processos fermentativos vem sendo proposta como alternativa aos processos convencionais de extração, resultando em maiores rendimentos e maior gama de aplicações industriais (CHONG *et al.*, 2005). Em escala industrial, a produção microbiana de AH iniciou-se na década de 1980. A cepa comumente utilizada é *S. zooepidemicus*, que pode produzir, em condições adequadas, cerca de 6-7 g.L<sup>-1</sup> de AH. No entanto, a produção de AH é limitada pela alta viscosidade no meio de fermentação gerada pela produção do polímero, competição entre o crescimento microbiano e a síntese de AH, e a formação de subprodutos, tais como o ácido lático (LIU *et al.*, 2011). Desta forma, muitos estudos tem se concentrado na busca por alternativas que elevem a produtividade e a qualidade do AH produzido por *S. zooepidemicus*.

### Via Biosintética

O AH de origem microbiana é sintetizado como uma cápsula extracelular por *Streptococcus* dos grupos A e C de Lancefield, em particular *Streptococcus equi* e *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus*. Esta cápsula é excretada no meio de cultivo possibilitando o controle das características do polímero e do rendimento do produto (CHONG; BLANCK, 1998).

Para a síntese do AH, as células bacterianas mobilizam três diferentes enzimas: HAS (AH sintase), UDP-Glc desidrogenase e UDP-Glc pirofosforilase, que são codificadas pelos genes, *hasA*, *hasB*, e *hasC*, respectivamente, os quais estão arrançados em um único operon denominado de *has* (YAMADA; KAWASAKI, 2005). A Figura 3 apresenta um esquema da rota metabólica para a síntese de AH por *Streptococcus*.

**Figura 3** Via metabólica de biossíntese do AH por *Streptococcus*. Fonte: Adaptado de Chong et al., 2005.

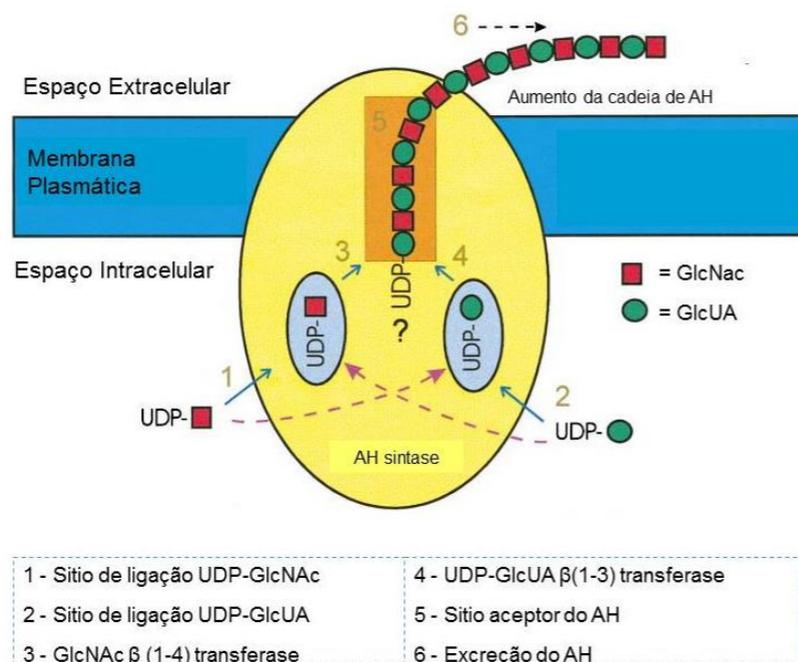


A glicose-6-fosfato é um intermediário comum na produção de polissacarídeos de estocagem em muitos organismos. A enzima  $\alpha$ -fosfoglicomutase (EC 5.4.2.2) converte a glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato em uma reação reversível. A enzima UDP-glicose pirofosforilase (EC 2.7.7.9), por sua vez, 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 síntese de N-acetilglicosamina se dá pela transferência do grupo amino

da glutamina para a frutose-6-fosfato por uma aminotransferase (EC 2.6.1.16) produzindo a glicosamina-6-fosfato. A transferência do grupo acetil por uma acetiltransferase (EC 2.3.1.4) forma N- acetil glicosamina-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. Para produzir 1 mol da unidade dissacarídica de AH, são requeridos 4 moles de ATP, sendo 2 moles consumidos nas duas reações mediadas pela glicoquinase fornecendo as hexoses precursoras fosforiladas para cada ramificação da via biossintética; e os outros 2 moles de ATP são 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 síntese de AH ocorre dentro da célula bacteriana através da enzima AH sintase. Esta enzima está associada à membrana celular e polimeriza as unidades de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina resultando na molécula de AH (DOUGHERTY; RIJN, 1993; CHONG *et al.*, 2005). Esta enzima sintetiza um polissacarídeo de alta massa molar que é simultaneamente extrudado através da membrana até o espaço extracelular para formar a cápsula bacteriana. Isto permite a elongação do polímero, sem qualquer restrição e, conseqüentemente, o AH pode apresentar alta massa molar (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 4).

**Figura 4** Elongação da cadeia do AH na membrana plasmática. O diagrama apresenta a enzima hialuronato sintase (HAS) ligada à membrana plasmática e as seis atividades enzimáticas requeridas para a produção do AH. A enzima apresenta 2 sítios de ligação distintos. Em (1) recebe a unidade UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc) e em (2) o ácido UDP-glicurônico (UDP-GlcUA). Posteriormente, essas unidades são ligadas pela ação das enzimas  $\beta$  (1-4) GlcNAc (3) e  $\beta$  (1-3) UDP-GlcUA transferase (4). A unidade dissacarídica do AH é ligada a um terceiro sítio (5). Esse processo pode ocorrer repetidas vezes resultando num polímero de até 40.000 monossacarídeos. Por fim, o polissacarídeo é excretado através da membrana até o espaço extracelular para formar a cápsula bacteriana (6). Fonte: Adaptado de Tlapak-Simmons et al. (1999).



Além de fornecer os precursores para a síntese de AH, essas duas vias metabólicas fornecem constituintes estruturais da parede celular bacteriana, como peptidoglicanos, ácidos teicóicos e polissacarídeos diversos (YAMADA; KAWASAKI, 2005). Desta forma, Chong e Black (1998) observaram que a massa molar do AH produzido durante a fermentação é

inversamente proporcional à taxa de crescimento celular da bactéria. Portanto, a taxa específica de produção do AH aumenta com a diminuição da taxa de crescimento específica, de modo que maiores taxas de produção podem ser atribuídas a maiores taxas de polimerização por meio da AH sintase.

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 ácido láctico, acético e etanol, 10% em ácido hialurônico e 5% em biomassa. 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 celular e a síntese de AH. 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 que é necessário para a síntese do polímero.

#### Microrganismo produtor

A produção de AH por *Streptococcus* é conhecida por mais de 50 anos, e a maioria dos sistemas divulgados na literatura referem-se ao uso de *Streptococcus* dos grupos A e C de Lancefield, onde o grupo A é considerado como patógeno humano e o grupo C, patógeno de animais (KENDALL; HEIDELBERGER; DAWSON, 1937). Análises microscópicas dessas bactérias sugerem que estas possuem células esféricas ou ovóides tipicamente arranjadas em pares ou cadeias circundadas por uma cápsula celular (CHONG *et al.*, 2005).

*Streptococcus* são bactérias Gram-positivas, catalase negativas, anaeróbias facultativas com algumas estirpes aerotolerantes; não esporulam e produzem ácido láctico como subproduto do catabolismo da glicose (CHONG *et al.*, 2005). A cápsula de AH é produzida como um fator de virulência por esses microrganismos. Além disso, são  $\beta$ -hemolíticos por

exibirem  $\beta$ -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 esteja totalmente esclarecida, o AH utilizado em 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 outras proteínas extracelulares, facilitando o controle do tamanho do polissacarídeo produzido. Desta forma, 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 negativos (KIM *et al.*, 1996) (Tabela 1).

**Tabela 1** Cepas mutantes de *S. zooepidemicus*.

Cepa	Características	Referência
HA-116, ATCC 39920	Patogenicidade desprezível (mínimo de hemolisina)	NIMROD <i>et al.</i> , 1988
KFCC 10830	Hialuronidase negativa	KIM <i>et al.</i> , 1996
ATCC 39506	Hialuronidase negativa	BROWN; RUIZ; RINJ, 1988
NH-131 (FERM P-7580 e FERM BP-784)	Não hemolítica	AKASAKA; KOMASAKI; ARAI, 1989
ATCC 6580	Hialuronidase negativa	STOOLMILLER; DORFMAN, 1969

### Meio de Cultivo para a Produção do Ácido Hialurônico

*Streptococcus* são bactérias lácticas que requerem meio de cultivo rico para crescimento. De modo geral, os meios de cultivo incluem extratos de levedura, peptonas ou hidrolisados de caseína como fonte de nitrogênio, além de fatores de crescimento como sais de magnésio e fosfato

(ARMSTRONG; COONEY; JOHNS, 1997). O rendimento de AH nas fermentações bacterianas são relativamente baixos ( $0,1 \text{ g.g}^{-1}$  de glicose) e os requerimentos nutricionais influenciam na economia da fermentação devido aos custos elevados dos meios quimicamente definidos utilizados para produção em grande escala (CHONG; BLANCK, 1998). Desta forma, muitos estudos estão sendo realizados na tentativa de reduzir os custos de produção, aumentando assim o valor agregado deste biopolímero.

A fonte de carbono mais utilizada na produção de AH por fermentação 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). Neste sentido, a concentração inicial desta fonte de carbono foi o fator que apresentou maior efeito na massa molar do AH produzido por *S. zooepidemicus* (ARMSTRONG; JOHN, 1997). De acordo com os autores, quando os monômeros UDP-GlcUA e UDP-GlcNac estão presentes em altas concentrações, ocorre o alongamento da cadeia. Desta forma, a concentração externa de glicose pode estar ligada à concentração interna desses monômeros, uma vez que estes são derivados da glicose, ou pelo crescimento diáuxico observado em altas concentrações de glicose ( $40 \text{ g.L}^{-1}$ ). Embora a massa molar tenha sido maior em concentrações de glicose mais elevadas, o rendimento em AH foi inferior devido às limitações de transferência de massa decorrente do aumento da viscosidade do meio de cultivo, que impede a manutenção de boas condições de mistura no reator. A maltodextrina como fonte de carbono também se mostrou promissora na síntese de AH, resultando em um aumento significativo da produção (AROSKAR; KAMAT S. D; KAMAT D. V., 2012). Além disso, Chong e Nielsen (2003) compararam o metabolismo do *Streptococcus zooepidemicus* em meio contendo glicose e maltose e constataram uma maior eficiência de conversão da fonte de carbono em ácido hialurônico quando utilizaram maltose.

Outro fator nutricional bastante estudado são as fontes de nitrogênio orgânico que fornecem grande parte de carbono para a biossíntese celular (PIRES *et al.*, 2010). 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 ótima de 2,5:1 para o *S. zooepidemicus* ATCC 39920. Em um estudo realizado por Im *et al.* (2009), foram avaliadas diferentes fontes de carbono e nitrogênio para produção de AH em *Streptococcus sp.* ID102, e observaram um aumento na produção de AH na presença de 4% de glicose e 0,5% de extrato de levedura e peptona de caseína. Além disso, a adição de 0,04% de glutamina, 0,06% de glutamato e 0,02% de ácido oxálico também resultou no aumento da produção de AH.

Na tentativa de reduzir custos, trabalhos recentes preocupam-se em utilizar substratos alternativos e resíduos agroindustriais como fontes nutricionais para a produção do polímero por fermentação. Pires *et al.* (2010) avaliaram o suco de caju como uma fonte de carbono promissora para a produção do polímero atingindo 0,89 g.L<sup>-1</sup> de AH. Vázquez *et al.* (2010) obtiveram uma redução de 50% no custo de produção de AH por *Streptococcus zooepidemicus* em meio contendo água residual do tratamento de mexilhões e peptona de atum.

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. 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 hialuronato sintase prejudicando a produção de AH.

#### Fatores que Interferem na produção do Ácido Hialurônico

O AH de *S. zooepidemicus* é tradicionalmente produzido por fermentação em batelada em temperaturas próximas a 37°C e pH 7,5. Porém, a alta viscosidade do meio limita a produção do AH acima de 5-10 g.L<sup>-1</sup>, concentrações estas alcançadas por estirpes selvagens após 6 a 16 horas de cultivo. A fermentação contínua pode ser uma alternativa para aumentar a produção, reduzir os custos e diminuir a polidispersidade observada em processos em batelada (ARMSTRONG; JOHN, 1997). Contudo, os processos contínuos apresentam restrições no que diz respeito à sua baixa produtividade volumétrica, e ao uso de altas taxas de diluição devido à instabilidade do fenótipo da cepa produtora, 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 testado por Liu *et al.* (2008-b), resultando em um aumento de 32% em relação à produção por 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<sup>-1</sup> de sacarose, seguido por um processo em batelada durante 8-20 horas utilizando a concentração de sacarose inicial de 15 g.L<sup>-1</sup>. 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 importante fator que influencia tanto o crescimento celular, quanto a produção de AH. Armstrong e Johns (1997) observaram um 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. Este fato pode ser justificado pela redução da velocidade específica de crescimento em temperaturas mais baixas e à 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.

O pH também desempenha papel importante na produção do biopolímero. A influência do pH na síntese de AH por *S. zooepidemicus* foi avaliada por John, Goh e Oeggerli (1994) que observaram maiores produções em pH  $6,7 \pm 0,2$ . Esse resultado pode ser justificado pelo fato da enzima AH sintase, responsável pela polimerização de AH, apresentar atividade máxima em pH 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 influência na massa molar do AH produzido em pH variando de 6,3 a 8,0. Liu et al. (2008-a) investigaram uma estratégia de cultivo de *S. zooepidemicus* WSH-24 sob stress alcalino intermitente (pH 7,0-8,5) a 37°C e taxa de aeração 2 L.min<sup>-1</sup>, o que aumentou a produção do AH de 5 g.L<sup>-1</sup>, controle mantido em pH 7,0 para 6,5 g.L<sup>-1</sup>. 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).

O efeito da agitação na produção de AH ainda não foi completamente esclarecido, sendo descrita a necessidade de agitação vigorosa para

melhorar a transferência de massa, 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).

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<sup>-1</sup> (THONARD; MIGLIORE; BLUSTEIN, 1963). O AH obtido nessas condições geralmente possui massa molar média de  $7 \times 10^5$  Da ou menor. Sob condições aeróbias, um produto com maior massa molar (cerca de  $2 \times 10^6$  Da ou mais) pode ser obtido com produção equivalente (AKASAKA;KOMASAKI; ARAI, 1989). Huang, Chen e Chen (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.

#### Fatores que Influenciam a Massa Molar do AH

A massa molar do AH é um dos principais critérios de avaliação de sua qualidade, sendo responsáveis pela caracterização de suas propriedades físico-químicas e fisiológicas. Conseqüentemente, o desempenho e aplicação do produto dependem diretamente da sua massa molar que varia de  $10^4$  a  $10^7$  Da, dependendo da sua fonte (ARMSTRONG; JOHNS, 1997). Os mecanismos que controlam a massa molar do AH ainda não estão bem definidos. Acredita-se que os fatores determinantes parecem estar

divididos em duas categorias. Primeiro, as células bacterianas podem proceder ao alongamento da cadeia sem interrupção até as fontes de energia se esgotarem. Segundo, o término pode ser sinalizado por alterações transientes de certos metabólicos (ARMSTRONG; JOHNS, 1997). Mausolf (1988) sugeriu que altas concentrações de ATP e/ou baixas concentrações de UDP-N-acetilglicosamina conduzem a fosforilação do receptor e subsequente liberação de AH para o meio. Além disso, 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 fatores importantes para obtenção do AH de alta massa molar (JAGANNATH; RAMACHANDRAN, 2010).

Para a determinação da massa molar do AH, a literatura relata a utilização de métodos cromatográficos, tais como a cromatografia por exclusão molar ou permeação em gel ou por estimativa indireta através da sua viscosidade intrínseca (KIM *et al.*, 1996). A Tabela 2 apresenta diferentes condições de cultivo para a produção de AH por espécies de *Streptococcus zooepidemicus*.

## APLICAÇÕES

As inúmeras propriedades biológicas, tais como a capacidade de retenção de água e o comportamento viscoelástico do AH, lhe confere um perfil peculiar tornando-o apropriado para diversas aplicações médicas e farmacêuticas. Dentre as áreas de aplicação clínica destacam-se a viscoscirurgia, onde o AH apresenta a função de proteger os tecidos delicados e fornecer espaço durante manipulações cirúrgicas; a viscosseparação onde o AH age separando superfícies do tecido conjuntivo traumatizadas por procedimentos cirúrgicos ou injúrias, no intuito de prevenir adesões e formação excessiva de cicatrizes; a viscossuplementação quando substitui ou suplementa fluidos de tecidos e a

viscoproteção para proteger superfícies saudáveis ou injuriadas de desidratação, promovendo a cura de tais superfícies (BALAZS, 2004).

## Indústria cosmética

A indústria cosmética constitui-se em um dos maiores mercados do AH, devido às suas propriedades hidratante, antioxidante e viscoelástica (KOGAN *et al.*, 2007; MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009). Em 2006, cerca de 1,6 milhões de produtos cosméticos continham AH em sua formulação, representando um mercado de US\$ 850 milhões. Por conseguinte, em 2007, estimou-se uma produção de 15 mil toneladas de AH por ano (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009). O primeiro produto comercializado utilizando AH foi um creme para tratamento de queimaduras e úlceras denominado Hyalgan pela Fidia (Padua, Italy), em 1960 (CHONG *et al.*, 2005). Posteriormente, em 2003, o Hylaform (Genzyme) e Restylane (Q-Med) foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) aumentando assim o número de cosméticos que utilizam esse ativo hidratante (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009).

A perda do AH natural na pele 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 a alterações fisiológicas nas funções da pele. A exposição à radiação UV afeta os processos biológicos, acelerando o processo de envelhecimento. A pele envelhecida é, tipicamente, seca e irregular e apresenta rugas e rídulhas, bem como elasticidade reduzida.

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

Microrganismo	Modo de Fermentação	Meio Nutritivo	Parâmetros de Aeração	Produção de AH e massa molar	Referência
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> WSH-24	Batelada, 7 L	Extrato de levedura 25,0 g.L <sup>-1</sup> , sacarose 70,0 g.L <sup>-1</sup>	200 rpm, 0,5 vvm	[AH]: 6,70 g.L <sup>-1</sup> MW: n.d	LIU et al., 2009
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada alimentada 2,5 L	Glicose 5,0 g.L <sup>-1</sup> , extrato de levedura 2,5 g.L <sup>-1</sup>	20% OD	[AH]: 3,50 g.L <sup>-1</sup> MW: n.d	CHEN et al., 2009
<i>Streptococcus</i> sp. ID9102 (KCTC1139BP)	Batelada, 75 L	Glicose 40,0 g.L <sup>-1</sup> , extrato de levedura 7,5 g.L <sup>-1</sup> , peptona de caseína 10,0 g.L <sup>-1</sup>	400 rpm, 0,5 vvm	[AH]: 6,94 g.L <sup>-1</sup> MW: 5,90 x 10 <sup>6</sup> Da	IM et al., 2009
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada, 3 L	Glicose 20,0 g.L <sup>-1</sup> , extrato de levedura 10,0 g.L <sup>-1</sup>	300 rpm, 1 vvm	[AH]: 2,15 g.L <sup>-1</sup> MW: n.d	WU et al., 2009
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada, 3 L	Meio quimicamente definido	400 rpm, 1 vvm	[AH]: 3,66 g.L <sup>-1</sup> MW: 3,80 x 10 <sup>6</sup> Da	JAGANNATH; RAMACHANDR, 2010
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada, 2 L	Glicose 40,0 g.L <sup>-1</sup> , extrato de levedura 10,0 g.L <sup>-1</sup>	300 rpm, 1,3 vvm	[AH]: 1,80 g.L <sup>-1</sup> MW: 2,52 x 10 <sup>6</sup> Da	DON; SHOPARWE, 2010
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada, 3 L	Glicose 25,0 g.L <sup>-1</sup> , extrato de levedura 60,0 g.L <sup>-1</sup>	250 rpm, 2 vvm	[AH]: 1,21 g.L <sup>-1</sup> MW: 4,00 x 10 <sup>7</sup> Da	PIRES; SANTANA, 2010
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada, 125 mL	Glicose 25,0 g.L <sup>-1</sup> , extrato de levedura 60,0 g.L <sup>-1</sup>	150 rpm Volume líquido: 50 mL em 125 mL	[AH]: 1,03 g.L <sup>-1</sup> MW: 3,30 x 10 <sup>7</sup> Da	PIRES; EGUCHI; SANTANA, 2010
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada, 250 mL	Meio derivado de resíduos agrícolas	150 rpm	[AH]: 0,89 g.L <sup>-1</sup> MW: 1,84 x 10 <sup>4</sup> Da	PIRES et al., 2010
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC 35246	Batelada 2 L	Água residual do processamento de mexilhões 50,0 g.L <sup>-1</sup> , peptona de atum 8,0 g.L <sup>-1</sup>	500 rpm, 0 vvm	[AH]: 2,46 g.L <sup>-1</sup> MW: 2,50 x 10 <sup>6</sup> Da	VÁZQUEZ et al., 2010
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada, 2 L	Glicose 50,0 g.L <sup>-1</sup> , extrato de levedura 10,0 g.L <sup>-1</sup> , triptona 10,0 g.L <sup>-1</sup>	300 rpm	[AH]: 2,44 g.L <sup>-1</sup> MW: 4,36 x 10 <sup>6</sup> Da	LAI et al., 2011
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> MTCC 3523	Batelada, 500 mL	Glicose 40,5 g.L <sup>-1</sup> , peptona de soja 51,2 g.L <sup>-1</sup>	200 rpm, Volume líquido: 100 mL em 500 mL	[AH]: 0,80 g.L <sup>-1</sup> MW: n.d	PATIL, KAMALJA; CHAUDHARI, 2011

Continuação

Continuação

<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada, mL	250	Glicose 30,0 g.L <sup>-1</sup> , peptona 10,0 g.L <sup>-1</sup> , extrato de levedura 5,0 g.L <sup>-1</sup>	90 rpm, Volume líquido: 50 mL em 250 mL	[AH]: 0,70 g.L <sup>-1</sup> MW: n.d	AROSKAR; KAMAT S, D.; KAMAT D. V., 2012
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batelada, mL	250	Glicose 25,0 g.L <sup>-1</sup> , peptona de soja 33,5 g.L <sup>-1</sup>	150 rpm, Volume líquido: 100 mL em 250 mL	[AH]: 0,30 g.L <sup>-1</sup> MW: n.d	BENEDINI; SANTANA, 2013
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC 43079	-	-	Glicose 40,0 g.L <sup>-1</sup> , extrato de levedura 10,0 g.L <sup>-1</sup> , extrato de carne 20,0 g.L <sup>-1</sup>	-	[AH]: 0,04 g.L <sup>-1</sup> MW: n.d	KHUE; VO, 2013

O envelhecimento extrínseco (aquele que resulta da influência da exposição a fatores externos/ambientais) está associado a inúmeras alterações, entre elas a expressão do AH e suas enzimas de metabolização (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009).

A perda de hidratação cutânea é uma das desordens mais evidentes da pele envelhecida, por isso, um dos gestos diários essenciais para manter a pele saudável é o uso de produtos hidratantes. 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 da água e propriedades hidratantes (GUILLAUMIE *et al.*, 2006).

Além disso, o AH exibe 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). 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 87,3% na concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup>.

### Viscossuplementação

A segunda maior aplicação de AH ocorre na viscossuplementação em articulações afetadas por artrite. Pesquisas revelaram que, em 2005, esse mercado movimentou cerca de US\$ 407 milhões no Japão, US\$ 380 milhões nos Estados Unidos e US\$ 120 milhões na Europa (KOGAN *et al.*, 2007; MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009).

Dentre os diferentes tipos de artrite, a osteoartrite e a artrite reumatoide são as principais condições crônicas que afetam a população mundial. Embora, não se conheça a causa exata dessas patologias, a degradação de carboidratos poliméricos, principalmente o 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. Desde então, administrações de preparações contendo o AH têm melhorado os sintomas e diminuído a utilização de anti-inflamatórios em pacientes com artrite (CHONG *et al.*, 2005). A massa molar do AH no fluido sinovial de um adulto saudável encontra-se na faixa de 2 a 6 x 10<sup>6</sup> Da. Desta forma, 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.

### Oftalmologia

O AH é um componente natural do humor vítreo e é uma macromolécula chave na área da 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, as preparações de 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). O valor agregado mundial destas cirurgias em 2006, foi de aproximadamente US\$ 140 milhões e tende a crescer com o envelhecimento da população (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009). Devido a suas propriedades viscosas, o AH também tem sido incluído 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 desidratado causado pela redução da produção e qualidade da lágrima (TSUBOTA *et al.*, 1999).

### Reparo Tecidual

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, absorção de impactos, cicatrização de ferimentos e preenchimento de espaço (KOGAN, *et al.*, 2007). Em 1996, a indústria Genzyme (Cambridge, UK) desenvolveu um filme de carboximetilcelulose revestido de AH que forma uma barreira contra a 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-operatórias (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009). 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 de derivados 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 como rugas faciais e cicatrizes profundas (NARINS *et al.*, 2003).

### Farmacologia

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).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O AH constitui-se um dos mais atraentes glicosaminoglicanos encontrados na natureza. O mercado mundial do AH movimentava quase US\$ 1 bilhão a cada ano, e as indústrias da área médico-farmacêutica faturam até US\$ 40.000–60.000/kg de AH. Portanto, o número de aplicações do AH e o seu alto valor agregado justificam os esforços em buscar alternativas para sua produção. Os trabalhos descritos na literatura concentram-se na busca do aumento do rendimento e massa molar do AH, sendo que o sistema de produção bacteriano vem se destacando por permitir a otimização do rendimento e da qualidade do produto por meio do controle das condições de cultivo. Desta forma, o ácido hialurônico constitui-se objeto para inúmeras futuras pesquisas visando tanto a melhoria dos parâmetros de qualidade de produção, quanto a descoberta de novas aplicações nos diferentes setores industriais.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Araucária e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ADAM, N.; GHOSH, P. Hyaluronan molecular weight and polydispersity in some commercial intra-articular injectable preparations and in synovial. **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.
- 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 nutritional supplements on hyaluronic acid production. **Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology Letters**, v.2, p. 16-24, 2012.
- 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.
- BENEDINI, L. J.; SANTANA, M. H. A. Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of hyaluronic acid. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 798–800, 2013.
- BOERIU, C. D.; SPRINGER, J.; KOOY, F. K.; LAMBERTUS, A. M.; BROEK, V. D.; EGGINK, G. Production methods for hyaluronan. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, vol. 2013, Article ID 624967, 14 pages, 2013. doi:10.1155/2013/624967.
- BROWN, K. K.; RUIZ, L. C.; RINJ, I. **Ultrapure hyaluronic acid and method of making it**. United States Patent n. 4, 782, 046, 1988.
- 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.H.; CHEN J.L.; HUANG, W.C.; CHEN H. L. Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. **Korean Journal of Chemistry 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.
- CHONG, B.F.; BLANK, L. M.; MCLAUGHLIN, R.; NIELSEN, L.K. Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.66, n.4, p. 341-351, 2005.
- CHONG, 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.; GOH, L. -T.; LEE, P. L.; JOHNS, M. R. 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, p. 898-910, 1999.
- COWMAN, M.K.; MATSUOKA, S. Experimental approaches to hyaluronan structure. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 791-809, 2005.
- 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 an Operon Required for hyaluronic Acid Synthesis in Group a *Streptococci*. **Journal of Biological Chemistry**. v. 268, n. 10, p. 7118-7124, 1993.
- ESPOSITO, E.; MENEGATTI E.; CORTESI, R. Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study. **International Journal of Pharmacology**, v.288, p. 35-49, 2005.
- FOUISSAC, E. ; MILAS, M.; RINAUDO, M. Shear-rate, concentration, molecular weight, and temperature viscosity, dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte. **Macromolecules**, v. 26, 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.
- 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.
- 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.
- KAKEHI, K.; YASUEDA, S.; KINOSHITA, M. Hyaluronic acid: Separation and biological implications. **Journal of Chromatography**, v. 797. p. 347-355, 2003.
- 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.
- 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. 05, p. 12-15, 2013.
- KIM, J.; YOO, S.; OH, D.; KWEON, Y.; PARK, D.; LEE, C.; GIL, G. 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.; SOLTES, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial application. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 17-25, 2007.
- LAI, Z.; RAHIM, R. A.; ARIFF, A.; MOHAMAD, R. 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.; FRASER, J. R. E. Hyaluronan. **Faseb Journal**, v. 6, p. 2397-2404, 1992
- 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, 2008 (a).

LIU, L.; WANG, M.; SUN, J.; DU, G. C.; CHEN, J. Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8532-8536, 2008 (b).

LIU, L.; SUN, J.; XU, W. B.; WANG, M.; DU, G. C.; CHEN, J. 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.; LIU, Y.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. **Microbial Cell Factories** v.10:99, 2011.

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 synthesierende 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, 629–634, 1934.

NARINS, R.S.; BRANDT, F.; LEYEDEN, J.; LORENC, Z.P.; RUBIN, M.; SMITH, S. A randomized, Double-blind, multi-center comparison of the efficacy and tolerability of Restylane versus Zylplast for the correction of nasolabial folds. **Dermatologic Surgery**, v. 29, p. 588-595, 2003.

NIMROD, A.; GREENMAM, B.; KANNER, D. ; MOSHE, B. ; LANDSBERG, Y. **Method of production high molecular weight sodium hyalluronate by fermentation of streptococcus**. United State Patent: 4, 780, 414, 1988.

OGRODOWSKI, C. S.; HOKKA, C. O.; SANTANA, M. H. A. 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.; KAMALJA, K. K.; CHAUDHARI B. L. Optimization of medium components for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 using a statistical approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p.1573-1577, 2011.

PETROVÁ, P.; KOCA, J.; IMBERTY, A. Molecular dynamics simulation of solvated UDP-glucose in interaction with Mg<sup>2+</sup> 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.; MACEDO, A. C.; EGUCHI, S. Y.;SANTANA, M. H. A. 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.

ROSA, C. S.; HOELZEL, S. C.; VIERA, V. B.; BARRETO, P. M.; BEIRÃO, L. H. Antioxidant activity of hyaluronic acid extracted from chicken crest. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 38, n. 9, p. 2593-2598, 2008.

SCOOT, J. E.; CUMMING, C.; BRASS, A.; CHEN, Y. Secondary d tertiary structure in aqueous solution: a C-13 NMR study. Proceedings of the. **National Academy of Sciences**, v. 96, p. 4850-4855, 1999.

SCHIRALDI, C.; GATTA, A. L.; ROSA, M. D. **Biotechnological Production and Application of Hyaluronan**. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/biopolymers/biotechnological-production-characterization-and-application-of-hyaluronan>>. Acesso em: 12 set. 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.

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

TLAPAK-SIMMONS, V. L.; BAGGENSTOSS, B. A.; KUMARI, K.; HELDERMON, C.; WEIGEL P. H. Kinetic Characterization of the Recombinant Hyaluronan Synthases from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, p. 4246-4253, 1999.

TSUBOTA, K.; GOTO, E.; FUJITA, H.; ONO, M.; INOUE, H.; SAITO, I.; SHIMMURA, S. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome. **Brazilian Journal of Ophthalmology**, v. 83; p. 390-395; 1999.

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, n. 46, 2010.

WEIGEL, P. H.; HASCALL, V. C.; TAMMY, M. Hialuronan Synthases. **American Society for Biochemistry and Molecular Biology**. Minireview. 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. F. ; HUANG W. C. ; CHEN Y. C. ; TSAY Y. G. ; CHANG C. S. Proteomic investigation of the impact of oxygen on the protein profiles of hyaluronic acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. **Proteomics**, v. 9, n.19, p. 4507- 4518, 2009.

YAMADA, T., KAWASAKI, T. Microbial Synthesis of Hyaluronan and Chitin: New Approaches. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, p. 521-528, 2005.

RECEIVED 01 Oct 2013

ACCEPTED 18 Mar 2014