

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES**  
**URI – ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**DIANE RIGO**

**IMOBILIZAÇÃO DE *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 EM ESPUMA DE  
POLIURETANO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO**

**ERECHIM, RS - BRASIL**

**2024**

**DIANE RIGO**

**IMOBILIZAÇÃO DE *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 EM ESPUMA DE POLIURETANO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO**

**Tese de doutorado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora, pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento das Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim.**

**Orientadores: Dr<sup>a</sup>. Jamile Zeni  
Dr. Rogério Marcos Dallago**

**ERECHIM, RS - BRASIL**

**2024**

**DIANE RIGO**

**IMOBILIZAÇÃO DE *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 EM ESPUMA DE  
POLIURETANO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO**

**Tese de doutorado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora, pelo  
Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento das Ciências  
Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de  
Erechim.**

**Orientadores: Dr<sup>a</sup>. Jamile Zeni  
Dr. Rogério Marcos Dallago**

**Erechim, 20 de março de 2024.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jamile Zeni, D.Sc. (Orientadora)**  
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

---

**Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago, D.Sc. (Orientador)**  
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Valduga**  
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

---

**Dr<sup>a</sup>. Ilizandra Aparecida Fernandes**  
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alini Tinoco Fricks**  
Universidade Federal da Bahia – UFBA – Salvador

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gean Delise Leal Pasquali**  
Universidade Federal Fronteira Sul – Erechim

R572i Rigo, Diane

Imobilização de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em espuma de poliuretano, produção e caracterização de ácido hialurônico / Diane Rigo, 2024.

130 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, 2024.

“Orientação: Prof<sup>a</sup> Dra Jamile Zeni, Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago”

1. Biomassa imobilizada 2. Biomassa 3. Hialuronato de sódio  
4. Propriedade biológicas e físicas I. Título

C.D.U.: 664

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu “anjo da guarda”, à pessoa que esteve comigo desde sempre, que nunca me deixou, mesmo depois de sua partida. Obrigada minha amada Nona “Zeli”.

À minha família: meus humildes pais Vilson e Neide Rigo, por toda confiança depositada em meus sonhos, por todos os sacrifícios que fizeram e fazem para que eu seja feliz, meu muito obrigada! A minha irmã Elaine, meu cunhado Diego e minha “princess” (sobrinha/afilhada) Isabella por todo apoio, coragem que me deram durante este período e por entenderem minha ausência em dias incansáveis de experimentos. Ao (a) sobrinho (a) que está para chegar, tia Di já ama! E também minha gratidão a minha madrinha Clélia por sempre me enviar sua “luz”.

Ao meu namorado, companheiro de vida e de sonhos Gabriel Simanski, minha eterna gratidão por caminhar comigo nesse período tão intenso e desafiador. Por ter topado encarar a vida ao meu lado, por aceitar minhas escolhas, me incentivar e tentar me acalmar nos momentos mais difíceis. Obrigada por me fazer enxergar o mundo por outro ângulo!! Te amo!

Aos meus queridos Orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Jamile Zeni e Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago, vocês foram brilhantes e determinantes para que eu chegasse até aqui. Foi uma honra tê-los ao meu lado me orientando durante o mestrado e doutorado. Levarei a dedicação, persistência, ensinamentos e esforço de ambos para sempre comigo como exemplos de pessoas e profissionais.

A todos os professores do PPGEAL: Geciane, Cansian, Nathália, Marcelo, Juliana, Clarice, Eunice, Cláudio e Alexander, muito obrigada por tudo!!

Agora vem a família que o lab me deu: Rosi, Lucas, Bruno, Vane, Jô e Sandy. Sempre falo: “o que seria de mim sem vocês?”. Quantas boas risadas pudemos dar, mesmo que fossem das nossas “desgraças”. Quantos abraços de consolo, de incentivo, as vezes de choro, mas sempre de coração, foram dados nesses últimos anos! Além de tudo isso, quantos aprendizados, quanto conhecimento pudemos compartilhar e debater enquanto tomávamos um café na escada!! Eu não tenho palavras para agradecê-los!!

Aos meus amigos de fora da URI: Jaine, Mônica, Milena, Eli, Rai, Angélica, Bruna, Guilherme P., Guilherme G. Vocês são essenciais na minha vida!! Sempre me motivando e me ajudando a segurar as pontas de alguma forma. Além de dividirmos muitas alegrias, bons momentos, aventuras e, claro, sempre aprendendo algo com nossas conversas a fora.

Minha enorme gratidão também à Bruna Puton, Enzo, Helo, Lívia, Ângela, Emanuelle, Cláudia, Rafa, Luana, Luiza, Emily, Brenda, Mariana, Sabrina, Fernanda, Gabriela, Leonardo, Júlia! Vocês foram essenciais para que eu concluísse este trabalho, seja me ajudando com os experimentos, compartilhando conhecimentos, ou mesmo dividindo momentos ao tomarmos um cafezinho no intervalo.

Ao pessoal da central de materiais (Vera, Cidi e Giovana) e nossa querida “tia Di”. Obrigada por tantos anos de parceria e carinho que sempre me trataram.

Gratidão a todos os funcionários da URI que tiveram parte direta ou indiretamente neste trabalho.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, instituição a qual considero minha segunda casa, obrigada por tudo!

À Universidade Tiradentes – UNIT – Aracajú e à Universidade de Caxias do Sul – UCS-Caxias do Sul pela parceria.

À banca, por ter aceito o convite de fazer parte desse momento tão importante na minha vida e por todas as suas contribuições.

À CAPES, CNPQ, FAPERGS e todos os demais órgãos de fomento à pesquisa, meu muito obrigada!

## *DEDICATÓRIA*

Dedico este trabalho aos meus pais Wilson e Neide e para minha Nona Zélida (*in memoriam*). Obrigada por torcerem sempre por mim e por terem me ajudado de todas as formas durante toda a minha existência.

## RESUMO

O ácido hialurônico (AH) é um biopolímero que apresenta uma crescente demanda em múltiplas aplicações. A produção microbiana de AH é uma alternativa que vem sendo utilizada para suprir toda a demanda de mercado do biopolímero, além de ser um método que apresenta ter biossegurança. A imobilização de células microbianas em poliuretano pode ser uma excelente alternativa para reutilizar, otimizar e reduzir os custos operacionais. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo produzir ácido hialurônico através de células de *Streptococcus zooepidemicus* imobilizadas em espuma de poliuretano. Para a produção de biomassa, utilizou-se meio de infusão de cérebro e coração de carneiro (BHI) (37 g/L) em biorreator, sob as condições de 37 °C, 500 rpm e 1 vvm, durante 24 h. Após a separação das células, estas foram utilizadas para a imobilização em diferentes carregamentos (4, 6, 8 e 10 g bruta e 6 g diluídas) juntamente com uma razão de suporte de imobilização de 7 g de polirol, 0,02 g de silicone e 3 g de isocianato. Todas as formulações foram avaliadas através da bioprodução de AH utilizando meio reacional composto por glicose (30 g/L), extrato de levedura (15 g/L) suplementado com sais minerais (fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (2g/L), fosfato dipotássico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (0,5g/L), sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) (0,5g/L), sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (0,5g/L) e aminoácido (L-asparagina (0,1g/L)), com uma proporção de meio reacional/imobilizado de 30 g/L, além de uma caracterização parcial da morfologia. Após avaliação da melhor proporção célula/suporte, realizou-se a otimização da bioprodução em relação ao tempo com um delineamento composto central rotacional variando as condições (temperatura, agitação e aeração). A estabilidade operacional foi analisada utilizando cultivo em biorreator em batelada por 28 h, seguida de quantificação de AH, separação do imobilizado do mosto seguido por nova bioprodução. A estabilidade de estocagem foi realizada em temperatura ambiente (25 +/- 2 °C) e refrigeração (4 +/- 2 °C) mantendo o imobilizado em embalagem hermética composta por poliéster laminado e acabamento metalizado com fechamento ziplock. A recuperação do AH foi realizada utilizando diversas etapas intercaladas com precipitação com etanol, centrifugação, refrigeração e cloreto de sódio. A caracterização do hialuronato de sódio foi realizada através das propriedades biológicas (atividade antimicrobiana, antioxidante e citotoxicidade), grupamentos funcionais através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), propriedades térmicas (TGS e DSC) e morfologia (MEV). A imobilização de 8 g de biomassa em poliuretano demonstrou uma melhor eficiência em relação as demais proporções, com uma bioprodução de aproximadamente 0,4 g/L de AH e, portanto, foi escolhida para seguir as demais etapas do estudo. Para a otimização das condições operacionais, os pontos centrais do DCCR (35 °C, 2 vvm, 500 rpm) foram os que apresentaram valores de produção de AH superiores aos demais ensaios com uma bioprodução de aproximadamente 0,5 g/L de AH por 28 h. A estabilidade operacional demonstrou produção de AH por até 15 ciclos e a estabilidade de estocagem mostrou maior eficiência do imobilizado mantido sob refrigeração (4 °C) por até 90 dias com aproximadamente 53% de concentração de AH. Através dos processos de purificação, obteve-se o hialuronato de sódio apresentando não toxicidade, atividade antibacteriana com concentração inibitória mínima acima de 50 mg/mL frente a três bactérias (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*) e poder antioxidante de 77,82 mg/ml de hialuronato de sódio para eliminar 50% do radical ABTS. As propriedades morfológicas realizadas por MEV mostraram os cristais de hialuronato de sódio presente na amostra, além de detectar os grupos funcionais do hialuronato de sódio através do FTIR. Os termogramas apresentaram degradação do biopolímero em aproximadamente 280 °C. Também foi realizada a aplicação em creme cosmético com boas características físicas e de estabilidade. De acordo com os resultados obtidos, a produção de ácido hialurônico com células de *Streptococcus zooepidemicus* imobilizadas em espuma de poliuretano, pode vir a tornar-se uma alternativa inovadora para a produção do biopolímero.

**Palavras-chave:** bioprodução, biomassa imobilizada, purificação, hialuronato de sódio, propriedades biológicas e físicas.

## ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA) is a biopolymer that is in growing demand in multiple applications. The microbial production of HA is an alternative that has been used to meet the entire market demand for the biopolymer, in addition to being a method that presents biosafety. The immobilization of microbial cells in polyurethane can be an excellent alternative to reuse, optimize and reduce operational costs. In this sense, this work aimed to produce hyaluronic acid through *Streptococcus zooepidemicus* cells immobilized in polyurethane foam. For biomass production, sheep brain and heart (BHI) infusion medium (37 g/L) was used in a bioreactor, under conditions of 37 °C, 500 rpm and 1 vvm, for 24 h. After separating the cells, they were used for immobilization in different loadings (4, 6, 8 and 10 g raw and 6 g diluted) together with an immobilization support ratio of 7 g polyol, 0.02 g silicone and 3 g of isocyanate. All formulations were evaluated through HA bioproduction using reaction medium composed of glucose (30 g/L), yeast extract (15 g/L) supplemented with mineral salts (monopotassium phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (2g/L), dipotassium phosphate (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (0,5g/L), magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>) (0,5g/L), ammonium sulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (0,5g/L) and amino acid (L-asparagine (0.1g/L)), with a reaction medium/immobilized ratio of 30 g/L, in addition to a partial characterization of the morphology. After evaluating the best cell/support ratio, bioproduction was optimized in relation to time with a central rotational composite design varying the conditions (temperature, dynamics and aeration). Operational stability was proven using cultivation in a batch bioreactor for 28 h, followed by HA quantification, separation of the immobilized must from the must followed by new bioproduction. Storage stability was achieved at room temperature (25 ± 2 °C) and refrigeration (4 ± 2 °C), keeping the active ingredient in airtight packaging composed of laminated polyester and a metallized finish with ziplock closure. HA recovery was carried out through several steps interspersed with variations in ethanol, centrifugation, refrigeration and sodium chloride. The characterization of sodium hyaluronate was carried out through biological properties (antimicrobial activity, antioxidant and cytotoxicity), functional groups through non-infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR), thermal properties (TGS and DSC) and morphology (SEM). The immobilization of 8 g of biomass in polyurethane demonstrated better efficiency compared to other proportions, with bioproduction of approximately 0,4 g/L of HA and, therefore, was chosen to follow the other stages of the study. To optimize the operating conditions, the central points of the DCCR (35 °C, 2 vvm, 500 rpm) were those that presented higher HA production values than the other tests with bioproduction of approximately 0,5 g/L of HA per 28 h. The operational stability demonstrated the production of HA for up to 15 recyclings and the storage stability showed greater efficiency of the fixed asset kept under refrigeration (4 °C) for up to 90 days with a concentration of approximately 53% of HA. Through purification processes, sodium hyaluronate was obtained, which presents non-toxicity, antibacterial activity with a minimum inhibitory concentration above 50 mg/mL against three bacteria (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*) and an antioxidant power of 77.82 mg /ml of sodium hyaluronate to eliminate 50% of the ABTS radical. The morphological properties performed by SEM showed the sodium hyaluronate crystals present in the sample, in addition to detecting the functional groups of sodium hyaluronate through FTIR. Thermograms showed degradation of the biopolymer at approximately 280 °C. It was also applied over a cosmetic cream with good physical and stability characteristics. According to the results obtained, the production of hyaluronic acid with *Streptococcus zooepidemicus* cells immobilized in polyurethane foam could become an innovative alternative for the production of the biopolymer.

**Key words:** bioproduction, immobilized biomass, purification, sodium hyaluronate, biological and physical properties

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

<b>Tabela 1.1-</b> Estudos envolvendo aplicações de AH em diferentes áreas e diferentes funções. .....	35
<b>Tabela 1.2-</b> Produção de ácido hialurônico por via microbiana. ....	3939
<b>Tabela 1.3-</b> Produção de ácido hialurônico por microrganismos geneticamente modificados. .....	43
<b>Tabela 1.4-</b> Métodos de recuperação e purificação de AH produzidos por via microbiana. .....	4949

### Capítulo 3

<b>Tabela 3.1-</b> Variáveis e níveis utilizados no DCCR na produção de ácido hialurônico.....	76
<b>Tabela 3.2-</b> Comparação da formulação das espumas sem biomassa, com 4, 6, 8 e 10 g de biomassa bruta e 6 g de biomassa diluída e imagem obtida pelo MEV. ....	811
<b>Tabela 3.3-</b> Matriz do DCCR (valores codificados e reais das variáveis independentes) e resposta em concentração de AH (g/L) em 28 h de produção. ....	844
<b>Tabela 3.4-</b> Coeficientes de regressão e erro puro, valores de p e t do DCCR para a produção de ácido hialurônico.....	855
<b>Tabela 3.5-</b> Análise de variância para avaliação da significância estatística do modelo para a concentração de AH (g/L) obtida durante 28 h reacionais em cada ensaio do DCCR.....	866

### Capítulo 4

<b>Tabela 4.1-</b> Concentração inibitória e bactericida mínimas do hialuronato de sódio.....	1088
<b>Tabela 4.2-</b> Grupos orgânicos encontrados no espectro FTIR do hialuronato de sódio.....	1122

### Capítulo 5

<b>Tabela 5.1-</b> Resultados de viscosidade do creme cosmético contendo AH armazenado a 20 e 40 °C por um período de 60 dias. ....	1277
<b>Tabela 5.2-</b> Resultados de densidade do creme cosmético contendo AH armazenado a 20 e 40 °C por um período de 60 dias. ....	128
<b>Tabela 5.3-</b> Resultados de aw do creme cosmético contendo AH armazenado a 20 e 40°C por um período de 60 dias.....	1300
<b>Tabela 5.4-</b> Resultados de umidade do creme cosmético contendo AH armazenado a 20 e 40 °C por um período de 60 dias. ....	131
<b>Tabela 5.5-</b> Resultados de pH do creme cosmético contendo AH armazenado a 20 e 40 °C por um período de 60 dias.....	132

<b>Tabela 5.6-</b> Resultado de cor instrumental (L*, a*, b* e C*) do creme cosmético contendo AH armazenado a 20 e 40 °C por período de 60 dias.....	1344
---	------

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Fluxograma das etapas realizadas no presente estudo.....	23
<b>Capítulo 1</b>	
<b>Figura 1.1-</b> Cabeçalho do artigo publicado pela proponente no periódico <i>Biointerface Research in Applied Chemistry</i> sobre o assunto Ácido Hialurônico.....	244
<b>Figura 1.2-</b> Estrutura química do ácido hialurônico.....	27
<b>Figura 1.3-</b> Publicações de artigos de pesquisa e revisões bibliográficas no Science Direct referentes às palavras-chave “ácido hialurônico”, “hialuronan” e “ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> ” no período de 2010 a 2020. ....	29
<b>Capítulo 2</b>	
<b>Figura 2.1-</b> Métodos de imobilização de microrganismos. ....	61
<b>Figura 2.2-</b> Formação do poliuretano. ....	63
<b>Figura 2.3-</b> Representação de imobilização de células inteiras em espuma de PU.....	65
<b>Capítulo 3</b>	
<b>Figura 3.1-</b> (a) Banho ultratermostato; (b) Reator encamisado; (c) Controlador de rotação; (d) Bomba peristáltica para controle de entrada de oxigênio; (e) Controlador de pH; (f) Bomba peristáltica para injeção de hidróxido de sódio (NaOH); (g) Frasco com NaOH 5 M.....	73
<b>Figura 3.2-</b> Produção de ácido hialurônico em função do tempo utilizando biomassa de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> imobilizada em espuma de poliuretano. ....	7979
<b>Figura 3.3-</b> Concentração de AH em função do tempo de bioprodução quando utilizado diferentes condições operacionais (temperatura, agitação, aeração) dos 19 ensaios do delineamento composto central rotacional . ....	82
<b>Figura 3.4-</b> Superfície de resposta e curva de contorno de produção de AH (g/L) em função das variáveis independentes temperatura x agitação. ....	866
<b>Figura 3.5-</b> Consumo de carbono orgânico total e nitrogênio total durante as 28 h de bioprodução de AH.....	87
<b>Figura 3.6-</b> Estabilidade operacional das células de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> imobilizadas em poliuretano. ....	8888
<b>Figura 3.7-</b> Aspecto visual do imobilizado: a) antes do primeiro reciclo e b) após o 15° reciclo. ....	89

<b>Figura 3.8-</b> Relação entre concentração de ácido hialurônico e perda de massa de imobilizado durante os ciclos. ....	900
<b>Figura 3.9-</b> Estabilidade de estocagem do imobilizado em temperatura ambiente e refrigeração expressa concentração relativa de ácido hialurônico (%). ....	911
<b>Capítulo 4</b>	
<b>Figura 4.1-</b> Aspecto geral do liofilizador utilizado na secagem do AH. ....	988
<b>Figura 4.2-</b> Aspecto visual do AH em pó (hialuronato de sódio). ....	1033
<b>Figura 4.3-</b> Efeito do hialuronato de sódio na viabilidade das células VERO. Células tratadas com diferentes concentrações de hialuronato de sódio (10, 50, 100, 500 e 1000 µg/ml) por 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média ± DP de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos de acordo com a análise de variância (ANOVA) seguida do teste post hoc (b) de Tukey. A significância estatística foi determinada em $p \leq 0,05$ . ....	1044
<b>Figura 4.4-</b> Efeito do hialuronato de sódio nos níveis de óxido nítrico nas células VERO. Células tratadas com diferentes concentrações de hialuronato de sódio (10, 50, 100, 500 e 1000 µg/ml) por 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média ± DP de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos de acordo com a análise de variância (ANOVA) seguida do teste post hoc (b) de Tukey. A significância estatística foi determinada em $p \leq 0,05$ . ....	1055
<b>Figura 4.5-</b> Efeito do hialuronato de sódio os níveis de ERO nas células VERO. Células tratadas com diferentes concentrações de hialuronato de sódio (10, 50, 100, 500 e 1000 µg/ml) por 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média ± DP de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos de acordo com a análise de variância (ANOVA) seguida do teste post hoc (b) de Tukey. A significância estatística foi determinada em $p \leq 0,05$ . ROS= Espécies reativas ao oxigênio. ....	1066
<b>Figura 4.6-</b> Citotoxicidade do hialuronato de sódio de acordo com o reagente ds-DNA Quant-iT™ PicoGreen® em células VERO. Células tratadas com diferentes concentrações de hialuronato de sódio (10, 50, 100, 500 e 1000 µg/ml) por 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média ± DP de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos conforme análise de variância (ANOVA) seguida de testes post hoc (b) de Tukey. A significância estatística foi determinada em $p \leq 0,05$ . ....	1077

<b>Figura 4.7-</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de hialuronato de sódio. .....	1100
<b>Figura 4.8-</b> Espectros de FTIR de hialuronato de sódio. ....	1111
<b>Figura 4.9-</b> Análise termogravimétrica (TGA) e curvas de termogravimetria derivada (DTG).. .....	113
<b>Figura 4.10-</b> Termograma DSC de hialuronato de sódio. ....	1144
<b>Capítulo 5</b>	
<b>Figura 5.1-</b> Cabeçalho do capítulo do livro Expressões Acadêmicas 2022 - ENGENHARIA DE ALIMENTOS E ENGENHARIA QUÍMICA/URI.....	1200
<b>Figura 5.2-</b> Aspecto visual das formulações do creme-base e com adição de AH.....	125
<b>Figura 5.3-</b> Aspecto visual das formulações de creme após a análise de estabilidade acelerada. .....	1266

## SUMÁRIO

<b>DIAGRAMA CONCEITUAL</b> .....	<b>17</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>22</b>
<b>ESTRUTURA DO ESTUDO</b> .....	<b>23</b>
<b>CAPÍTULO 1: ÁCIDO HIALUÔNICO- DA PRODUÇÃO A APLICAÇÃO: UMA REVISÃO</b> .....	<b>24</b>
1.1. Introdução .....	25
1.2. Materiais e Métodos.....	26
1.3. Resultados e discussão .....	26
1.3.1. Ácido hialurônico: estrutura e constituição química.....	26
1.3.2. Propriedades: físicas, químicas e biológicas .....	29
1.3.3. Aplicações .....	32
1.3.4. AH na matriz extracelular .....	32
1.3.5. AH no processo de cicatrização .....	33
1.3.6. AH nos processos de inflamação e metástase tumoral.....	34
1.3.7. Produção/obtenção de AH.....	36
1.3.7.1. Origem animal.....	36
1.3.7.2. Fonte microbiana.....	37
1.3.7.3. Cepas microbianas selvagens .....	38
1.3.7.4. Cepas microbianas recombinantes .....	41
1.3.8. Fatores que interferem na produção de ácido hialurônico .....	44
1.3.8.1. Carbono .....	44
1.3.8.2. Nitrogênio.....	45
1.3.8.3. Suplementação do meio reacional .....	45
1.3.8.4. Temperatura.....	46
1.3.8.5. pH.....	46
1.3.8.6. Oxigênio dissolvido (OD) .....	47
1.3.8.7. Agitação.....	47
1.3.9. Operações de recuperação e purificação de AH.....	48
1.4. Conclusões .....	50
1.5. Referências.....	50
<b>CAPÍTULO 2: IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS</b> .....	<b>60</b>

<b>2.1. Introdução</b> .....	60
<b>2.2. Métodos de imobilização</b> .....	61
2.3. Imobilização em suporte de poliuretano (PU) .....	63
2.3.1. Características e propriedades do polímero .....	63
2.3.2. Imobilização de microrganismos em espuma de poliuretano .....	64
2.4. Conclusões .....	66
2.5. Referências.....	67

**CAPÍTULO 3: BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR CÉLULAS DE S. ZOOEPIDEMICUS IMOBILIZADAS EM ESPUMA DE POLIURETANO FLEXÍVEL**  
70

3.1. Introdução .....	70
3.2. Materiais e métodos .....	72
3.2.1. Cultivo de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> para produção de biomassa .....	72
3.2.2. Imobilização .....	73
3.2.2.1. Caracterização da morfologia de imobilização - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 74	
3.2.2.2. Produção de ácido hialurônico empregando imobilizados sintetizados com diferentes carregamentos de biomassa .....	74
3.2.3. Recuperação e quantificação do ácido hialurônico .....	75
3.2.4. Maximização das condições operacionais da produção de ácido hialurônico .....	75
3.2.5. Carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total.....	76
3.2.6. Parâmetros cinéticos.....	76
3.2.7. Estabilidade operacional do imobilizado .....	77
3.2.8. Estabilidade de estocagem do imobilizado .....	77
3.2.9. Análise estatística.....	78
3.3. Resultados e discussão.....	78
3.3.1. Produção de ácido hialurônico empregando imobilizados sintetizados com diferentes carregamentos de biomassa .....	78
3.3.2. Maximização da bioprodução de ácido hialurônico .....	82
3.3.3. Estabilidade operacional.....	88
3.3.4. Estabilidade de estocagem.....	90
<b>3.4. Conclusão</b> .....	<b>92</b>
<b>3.5. Referências</b> .....	<b>92</b>

**CAPÍTULO 4: RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO HIALURONATO DE SÓDIO PRODUZIDO POR *Streptococcus ZooepidemuS* IMOBILIZADO EM POLIURETANO** .....

<b>4.1. Introdução</b> .....	<b>95</b>
------------------------------	-----------

<b>4.2. Materiais e Métodos.....</b>	<b>96</b>
4.2.1. Produção de ácido hialurônico por células de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> imobilizadas <i>in situ</i> em poliuretano flexível.....	96
4.2.2. Recuperação do ácido hialurônico .....	97
4.2.3. Quantificação do ácido hialurônico purificado .....	97
4.2.4. Obtenção do hialuronato de sódio em pó .....	97
4.2.4.1. Avaliação da citotoxicidade .....	98
<b><i>Ensaio de viabilidade celular (MTT).....</i></b>	<b>98</b>
<b><i>Produção de óxido nítrico (ON).....</i></b>	<b>99</b>
<b><i>Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) extracelular .....</i></b>	<b>99</b>
<b><i>Avaliação da liberação de DNA de fita dupla (ds-DNA).....</i></b>	<b>99</b>
4.2.4.2. Propriedades biológicas.....	100
4.2.4.3. Avaliação da atividade antioxidante.....	101
4.2.4.4. Avaliação da morfologia do hialuronato de sódio.....	101
4.2.4.5. Avaliação de grupos funcionais .....	101
4.2.4.6. Avaliação da estabilidade e degradação térmica.....	102
4.2.4.7. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) .....	102
4.2.5. Análise estatística .....	102
<b>4.3. Resultados e discussão .....</b>	<b>102</b>
4.3.1. Purificação do ácido hialurônico .....	102
4.3.1.1. Citotoxicidade do hialuronato de sódio.....	103
<b><i>Avaliação da Citotoxicidade pelo Ensaio MTT.....</i></b>	<b>103</b>
<b><i>Produção de óxido nítrico (ON).....</i></b>	<b>105</b>
<b><i>Quantificação de ROS extracelular .....</i></b>	<b>105</b>
<b><i>Avaliação da liberação de DNA de fita dupla (ds-DNA).....</i></b>	<b>107</b>
4.3.1.2. Atividade antimicrobiana .....	108
4.3.1.3. Propriedades antioxidantes.....	109
4.3.1.4. Características estruturais do hialuronato de sódio .....	110
4.3.1.5. Grupamentos funcionais do hialuronato de sódio .....	110
4.3.1.6. Propriedades térmicas.....	112
4.3.1.7. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	113
<b>4.4. Conclusão .....</b>	<b>114</b>
<b>4.5. Referências .....</b>	<b>115</b>
<b>CAPÍTULO 5: ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CREME COSMÉTICO CONTENDO ÁCIDO HIALURÔNICO PRODUZIDO POR <i>Streptococcus Zooepidemicus</i> ATCC 39920.....</b>	<b>120</b>

<b>5.1. Introdução</b> .....	<b>120</b>
<b>5.2. Metodologia</b> .....	<b>123</b>
5.2.1. Preparação da emulsão semi-sólida O/A e incorporação do AH em creme cosmético	123
5.2.2. <i>Caracterização das formulações cosméticas</i> .....	<b>123</b>
<b>5.3. Resultados e discussões</b> .....	<b>124</b>
5.3.1. Preparação e incorporação do AH em creme cosmético .....	124
5.3.2. Caracterização das formulações cosméticas .....	125
<i>Estabilidade acelerada por centrifugação</i> .....	<b>125</b>
<i>Viscosidade</i> .....	<b>126</b>
<i>Densidade</i> .....	128
<i>Atividade de água</i> .....	129
<i>Umidade</i> .....	130
<i>pH</i> .....	131
<i>Cor</i> .....	133
<b>5.4. Conclusão</b> .....	135
<b>5.5. Referências</b> .....	<b>135</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>137</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>138</b>

## DIAGRAMA CONCEITUAL

### Por que?

- O consumo de ácido hialurônico (AH) apresenta uma tendência de crescimento significativa;
- O ácido hialurônico apresenta inúmeras aplicações nas áreas da medicina, biomedicina, farmacêutica, alimentos, entre outras.
- A produção tradicional (com crista de galo) apresenta inúmeras desvantagens, como contaminação por vírus, sazonalidade, dificuldade de purificação;
- Uma das soluções para suprir a demanda e também evitar a contaminação por vírus é a produção de ácido hialurônico por via microbiana;
- Dentre os microrganismos produtores de AH, se destacam os *Streptococcus zooepidemicus*;
- Para restringir a mobilidade microbiana, bem como proporcionar a reutilização das células ou até mesmo aumentar a produção de AH, a imobilização de microrganismos representa uma excelente alternativa.

### Quem fez?

- A produção de AH tem sido amplamente estudada;
- Não foram encontrados relatos na literatura de produção de AH com o uso de biomassa de *Streptococcus zooepidemicus* imobilizada com nenhum tipo de suporte.

### Hipóteses

- A imobilização de *Streptococcus zooepidemicus* é realmente eficiente em suporte de poliuretano?
- A quantidade de biomassa utilizada na imobilização deve ser analisada?
- Parâmetros reacionais (temperatura, agitação e aeração) afetam a produção do biopolímero?
- A estocagem do imobilizado garante uma produção contínua e estável?
- Quantos ciclos o imobilizado poderia oferecer?
- Como purificar o ácido hialurônico (hialuronato de sódio)?
- Quais são as propriedades biológicas hialuronato de sódio?
- Quais são as características físicas do hialuronato de sódio?
- Existe a possibilidade de aplicação do hialuronato de sódio?

### Metodologia

- Produção de biomassa utilizando *Streptococcus zooepidemicus*;
- Imobilização do microrganismo em espuma de poliuretano (poliol e isocianato);
- Fermentação do imobilizado utilizado meio reacional previamente otimizado;
- Caracterização parcial do imobilizado;
- Avaliação da produção de AH por espectrofotômetro;
- Purificação do ácido hialurônico (hialuronato de sódio) utilizando solvente etanol, cloreto de sódio e centrifugação;
- Avaliação microbiológica; capacidade antioxidante e citotoxicidade;
- Características físicas (MEV, FTIR, TGA e DSC);
- Aplicação em creme cosmético.

## Respostas

- Produção de ácido hialurônico utilizando *Streptococcus zooepidemicus* imobilizado em espuma de poliuretano;
- Avaliação das condições operacionais de fermentação (temperatura, agitação, aeração);
- Quantidade de ciclos possíveis;
- Estabilidade de estocagem;
- Purificação do ácido hialurônico (hialuronato de sódio);
- Propriedades biológicas e físicas;
- Aplicação em creme cosmético.

## 1. INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) é um biopolímero linear componente principal da matriz extracelular das articulações, pele e córnea, e tornou-se muito conhecido devido às suas propriedades biocompatíveis, biodegradáveis, não adesivas, não imunogênicas, hidrofílicas e viscoelásticas (CHO et al., 2023).

A produção industrial deste biopolímero era realizada através de fontes animais, principalmente crista de galo, mas devido problemas de contaminação viral, dificuldades de extração e purificação, além do alto custo, uma excelente alternativa de produção é a via microbiana, pois não apresenta tais dificuldades, além de possuir ótimo rendimento devido à elevado níveis de bioconversão (MOHAN et al., 2019; FERREIRA et al., 2021).

Para a obtenção de ácido hialurônico a seleção adequada do microrganismo é um fator importante, pois cada um deles apresenta propriedades que podem ser vantajosas ou desvantajosas em termos de desempenho de produção e lucratividade. Por isso, o microrganismo deve ser capaz de produzir altos rendimentos do biopolímero, ser fácil de cultivo e ter baixo custo de produção. Suprindo estes requisitos, as espécies de *Streptococcus zooepidemicus* podem produzir AH de alto peso molecular com excelente biocompatibilidade, tornando-o adequado para inúmeras aplicações de forma não tóxica e segura (SERRA et al., 2023).

Tão importante quanto a escolha do microrganismo, são as condições operacionais utilizadas no processo de bioprodução, como aeração, agitação e temperatura. Estudos mostram que a produção de AH é consideravelmente melhorada por boa homogeneização do meio de cultura e pela exposição ao oxigênio, uma vez que o cultivo de AH é um processo altamente viscoso. Assim, a agitação deve ser ajustada a uma velocidade adequada, suficiente para uma boa uniformização do meio, porém não elevada ao ponto de danificar as células e diminuir a síntese de AH. A síntese de AH em condições aeróbicas com alto nível de oxigênio leva a produção de moléculas com maior massa molecular em comparação com o cultivo anaeróbico (SADEGHI, 2022).

Para otimizar ainda mais os processos de produção de AH por *S. zooepidemicus*, a biotecnologia investiga o uso de imobilização destas células, que além de oferecer a possibilidade de reutilização microbiana, pode proporcionar um aumento na produtividade, aliada à redução dos custos dos processos de bioprodução. Essa técnica pode ser realizada através de métodos físicos ou químicos para fixar as células em um determinado espaço, de forma que não possam se mover livremente e possam ser utilizadas repetidamente. Ainda como

vantagem, a imobilização celular pode catalisar uma série de reações e é uma tecnologia relativamente nova (LU et al., 2020).

Em termos de suporte, a espuma de poliuretano tem sido utilizada como excelente alternativa para imobilização. A espuma de poliuretano (PU) é produzida a partir da polimerização de polioliol e isocianato e é caracterizado por ser um material altamente versátil que oferece várias vantagens, como porosidade, grande área de superfície, fácil de formular, de baixo custo, excelente biocompatibilidade, sendo amplamente utilizada como meio para filtração e separação além de suporte de imobilização de microrganismos. A imobilização de células inteiras em poliuretano pode ser realizada por meio de adsorção física, aprisionamento por copolimerização ou através de ligações covalentes (MOON et al., 2020; MA et al., 2023).

Após a bioprodução do AH, o caldo obtido deve passar por diversas etapas para a recuperação ou purificação do biopolímero. Para a extração e processo inicial de purificação do AH, necessário é primeiro extrair o biopolímero da cápsula usando um surfactante ou um detergente como o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Esta etapa é complexa porque o surfactante deve ser adicionado com a intenção de extrair o máximo de AH possível, mas deve ser removido antes da etapa final de purificação (ROSSATTO et al., 2023). As demais etapas de purificação podem envolver o uso de solventes como etanol, acetona, propranolol, entre outros, combinadas com o uso de técnicas de centrifugação, precipitação (JABBARI; BABAEIPOUR; SAHARKHIZ, 2023).

Conforme todos estes aspectos apresentados, a AH tem aplicações versáteis nas indústrias de farmacêutica, cosmética e alimentos. Por exemplo, o AH com peso molecular superior a 10 kDa é muito utilizado em tratamentos cosméticos e ortopédicos, enquanto o AH inferior a 5 kDa pode inibir a inflamação e promover a angiogênese. Além disso, o AH foi autorizado como ingrediente alimentar nos Estados Unidos, Canadá, China, Japão, Coreia do Sul, Itália e Bélgica (ZHANG et al., 2023).

No entanto, para a imobilização de *S. zooepidemicus* ainda há uma escassez de estudos, o que torna pesquisas como estas inovadoras, servindo como uma alavancagem para novos rumos da biotecnologia.

Neste contexto, este trabalho foi conduzido com o objetivo de imobilizar o microrganismo *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em espuma de poliuretano otimizando as condições de bioprodução de ácido hialurônico, realizar a caracterização do produto obtido e avaliar a estabilidade operacional e de armazenamento e a potencialidade de aplicação em creme cosmético.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Imobilizar o microrganismo *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em espuma de poliuretano para a produção de ácido hialurônico (AH).

### 2.2. Objetivos específicos

- Otimizar o carregamento de biomassa para a formulação da espuma;
- Avaliar a morfologia da espuma de poliuretano livre e imobilizada utilizando a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Avaliar a capacidade de produção de Ácido Hialurônico do imobilizado;
- Otimizar as condições operacionais (temperatura, agitação e aeração) da bioprodução;
- Avaliar o consumo de carbono e nitrogênio durante o cultivo;
- Avaliar a estabilidade operacional do imobilizado;
- Avaliar a estabilidade de estocagem do imobilizado em temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) e resfriamento ( $\pm 4$  °C);
- Recuperar o ácido hialurônico;
- Realizar a caracterização da morfologia (MEV), grupos funcionais (FTIR), degradação térmica (DSC e TGA), e biológica (citotoxicidade e capacidade antimicrobiana e antioxidante) do hialuronato de sódio;
- Formular creme cosmético com adição de ácido hialurônico bioproduzido.

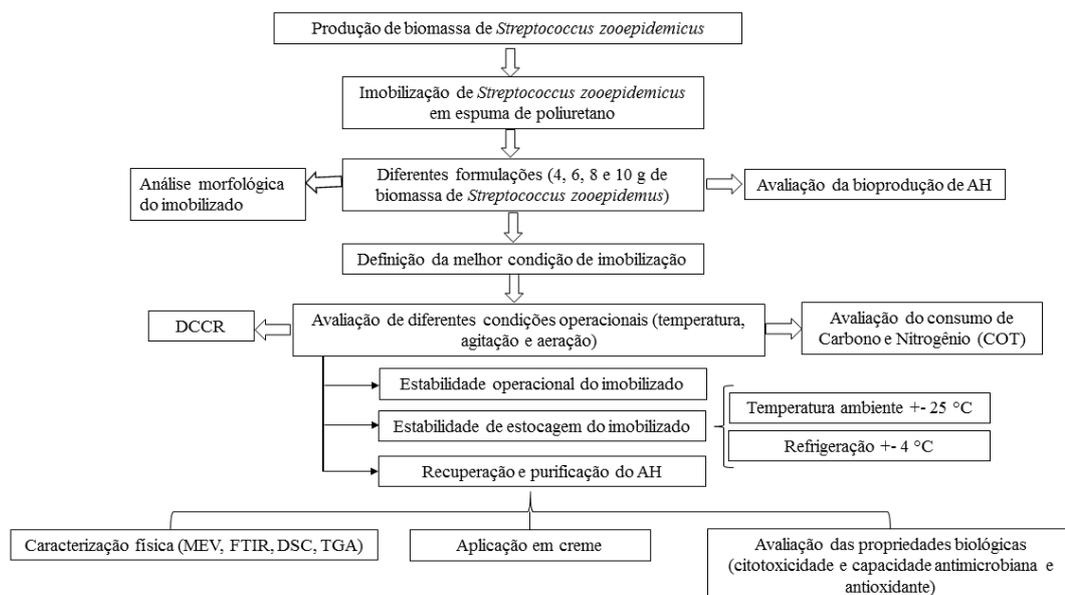
## ESTRUTURA DO ESTUDO

O presente estudo foi dividido em capítulos de acordo com os assuntos abordados. Ao final do trabalho será apresentada uma conclusão geral de todo o trabalho realizado, bem como sugestões para trabalhos futuros, referências bibliográficas utilizadas em todo o trabalho e apêndices.

- Capítulo 1. Apresenta revisão da literatura com ênfase ao ácido hialurônico, onde abrange desde sua descoberta, estrutura química, produção, aplicações e purificação (artigo publicado);
- Capítulo 2. Apresenta revisão da literatura com ênfase na imobilização celular;
- Capítulo 3. Imobilização de células de *S. zooepidemicus* em espuma de poliuretano flexível para a bioprodução de ácido hialurônico;
- Capítulo 4. Purificação e caracterização física e biológica do hialuronato de sódio;
- Capítulo 5. Elaboração e caracterização de creme cosmético contendo ácido hialurônico produzido por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920;
- Considerações finais;

Para melhor compreensão da pesquisa, a Figura 1 apresenta um diagrama simplificado da sequência de etapas envolvidas no presente estudo.

**Figura 1-** Fluxograma das etapas experimentais realizadas no presente estudo.



Fonte: O autor (2024).

## CAPÍTULO 1: ÁCIDO HIALUÔNICO- DA PRODUÇÃO A APLICAÇÃO: UMA REVISÃO

A revisão bibliografia apresentada aqui corresponde ao review publicado no periódico *Biointerface Research in Applied Chemistry* (Figura 1.1) sobre o tema desta tese.

**Figura 1.1-** Cabeçalho do artigo publicado no periódico *Biointerface Research in Applied Chemistry* sobre o assunto Ácido Hialurônico.

*Biointerface Research in Applied Chemistry*  
Open-Access Journal (ISSN: 2069-5837)

*Article*  
**Volume 13, Issue 3, 2023, 211**  
<https://doi.org/10.33263/BRIAC133.211>

### Hyaluronic Acid – from Production to Application: A Review

**Diane Rigo** <sup>1</sup> , **Leonardo M. da Silva** <sup>1</sup> , **Bruno Fischer** <sup>1</sup> , **Rosicler Colet** <sup>1</sup> ,  
**Rogério M. Dallago** <sup>1</sup> , **Jamile Zeni** <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Food Engineering, URI – Erechim, Av. 7 de Setembro, 1621, CEP 99709-910, Erechim – RS, Brazil  
\* Correspondence: [jamilezeni@uricer.edu.br](mailto:jamilezeni@uricer.edu.br) (J.Z.);

Scopus Author ID 35323468700  
**Received: 16.04.2022; Accepted: 16.05.2022; Published: 5.06.2022**

**Fonte:** O autor (2023).

### RESUMO

O ácido hialurônico (AH) era tradicionalmente obtido por extração de fontes animais, especificamente de cristas de galo. No entanto, este método de obtenção tem várias desvantagens. Portanto, o número de pesquisas tem aumentado, e diversas linhagens microbianas têm sido estudadas para a síntese de AH. Nesta revisão foram abordadas as características do AH; os microrganismos envolvidos na produção de AH; as operações para recuperação e purificação de AH e as aplicações do AH. Diversas espécies de microrganismos são capazes de produzir AH, principalmente *Streptococcus zooepidemicus*, que pode produzir até 7 g/L em condições ideais de cultivo. O meio de cultura, assim como as condições ambientais (pH, temperatura, aeração, agitação), são fatores que influenciam diretamente na produção de AH, podendo reduzi-la ou maximizá-la. Em relação aos métodos de recuperação e purificação, várias técnicas em sequência são utilizadas envolvendo a precipitação do AH do caldo de fermentação, geralmente utilizando repetidamente solventes orgânicos, surfactantes, centrifugação, separação por membrana, entre outros. As funções do AH abrangem diversas áreas como farmacêutica, médica e estética, entre outras, fazendo com que a demanda comercial por esse biopolímero aumente a cada ano, justificando pesquisas envolvendo sua bioprodução.

**Palavras-chave:** biopolímero; hialuronano; bioprodução; *Streptococcus zooepidemicus*; engenharia metabólica.

## 1.1. Introdução

O ácido hialurônico (AH) é um polímero natural que pertence a um grupo de heteropolissacarídeos encontrados em diversos tecidos humanos e animais e por meio de fontes microbianas (GRAÇA et al., 2020). Suas características estruturais e propriedades físicas, químicas e biológicas permitem que seu uso seja amplo e abranja diversas áreas, principalmente farmacêutica, médica, odontológica e biomédica (GUPTA et al., 2019; AL-KHATEEB; OLSZEWSKA-CZYŻ, 2020).

Tradicionalmente, o AH ainda é obtido a partir de extrações de origem animal, mais especificamente de cristas de galo. No entanto, devido à complexidade da matriz, que consiste em um emaranhado de glicosaminoglicanos ligados a proteínas, o processo necessário para sua extração e purificação é caracterizado pela complexidade e severidade das etapas envolvidas, desestimulando sua produção (CHAHUKI et al., 2019). Assim, a produção de AH por microrganismos surge como uma alternativa à substituição da via tradicional, que também pode aumentar a produção por meio de abordagens de engenharia metabólica e biologia sintética. Inicialmente, verificou-se que cepas selvagens de *Streptococcus* sp, como *S. zooepidemicus*, *S. thermophilus*, *S. pyrogenes* e *S. equisimilis* sintetizam precursores de AH. Destes, nas últimas 3 décadas, o *S. zooepidemicus* tem estado no centro da indústria de produção de AH devido aos seus excelentes resultados (MOHAN et al., 2019). Nos últimos anos, por meio de modificações genéticas, outras cepas, como *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium* sp. e *Corynebacterium glutamicum*, também começaram a ser estudadas como possíveis produtoras de AH (SUNGUROĞLU et al., 2018).

Além disso, a síntese microbiana de AH permite a utilização de uma ampla variedade de meios de bioprodução, que devem apresentar um equilíbrio entre os teores de carbono, nitrogênio e sais, para que não haja deficiência ou excesso dos mesmos, prejudicando o desenvolvimento da microbiota e conseqüentemente a produção de AH. Outros fatores como pH, temperatura, agitação e aeração também devem ser levados em consideração, pois cada microrganismo possui suas necessidades nutricionais e condições ambientais para manter suas necessidades fisiológicas funcionando adequadamente (ARSLAN; AYDOGAN, 2021). Em relação ao processo de produção, as etapas de separação e purificação, normalmente realizadas

através da combinação sequencial de diferentes métodos, devem ser consideradas, garantindo assim a segurança e qualidade final do biopolímero (CAVALCANTI et al., 2020).

Nesse contexto, o objetivo desta revisão é servir de embasamento teórico para futuros estudos sobre a produção de ácido hialurônico por microrganismos, sendo os tópicos abordados características do AH; microrganismos utilizados na produção de AH; operações para recuperação e purificação de AH, bem como aplicações de AH, por meio de bancos de dados online disponíveis.

## **1.2. Materiais e Métodos**

Foi realizada uma revisão de literatura nas principais bases de dados abertas (Scielo, ScienceDirect, tendo como descritores ácidos hialurônicos; propriedades físicas, químicas e biológicas; produção de AH, incluindo fonte animal e fonte microbiana; recuperação e purificação de AH, em português e inglês, considerando os artigos publicados nos últimos 15 anos.

## **1.3. Resultados e discussão**

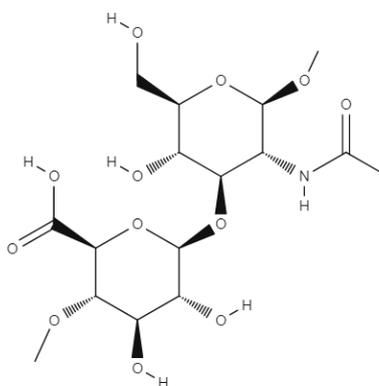
### **1.3.1. Ácido hialurônico: estrutura e constituição química**

O primeiro estudo sobre AH data de 1880, quando o cientista francês Portes observou que a mucina do corpo vítreo era diferente de outros mucóides na córnea e na cartilagem e a chamou de “hialomucina”. Em 1934, Karl Meyer e John Palmer isolaram pela primeira vez um glicosaminoglicano (GAG) do humor vítreo do olho bovino, chamando-o de “ácido hialurônico” (derivado do ácido hialóide [vítreo] e urônico). O primeiro AH de grau farmacêutico foi produzido em 1979 pela Balazs através de sucessivas etapas de extração e purificação de favos de galo e cordão umbilical humano, estabelecendo assim uma base para a produção industrial de AH. A nomenclatura foi alterada em 1986 para “hialuronano”, confirmando a nomenclatura deste polissacarídeo, descrito como uma biomolécula única com diferentes funções biológicas, atribuídas às suas propriedades físico-químicas e suas interações específicas com células e matriz extracelular. Posteriormente, foi confirmada a presença de ácido hialurônico em outros órgãos (articulações, pele, crista de galo, cordão umbilical, entre outros) e tecidos (conjuntivo, epitelial e nervoso) (FALLACARA et al., 2018; GUPTA et al., 2019).

O hialuronano é um polímero linear de glicosaminoglicano (GAG) com unidades repetidas de  $\beta$ -1,3-N-acetil glucosamina e ácido  $\beta$ -1,4-D-glucurônico ligados entre si (Figura 1.2) (GUNASEKARAN; GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2020). Quando ambos os açúcares estão na configuração  $\beta$ , as hidroxilas, o grupo carboxilato e o carbono anomérico no açúcar adjacente estão em posições equatoriais estericamente favoráveis ao mesmo tempo, todos os átomos de hidrogênio ocupam as posições axiais menos favoráveis. Isso torna a estrutura do AH energeticamente muito estável e, devido ao caráter aniônico da molécula, torna-se altamente hidrofílica (GALLO et al., 2019).

AH é o único GAG que não é sulfatado e ligado a proteínas. Geralmente é composto por 100 a 20.000 unidades de repetição e possui peso molecular entre 105 e 108 Da, diferentemente de outros GAGs, que são menores (ABDALLAH et al., 2020). Dependendo da fonte, o peso molecular do AH pode variar. Por exemplo, o ácido hialurônico derivado de animais tende a ter pesos moleculares elevados (até 20.000 kDa). Por outro lado, os AHs bacterianos tendem a ter um peso molecular menor, entre 1.000 e 4.000 kDa.

**Figura 1.2-** Estrutura química do ácido hialurônico.



**Fonte:** O autor (2023).

O AH é um componente onipresente de todos os tecidos e fluidos do corpo humano. No entanto, é mais abundante na pele (50%), onde participa na cicatrização de feridas. Além disso, o AH é essencial para manter a umidade e regular a pressão osmótica da pele, reter grandes quantidades de água e reduzir rugas (MIHAJLOVIC et al., 2022). O AH é sintetizado extracelularmente por seis glicosiltransferases conhecidas como hialuronano sintases (HASs). Em células de mamíferos, HASs podem aparecer em três isoformas (HAS1, HAS2 e HAS3) que diferem em atividade catalítica ou tipo de célula. A isoforma mais expressiva nos

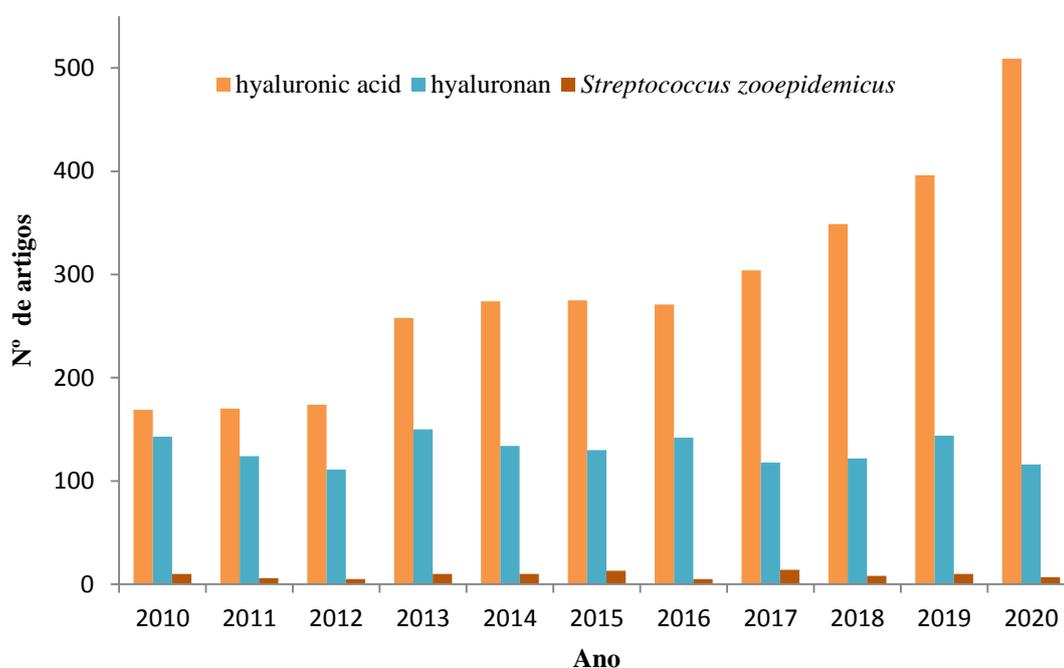
queratinócitos é a SAH2, caracterizada por sua produção diminuir com o envelhecimento da pele (LEE et al., 2011).

Devido às suas propriedades físico-químicas e biológicas, em 1950, o AH passou a ser comercializado em escala industrial como insumo/aditivo para diversos produtos, principalmente ligados a formulações destinadas às áreas médica e cosmética. As principais fontes precursoras utilizadas para obtê-lo foram os cordões umbilicais, vítreos bovinos e, principalmente, cristas de galo, que se destacam por sua concentração atual, com uma quantidade de aproximadamente 7,5 mg/g (GUNASEKARAN; GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2020).

O alto consumo de AH, associado à falta de sua principal matéria-prima (crista de galo), além da possível contaminação com endotoxinas animais que causam efeitos indesejáveis na forma de respostas imunes e alergias, são fatores que desencadeiam o aumento da procura por fontes e, principalmente, por formas alternativas de obtenção de AH. Nos últimos anos, uma dessas alternativas estudadas tem sido a via microbiológica (CHAHUKI et al., 2019).

Nesse contexto, destaca-se a produção por fermentação bacteriana a partir de *S. zooepidemicus*, bactéria conhecida por causar infecção em muitos animais, como cavalos, vacas, coelhos, porcos, cães e gatos, mas raramente em humanos. O interesse da comunidade científica por esta bactéria, e principalmente por sua aplicação na produção de AH, vem crescendo nos últimos anos (Figura 1.3) e deve-se principalmente ao processo de produção (produção, extração/purificação), cuja escalabilidade é facilmente demonstrada, e à qualidade do AH obtido (GUNASEKARAN; GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2020).

**Figura 1.3-** Publicações de artigos de pesquisa e revisões bibliográficas no Science Direct referentes às palavras-chave “ácido hialurônico”, “hyaluronan” e “*Streptococcus zooepidemicus*” no período de 2010 a 2020.



**Fonte:** O autor (2023).

É possível observar um aumento no número de artigos aproximadamente 3 vezes em um período de 10 anos em relação ao “ácido hialurônico”. No entanto, em relação às palavras-chave “hyaluronan” e “*Streptococcus zooepidemicus*”, o número de artigos apresentou poucas alterações nesse mesmo período.

### 1.3.2. Propriedades: físicas, químicas e biológicas

As propriedades físicas, físico-químicas e biológicas do AH estão diretamente ligadas ao seu peso molecular. Pesos moleculares de 0,4 a 4,0 kDa permitem que ela atue como indutora de proteínas de choque térmico e como propriedade não apoptótica. Polissacarídeos com peso molecular de 6 a 20 kDa têm atividades imunoestimuladoras, angiogênicas e flogóticas. O ácido hialurônico com peso molecular de 20 a 200 kDa participa de processos biológicos como desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas e ovulação. Em contraste, o ácido hialurônico de alto peso molecular (>500 kDa) tem atividade antiangiogênica e pode funcionar como um preenchedor de espaço natural e imunossupressor. O aumento do peso molecular e da concentração nas soluções poliméricas leva ao reforço da rede tridimensional do polímero e,

consequentemente, resulta no aumento da viscosidade e viscoelasticidade da solução. Em alguns casos, por exemplo, no processo de eletrofiação, peso molecular, concentração e viscosidade são os principais parâmetros considerados na obtenção de nanofibras (SNETKOV et al., 2020). Além disso, o AH pode ter alta capacidade de retenção de umidade, alta biocompatibilidade e propriedades higroscópicas, proporcionando ao AH a capacidade de atuar como lubrificante, amortecedor, estabilizador da estrutura articular e regulador da resistência ao fluxo do equilíbrio hídrico (GUPTA et al., 2019). Devido à sua estrutura química, o AH é facilmente modificável e maleável em termos de manuseio, o que permite a criação de diferentes formas físicas, tornando-o extremamente versátil em termos de aplicações.

Cada uma dessas formas tem seu nicho e aplicação, como:

- Formação de hidrogéis: quando usados como base para hidrogéis, formam redes de cadeias interconectadas. Para melhorar as funções de reticulação, ligações covalentes devem ser feitas.

O ácido hialurônico possui dois grupos funcionais (COOH e OH) que influenciam o tipo de reticulador usado para modificar a matéria. O grupo carboxílico pode ser modificado, por exemplo, pela adição de N-hidroxisuccinimida. O grupo hidroxila pode ser reticulado por glutaraldeído, por exemplo. No entanto, o método de reticulação covalente requer reagentes biologicamente hostis que não são adequados para células e tecidos. Comparado ao ácido hialurônico original, o tipo reticulado, usado principalmente na engenharia de tecidos, apresenta mecânica mais robusta e é menos suscetível à degradação enzimática. A cinética de gelificação deve ser rápida o suficiente para fins de engenharia de tecidos para permitir o encapsulamento no material celular/gel (KAZEMZADEH et al., 2020). Esses materiais podem ser considerados favoráveis para uso tanto na indústria farmacêutica quanto na área biomédica.

Suas aplicações podem atuar como carreadores de drogas (CHEN et al., 2013).

- Soluções viscoelásticas: devido aos seus altos pesos moleculares, suas soluções podem ser extremamente viscosas e apresentar propriedades de escoamento não newtonianas (HUI et al., 2019). O alto volume ocupado por suas cadeias poliméricas, em sua maioria ligadas à água, confere flexibilidade ao ácido hialurônico, contribuindo para constantes mudanças estruturais (SILVER et al., 2019). As soluções viscoelásticas de AH são excelentes para simular o líquido sinovial encontrado nas articulações, cujas propriedades viscoelásticas naturais podem ser atribuídas à concentração de ácido hialurônico presente nelas. No entanto, essas soluções não possuem integridade mecânica duradoura (DOVEDYTIS; LIU; BARTLETT, 2020).

- Andaimos à base de AH são estruturas de suporte temporárias que ajudam a promover o crescimento interno de células e tecidos por meio de estruturas biodegradáveis, como hidrogéis. Eles estão sendo amplamente utilizados na indústria médica para vários fins terapêuticos, como aplicações em tecido ósseo, preenchimento de espaços, reparo de tecido nervoso e cerebral, distribuição de células e regeneração muscular (ERICKSON et al., 2018). Certos critérios devem ser atendidos por essas estruturas, como a superfície do scaffold deve permitir adesão e crescimento celular; deve ser biocompatível, não deve promover inflamação ou resposta imune e a degradação da superfície do scaffold não deve produzir produtos tóxicos; o andaime deve ter as propriedades físicas e mecânicas do tecido original que está tentando imitar; a porosidade da estrutura deve ser suficiente para permitir o crescimento celular e a difusão de nutrientes (ZAMBONI et al., 2017).
- Nanopartículas AH (NPs-AH): na medicina, as nanopartículas são inovações nanotecnológicas que visam diagnosticar, tratar ou prevenir doenças (KRISHNAN et al.; (2022). O AH e seus derivados têm sido extensivamente investigados no projeto de carreadores de drogas pela indústria farmacêutica (YU et al., 2020).

Relatos mostram que esse biopolímero pode se ligar a receptores CD44, considerados superexpressos em células malignas com alta mobilidade e capacidade invasiva por meio de ligações de hidrogênio. Assim, nanopartículas à base de AH podem ter um tecido tumoral alvo especial, sendo capazes de se automontar contendo vários núcleos hidrofóbicos e uma camada externa hidrofílica de AH. Além disso, NPs-AH demonstra melhor acúmulo no local do tumor em comparação com derivados de AH solúveis em água (ZHONG et al., 2015).

Além de fornecer propriedades mecânicas e físico-químicas interessantes para os tecidos, o AH também desempenha importantes funções biológicas como molécula sinalizadora e é facilmente degradado em fragmentos bioativos (GALLO et al., 2019). Nesse contexto, diversas modificações químicas podem ser realizadas para aumentar sua estabilidade estrutural. Essas modificações visam os grupos funcionais de ácido carboxílico da porção de ácido glicurônico da hidroxila da porção de N-acetilglucosamina. Os grupos de ácido carboxílico podem ser modificados por amidação, condensação de Ugi ou formação de éster, enquanto os grupos hidroxila podem ser modificados por formação de éter, formação de hemiacetal usando glutaraldeído, formação de éster, formação de carbamato ou oxidação.

Esses derivados de AH podem ser reticulados quimicamente por ligações covalentes, fisicamente reticulados usando interações não covalentes ou combinados com ambos os

métodos. O processo de reticulação leva à formação de uma rede 3D capaz de reter grandes quantidades de água; ou seja, formam um hidrogel com propriedades semelhantes às dos tecidos biológicos, o que resultará em excelente biocompatibilidade (ZAMBONI et al., 2018).

### 1.3.3. Aplicações

As funções *in vivo* e aplicações industriais do AH estão diretamente relacionadas às suas propriedades viscoelásticas e pseudoplásticas com base no peso molecular do polímero (YASSER, MOHAMED, KOBEASY, 2018). Por exemplo, o AH de baixo peso molecular, também chamado de oligoácido hialurônico, possui atividade antioxidante superior ao AH de massa molar convencional.

Considerando que pode ser obtido com diferentes pesos moleculares, este produto está sendo comercializado tanto para uso em produtos farmacêuticos (tratamento de olho seco, osteoartrite, osteogênese, cicatrização de feridas) quanto em cosméticos (preenchimentos dérmicos) (GUNASEKARAN; GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2020). Sua capacidade antioxidante sugere que pode ser utilizado como suplemento em sucos e iogurtes, visando reduzir o número de radicais livres presentes no organismo (GUO; YIN; CHEN, 2018).

### 1.3.4. AH na matriz extracelular

Quando em soluções fisiológicas, ocorrem repulsões mútuas entre seus grupos carboxílicos, fazendo com que o AH inche, formando uma rede hidratada com excelente plasticidade. Quando introduzido na matriz celular dos tecidos conjuntivos moles, o AH desempenha um papel importante na minimização dos efeitos do envelhecimento por meio de sua ação lubrificante, tamponamento osmótico e preenchimento de espaços, como distúrbios ortopédicos, síndrome do olho seco e, principalmente, flacidez da pele (ZAMBONI et al., 2018).

Destes, o resultado estético proporcionado pelo preenchimento de tecidos moles com AH reticulado ou estabilizado, que leva à eliminação de rugas, além de permitir a modelagem do contorno facial, é responsável pela maior demanda comercial por AH, principalmente em baixo peso molecular (aproximadamente 105 Da). É utilizado em diversas formulações cosméticas de uso tópico para melhorar a hidratação dos tecidos (GALLO et al., 2019).

### 1.3.5. AH no processo de cicatrização

Segundo Dovedytis, Liu e Bartlett (2020), o processo de cicatrização é dividido em quatro fases principais: hemostasia, inflamatória, proliferação e maturação. Portanto, a aplicação do ácido hialurônico se deve principalmente ao seu papel durante esses processos.

O AH fornece duas funções muito importantes durante a cicatrização de feridas como parte da proliferação e migração celular. Primeiro esse biopolímero fornece uma estrutura temporária nos estágios iniciais da ferida. Essa estrutura ajuda a facilitar a difusão de suprimentos nutricionais e ajuda a livrar a ferida dos resíduos do metabolismo celular. Em segundo plano, o AH está intimamente envolvido na proliferação e migração dos queratinócitos (tipo de célula da epiderme ou camada mais externa da pele). Essa estrutura temporária é substituída à medida que a ferida amadurece pela adição de proteínas proteoglicanas e moléculas de colágeno. Além dessas funções, por ser uma macromolécula higroscópica, é altamente osmótica, permitindo o controle da hidratação durante os períodos de reparo de feridas e processos inflamatórios associados. A sua presença em níveis elevados durante este processo é relevante para a proliferação e migração celular. À medida que o tecido de granulação amadurece, o AH é degradado e, à medida que os níveis caem, mais moléculas de proteína são produzidas. As proteínas se ligam ao AH para tornam-se proteoglicanos e continuam o processo de cicatrização para aumentar a resiliência do tecido. Essas moléculas são capazes de absorver até 3.000 vezes seu peso em água e são, portanto, um importante agente umectante para o tecido (VOIGT; DRIVER, 2012).

Foglarová et al., (2016) desenvolveram filmes à base de AH para aplicações biomédicas. Os filmes produzidos apresentaram superfície lisa e homogênea e foram preparados à base de ésteres de palmitol, um material insolúvel em água. Com base na caracterização, o filme manteve o peso molecular do polímero utilizado e mostrou-se não citotóxico, possuindo grande potencial de aplicação em diversas áreas da biomedicina, incluindo seu uso na engenharia de tecidos para cicatrização de feridas.

Os géis de AH apresentam boa capacidade de absorção e histocompatibilidade, por isso são frequentemente utilizados para prevenir aderências teciduais pós-operatórias, separando a superfície tecidual durante o reparo de feridas teciduais, como o endométrio, prevenindo aderências e formação de tecido fibroso, além de inibir a migração e a fagocitose de granulócitos e a deposição de plaquetas (FEI et al., 2020).

### 1.3.6. AH nos processos de inflamação e metástase tumoral

Suas funções incluem mediar a migração, adesão, proliferação, sinalização e diferenciação celular, atividade imunorreguladora, anti-inflamatória, antioxidante e antienvhecimento. Também pode ser utilizado como principal matéria-prima para a construção de bases de biomateriais na engenharia de tecidos e promoção da diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo em células produtoras de insulina. Além disso, estudos mostraram que o AH pode aumentar a secreção de insulina pela linhagem de células  $\beta$  pancreáticas HIT-T15, sugerindo que o ácido hialurônico pode ser um potencial regulador da diferenciação de células-tronco que pode tratar o diabetes tipo 1 (LUO et al., 2019).

Existem dois receptores comuns de superfície celular que interagem com moléculas de AH. Eles são chamados de CD44 e RMMAHA (receptor para motilidade mediada por ácido hialurônico). O comprimento da cadeia de polissacarídeos desempenha um papel crucial no efeito; em particular, pequenos oligômeros de AH, emergentes devido à atividade de hialuronidase (HYAL), têm uma atividade biológica extraordinariamente alta. Por exemplo, moléculas de AH de alto peso molecular suprimem a angiogênese, enquanto pequenos fragmentos estimulam o mesmo processo. Existem muitos outros exemplos de impactos opostos, dependendo do comprimento da cadeia. Sabe-se também que pequenos fragmentos de AH participam de processos de inflamação e metástase tumoral por meio da interação com os receptores supracitados, gerando um atrativo ponto de partida para a modificação química estrutural de moléculas de AH para investigar alterações na atividade biológica ou geração de novas propriedades devido a uma alteração na estrutura e comportamento secundário/terciário do polieletrólito (MENDE; NIEGER; BRÄSE, 2017). Esta biocompatibilidade, biodegradabilidade, características de direcionamento ativo e a estrutura química facilmente modificada do AH o torna amplamente utilizado em vários métodos de tratamento do câncer (HUANG et al., 2019).

A Tabela 1.1 apresenta alguns estudos com aplicações de AH em diferentes áreas e diferentes funções.

**Tabela 1.1-** Estudos envolvendo aplicações de AH em diferentes áreas e diferentes funções.

Área	Aplicação de AH	Referência
	Fibras eletrofiadas carregadas com AH para aplicações de curativos e cicatrização de feridas	GUO; YIN; CHEN, (2018); CHANDA et al., (2018) HUSSEIN et al., (2020)
	Nanomedicamentos à base de AH para tratamento de câncer	KIM et al., (2019); SU et al., (2021)
	Aplicação de ácido hialurônico na regeneração óssea	WEN et al., (2020)
Médica; Farmacêutica; Odontológica; Biomédica	Injeção de AH para regeneração da papila; Cobertura de implante dentário com HA para melhorar sua osseointegração; Mistura de AH com material de enxerto ósseo sintético; Cobertura de área cirúrgica (de dentro e de fora) por AH para melhorar e acelerar o processo de cicatrização do tecido; Uso de AH após raspagem e planejamento radicular como uma terapia adjacente para periodontite; Aplicação tópica de AH para tratamento de úlceras orais; Uso de AH como um adjacente aos tratamentos de gengivite e peri-implantite; Uso de AH como um adjacente ao tratamento não cirúrgico da recessão gengival; Misturar AH com fibrina rica em plaquetas, plasma e fatores de crescimento para melhorar os resultados gerais; Usado como um carreador de drogas de tamanho nano; HA como matriz para encapsular células-tronco e moléculas de sinalização para reconstrução da articulação temporomandibular, glândulas salivares, polpa dentária, osso dentário, esmalte, canal radicular e mucosa. Matriz de microagulhas à base de ácido hialurônico	ZHAI et al., (2020) SAHA; RAI, (2021)
	Uso como colírio; Injeções de AH intra-articular como opção de tratamento de osteoartrite; Preenchimento de gengivas, lábios e cicatrização de feridas	HUYNH; PRIEFER, (2020)
	Filme fino feito da mistura de colágeno, ácido hialurônico e quitosana reticulado com amido dialdeído	SIONKOWSKA; MICHALSKA- SIONKOWSKA; WALCZAK, (2020)
	Formação de hidrogéis para aplicações biomédicas e na engenharia de tecidos	PANDIT; MAZUMDAR; AHMAD, (2019); LARRANETA et al., (2018); MENDES et al., (2021); XU et al., (2021); BENINATTO et al., (2019)
	AH para preenchimento dérmico na área periocular	MURTHY; ROOS; GOLDBERG, (2019)
	Aplicações do ácido hialurônico em oftalmologia e lentes de contato	CHANG et al., (2021)
	Aplicação de AH como carreador de drogas para liberação sustentada	HUANG et al., (2019)

	Rejuvenescimento facial	BILLON; HERSANT; MENINGAUD, (2017)
Ambiental e Química	Síntese de pontos fluorescentes de carbono (CDs) usando ácido hialurônico como fonte de carbono e aplicação para detecção seletiva de íons Fe 3+ e ácido fólico	ZHONG et al., (2019)
Alimentícia	Propriedades de formação de filme e gelificação para embalagens comestíveis	MORADI; GUIMARÃES; SAHIN, (2021)

**Fonte:** O autor (2023).

Como apresentado na Tabela 3, as aplicações do AH são inúmeras e em múltiplas áreas (odontológica, médica, alimentícia, cosmética, etc). No entanto, é notória a utilização deste glicosaminoglicano principalmente nas áreas da odontologia, médica e procedimentos estéticos.

### 1.3.7. Produção/obtenção de AH

O mercado global de produtos baseados em AH, estimado em cerca de US\$ 8,3 bilhões em 2018 deve superar os US\$ 15 bilhões até 2026. Dependendo da aplicação, o valor do AH e seus derivados variam de US\$ 2.000 a 60.000 por kg (GUNASEKARAN; GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2020). Essa enorme diferença de preço deve-se principalmente à elevada pureza exigida, principalmente pelas aplicações médicas e, em menor grau, ao peso molecular exigido por essas aplicações. A produção de HA está crescendo, particularmente na China, onde as vendas devem atingir um volume de 613 toneladas até o final de 2022. A título de comparação, a produção de HA no início dos anos 2000 foi estimada em 10-20 toneladas/ano para aplicações oftálmicas, cosméticas e dietéticas, e menos de 1 toneladas/ano para aplicações de grau médico (FERREIRA et al., 2021).

Essa grande demanda comercial exige que os processos de produção de AH sejam otimizados para se obter produtos que atendam a elevados padrões de qualidade, associados a rendimentos e custos acessíveis. Tanto a fonte quanto o processo de purificação colaboram para determinar as características do AH produzido em termos de pureza, peso molecular, rendimento e custo, o que representa um grande desafio no campo da pesquisa aplicada há hialuranos de alta qualidade e elevado rendimento utilizando métodos menos dispendiosos (FALLACARA et al., 2018).

#### 1.3.7.1. Origem animal

Segundo Yao et al. (2021), durante o período de 1930, o AH foi isolado de forma sucessiva de uma grande variedade de diferentes tecidos de animais. A primeira vez que o AH foi obtido com um elevado grau de purificação, bem como apresentando um elevado peso molecular foi de cordão umbilical e crista de galo, sendo esta extração realizada por Endre Balazs, tornando-se então um dos produtos mais aplicados em cirurgia oftálmica.

A obtenção de AH de fontes animais, principalmente de cristas de galo e humor vítreo bovino baseiam-se na extração com solventes, com posterior precipitação e lavagens como tratamentos finais da extração. Anteriormente os solventes de extração eram compostos por misturas de clorofórmio e água, no entanto, foram substituídos por misturas ambientalmente mais amigáveis de água e etanol ou acetona. Após o processo de extração, as soluções contendo AH são submetidas a tratamentos subsequentes, envolvendo a remoção bacteriana e posterior separação das cadeias proteicas ligadas à estrutura do AH, utilizando para isso bactericidas e enzimas proteolíticas, respectivamente (CAVALCANTI et al., 2020).

As desvantagens dos métodos de extração oriundos de tecido animal podem ser resumidas da seguinte forma: disponibilidade limitada de tecidos animais; o processo de extração é extremamente complicado; pode gerar impacto ambiental; a taxa de extração da produção de AH é baixa e o controle de qualidade não é confiável. Segundo Badri et al. (2018), todos estes fatores contribuem como limitadores no emprego do método de extração de tecidos animais para a produção comercial do AH em grande escala.

#### 1.3.7.2. Fonte microbiana

Os microrganismos desempenham um importante papel econômico nos processos metabólicos e bioquímicos que incluem reações que vão desde a produção de enzimas até biopolímeros (SOMAN et al., 2020). As investigações sobre a produção de AH por fermentação microbiana começaram a aparecer na década de 1980 e evoluíram rapidamente nas últimas décadas (YAO et al., 2021). Esse aumento da produção se deve a algumas vantagens, como evitar o risco de infecção viral cruzada de espécies, purificação mais eficiente, menores custos de produção e maiores rendimentos em comparação com fontes animais (AMADO et al., 2016).

Algumas técnicas de produção microbiana vêm sendo desenvolvidas com a intenção de se obter um elevado peso molecular por meio do isolamento da cápsula que é composta de polímeros de AH, além de fontes microbianas adequadas (YASSER, MOHAMED, KOBEASY, 2018).

A produção microbiana de AH pode ser afetada de maneira considerável em função das condições de cultura, incluindo temperatura, pH, taxa de aeração, velocidade de agitação, oxigênio dissolvido, tensão de cisalhamento e tipo de biorreator. Portanto, em vários estudos, parâmetros ótimos sobre a produção microbiana têm sido investigados (GEDIKLI et al., 2018).

#### 1.3.7.3.Cepas microbianas selvagens

Segundo Rohit et al. (2018), diversas cepas microbianas selvagens produzem cápsulas de AH naturalmente, como parte de sua autodefesa contra hospedeiros invasores. Exemplos destas espécies são: *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus thermophilus* e outros organismos, como *Pasteurella multocida* e *Cryptococcus neoformans*. No entanto, a produção industrial atual de AH é realizada por espécies de *Streptococcus*, principalmente o *S. zooepidemicus*, devido a sua elevada produção de AH (6 - 7 g.L<sup>-1</sup>) (Tabela 1.2).

Os diferentes resultados obtidos (0,007 até 6,74 g/L) podem estar relacionados a utilização de diferentes meios de produção (sintéticos e/ou oriundos de resíduos agroindustriais), a espécie do microrganismo ou ainda a variação das condições experimentais (pH, temperatura, agitação e aeração).

No entanto, dentre os trabalhos encontrados na literatura, referentes ao *Streptococcus zooepidemicus*, a faixa de pH e temperatura são fatores que não variam (entre 6 e 8 e 37°C, respectivamente), diferentemente da agitação, que pode variar de 90 a 500 rpm. A aeração utilizada nos estudos geralmente é de 1 vvm, mas ainda assim pode variar de 0,1 a 2 vvm.

**Tabela 1.2-** Produção de ácido hialurônico por via microbiana.

Microrganismo	Meio de produção	pH	Temperatura (C°)	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	AH (g/L)	Referência
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 35246	Soro de leite e hidrolisado de soro de leite; glicose (50 g/L); lactose (50 g/L); extrato de levedura (5 g/L); triptona (15 g/L)	6,7	37	500	1	4	CHAHUKI et al., (2019)
	Melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho (50 g/L); extrato de levedura (5 g/L); Triptona (15 g/L)	6,7	37	500	1	3,48	ROHIT et al., (2018)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> MTCC 3523	Açúcar de palma (10,0–50 g/L); fontes diversas de nitrogênio (17,5 g/L)	7	37	200	1	1,22	AMADO et al., (2016)
	Glicose em concentrações variadas (10–60 g/L); extrato de levedura (10 g/L)	7	37	400	DI	3,345	FERREIRA et al., (2021)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920	Suco de caju; extrato de levedura (60 g/L)	6,5	37	150	2	0,0070	AMADO et al., (2017)
	Maltodextrina (30 g/L); extrato de levedura (5 g/L)	6,4	37	90	Aeração natural	0,92	PIRES et al., (2010)
	Sacarose (20 g/L); caseína hidrolisada (25 g/L); extrato de levedura (3,5 g/L)	7	37	400	2	5,10	AROSKAR; KAMAT; KAMAT, (2013)
	Glicose (30 g/L); extrato de levedura (10 g/L)	7,2	37	200	1	5	RANGASWAMY; JAIN, (2008)
	Glucose (50 g/L); extrato de levedura (20 g/L); solução com oligoelementos	7	37	200	DI	0,226	SHAH; BADLE; RAMACHANDRAN, (2013)
	Extrato de levedura (variando de 14,65 a 85,35 g/L; melaço de cana (variando de 14,65 a 85,35 g/L)	8	37	150	0,5	2,825	WANG et al., (2020)
	Glicose (25 g/L); extrato de levedura (60 g/L)	7	37	DI	2	2,5	YAO et al., (2021)
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	Glicerol (40 g/L)	7	37	1200	0,1 a 1	7	PAN et al., (2015)
	Ar enriquecido com CO <sub>2</sub> (1% (v / v)), sob iluminação contínua (300 μmol fótons m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	DI	38	DI	DI	0,08	WESTBROOK et al., (2018)

<i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24	Extrato de levedura (25 g/L); sacarose (70 g/L)	7	37	294	1,5	6,2	ZHANG et al., (2019)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> NJUST01	Amido (5%); glicose (0,5%); extrato de levedura (0,5%)	7	37	220	Aeração natural	6,74	LIU et al., (2010)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> 3523-7	Glicose (diferentes concentrações); extrato de levedura (diferentes concentrações)	7	37	DI	DI	1,38	ZHANG et al., (2006)
<i>Streptococcus thermophilus</i> YIT 2084	Leite desnatado a 10%	DI	42	DI	Sem agitação	0,8	IZAWA et al., (2009)
<i>Bacillus subtilis</i> 3NA	Glicose (30 g/L); extrato de levedura (10 g/L)	7	37	300	DI	0,096	KOTRA et al., (2013)
<i>Streptococcus equisimilis</i> (MK156140)	Sacarose; extrato de levedura; extrato de carne bovina	7	37	180	DI	7,16	KUMAR; JANAKIRAMAN; NATARAJ, (2021)

DI: Dados não informados

Fonte: O autor (2023).

### *Streptococcus zooepidemicus*

Investigações sobre a produção de AH por fermentação microbiana começaram a aparecer na década de 1980 utilizando o *Streptococcus zooepidemicus* e evoluiu rapidamente ao longo das décadas, sendo que este microrganismo foi usado pela primeira vez para produção comercial durante este período e se estende até hoje. No entanto, existem alguns desafios que persistem no processo de fermentação de *S. zooepidemicus*: a viscosidade do caldo de fermentação aumenta dramaticamente quando o teor de AH atinge acima de 4 g/L, e o oxigênio dissolvido (OD) é reduzido drasticamente, dificultando o acúmulo de biomassa e rendimento de AH; durante o consumo de carbono, a concentração de OD cai rapidamente podendo levar ao acúmulo de subprodutos da via anaeróbia, como o lactato (YAO et al., 2021).

Além de reduzir riscos de contaminação viral, a produção de AH microbiano requer um processamento mais simples, é desprovido de instabilidades, pois não depende da sazonalidade e demonstra menos variações de lote. Diante dessas considerações, tendo aceitação regulatória nos EUA e no Reino Unido, a literatura referente a produção de AH por *S. Zooepidemicus* apresenta inúmeras tentativas para aumentar a quantidade produzida, incluindo técnicas convencionais (por exemplo, otimizar o processo de extração, adaptar os meios de cultura e selecionar cepas com alta produtividade de AH) e métodos de engenharia metabólica (ZAKERI; RASAEI; POURZARDOSHT, 2017).

Como essas bactérias adquiriram a capacidade de sintetizar hialuronano ainda é uma questão de debate, mas a bactéria *Streptococcus* precisa de três genes diferentes para produzir a cápsula de AH (VIGETTI et al., 2014). Os genes hasA, hasB e hasC são transcritos em um operon e codificam ácido hialurônico sintase, UDP-glicose desidrogenase e UDP-glicose pirofosforilase, respectivamente. (YAO et al., 2021).

#### 1.3.7.4.Cepas microbianas recombinantes

A produção de AH por bactérias recombinantes apresenta-se como uma fonte alternativa devido às preocupações de segurança sobre a patogenicidade das cepas naturais produtoras de AH. Neste sentido, várias tentativas de obtenção deste biopolímero com hospedeiros bacterianos Gram (+) e Gram (-) vem sendo investigadas, utilizando, por exemplo, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium* sp. e *Corynebacterium glutamicum* (Tabela 1.3) (SUNGUROĞLU et al., 2018).

O aprimoramento de cepas é provavelmente um dos métodos mais importantes para resolver problemas de baixa eficiência de conversão do substrato, formação de subproduto e baixa tolerância ao stress através do uso de mutagênese aleatória, mutagênese dirigida ao local, superexpressão do gene alvo, evolução laboratorial e triagem de alto rendimento. Outras abordagens para melhorar a expressão fenotípica também são relatadas, como embaralhamento de genoma e engenharia de fator de transcrição artificial (YAO et al., 2021).

Várias estratégias podem ser adotadas para construir esses produtores de AH, com a seleção de AHsintases e cepas hospedeiras representando a etapa mais crítica, pois variações na sequência da AH sintase, conformação estrutural ou capacidades metabólicas da célula hospedeira fazem diferença no rendimento da produção ou no peso molecular do AH. A primeira vez que a clonagem de AH sintase e agrupamentos de genes relacionados de *S. zooepidemicus* ocorreu em 1993, e realizou a síntese heteróloga de AH. As funções da AH sintase foram melhoradas pela engenharia de proteínas ou modificação do microambiente da reação enzimática, incluindo a composição lipídica da membrana. Além disso, estratégias de engenharia metabólica, como a superexpressão de enzimas de vias metabólicas intermediárias (por exemplo, UDP-glicose 6-desidrogenase ou glucosamina-1-fosfato N-acetiltransferase) ou o bloqueio da síntese de metabólitos indesejados (por exemplo, L-lactato) foram adotadas para conduzir a geração de metabólitos intermediários necessários para a síntese de AH (WANG et al., 2020; YAO et al., 2021).

**Tabela 1.3-** Produção de ácido hialurônico por microrganismos geneticamente modificados.

Microrganismo	Meio de produção	Ph	Temperatura ( C°)	Agitação (rpm)	Aeração(v vm)	AH (g/L)	Referência
<i>Escherichia coli</i> K12 W3110	LB suplementado com 3 g/L glicose e 3 g/L lactose	DI <sup>1</sup>	37	200	DI <sup>1</sup>	0,299	WOO et al., (2019)
	M17 broth supplemented with 0,5% (weight/vol) glucose	DI <sup>1</sup>	37	-	-	6,09	SUNGUROĞ LU et al., (2018)
<i>Lactococcus lactis</i>	M17 medium containing 10 g/L glucose	DI <sup>1</sup>	30	200	DI <sup>1</sup>	0,68	HMAR et al., (2014)
	M17 supplemented with 1% (w/v) glucose	DI <sup>1</sup>	30	170	DI <sup>1</sup>	0,65	CHIEN; LEE, (2007)
<i>Bacillus subtilis</i>	Sucrose (20 g/L); yeast extract (10 g/L)	DI <sup>1</sup>	37	280	DI <sup>1</sup>	0,97	ZAMBONI et al., (2017)
	LB	DI <sup>1</sup>	37	200	DI <sup>1</sup>	6,8	JIA et al., (2013)
<i>Ogataea polymorpha</i> NCYC495	1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose	DI <sup>1</sup>	37	200	DI <sup>1</sup>	0,197	MANFRÃO-NETTO et al., (2021)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	YNB medium and glucose (40 g/L)	6,0	30	200	2	1,89	GOMES et al., (2019)
<i>Pichia pastoris</i>	Glucose (40 g/L); yeast extract (7,5 g/L); peptone (10 g/L)	7,0	30	500	0,7	1,7	JEONG; SHIM; KIM, (2014)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	M17 with 1% lactose	6,8	40	100	No agitation	1,2	IZAWA et al., (2011)
<i>Agrobacterium</i> sp.	LB	DI <sup>1</sup>	30	250	DI <sup>1</sup>	0,3	MAO; CHEN, (2007)

**DI:** Dados não informados.**Fonte:** O autor (2023).

### 1.3.8. Fatores que interferem na produção de ácido hialurônico

Segundo Chahuki et al. (2019), a síntese microbiana de AH é um processo intensivo em energia e carbono, onde aproximadamente 5% da fonte de carbono é responsável pela síntese de AH, enquanto o crescimento celular e a produção de lactato e acetato consomem cerca de 10 e 80% da fonte de carbono, respectivamente. O ácido UDP-glucurônico e a UDP-*N*-acetil glucosamina são precursores tanto do AH quanto da biossíntese da parede celular. Assim, acaba ocorrendo uma competição por fontes de energia e carbono entre a biossíntese de AH e o crescimento celular. A biossíntese de AH também enfrenta uma forte competição entre a biossíntese da parede celular e a via glicolítica. Nesse sentido, reduzir o crescimento celular e a via glicolítica podem ser alternativas para se obter uma maior quantidade de AH.

A influência da composição do meio de cultura na produção de AH por fermentação tem sido muito estudada. Os primeiros meios eram compostos por fontes animais como a infusão de cérebro e coração (BHI) e sangue de ovelha. No entanto, outras fontes alternativas de meio de cultura vêm sendo estudadas, como as fontes microbianas, particularmente o extrato de levedura e derivados vegetais, como peptona de soja.

#### 1.3.8.1. Carbono

O carbono não é apenas essencial para o crescimento microbiano, mas também para a síntese da cadeia de açúcar do AH. No entanto, existe uma tolerância celular às concentrações de nutrientes que precisam ser levadas em consideração. Diferentes concentrações de glicose variando de 10 a 60 g/L já foram testados e os resultados encontrados foram que o peso molecular máximo de AH obtido foi em uma concentração de glicose de 40 g/L. Ao aumentar a concentração de glicose acima de 40 g/L, o crescimento bacteriano é inibido e o peso molecular do AH também diminui. Isso indica que os microrganismos possuem pontos de corte específicos quanto ao uso de fontes de carbono e também podem modular o metabolismo detectando mudanças ambientais. O carbono pode resultar em pressão osmótica excessiva em altas concentrações, o que pode ser prejudicial para a produção de AH, convertendo assim mais fluxos de carbono em outras vias competitivas (YAO et al., 2021).

Em geral, os meios de cultura utilizados para a produção de AH microbiano contêm glicose como fonte de carbono (PIRES et al., 2010). No entanto, estudos indicam que o uso

de sacarose no meio de fermentação pode aumentar o peso molecular do HA em 800 kDa mais do que o uso de glicose como fonte de carbono (GEDIKLI et al., 2018).

Algumas das fontes de carbono também podem incluir substratos agroindustriais, como melaço, caldo de cana, licor de milho, entre outros. Esses subprodutos de custo relativamente baixo podem ser usados no meio de cultura, reduzindo assim o custo de produção de polímeros de alto valor, como o AH (PAN et al., 2015).

#### 1.3.8.2. Nitrogênio

O potencial de crescimento e produção de AH por *S. zooepidemicus* é altamente dependente do nitrogênio orgânico. O primeiro meio consistia em fontes animais, como infusão de cérebro e coração (BHI) e sangue de ovelha. No entanto, outras fontes alternativas de meio de cultura têm sido estudadas, como as fontes microbianas. Extrato de levedura e/ou peptona são amplamente adicionados como fontes de nitrogênio no meio de cultura. A literatura afirma que esta bactéria pode necessitar de concentrações muito altas (até 20 g/L) de peptona e/ou extrato de levedura para a produção de AH (ARSLAN; AYDOGAN, 2021). Outras fontes que incluem substratos orgânicos são a proteína de soja e a proteína de soro de leite, que podem reduzir os custos de produção de AH (PAN et al., 2015).

#### 1.3.8.3. Suplementação do meio reacional

Embora muitos estudos tenham sido realizados para otimizar a produção de AH, poucos trabalhos foram publicados relacionados ao uso de suplementos para aumentar a produção de AH.

O resultado da suplementação com alguns compostos no meio de produção é descrito por Aroskar; Kamat; Kamat (2013):

- Sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>): Este composto é um cofator necessário para que a enzima HAS se torne uma holoenzima. A adição deste magnésio pode aumentar o peso molecular do AH formado.
- Fosfatos: sua adição pode aumentar o peso molecular do AH. No entanto, eles não aumentam o rendimento do polímero.
- L-arginina: o papel deste aminoácido está relacionado à doação de carbono e nitrogênio na síntese de purina e pirimidina, economizando assim o consumo de energia pelo microrganismo.

- Glutamina: é um componente que está diretamente envolvido na via de síntese do AH, doando o grupo amina para a conversão da frutose 6 fosfato em glucosamina 6 fosfato, que é um importante precursor para a síntese do AH, que, por sua vez, produzirá N-acetilglucosamina em outros, aumentando assim o rendimento de AH.
- Uridina: pode aumentar a produção de AH devido ao envolvimento de moléculas no AH via de síntese.
- Glucronato de sódio: ativa a síntese de AH e atua no alongamento da cadeia molecular do AH.

Outros elementos minerais como sódio (Na) e manganês (Mn) também participam de várias reações e funções:

- Manganês (Mn): atua como cofator para glicosiltransferases que estão envolvidas na síntese de dissacarídeos em cadeias poliméricas.
- Sódio (Na): pode contribuir para a produção microbiana de AH, devido ao seu papel no lactato excreção por bactérias do gênero *Streptococcus* (PIRES et al., 2010).

#### 1.3.8.4. Temperatura

A temperatura também é considerada um parâmetro fundamental para a fermentação, pois pode modificar tanto a concentração máxima de AH quanto seu peso molecular médio (CAVALCANTI et al., 2020).

A temperatura afeta a velocidade das reações bioquímicas, a atividade catalítica da enzima intracelular dos microrganismos, o tempo de geração e a atividade do microrganismo envolvido. As taxas de reação do microrganismo aumentam com a temperatura até que uma temperatura limite seja atingida, após a qual a taxa de crescimento diminui. A temperatura ideal para a produção de polissacarídeos como o AH dependerá do tipo de microrganismo envolvido na bioprodução (LIU et al., 2018; SHOPARWE et al., 2020).

#### 1.3.8.5. pH

O pH do meio é um dos parâmetros essenciais a serem controlados na maioria dos processos fermentativos. O efeito do pH é mostrado para influenciar a produção de polissacarídeos do que no crescimento celular (SHOPARWE et al., 2020). Em particular, o

AH é sensível a mudanças no pH. Em pHs relativamente ácidos (< 4,0) ou básicos (> 11), o AH é degradado por hidrólise. Destes, em condições alcalinas, esse efeito é mais pronunciado devido ao rompimento das ligações H, que participam da organização estrutural das cadeias AH (FALLACARA et al., 2018).

#### 1.3.8.6. Oxigênio dissolvido (OD)

Os níveis de oxigênio dissolvido (OD) afetam os potenciais redox intracelulares, as cargas de energia e os coeficientes de transferência de massa de oxigênio, que interferem no metabolismo microbiano. A disponibilidade de OD no processo de fermentação para a produção de AH fermentado é um fator importante, e as concentrações de OD demonstraram afetar significativamente a eficiência da síntese. A viscosidade proporcionada pelo AH macromolecular causa uma diminuição no OD do caldo de fermentação, dificultando a manutenção do metabolismo celular normal e o acúmulo efetivo do AH, que forma uma camada tipo cápsula ao final da fermentação, inibindo o metabolismo do crescimento bacteriano (YAO et al., 2021).

#### 1.3.8.7. Agitação

Segundo Huang et al. (2007), a função principal da função é homogeneizar o caldo. Glucoronato de sódio: ativa a síntese de AH e atua no alongamento da cadeia molecular do AH. O clima vigoroso também favorece a oxigenação, mas não auxilia diretamente na produção de AH. Shoparwe et al. (2020) observaram para *Streptococcus zooepidemicus* que a biomassa celular e a produção de AH aumentaram significativamente com o aumento da velocidade de agitação até 300 rpm, obtendo biomassa celular máxima de 2,20 g/L e concentração de AH de 1,23 g/L. Segundo os autores, o aumento da velocidade até 300 rpm proporciona uma maior subdivisão das bolhas, resultando em uma maior área superficial para a ocorrência de transferência de massa gás-líquido, reduzindo a espessura dos filmes de gás e líquido responsáveis pela resistência ao transporte da massa. Também foi observado que o rendimento de AH e o crescimento celular diminuíram com o aumento da velocidade de agitação de 400 para 500 rpm. Neste caso, houve uma diminuição mais drástica na produção de AH em comparação com o crescimento celular, indicando que a produção de AH é mais sensível à velocidade do agitador do que o crescimento celular. No entanto, essa

velocidade de agitação não deve ser muito maior, pois tende a prejudicar a qualidade do AH e pode danificar o biopolímero.

### 1.3.9. Operações de recuperação e purificação de AH

A produção de ácido hialurônico ocorre intracelularmente, pois a enzima HasA (sintase de hialuronano) atua na membrana plasmática da célula, polimerizando as unidades de ácido glicurônico UDP e UDP-Nacetilglucosamina. Após a polimerização, grande parte do AH é excretado fora do meio celular, na forma de cápsula, o que permitirá que o polímero se alongue e garanta um alto peso molecular, aumentando o interesse pelo produto (Güngör et al. (2019), CALDASPAN et al., 2013).

De acordo com os diferentes métodos de extração na literatura incluem a lise SDS (dodecil sulfato de sódio), sonicação, centrifugação, precipitação com etanol, diálise, filtração por membrana, salting in e salting-out. No trabalho desses autores, foi realizada filtração sequencial com membrana de 8–0,45–0,2  $\mu\text{m}$ , seguida de liofilização do AH após precipitação com etanol. A utilização deste método sequencial possibilitou a recuperação de 12 g/L AH.

A separação e purificação do AH envolve a precipitação repetida do caldo de fermentação usando solventes orgânicos como etanol, acetona, isopropanol, etc. Esses processos envolvem grandes quantidades de solventes e são demorados, o que pode levar a aumento de custos. Embora a tecnologia de membranas tenha sido usada em alguns processos de purificação, o processo apenas concentra a solução de AH ou remove pequenas moléculas solúveis (AKDAMAR et al., 2009).

Muitos autores usam dodecil sulfato de sódio (SDS) para liberar AH produzido dentro da cápsula excretada ou que permaneceu dentro da célula (AMADO et al., 2016; AMADO et al., 2017; HUANG et al. 2007; ZHOU et al., 2009; RAMACHANDRAN, 2010). Outros estudos vão diretamente para a precipitação e purificação do AH presente no caldo, sem adição de SDS ou qualquer outro surfactante para quebrar a cápsula (MACEDO; SANTANA, 2012; AROSKAR; KAMAT; KAMAT, 2013; CALDASPAN et al., 2013; ZEE-WEI LAI, 2011).

Segundo Souza et al. (2021), o uso de surfactantes para recuperação de AH, como dodecil sulfato de sódio, lauril sulfato ou desoxicolato de sódio, não é muito adequado, pois introduz um novo contaminante no caldo de fermentação, que deve ser removido posteriormente na etapa de purificação. Alega também que são necessárias apenas etapas de

centrifugação do caldo em baixas velocidades por um longo tempo para que ocorra a liberação de AH. Segundo Cavalcanti et al. (2020), o uso de sais quaternários (cloreto de cetilpiridínio – CPC ou brometo de cetiltrimetilamônio – CTAB) pode ser utilizado em caldos para a formação de complexos com AH, facilitando sua recuperação.

Segundo Cavalcanti et al. (2020), o grau de pureza do AH é um fator determinante para o sucesso de aplicações clínicas. Por exemplo, ao usar AH não purificado, a inflamação pode se desenvolver na cirurgia intraocular. Isso se deve à sua estrutura molecular, pois o AH retém contaminantes em sua estrutura, que é altamente hidratada e carregada negativamente quando em pH fisiológico. Portanto, precipitação, filtração, adsorção, eletroforese e troca iônica são os processos de separação e purificação mais amplamente estudados. A combinação de operações de purificação pode levar a processos otimizados em termos de eficácia e eficiência na remoção de impurezas, conforme mostrado na Tabela 1.4.

**Tabela 1.4-** Métodos de recuperação e purificação de AH produzidos por via microbiana.

Microrganismo	Sequência de etapas aplicadas na recuperação e purificação de AH	Produção (g/L)	Referência
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 35246	SDS; Etanol; Precipitação por centrifugação; Solução de NaCl;	2,47	FALLACARA et al. (2018)
	Centrifugação; Precipitação com etanol; Solução de NaCl; Carbazol	0,3	AL-KHATEEB; OLSZEWSK A-CZYZ (2020)
	SDS; Centrifugação; Precipitação com etanol; Carbazol	2,4	HUANG; CHEN; CHEN (2007)
	Centrifugação; Etanol; Carbazol	0,219	PAN et al. (2015)
	Centrifugação; Filtração por membrana; Carvão ativado; Precipitação com isopropanol; Solução de NaCl	2,5	YAO et al. (2021)
	SDS; Centrifugação; Solução de NaCl; Carbazol modificado	5	RANGASWAMY; JAIN (2008)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920	Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)	0,111	KOTRA et al. (2013)
	SDS; Centrifugação; Solução de NaCl; Coluna de diálise	1,2	GÜNGÖR et al. (2019)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> RSKK 677	Precipitação com álcool isopropílico; Solução de NaCl; Carvão ativado; Centrifugação; Filtração; Carbazol	1,386	ZHANG et al. (2006)
<i>Streptococcus thermophilus</i> YIT 2084	Ácido tricloroacético; Precipitação com etanol; Liofilização; Cromatografia em gel	0,208	CAVALCANTI et al. (2019)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> MTCC3523	SDS; Centrifugação; Precipitação com etanol; Solução de NaCl; CTAB	0,54	AMADO et al. (2016)

Fonte: O autor (2023).

Pode-se observar que em todos os estudos contemplados na Tabela 4, diversas técnicas foram utilizadas para a recuperação e purificação do AH, sugerindo, portanto, que não existe uma técnica única que seja mais eficiente para esses processos e que novas pesquisas nessa área é necessário desenvolver um método eficiente para que possa ser utilizado, se não em todas, mas na maioria das produções microbianas de AH.

#### 1.4. Conclusões

O ácido hialurônico tem diversas finalidades/aplicações em inúmeras áreas como farmacêutica, médica, estética, odontológica, ambiental, química e alimentícia. Seu alto valor agregado justifica o aumento da demanda comercial por este biopolímero a cada ano. Diante disso, diversos microrganismos estão sendo estudados buscando maximizar a produção de AH, apresentando uma vantagem ao obtido de animais, pois permite sua produção em escala industrial e, por não possuir proteínas animais, não causa reações alérgicas, sendo, portanto, a forma mais utilizada.

O sistema de produção bacteriana tem se destacado por permitir a otimização do rendimento e qualidade do produto através do controle das condições de cultivo. *Streptococcus zooepidemicus* se destaca em relação a outros microrganismos devido à sua alta capacidade de produção de AH, o que torna essa cepa uma das mais utilizadas para pesquisas nessa área.

As fontes de nutrientes (carbono, nitrogênio e sais) que podem ser utilizadas para alimentar esse microrganismo são diversas. No entanto, devem ser oferecidos em quantidades adequadas para que a bioprodução ocorra de forma otimizada. Outros fatores ambientais (como pH, temperatura, agitação e aeração) devem ser considerados para manter as necessidades fisiológicas do microrganismo.

Portanto, este trabalho fornece informações sobre o AH, descrevendo sua estrutura, aplicações, processos de produção, separação e purificação. Esta revisão de literatura busca contribuir com a comunidade científica, subsidiando estudos futuros e atuais sobre a bioprodução de AH por microrganismos.

#### 1.5. Referências

ABDALLAH, M. M.; FERNÁNDEZ, N.; MATIAS, A. A.; BRONZE, M. do R. Hyaluronic acid and Chondroitin sulfate from marine and terrestrial sources: Extraction and purification methods. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 243, n. May, p. 116441, 2020.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116441>>

AKDAMAR, H. A.; SARIÖZLÜ, N. Y.; ÖZCAN, A. A.; ERSÖZ, A.; DENIZLI, A.; SAY, R. Separation and purification of hyaluronic acid by glucuronic acid imprinted microbeads. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 1404–1408, 2009.

AL-KHATEEB, R.; OLSZEWSKA-CZYŻ, I. Biological molecules in dental applications: hyaluronic acid as a companion biomaterial for diverse dental applications. **Heliyon**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. e03722, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03722>>

AMADO, I. R.; VÁZQUEZ, J. A.; PASTRANA, L.; TEIXEIRA, J. A. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 198, p. 54–61, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.062>>

AMADO, I. R.; VÁZQUEZ, J. A.; PASTRANA, L.; TEIXEIRA, J. A. Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: Molasses and corn steep liquor. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 117, p. 181–187, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.09.017>>

AROSKAR, V. J.; KAMAT, S. D.; KAMAT, D. V. Effect of Various Nutritional Supplements on Hyaluronic Acid Production. **IIOAB Letters**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 16–24, 2013.

ARSLAN, N. P.; AYDOGAN, M. N. Evaluation of Sheep Wool Protein Hydrolysate and Molasses as Low-Cost Fermentation Substrates for Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 925–935, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12649-020-01062-w>>

BADRI, A.; WILLIAMS, A.; LINHARDT, R. J.; KOFFAS, M. A. The road to animal-free glycosaminoglycan production: current efforts and bottlenecks. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 53, p. 85–92, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.12.018>>

BENINATTO, R.; BARBERA, C.; DE LUCCHI, O.; BORSATO, G.; SERENA, E.; GUARISE, C.; PAVAN, M.; LUNI, C.; MARTEWICZ, S.; GALESSO, D.; ELVASSORE, N. Photocrosslinked hydrogels from coumarin derivatives of hyaluronic acid for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 96, p. 625–634, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.052>>

BILLON, R.; HERSANT, B.; MENINGAUD, J. P. Hyaluronic acid rheology: Basics and clinical applications in facial rejuvenation. **Annales de Chirurgie Plastique Esthétique**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 261–267, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anplas.2016.12.002>>

CALDASPAN, N.; VIGNOLI, J.A.; BALDO, C.; PEDRINE, C.; CELLIGOI, M.A. Ácido Hialurônico: Características, Produção Microbiana E Aplicações Industriais. **BBR - Biochem Biotechnol Reports** 2013, 2, 42, <https://doi.org/10.5433/2316-5200.2013v2n4p42>.

- CAVALCANTI, A. D. D.; MELO, B. A. G.; OLIVEIRA, R. C.; SANTANA, M. H. A. Recovery and Purity of High Molar Mass Bio-hyaluronic Acid Via Precipitation Strategies Modulated by pH and Sodium Chloride. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 188, n. 2, p. 527–539, 2019.
- CAVALCANTI, A. D. D.; MELO, B. A. G. De; FERREIRA, B. A. M.; SANTANA, M. H. A. Performance of the main downstream operations on hyaluronic acid purification. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 99, n. August, p. 160–170, 2020.
- CHAHUKI, F. F.; AMINZADEH, S.; JAFARIAN, V.; TABANDEH, F.; KHODABANDEH, M. Hyaluronic acid production enhancement via genetically modification and culture medium optimization in *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 121, p. 870–881, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.112>>
- CHANDA, A.; ADHIKARI, J.; GHOSH, A.; CHOWDHURY, S. R.; THOMAS, S.; DATTA, P.; SAHA, P. Electrospun chitosan/polycaprolactone-hyaluronic acid bilayered scaffold for potential wound healing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 116, n. 2017, p. 774–785, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.099>>
- CHANG, W.; LIU, P.; LIN, M.; LU, C.; CHOU, H.; NIAN, C.; JIANG, Y.; HSU, Y. H. Contact Lenses. [s. l.], p. 1–15, 2021.
- CHEN, Y. L.; CHANG, H. H.; CHIANG, Y. C.; LIN, C. P. Application and development of ultrasonics in dentistry. **Journal of the Formosan Medical Association**, [s. l.], v. 112, n. 11, p. 659–665, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2013.05.007>>
- CHIEN, L. J.; LEE, C. K. Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 339–346, 2007.
- DOVEDYTIS, M.; LIU, Z. J.; BARTLETT, S. Hyaluronic acid and its biomedical applications: A review. **Engineered Regeneration**, [s. l.], v. 1, n. October, p. 102–113, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.engreg.2020.10.001>>
- ERICKSON, A. E.; LAN LEVENGOOD, S. K.; SUN, J.; CHANG, F. C.; ZHANG, M. Fabrication and Characterization of Chitosan–Hyaluronic Acid Scaffolds with Varying Stiffness for Glioblastoma Cell Culture. **Advanced Healthcare Materials**, [s. l.], v. 7, n. 15, p. 1–9, 2018.
- FALLACARA, A.; BALDINI, E.; MANFREDINI, S.; VERTUANI, S. Hyaluronic acid in the third millennium. **Polymers**, [s. l.], v. 10, n. 7, 2018.
- FEI, Z.; XIN, X.; FEI, H.; YUECHONG, C. Meta-analysis of the use of hyaluronic acid gel to prevent intrauterine adhesions after miscarriage. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, [s. l.], v. 244, p. 1–4, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2019.10.018>>
- FERREIRA, R. G.; AZZONI, A. R.; SANTANA, M. H. A.; PETRIDES, D. Techno-economic analysis of a hyaluronic acid production process utilizing streptococcal fermentation. **Processes**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 1–16, 2021.

- FOGLAROVÁ, M.; CHMELAR, J.; HUERTA-ANGELES, G.; VÁGNEROVÁ, H.; KULHÁNEK, J.; BARTOŇ TOMÁNKOVÁ, K.; MINAŘÍK, A.; VELEBNÝ, V. Water-insoluble thin films from palmitoyl hyaluronan with tunable properties. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 144, p. 68–75, 2016.
- GALLO, N.; NASSER, H.; SALVATORE, L.; NATALI, M. L.; CAMPA, L.; MAHMOUD, M.; CAPOBIANCO, L.; SANNINO, A.; MADAGHIELE, M. Hyaluronic acid for advanced therapies: Promises and challenges. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 117, n. April, p. 134–147, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.05.007>>
- GEDIKLI, S.; GÜNGÖR, G.; TOPTAŞ, Y.; SEZGIN, D. E.; DEMIRBILEK, M.; YAZIHAN, N.; AYTAR ÇELIK, P.; DENKBAŞ, E. B.; BÜTÜN, V.; ÇABUK, A. Optimization of hyaluronic acid production and its cytotoxicity and degradability characteristics. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 48, n. 7, p. 610–618, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1476885>>
- GOMES, A. M. V.; NETTO, J. H. C. M.; CARVALHO, L. S.; PARACHIN, N. S. Heterologous hyaluronic acid production in *Kluyveromyces lactis*. **Microorganisms**, [s. l.], v. 7, n. 9, 2019.
- GRAÇA, M. F. P.; MIGUEL, S. P.; CABRAL, C. S. D.; CORREIA, I. J. Hyaluronic acid—Based wound dressings: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 241, n. February, p. 116364, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116364>>
- GUNASEKARAN, V.; GOWDHAMAN, D.; PONNUSAMI, V. Role of membrane proteins in bacterial synthesis of hyaluronic acid and their potential in industrial production. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 164, p. 1916–1926, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.077>>
- GÜNGÖR, G.; GEDIKLI, S.; TOPTAŞ, Y.; AKGÜN, D. E.; DEMIRBILEK, M.; YAZIHAN, N.; AYTAR ÇELIK, P.; DENKBAŞ, E. B.; ÇABUK, A. Bacterial hyaluronic acid production through an alternative extraction method and its characterization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 94, n. 6, p. 1843–1852, 2019.
- GUO, C.; YIN, J.; CHEN, D. Co-encapsulation of curcumin and resveratrol into novel nutraceutical hyalurosomes nano-food delivery system based on oligo-hyaluronic acid-curcumin polymer. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 181, n. November, p. 1033–1037, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.046>>
- GUPTA, R. C.; LALL, R.; SRIVASTAVA, A.; SINHA, A. Hyaluronic acid: Molecular mechanisms and therapeutic trajectory. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 6, n. JUN, p. 1–24, 2019.
- HMAR, R. V.; PRASAD, S. B.; JAYARAMAN, G.; RAMACHANDRAN, K. B. Chromosomal integration of hyaluronic acid synthesis (has) genes enhances the molecular weight of hyaluronan produced in *Lactococcus lactis*. **Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1554–1564, 2014.
- HUANG, W. C.; CHEN, S. J.; CHEN, T. L. Modeling the microbial production of hyaluronic acid. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, [s. l.], v. 38,

n. 3–4, p. 355–359, 2007.

HUANG, Y. Q.; SUN, L. J.; ZHANG, R.; HU, J.; LIU, X. F.; JIANG, R. C.; FAN, Q. L.; WANG, L. H.; HUANG, W. Hyaluronic Acid Nanoparticles Based on a Conjugated Oligomer Photosensitizer: Target-Specific Two-Photon Imaging, Redox-Sensitive Drug Delivery, and Synergistic Chemo-Photodynamic Therapy. **ACS Applied Bio Materials**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 2421–2434, 2019.

HUI, E.; GIMENO, K. I.; GUAN, G.; CALIARI, S. R. Spatiotemporal Control of Viscoelasticity in Phototunable Hyaluronic Acid Hydrogels. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 4126–4134, 2019.

HUSSEIN, Y.; EL-FAKHARANY, E. M.; KAMOUN, E. A.; LOUTFY, S. A.; AMIN, R.; TAHA, T. H.; SALIM, S. A.; AMER, M. Electrospun PVA/hyaluronic acid/L-arginine nanofibers for wound healing applications: Nanofibers optimization and in vitro bioevaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 164, p. 667–676, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.126>>

HUYNH, A.; PRIEFER, R. Hyaluronic acid applications in ophthalmology, rheumatology, and dermatology. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 489, n. February, p. 107950, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.107950>>

IZAWA, N.; HANAMIZU, T.; IIZUKA, R.; SONE, T.; MIZUKOSHI, H.; KIMURA, K.; CHIBA, K. *Streptococcus thermophilus* produces exopolysaccharides including hyaluronic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 107, n. 2, p. 119–123, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.11.007>>

IZAWA, N.; SERATA, M.; SONE, T.; OMASA, T.; OHTAKE, H. Hyaluronic acid production by recombinant *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 111, n. 6, p. 665–670, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.02.005>>

JEONG, E.; SHIM, W. Y.; KIM, J. H. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 185, p. 28–36, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.018>>

JIA, Y.; ZHU, J.; CHEN, X.; TANG, D.; SU, D.; YAO, W.; GAO, X. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the efficient biosynthesis of uniform hyaluronic acid with controlled molecular weights. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 132, p. 427–431, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.150>>

KAZEMZADEH, S.; NAGHAVI, N. S.; EMAMI-KARVANI, Z.; FOULADGAR, M.; EMTIAZI, G. Gas chromatography-mass spectrometry analyses of crude oil bioremediation by the novel *Klebsiella variicola* SKV2 immobilized in polyurethane polymer scaffold and two-layer microcapsulation. **Bioremediation Journal**, [s. l.], v. 24, n. 2–3, p. 129–149, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10889868.2020.1793722>>

KIM, S.; MOON, M. J.; SURENDRAN, S. P.; JEONG, Y. Y. Biomedical applications of hyaluronic acid-based nanomaterials in hyperthermic cancer therapy. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 1–19, 2019.

- KOTRA, S. R.; VENKATESWARULU, T. C.; BABU, D. J.; SUDHEER, Y.; REDDY, K. S.; PERAVALI, 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. **International Journal of Advanced Science and Technology**, [s. l.], v. 60, n. August 2017, p. 83–96, 2013.
- KRISHNAN, V.; DHARAMDASAN, V.; BAKRE, S.; DHOLE, V.; WU, D.; BUDNIK, B.; MITRAGOTRI, S. Hyaluronic Acid Nanoparticles for Immunogenic Chemotherapy of Leukemia and T-Cell Lymphoma. **Pharmaceutics** 2022, 14, 466, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020466>.
- KUMAR, A.; JANAKIRAMAN, S.; NATARAJ, L. K. Optimization study for enhanced production of hyaluronic acid from *Streptococcus equisimilus* MK156140. **Korean Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 1–8, 2021.
- LARRAÑETA, E.; HENRY, M.; IRWIN, N. J.; TROTTER, J.; PERMINOVA, A. A.; DONNELLY, R. F. Synthesis and characterization of hyaluronic acid hydrogels crosslinked using a solvent-free process for potential biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 181, n. November, p. 1194–1205, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.015>>
- LEE, J. S.; PARK, S. A.; CHUNG, D.; LEE, H. G. Encapsulation of astaxanthin-rich *Xanthophyllomyces dendrorhous* for antioxidant delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 268–273, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.04.021>>
- LIU, J.; WANG, Y.; LI, Z.; REN, Y.; ZHAO, Y.; ZHAO, G. Efficient production of high-molecular-weight hyaluronic acid with a two-stage fermentation. **RSC Advances**, [s. l.], v. 8, n. 63, p. 36167–36171, 2018.
- LIU, L.; WANG, M.; SUN, J.; DU, G.; CHEN, J. Application of a novel cavern volume controlled culture model to microbial hyaluronic acid production by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 141–147, 2010.
- LUO, Y.; CHENG, Y. W.; YU, C. Y.; LIU, R. M.; ZHAO, Y. J.; CHEN, D. X.; ZHONG, J. J.; XIAO, J. H. Effects of hyaluronic acid on differentiation of human amniotic epithelial cells and cell-replacement therapy in type 1 diabetic mice. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 384, n. 2, p. 111642, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111642>>
- MACEDO, A.C.; SANTANA, M.H.A. Hyaluronic acid depolymerization by ascorbate-redox effects on solid state cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in cashew apple fruit bagasse. **World J Microbiol Biotechnol** 2012, 28, 2213-2219, <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-012-1028-z>
- MANFRÃO-NETTO, J. H. C.; QUEIROZ, E. B.; RODRIGUES, K. A.; COELHO, C. M.; PAES, H. C.; RECH, E. L.; PARACHIN, N. S. Evaluation of ogataea (Hansenula) polymorpha for hyaluronic acid production. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 1–16, 2021.
- MAO, Z.; CHEN, R. R. Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp.

- Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 1038–1042, 2007.
- MENDE, M.; NIEGER, M.; BRÄSE, S. Chemical Synthesis of Modified Hyaluronic Acid Disaccharides. **Chemistry - A European Journal**, [s. l.], v. 23, n. 50, p. 12283–12296, 2017.
- MENDES, B. B.; DALY, A. C.; REIS, R. L.; DOMINGUES, R. M. A.; GOMES, M. E.; BURDICK, J. A. Injectable hyaluronic acid and platelet lysate-derived granular hydrogels for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 119, p. 101–113, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.10.040>>
- MIHAJLOVIC M.; RIKKERS, M.; MIHAJLOVIC, M.; VIOLA, M.; SCHUIRINGA, G.; ILOCHONWU, B.C.; MASEREEUW, R.; VONK, L.; MALDA, J.; ITO, K.; VERMONDEN, T. Viscoelastic Chondroitin Sulfate and Hyaluronic Acid DoubleNetwork Hydrogels with Reversible Crosslinks. **Biomacromolecules** 2022, 23, 1350–1365, <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c01583>.
- MOHAN, N.; PAVAN, S. S.; ACHAR, A.; SWAMINATHAN, N.; SIVAPRAKASAM, S. Calorespirometric investigation of *Streptococcus zooepidemicus* metabolism: Thermodynamics of anabolic payload contribution by growth and hyaluronic acid synthesis. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 152, n. August, p. 107367, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107367>>
- MORADI, M.; GUIMARÃES, J. T.; SAHIN, S. Current applications of exopolysaccharides from lactic acid bacteria in the development of food active edible packaging. **Current Opinion in Food Science**, [s. l.], v. 40, p. 33–39, 2021.
- MURTHY, R.; ROOS, J. C. P.; GOLDBERG, R. A. Periocular hyaluronic acid fillers: Applications, implications, complications. **Current Opinion in Ophthalmology**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 395–400, 2019.
- PAN, N. C.; VIGNOLI, J. A.; BALDO, C.; PEREIRA, H. C. B.; DA SILVA, R. S. dos S. F.; CELLIGOI, M. A. P. C. Effect of fermentation conditions on the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 411–417, 2015.
- PANDIT, A. H.; MAZUMDAR, N.; AHMAD, S. Periodate oxidized hyaluronic acid-based hydrogel scaffolds for tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 137, p. 853–869, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.014>>
- 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**, [s. l.], v. 101, n. 16, p. 6506–6509, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.074>>
- RAMACHANDRAN, S. J. e K. B. Influence of competing metabolic process on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], [s.d.].
- RANGASWAMY, V.; JAIN, D. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*. **Biotechnology Letters**,

[s. l.], v. 30, n. 3, p. 493–496, 2008.

ROHIT, S. G.; JYOTI, P. K.; SUBBI, R. R. T.; NARESH, M.; SENTHILKUMAR, S. Kinetic modeling of hyaluronic acid production in palmyra palm (*Borassus flabellifer*) based medium by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523. [s.l.] : **Elsevier B.V.**, 2018. v. 137 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.06.011>>

SAHA, I.; RAI, V. K. Hyaluronic acid based microneedle array: Recent applications in drug delivery and cosmetology. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 267, n. May, p. 118168, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118168>>

SHAH, M. V.; BADLE, S. S.; RAMACHANDRAN, K. B. Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 80, p. 53–60, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.09.013>>

SHOPARWE, N. F.; KEW, W. S.; MOHAMAD, M.; AMERAM, N.; ZAINI MAKHTAR, M. M. Optimization and Kinetic Analysis on the Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* in A Batch System. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, [s. l.], v. 596, n. 1, 2020.

SILVER, F. H.; SHAH, R. G.; KELKAR, N.; BENEDETTO, D.; DEVORE, D.; COHEN, J. Viscoelastic Evaluation of Different Hyaluronic Acid Based Fillers Using Vibrational Optical Coherence Tomography. **Materials Sciences and Applications**, [s. l.], v. 10, n. 05, p. 423–431, 2019.

SIONKOWSKA, A.; MICHALSKA-SIONKOWSKA, M.; WALCZAK, M. Preparation and characterization of collagen/hyaluronic acid/chitosan film crosslinked with dialdehyde starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 149, p. 290–295, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.262>>

SNETKOV, P.; ZAKHAROVA, K.; MOROZKINA, S.; OLEKHNOVICH, R.; USPENSKAYA, M. Hyaluronic acid: The influence of molecular weight on structural, physical, physico-chemical, and degradable properties of biopolymer. **Polymers**, [s. l.], v. 12, n. 8, 2020.

SOMAN, S.; KUMARASAMY, S.; NARAYANAN, M.; RANGANATHAN, M. Biocatalyst: Phytase production in solid state fermentation by ovat strategy. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 6119–6127, 2020.

SOUZA R. C.; SILVA L. M.; CARRA S.; FLORES L. M.; PUTON B. M. S.; MALVESSI E.; VALDUGA E.; ZENI J. Immobilization of *Zymomonas mobilis* In situ in Flexible Polyurethane and Potential for Bioconversion in Sodium Maltobionate. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 279–291, 2021.

SU, S.; BEDIR, T.; KALKANDELEN, C.; BAŞAR, A.O.; ŞAŞMAZEL, H.T.; USTUNDAG, C.B.; SENGOR, M.; GUNDUZ, O. Coaxial and emulsion electrospinning of extracted hyaluronic acid and keratin based nanofibers for wound healing applications. **Eur Polym J** 2021, 142, 110158, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110158>.

SUNGUROĞLU, C.; SEZGIN, D. E.; AYTAR ÇELİK, P.; ÇABUK, A. Higher titer hyaluronic acid production in recombinant *Lactococcus lactis*. **Preparative**

- Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 48, n. 8, p. 734–742, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1508036>>
- VIGETTI, D.; KAROUSOU, E.; VIOLA, M.; DELEONIBUS, S.; DE LUCA, G.; PASSI, A. Hyaluronan: Biosynthesis and signaling. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [s. l.], v. 1840, n. 8, p. 2452–2459, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.001>>
- VOIGT, J.; DRIVER, V. R. Hyaluronic acid and wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 317–331, 2012.
- WANG, Y.; HU, L.; HUANG, H.; WANG, H.; ZHANG, T.; CHEN, J.; DU, G.; KANG, Z. Eliminating the capsule-like layer to promote glucose uptake for hyaluronan production by engineered *Corynebacterium glutamicum*. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-16962-7>>
- WEN, Q. L.; PU, Z. F.; YANG, Y. J.; WANG, J.; WU, B. C.; HU, Y. L.; LIU, P.; LING, J.; CAO, Q. Hyaluronic acid as a material for the synthesis of fluorescent carbon dots and its application for selective detection of Fe<sup>3+</sup> ion and folic acid. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 159, n. July, p. 105364, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105364>>
- WESTBROOK, A. W.; REN, X.; OH, J.; MOO-YOUNG, M.; CHOU, C. P. Metabolic engineering to enhance heterologous production of hyaluronic acid in *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 47, n. November 2017, p. 401–413, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.016>>
- WOO, J. E.; SEONG, H. J.; LEE, S. Y.; JANG, Y.; TECHNOLOGY, F. S.; KOREA, S.; ENGINEERING, B.; BIOTECHNOLOGY, S.; KOREA, S.; KOREA, S. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of hyaluronic acid from glucose and galactose. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 7:351, 2019.
- XU, Q.; TORRES, J. E.; HAKIM, M.; BABIAK, P. M.; PAL, P.; BATTISTONI, C. M.; NGUYEN, M.; PANITCH, A.; SOLORIO, L.; LIU, J. C. Materials Science & Engineering R Collagen- and hyaluronic acid-based hydrogels and their biomedical applications. **Materials Science & Engineering R**, [s. l.], v. 146, n. July, p. 100641, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mserr.2021.100641>>
- YAO, Z. Y.; QIN, J.; GONG, J. S.; YE, Y. H.; QIAN, J. Y.; LI, H.; XU, Z. H.; SHI, J. S. Versatile strategies for bioproduction of hyaluronic acid driven by synthetic biology. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 264, p. 118015, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118015>>
- YASSER A. ATTIA, MOHAMED I. KOBEASY, M. S. Evaluation of magnetic nanoparticles influence on hyaluronic acid production from *Streptococcus equi*. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 192, p. 135–142, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.037>>
- YU, F.; ZHU, M.; LI, N.; AO, M.; LI, Y.; ZHONG, M.; YUAN, Q.; CHEN, H.; FAN, Z.; WANG, Y.; HOU, Z.; QI, Z.; SHEN, Y.; CHEN, X. D. Imaging-guided synergistic targeting-promoted photo-chemotherapy against cancers by methotrexate-conjugated hyaluronic acid nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 380, n. April

- 2019, p. 122426, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122426>>
- ZAKERI, A.; RASAEI, M. J.; POURZARDOSHT, N. Enhanced hyaluronic acid production in *Streptococcus zooepidemicus* by over expressing HasA and molecular weight control with Niscin and glucose. **Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 16, p. 65–70, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.02.007>>
- ZAMBONI, F.; KEAYS, M.; HAYES, S.; ALBADARIN, A. B.; WALKER, G. M.; KIELY, P. A.; COLLINS, M. N. Enhanced cell viability in hyaluronic acid coated poly(lactic-co-glycolic acid) porous scaffolds within microfluidic channels. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 532, n. 1, p. 595–602, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.053>>
- ZAMBONI, F.; VIEIRA, S.; REIS, R. L.; MIGUEL OLIVEIRA, J.; COLLINS, M. N. The potential of hyaluronic acid in immunoprotection and immunomodulation: Chemistry, processing and function. **Progress in Materials Science**, [s. l.], v. 97, p. 97–122, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2018.04.003>>
- ZEE-WEI LAI. Medium formulation and impeller design on the biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. **African Journal of Microbiology Research**, [s. l.], v. 5, n. 15, p. 2114–2123, 2011.
- ZHAI, P.; PENG, X.; LI, B.; LIU, Y.; SUN, H.; LI, X. The application of hyaluronic acid in bone regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 151, p. 1224–1239, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.169>>
- ZHANG, J.; DING, X.; YANG, L.; KONG, Z. A serum-free medium for colony growth and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 168–172, 2006.
- ZHANG, L.; TOSCANO SELÃO, T.; NIXON, P. J.; NORLING, B. Photosynthetic conversion of CO<sub>2</sub> to hyaluronic acid by engineered strains of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. **Algal Research**, [s. l.], v. 44, n. August, p. 101702, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101702>>
- ZHONG, W.; PANG, L.; FENG, H.; DONG, H.; WANG, S.; CONG, H.; SHEN, Y.; BING, Y. Recent advantage of hyaluronic acid for anti-cancer application: a review of “3S” transition approach. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 238, n. December 2019, p. 116204, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116204>>
- ZHONG, Y.; ZHANG, J.; CHENG, R.; DENG, C.; MENG, F.; XIE, F.; ZHONG, Z. Reversibly crosslinked hyaluronic acid nanoparticles for active targeting and intelligent delivery of doxorubicin to drug resistant CD44 + human breast tumor xenografts. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 205, p. 144–154, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.01.012>>
- ZHOU, L. C.; LI, Y. F.; BAI, X.; ZHAO, G. H. Use of microorganisms immobilized on composite polyurethane foam to remove Cu(II) from aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 167, n. 1–3, p. 1106–1113, 2009.

## CAPÍTULO 2: IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS.

**Resumo:** A imobilização é uma alternativa que vem sendo muito estudada e aplicada, não somente em processos enzimáticos, mas também em situações que utilizam células microbianas. Existem inúmeras opções de suporte, no entanto, a espuma de poliuretano vem se destacando como um método simples e eficaz para a obtenção de imobilizados. Neste sentido, realizou-se uma pesquisa bibliográfica em plataformas como o Science Direct, Scielo e google acadêmico focada em imobilização, especialmente a microbiana. Imobilizar um microrganismo por métodos físicos ou químicos permite a preservação das atividades metabólicas, a possibilidade de reutilização e proteção das células, podendo assim, melhorar a estabilidade microbiana e tolerância a diferentes condições de temperatura e pH. Em relação ao material de suporte, este deve oferecer condições adequadas para a sobrevivência dos microrganismos, não devendo ser tóxica e deve ter uma boa capacidade de adsorção. A espuma de poliuretano apresenta inúmeras vantagens como alta resistência mecânica e a solventes orgânicos, além de apresentar uma elevada porosidade e baixo custo. No entanto, não foram encontrados trabalhos referentes a imobilização de *Streptococcus zooepidemicus*.

**Palavras-chave:** suporte, microrganismo, poliuretano, reutilização.

### 2.1. Introdução

A aplicação industrial de estratégias biotecnológicas é limitada por dois fatores principais: a falta de estabilidade operacional em longo prazo e a dificuldade na recuperação e reutilização das células. Como alternativa, a literatura recomenda o emprego de células imobilizadas como forma de superar tais desvantagens (BOUABIDI; EL-NAAS; ZHANG, 2019).

Os sistemas de cultivo microbiano imobilizado têm mostrado grande potencial nos processos de produção bioquímica. Após a imobilização celular, a competição adversa entre diferentes microrganismos pode ser reduzida, e o efeito sinérgico de vários microrganismos com diferentes funções pode ser promovido, o que torna os sistemas mais estáveis e robustos. No entanto, ainda existem muitos desafios a serem enfrentados, como por exemplo, a seleção de métodos e suportes de imobilização adequados, que podem assim, melhorar ainda mais a bioconversão eficiente de substratos complexos e a produção de bioprodutos metabólicos (LU et al., 2020).

A imobilização de células em suportes pode preservar as atividades metabólicas, além de minimizar a contaminação do meio ambiente. Mais importante ainda, a tecnologia de imobilização permite a coleta e reutilização de células, manter a densidade microbiana alta e proteger as células contra danos causados pelo ambiente externo. A imobilização também pode aumentar a estabilidade das bactérias contra substâncias tóxicas e tornar o

derivado imobilizado à base de microrganismos fácil de separar, bem como melhorar a eficiência (WU et al., 2021).

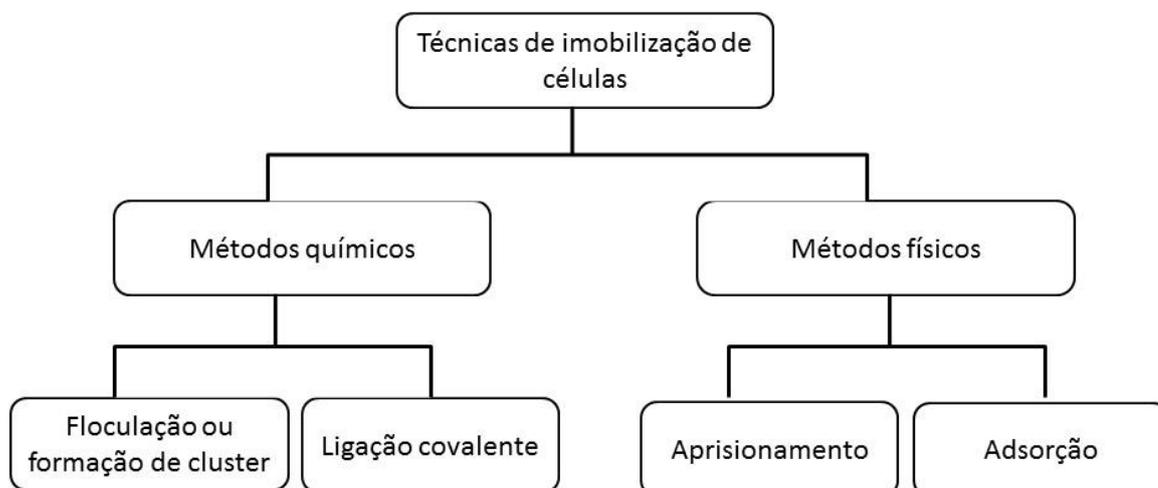
Em comparação com a biotecnologia tradicional, a tecnologia de microrganismos imobilizados apresenta melhor em relação a estabilidade e tolerância dos microrganismos ao calor e ao pH, além de redução do custo operacional, proporcionando um desenvolvimento ecológico, seguro e econômico (LIU et al., 2021).

O método de imobilização de microrganismos tem sido estudado como uma forma alternativa de retirada de nitrogênio para o tratamento de efluentes em países como Japão e na Europa. O emprego de microrganismos imobilizados pode reduzir o tempo de tratamento, além de possibilitar mudanças mínimas na atividade microbiana, em comparação com o método de tratamento convencional, devido a mudanças repentinas na carga afluente ou nas condições de operação (SHIN; YOON; PARK, 2019).

## 2.2. Métodos de imobilização

O processo de imobilização microbiana pode ser conduzido empregando métodos químicos (por ligação covalente, floculação ou formação de cluster) ou físicos (adsorção ou aprisionamento (carragenina, goma gelana, quitosana) (Figura 2.1). A escolha do método está relacionada a vários fatores, tais com tipo de suporte e microrganismo, meio reacional e condições de aplicações (NG; WANG; CHEN, 2020).

**Figura 2.1-** Métodos de imobilização de microrganismos.



**Fonte:** Adaptado de Bouabidi; El-Naas; Zhang, (2019).

Segundo Qiao et al. (2020), o material de suporte utilizado na imobilização de microrganismos é um parâmetro fundamental. Um suporte eficaz não deve ser tóxico para os microrganismos e não deve ser poluente para o meio ambiente, além de exibir boa capacidade de retenção. Também deve fornecer capacidade elevada de carga de massa celular, elevada estabilidade mecânica, biológica e química, além da difusão ideal de nutrientes através do material, permitindo um contato efetivo como o microrganismo onde será metabolizado. O suporte para imobilização celular deve ser biocompatível, o que significa fornecer um ambiente inerte para as células imobilizadas sem comprometer sua atividade biológica (BOUABIDI; EL-NAAS; ZHANG, 2019).

Materiais porosos são desejáveis em muitos processos biotecnológicos, sendo utilizados como suporte para imobilização de biomassa microbiana. Vários materiais sintéticos como vermiculita, perlita, polietileno ou poliuretano expandido (PU) são usados. Esses materiais são biologicamente inativos, ou seja, fornecem apenas uma superfície para a imobilização da biomassa e formação do biofilme, enquanto o crescimento dos microrganismos deve ser suprido pela solução nutritiva adicionada. Vantajosamente, a composição química variável das espumas de PU permite modificar as propriedades da superfície e, assim, ajustar as interações entre a espuma e outras substâncias (BENEŠ et al., 2020).

Mukundan et al. (2020) naram o aprisionamento de células de *Streptococcus lactis* produtoras de  $\beta$ -galactosidase em microcápsulas de sílica. As células imobilizadas apresentaram aumento de três vezes na atividade enzimática em relação as células livres. A constante de Michaelis para células livres e células imobilizadas foi de 8,33 e 4,16 mM, respectivamente, com um  $V_{max}$  para células livres e células imobilizadas de 71,43 e 125  $\mu\text{moles min}^{-1}$ , respectivamente, podendo este estudo ser interpretado como favorável para a formação do complexo substrato-microrganismo nas células microencapsuladas.

Peng et al. (2010) imobilizaram *Streptococcus faecalis* BT001 em uma estrutura combinada de alginato de sódio, diatomita e silicone. A produção diária de *L*-citrulina atingiu 95,6 g/L, com rendimento molar de 95,1%, o qual se manteve estável por até 73 dias.

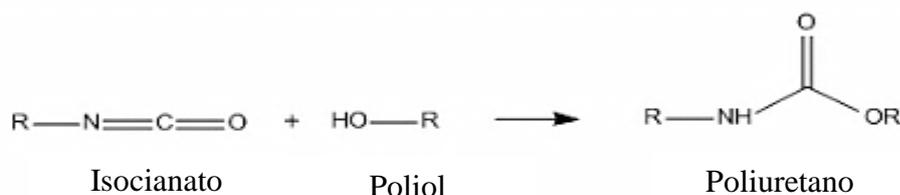
Aissa et al. (2019) imobilizaram *Streptococcus thermophilus* em partículas de argila suspensas de Maghnia. Sua capacidade de remoção de azul de metileno em sistemas aquosos, dependendo da concentração inicial, variou entre 88 e 96% de eficiência após uma hora reacional.

## 2.3. Imobilização em suporte de poliuretano (PU)

### 2.3.1. Características e propriedades do polímero

Atualmente, o poliuretano (PU) é um dos materiais poliméricos orgânico em crescente expansão em termos de aplicações na área das engenharias (JIN et al., 2020). O poliuretano é amplamente utilizado como espuma, borracha, revestimentos e adesivos, devido as suas propriedades exclusivas que são adequadas para diversas condições especiais (ZHANG et al., 2020). O PU é um composto macromolecular contendo vários grupos carbamato gerados gradualmente pela polimerização entre grupos diol ou diamina e um pré-polímero com grupos terminais de isocianato, que são formados pela reação exotérmica entre o isocianato, poliéster, poliéter, poliolefina e outros oligômeros polióis (Figura 2.2).

**Figura 2.2-** Formação do poliuretano.



**Fonte:** Adaptado de Liu et al. (2013).

Os poliuretanos são um grupo de polímeros extremamente versáteis, porque podem ser produzidos em uma ampla gama de densidades de reticulação, com estruturas desde muito macias a muito duras. As espumas de PU são classificadas de acordo com a natureza da estrutura celular (aberta, fechada) ou de acordo com sua rigidez (flexível -PUF) ou rígida (PUR). Geralmente a espuma rígida têm sido usada para aumentar a rigidez e fornecer absorção de energia extra quando aplicados, no entanto, esse fator contribui para diminuir o envelhecimento da estrutura (MAHMOUD; NASR; MAAMOUN, 2017).

A morfologia e a resistência física das espumas de poliuretano podem ser ajustadas otimizando as formulações do material (razão isocianato/poliol) e introduzindo vários tipos de enchimentos durante a fabricação (SUNG; KIM, 2017). A espuma tradicional tem características de baixa densidade e fabricação facilmente escalável. No entanto, geralmente absorve água e óleos (LIU et al., 2013).

As espumas de PUF e PUR são diferentes, cada uma com vantagens e desvantagens específicas para os usos pretendidos. Os PUFs têm uma estrutura de células abertas quase completa, com densidades tão baixas quanto  $20 \text{ kg/m}^3$ . O PUF é propenso a queimar com a liberação de gases extremamente tóxicos e combustíveis. As espumas de PUR são principalmente de estrutura celular fechada com densidades aparentes tipicamente entre 30 e  $35 \text{ kg/m}^3$ , embora densidades de até  $80 \text{ kg/m}^3$  sejam comercialmente oferecidas. O gás do agente de expansão contribui para baixa condutividade térmica, baixa densidade, baixa permeabilidade e absorção de umidade, alta rigidez e estabilidade dimensional. As espumas de PUR são usadas principalmente em aplicações de construção e industriais, como placas isolantes ou para isolar refrigeradores e freezers. Para melhorar as características mecânicas e térmicas e o comportamento durante a formação de espuma, nanopartículas podem ser adicionadas a espumas de PU (DENG et al., 2021).

Segundo Dacewicz; Grzybowska-Pietras, (2021), a espuma de poliuretano é inofensiva ao meio ambiente, ou seja, não polui nosso entorno. Também é inodoro e não afeta a fisiologia humana. Além disso, a espuma de poliuretano não se decompõe facilmente e é bastante resistente a condições climáticas variáveis. Devido a sua elevada porosidade, alta absorção de água, inércia química, estabilidade física, flexibilidade mecânica, baixo custo e facilidade de aumento de escala a espuma de poliuretano (PU) tem sido utilizada como um excelente suporte para imobilização de microrganismos e enzimas, além de serem úteis no tratamento biológico de gases de exaustão, por exemplo, amônia, bem como na remoção de  $\text{NH}_4^+$  de águas residuais (MOON et al., 2020; DACEWICZ; GRZYBOWSKA-PIETRAS, 2021).

Na literatura observa-se a existência de alguns artigos científicos descrevendo diferentes maneiras de como os microrganismos podem colonizar espumas de poliuretano em culturas de escala de laboratório, conforme descrito a seguir.

### 2.3.2. Imobilização de microrganismos em espuma de poliuretano

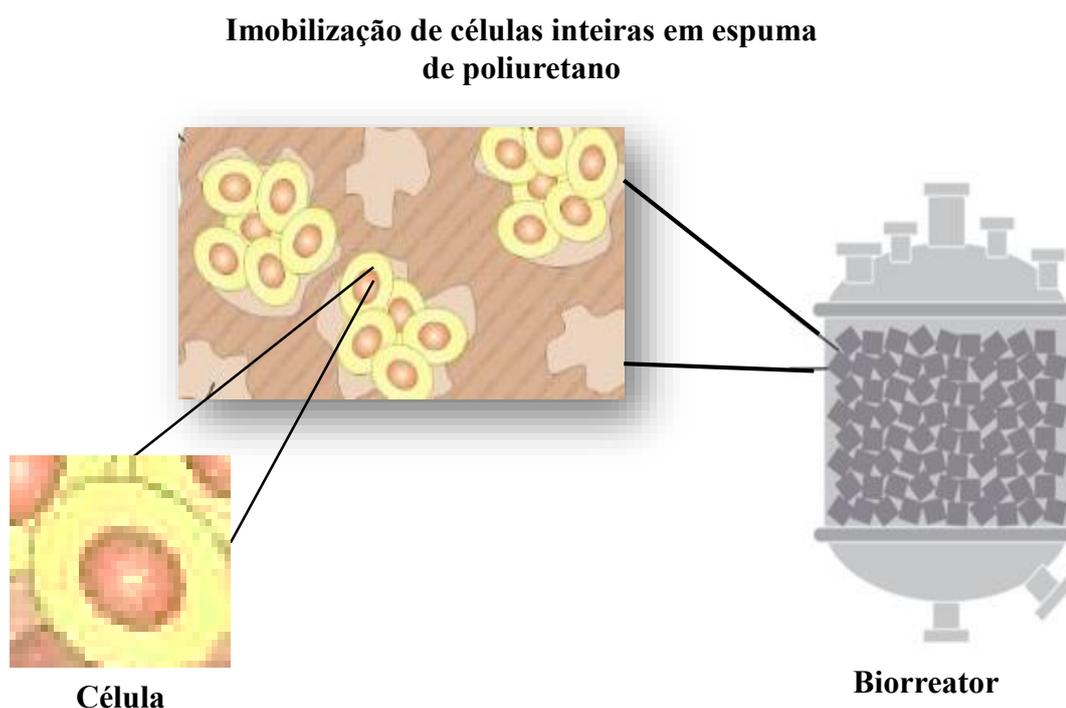
A espuma de poliuretano (PU) tem sido amplamente utilizada como carreador para a imobilização de diversos microrganismos devido a sua elevada resistência mecânica, resistência a solventes orgânicos e ataque microbiano (ZHOU et al., 2009). Além disso, a imobilização de células oferece uma alternativa para otimizar a separação e purificação de compostos, uma vez que é uma abordagem de baixo custo que protege o microrganismo e permite a reutilização das células imobilizadas. Também pode ser fácil de manusear e não

exige custos elevados. O poliuretano tem sido utilizado como matriz de imobilização para diferentes microrganismos e utilizado em múltiplas aplicações (MESQUITA et al., 2018).

Uma das vantagens mais importantes do polímero de poliuretano é que o mesmo possui uma grande superfície devido a sua porosidade e uma grande capacidade de absorção para células microbianas, o que o torna adequado para revestir superfícies com agentes microbianos (KAZEMZADEH et al., 2020).

A imobilização de células inteiras em PU pode ser realizada por meio de adsorção física ou aprisionamento por copolimerização. Em contraste com a adsorção, que é um processo demorado de duas etapas que separa a etapa de imobilização da síntese de PU, o aprisionamento “*in situ*” combina a polimerização de PU com a imobilização de células (Figura 2.3) (MOON et al., 2020).

**Figura 2.3-** Representação de imobilização de células inteiras em espuma de PU.



**Fonte:** Adaptado de Moon et al. (2020).

Apesar do elevado número de trabalhos de imobilização microbiana, não há nenhum trabalho abordando a imobilização de *Streptococcus zooepidemicus* em PU. No entanto, há estudos com os quais esta pesquisa pode tomar como referências em relação a imobilização microbiana em PU. Em Souza et al. (2021) produzir ácido maltobiônico e seus sais pela ação da enzima periplasmática de *Zymomonas mobilis* imobilizada *in situ* em espuma de poliuretano flexível (PU). Na imobilização, as concentrações de formulação do poliuretano

para suporte de biomassa variaram, e o aspecto visual do material imobilizado foi avaliado, bem como sua atividade, rendimento de imobilização e estabilidade operacional. Na condição de imobilização maximizada o derivado imobilizado apresentou uma atividade de 19,40 U.g<sup>-1</sup> de célula seca, com um rendimento de imobilização de 60,29% e 15 reutilizações.

Mesquita et al. (2018) imobilizaram a bactéria *Xanthomonas campestris* em PU para produção de goma xantana. Com resultado da imobilização o material sintetizado proporcionou um aumento da produção de goma xantana de 274%. As fermentações em batelada contínua demonstraram a possibilidade de reaproveitar as células imobilizadas em até 6 vezes, considerando 50% da produção inicial de goma xantana. O armazenamento em diferentes temperaturas (-4°C e -80 °C) por trinta dias não afetou a capacidade metabólica das células imobilizadas de produzir goma xantana, embora o armazenamento em -80°C tenha mostrado maior produção de goma xantana e menor lixiviação de células da matriz.

Células de *Klebsiella variicola* SKV<sub>2</sub> foram imobilizadas em poliuretano para biorremediação de petróleo bruto. A eficiência máxima de biorremediação do petróleo bruto pela cepa de *K. variicola* SKV<sub>2</sub> livre foi de 93,3% durante 3 semanas, enquanto que a biorremediação do petróleo bruto foi de 44,31% para as células imobilizadas em poliuretano, com as células permanecendo vivas por mais de 6 meses (KAZEMZADEH et al., 2020).

## 2.4. Conclusões

A imobilização de células microbianas em espuma de poliuretano representa uma abordagem inovadora e promissora para uma variedade de aplicações biotecnológicas. Ao encapsular microorganismos em uma matriz porosa de poliuretano, esta técnica oferece várias vantagens, desde a estabilização de enzimas até a produção de bioprodutos.

Esta metodologia oferece uma proteção física eficaz às células, protegendo-as contra estresses ambientais adversos, enquanto ainda permite a troca de nutrientes e metabólitos. Além disso, a espuma de poliuretano fornece uma plataforma de suporte robusta e versátil, que pode ser facilmente adaptada para diferentes sistemas de cultivo e condições de processo.

A imobilização de células microbianas em espuma de poliuretano apresenta um potencial significativo em várias áreas da biotecnologia, incluindo a produção de ácido hialurônico. Sua aplicação pode resultar em processos mais eficientes, econômicos e sustentáveis, contribuindo assim para o avanço da ciência e da indústria.

No entanto, é importante ressaltar que ainda há desafios a serem superados, como a otimização das condições de imobilização, a maximização da atividade celular e a minimização da lixiviação de células. Investigações futuras devem continuar explorando e refinando essa técnica, visando sua ampla adoção e implementação em diversos campos da biotecnologia.

## 2.5. Referências

- AISSA, S.; MERIEM, M.; MOURAD, B.; LAREDJ, H. Preparation of a biosorbent complex (clay particles/*Streptococcus thermophilus*) to treat polluted water with methylene blue. **Advances in Environmental Biology**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 30–38, 2019.
- BENEŠ, H.; VLČKOVÁ, V.; PARUZEL, A.; TRHLÍKOVÁ, O.; CHALUPA, J.; KANIZSOVÁ, L.; SKLENÍČKOVÁ, K.; HALECKÝ, M. Multifunctional and fully aliphatic biodegradable polyurethane foam as porous biomass carrier for biofiltration. **Polymer Degradation and Stability**, [s. l.], v. 176, 2020.
- BOUABIDI, Z. B.; EL-NAAS, M. H.; ZHANG, Z. Immobilization of microbial cells for the biotreatment of wastewater: A review. **Environmental Chemistry Letters**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 241–257, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10311-018-0795-7>>
- DACEWICZ, E.; GRZYBOWSKA-PIETRAS, J. Polyurethane foams for domestic sewage treatment. **Materials**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 1–19, 2021.
- DENG, Y.; DEWIL, R.; APPELS, L.; ANSART, R.; BAEYENS, J.; KANG, Q. Reviewing the thermo-chemical recycling of waste polyurethane foam. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 278, n. P1, p. 111527, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111527>>
- JIN, X.; GUO, N.; YOU, Z.; WANG, L.; WEN, Y.; TAN, Y. Rheological properties and micro-characteristics of polyurethane composite modified asphalt. **Construction and Building Materials**, [s. l.], v. 234, p. 117395, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.117395>>
- KAZEMZADEH, S.; NAGHAVI, N. S.; EMAMI-KARVANI, Z.; FOULADGAR, M.; EMTIAZI, G. Gas chromatography-mass spectrometry analyses of crude oil bioremediation by the novel *Klebsiella variicola* SKV2 immobilized in polyurethane polymer scaffold and two-layer microcapsulation. **Bioremediation Journal**, [s. l.], v. 24, n. 2–3, p. 129–149, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10889868.2020.1793722>>
- LIU, H. D.; LIU, Z. Y.; YANG, M. B.; HE, Q. Superhydrophobic polyurethane foam modified by graphene oxide. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 130, n. 5, p. 3530–3536, 2013.
- LIU, X.; XUE, P.; JIA, F.; QIU, D.; SHI, K.; ZHANG, W. Tailoring polymeric composite gel beads-encapsulated microorganism for efficient degradation of phenolic compounds. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, [s. l.], v. 32, p. 301–306, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.08.002>>

- LU, J.; PENG, W.; LV, Y.; JIANG, Y.; XU, B.; ZHANG, W.; ZHOU, J.; DONG, W.; XIN, F.; JIANG, M. Application of Cell Immobilization Technology in Microbial Cocultivation Systems for Biochemicals Production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 59, n. 39, p. 17026–17034, 2020.
- MAHMOUD, A. A.; NASR, E. A. A.; MAAMOUN, A. A. H. The Influence of Polyurethane Foam on the Insulation Characteristics of Mortar Pastes. **Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering**, [s. l.], v. 05, n. 02, p. 49–61, 2017. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/jmmce.2017.52005>>
- MESQUITA, R. A.; HASSEMER, G.; MARCHIORI, V.; KIEDIS, J.; VALDUGA, E.; JUNGES, A.; MALVESSI, E.; CANSIAN, R. L.; ZENI, J. Synthesis of xanthan gum from *xanthomonas campestris* immobilized in polyurethane. **Industrial Biotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 276–281, 2018.
- MOON, H.; KIM, S.; JO, B. H.; CHA, H. J. Immobilization of genetically engineered whole-cell biocatalysts with periplasmic carbonic anhydrase in polyurethane foam for enzymatic CO<sub>2</sub> capture and utilization. **Journal of CO<sub>2</sub> Utilization**, [s. l.], v. 39, n. March, p. 101172, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.101172>>
- MUKUNDAN, S.; MELO, J. S.; SEN, D.; BAHADUR, J. Enhancement in  $\beta$ -galactosidase activity of *Streptococcus lactis* cells by entrapping in microcapsules comprising of correlated silica nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 195, n. July, p. 111245, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111245>>
- NG, K. S.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J. A novel immobilized cell system involving Taiwanese kefir microorganisms and sugar cane pieces for fermented milk production. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 141–149, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-16763>>
- PENG, Z. Y. Z. C. Z. S. Z. Produção contínua de L-citrulina por *Streptococcus faecalis* imobilizado. (**Escola de Ciências e Tecnologia da Vida, Universidade de Tecnologia Química de Pequim, Pequim 100029**), [s. l.], [s.d.].
- QIAO, K.; TIAN, W.; BAI, J.; WANG, L.; ZHAO, J.; SONG, T.; CHU, M. Removal of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a microbial consortium immobilized in magnetic floating biochar gel beads. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 159, n. July, p. 111489, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111489>>
- SHIN, D. chul; YOON, S. chul; PARK, C. hwi. Biological characteristics of microorganisms immobilization media for nitrogen removal. **Journal of Water Process Engineering**, [s. l.], v. 32, n. September, p. 100979, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100979>>
- SOUZA R. C.; SILVA L. M.; CARRA S.; FLORES L. M.; PUTON B. M. S.; MALVESSI E.; VALDUGA E.; ZENI J. Immobilization of *Zymomonas mobilis* In situ in Flexible Polyurethane and Potential for Bioconversion in Sodium Maltobionate. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 279–291, 2021.
- SUNG, G.; KIM, J. H. Influence of filler surface characteristics on morphological, physical,

acoustic properties of polyurethane composite foams filled with inorganic fillers. **Composites Science and Technology**, [s. l.], v. 146, p. 147–154, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.compscitech.2017.04.029>>

WU, P.; WANG, Z.; BHATNAGAR, A.; JEYAKUMAR, P.; WANG, H.; WANG, Y.; LI, X. Microorganisms-carbonaceous materials immobilized complexes: Synthesis, adaptability and environmental applications. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 416, n. April, p. 125915, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125915>>

ZHANG, C.; TONG, X.; DENG, C.; WEN, H.; HUANG, D.; GUO, Q.; LIU, X. The foaming dynamic characteristics of polyurethane foam. **Journal of Cellular Plastics**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 279–295, 2020.

ZHOU, L. C.; LI, Y. F.; BAI, X.; ZHAO, G. H. Use of microorganisms immobilized on composite polyurethane foam to remove Cu(II) from aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 167, n. 1–3, p. 1106–1113, 2009.

## CAPÍTULO 3: BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR CÉLULAS DE *S. ZOOEPIDEMICUS* IMOBILIZADAS EM ESPUMA DE POLIURETANO FLEXÍVEL

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi imobilizar células de *Streptococcus zooepidemicus* em espuma de poliuretano para produção de ácido hialurônico. A produção de biomassa foi realizada em biorreator utilizando meio BHI (infusão de cérebro e coração de carneiro) sob as condições de 500 rpm, 1 vvm e 37°C. A avaliação do processo de imobilização ocorreu primeiramente avaliando-se a relação biomassa (4, 6, 8 e 10 g de célula bruta e 6 g de célula diluída) versus suporte (7g de polioliol, 0,02g de silicone e 3 g de isocianato). Para confirmação da aderência das células ao suporte, foi realizado microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após definição da melhor relação biomassa/suporte, foi realizado um estudo cinético de produção do AH com as células imobilizadas, onde variou-se as condições operacionais (temperatura, agitação e aeração) através de um DCCR. Da melhor condição operacional para produção do AH analisou-se o consumo de carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) e os parâmetros cinéticos (conversão de substrato em produto, produtividade mássica, produtividade específica, velocidade específica de formação de produto). Avaliou-se a estabilidade operacional (ciclos repetidos) e de estocagem do imobilizado. A máxima produção de AH (0,445 g/L) foi obtida com o imobilizado contendo 8g de biomassa em 28h de processo com condições operacionais de 500 rpm, 2 vvm e 35°C e meio composto por glicose (30 g/L), extrato de levedura (7,5 g/L) e suplementação (fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (2g/L), fosfato dipotássico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (0,5g/L), sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) (0,5g/L), sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (0,5g/L) e L-asparagina (0,1g/L). Neste mesmo período foi observado um consumo de 28% COT e 43% NT, um  $Y_{P/S}$  de 0,01484,  $P_m$  de 0,01486 g/L.h,  $q$  de 0,00849 g/(L.g.h) e  $\mu_{m\acute{a}x}$  de 0,00847 g/(g.h). O reuso das células imobilizadas foi possível com 15 ciclos. A estabilidade de estocagem em refrigeração (4 ± 2 °C) foi eficiente por 90 dias apresentado aproximadamente 54% de produtividade de AH, já em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por apenas 30 dias com aproximadamente 55%. Os resultados obtidos fornecem informações importantes para permitir a continuidade dos estudos de produção de AH por *S. zooepidemicus* imobilizado em espuma de poliuretano.

**Palavras-chave:** biomassa, suporte, bioconversão.

### 3.1. Introdução

Os polímeros microbianos ganharam enorme atenção ao longo das décadas devido às suas excelentes propriedades e versatilidade. Dentre os polímeros microbianos, o ácido hialurônico (AH) destaca-se como um dos biopolímeros mais versáteis. Devido às funções biológicas, como estimulação da proliferação de fibroblastos, propriedades cicatrizantes, facilidade de dissolução e baixa viscosidade, o AH de baixo peso molecular,

por exemplo, é usado na engenharia de tecidos, bem como em colírios e pomadas para a pele. Também é um ingrediente chave em formulações nutracêuticas, e como ingredientes alimentares em diversos países (CIRIMINNA; SCURRIA; PAGLIARO, 2021).

Com crescimento exponencial do consumo do AH devido às suas diversas áreas de aplicações, o AH está estimado em US\$ 15,25 bilhões até 2026 e, diante disso, a produção microbiana torna-se a melhor alternativa comparada à produção de origem animal, através da minimização de contaminação viral e proporciona menor custo (BRUGNOLI et al., 2023).

Neste sentido, o AH pode ser sintetizado por várias bactérias, no entanto, o AH sintetizado por bactérias selvagens de *Streptococcus zooepidemicus* que produzem naturalmente AH como parte de sua autodefesa, recebe destaque por esta ser considerada a cepa com maior capacidade produtiva do biopolímero (ROHIT et al, 2018).

Para que a produção de AH ocorra de forma maximizada é importante levar em consideração não só o meio de cultura, devendo este conter fontes de carbono, nitrogênio e sais, mas também as condições de fermentação como temperatura, pH, distribuição de oxigênio e homogeneização do meio (ROSSATTO et al., 2023). Além disso, o modo convencional de fermentação acaba se tornando obsoleto, instigando a busca por tecnologias e bioengenharias mais produtivas e economicamente viáveis, como a imobilização, a qual pode ocorrer empregando métodos físicos ou químicos para fixar as células ao suporte (LU et al., 2020).

Dentre os suportes, devido às suas excelentes propriedades físicas e químicas (resistência mecânica e a solventes) e biocompatibilidade nas áreas bioquímica e biotecnológica, a espuma de poliuretano tem ganhado destaque na imobilização de microrganismos e enzimas, pois permite a incorporação do material biológico há estrutura do suporte em uma única etapa, *in situ*, durante a síntese do polímero (BUSTAMANTE-VARGAS, 2015; SOUZA et al., 2021).

Souza et al. (2021) produziram ácido maltobiônico utilizando células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas *in situ* em espuma flexível de poliuretano (PU) utilizando uma proporção de 7 g de polioliol, 3,5 g de isocianato; 0,02 g de silicone e 7 g de biomassa e obteve uma bioconversão de 491,42 mmol L<sup>-1</sup> de maltobionato de sódio em 47,56 h, com conversão fator de 0,88 e produtividade em massa, produtividade específica e velocidade específica de formação de produto de 2,58 mmolh<sup>-1</sup>; 1,81 mmolg<sup>-1</sup>H<sup>-1</sup> e 6,25 mmolg<sup>-1</sup>H<sup>-1</sup>, respectivamente. Também foram obtidos 15 ciclos com rendimento de 60,29%. Este trabalho pôde ser utilizado como base para as pesquisas de imobilização de *Streptococcus*

*zooepidemicus* em PU para produção de AH, visto que não foram encontrados trabalhos com esta cepa imobilizada.

Neste contexto, o objetivo desta etapa do trabalho, foi avaliar a imobilização de *Streptococcus zooepidemicus* em poliuretano (PU), caracterizar o imobilizado gerado em relação as suas propriedades estruturais, quantidade de biomassa aplicada no momento da imobilização, otimização da produção de AH em diferentes condições operacionais, consumo de carbono e nitrogênio, quantidade de ciclos e a estabilidade de estocagem.

## **3.2. Materiais e métodos**

### **3.2.1. Cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* para produção de biomassa**

Para a produção de biomassa de *S. zooepidemicus* ATCC 39920 foram necessárias duas etapas: ativação e cultivo em biorreator.

#### *Ativação da cepa*

A cepa de *S. zooepidemicus* foi reativada em placas contendo caldo Brain Heart Infusion – BHI (Merck KGaA/Alemanha), 37 g/L, e ágar (Kasvi/Brasil), 20 g/L, sendo incubada em estufa bacteriológica (Biomatic/Brasil) à 37 °C por 24 ou 48 h, até apresentar crescimento do microrganismo. As colônias foram transferidas para frascos contendo caldo BHI (37 g/L) e ágar (20 g/L) inclinado e deixadas crescer por 24 h à 37°C. Após, foi adicionado óleo mineral (Synth/Brasil) ao frasco, resultando na solução estoque do microrganismo, que permaneceu armazenada à 4°C, com repique sendo efetuado, no mínimo, a cada 6 meses.

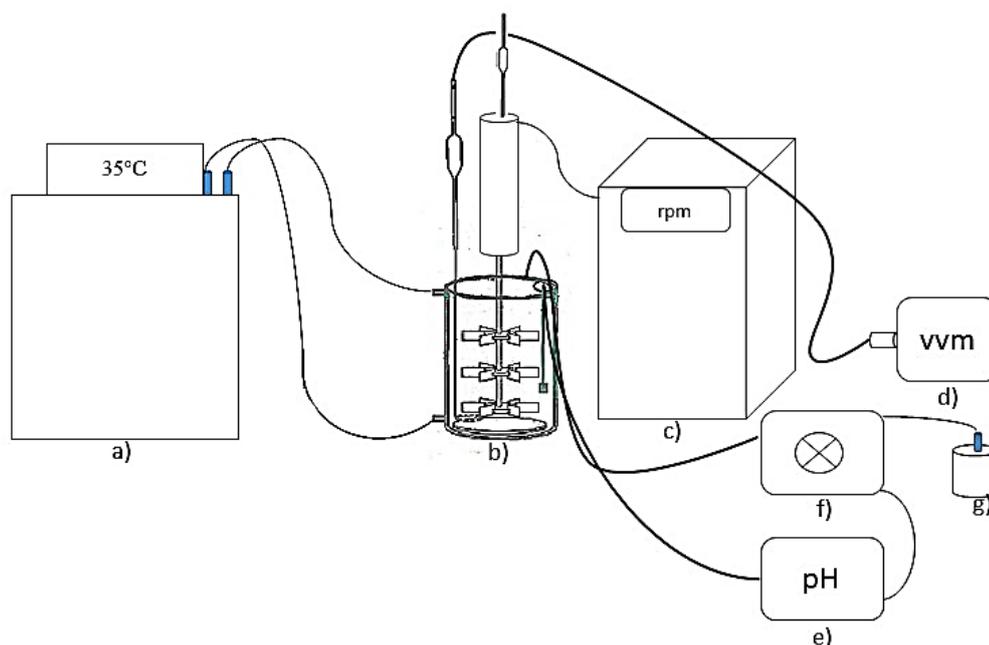
#### *Cultivo em biorreator*

Após a incubação por 24 h em estufa bacteriológica à 37°C em placas de Petry contendo caldo BHI (37 g/L) e ágar (20 g/L), foram retiradas 10 alçadas das unidades formadoras de colônia (UFC) e estas foram transferidas para erlenmeyers contendo 100 mL de caldo BHI (37 g/L). Posteriormente, este inóculo acrescido de microrganismos, foi adicionado ao biorreator (B-Braun - Biotech International) com mais 900 mL do mesmo meio reacional (BHI) previamente esterilizado. O conteúdo foi incubado à 37 °C, 500 rpm e

1 vvm por 24 h com o objetivo de se obter uma maior quantidade de massa celular. Ao final da fermentação, o caldo foi centrifugado a 4800 rpm, 25 °C e 15 min para separação da biomassa e descarte do sobrenadante.

A Figura 3.1 apresenta o aparato experimental utilizado tanto para cultivo de biomassa, como a realização da fermentação submersa para produção de AH.

**Figura 3.1-** Aparato experimental utilizado para produção de biomassa em biorreator e para a produção de ácido hialurônico.



(a) Banho ultratermostato; (b) Reator encamisado; (c) Controlador de rotação; (d) Bomba peristáltica para controle de entrada de oxigênio; (e) Controlador de pH; (f) Bomba peristáltica para injeção de hidróxido de sódio (NaOH); (g) Frasco com NaOH 5 M.

Fonte: Autor (2023).

### 3.2.2. Imobilização

O processo de imobilização ocorreu seguindo metodologia descrita por Souza et al. (2021), com adaptações. O estudo envolveu a observação da formação da espuma e aderência das células, bem como sua produtividade em diversas proporções de biomassa.

A ordem de formação da espuma foi realizada da seguinte maneira: em um copo plástico descartável de 180 mL foram adicionados 7 g do reagente A (poliol), posteriormente foi adicionada a quantidade de biomassa desejada em cada formulação (4, 6, 8 e 10 g de

biomassa bruta e também 4 g de biomassa diluída com 2 g de água destilada). A mistura foi agitada manualmente com bastão de vidro até homogeneização. Em seguida, foram adicionados 0,02 g de silicone e novamente homogeneizado. Por fim, 3 g de isocianato foram adicionados a cada formulação e homogeneizados com bastão de vidro até iniciar o processo de expansão da espuma. As espumas formadas foram deixadas em repouso por 24 h para estabilização da sua estrutura e posteriormente foram cortadas com bisturi estéril em cubos com arestas de 0,5 cm<sup>3</sup>.

### 3.2.2.1. Caracterização da morfologia de imobilização - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de MEV foram realizadas em microscópio marca Zeiss, modelo EVO LS25. Para o recobrimento da superfície das amostras com ouro foi utilizado um metalizadora Quorum SC 7620. As micrografias foram obtidas na tensão de 10Kv.

### 3.2.2.2. Produção de ácido hialurônico empregando imobilizados sintetizados com diferentes carregamentos de biomassa

Inicialmente, foram produzidos 30 g de espuma para cada formulação (4, 6, 8 e 10 g de biomassa bruta e também 6 g de biomassa diluída – equivalente a 210g/L de célula), a fim de avaliar a eficiência da quantidade de biomassa e a cinética de produção de AH. As 30 g de espuma de poliuretano imobilizada foram adicionadas a 1 litro de meio reacional composto por glicose (30 g/L), extrato de levedura (7,5 g/L), suplementação com sais minerais (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5g/L), MgSO<sub>4</sub> (0,5g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5g/L) e aminoácidos (L-asparagina (0,1g/L)) (Silva et al., 2021). A produção de AH foi conduzida em pH 7,0, temperatura de 37 °C, aeração de 1 vvm e 500 rpm e foi acompanhada temporalmente até observação de declínio de bioprodução, a qual ocorreu em aproximadamente 8 h. O controle de aeração foi realizado com um compressor aerador (Inalar/Compact/Brasil), o pH foi controlado continuamente ao longo do tempo de bioprodução com NaOH 5 M alimentado no reator com controlador de pH equipado com bomba dosadora (DosaTronic pH 2900/Provitec/Brasil) e a temperatura foi controlada mediante um banho termostatizado (Nova Ética/Brasil).

A cada hora alíquotas de 10 mL de caldo foram retirados do biorreator para determinação da concentração de AH no meio, em g/L.

### 3.2.3. Recuperação e quantificação do ácido hialurônico

Para a liberação do AH aos 10 mL de caldo fermentativo foi adicionado 10% (v/v) de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 5% (m/v) (Neon/Suzano), permanecendo em ultrassom (UNIQUE – modelo USC – 1800 A, Frequência US: 40 kHz, potência US: 154 W) por 15 minutos. Posteriormente, o caldo fermentativo com SDS foi submetido à centrifugação (Centrifuge MPW-351R/MPW® Med. Instruments/Polônia) à 4800 rpm por 15 min., a 25 °C. O sobrenadante foi empregado para a quantificação da concentração do AH.

A concentração de AH presentes, tanto no caldo de fermentação após o processo de liberação, como após a purificação, foi conduzida empregando alíquotas de 1 mL acondicionadas em tubos de ensaio aos quais adicionou-se 2 mL de brometo de cetiltrimetilamônio – CTAB (Dinâmica/Brasil) 2,5% (m/v) dissolvido em uma solução de NaCl (Synth/Brasil) 0,2 M. Após uma etapa de homogeneização, os tubos de ensaio foram deixados em repouso por 10 min à temperatura entre 20 e 30°C, seguido de análise espectrofotométrica em 400 nm, contra um branco realizado com água em substituição à amostra.

A curva padrão utilizada foi construída com ácido hialurônico comercial 1,5% (Exodo Científica/Brasil), nas concentrações de 10 a 100 µg/mL, nas mesmas condições descritas. Os resultados foram expressos em gramas de AH por litro de caldo fermentativo ( $g_{AH}/L$ ), levando em consideração a diluição realizada (Silva et al., 2021).

### 3.2.4. Maximização das condições operacionais da produção de ácido hialurônico

Após definição da quantidade de biomassa a ser utilizada no processo de imobilização, um DCCR com pontos axiais (valores codificados e reais) foi realizado para avaliar a influência das condições operacionais utilizadas na produção de AH com células imobilizadas em poliuretano. As variáveis estudadas foram: temperatura (20 a 50 °C); agitação (164 a 836 rpm) e aeração (1 a 3 vvm) (Tabela 3.1). A variável fixa utilizada em cada ensaio foi o pH (7,0). Todos os ensaios estão apresentados na Tabela 3.3 dos resultados.

**Tabela 3.1-** Variáveis e níveis utilizados no DCCR na produção de ácido hialurônico.

Variáveis independentes*	Código	Níveis				
		- 1,68	- 1	0	+ 1	+ 1,68
Temperatura	X <sub>1</sub>	20	26	35	44	50
Agitação	X <sub>2</sub>	164	300	500	700	836
Aeração	X <sub>3</sub>	1	1,4	2	2,6	3

Variáveis fixas: glicose (30 g/L), extrato de levedura (7,5 g/L) e sais (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5g/L), MgSO<sub>4</sub> (0,5g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5g/L) e L-asparagina (0,1g/L).

Fonte: O autor (2024).

Os ensaios foram conduzidos empregando 30 g de imobilizado e um 1 L de meio reacional. A concentração de AH em cada um dos ensaios foi avaliada com a retirada de 1 mL de amostra de hora em hora tomando o cuidado para não ultrapassar uma quantidade total superior a 10% (v/v).

### 3.2.5. Carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total

A determinação de COT e nitrogênio total foram realizadas pelo método da oxidação por combustão catalítica a 680 °C e detecção por infravermelho, em equipamento Shimadzu modelo TOC-VCSH.

### 3.2.6. Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram calculados com base no melhor tempo de produção de ácido hialurônico, ou seja, no tempo de 28 h reacionais e sob as condições operacionais de temperatura, aeração e agitação otimizadas.

O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S_0}$ ) foi determinada pela relação entre a concentração de AH e a concentração de glicose inicial, segundo a Equação 1.

$$Y_{\frac{P}{S_0}} = \frac{P_f}{S_0} \quad (1)$$

Onde:  $Y_{P/S_0}$ , conversão de substrato em produto (g/L)/(g/L);  $P_f$ , concentração de ácido hialurônico formado (g/L);  $S_0$ , concentração inicial de glicose (g).

A produtividade mássica foi calculada a partir da Equação 2.

$$P_m = \frac{P_f - P_i}{t} \quad (2)$$

Onde:  $P_m$ , produtividade mássica g/L.h;  $P_i$ , massa inicial de produto (g/L);  $P_f$ , massa final de produto (g/L);  $t$ , tempo de processo (h).

Para determinar a produtividade específica nos ensaios de bioconversão foi empregada a Equação 3.

$$q = \frac{p}{g} \quad (3)$$

Onde:  $q$  = produtividade específica g/(L.g.h);  $p$  = produtividade mássica g/(L.h);  $g$  = massa seca de *S. zooepidemicus* em gramas de (g).

A velocidade específica de formação de produto ( $\mu_{pm\acute{a}x}$ ) foi determinada conforme equação 4.

$$\mu_{pm\acute{a}x} = \frac{1}{M_x} \times \frac{dMp}{dt} \quad (4)$$

Onde:  $\mu_{m\acute{a}x}$ , velocidade específica de formação de produto g/(g.h);  $M_x$ , massa de células (g);  $dMp/dt$ , derivada do produto em função do tempo (g.h).

### 3.2.7. Estabilidade operacional do imobilizado

A estabilidade do imobilizado foi avaliada pelo reuso em ciclos repetidos, utilizando o melhor tempo reacional obtido pelo planejamento experimental (28 h), utilizando o meio reacional otimizados por Silva et al. (2021). Foram utilizados 30 g de espuma para 1 Litro de meio reacional.

No intervalo entre cada batelada, a espuma de poliuretano flexível contendo o *S. zooepidemicus* incorporado foi removida do meio de filtração à vácuo (Marte® modelo 131, Brasil) e adicionada a um novo meio para nova síntese.

### 3.2.8. Estabilidade de estocagem do imobilizado

Os imobilizados foram armazenados em embalagens de polietileno, de tamanho 12 X 17,3 cm e espessura: entre 0,8 e 0,9 micras, em duas temperaturas diferentes: refrigeração (4 °C) e em temperatura ambiente (25 °C) até o processo de bioconversão de 28 h. A avaliação de produção de AH foi realizada nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 75, e 90 dias de armazenamento utilizando toda a amostra armazenada em cada embalagem.

### 3.2.9. Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 95% de confiança, utilizando o software Statistica (versão 5.0 StatSoft, Inc., Tulsa OK, USA).

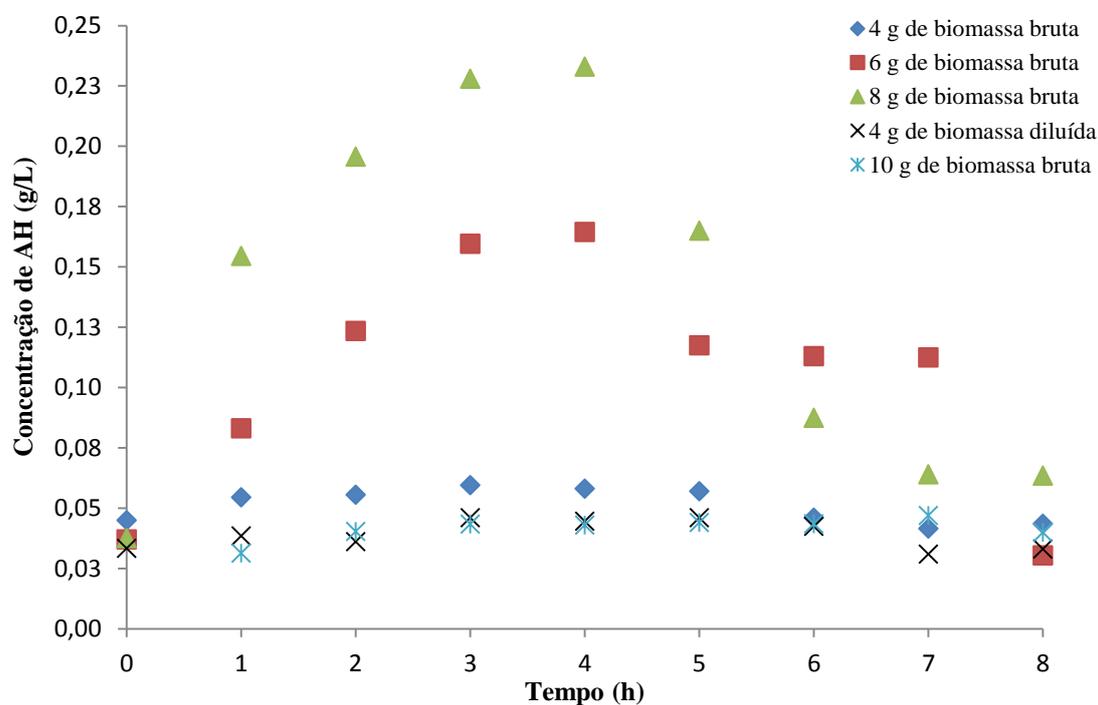
## 3.3. Resultados e discussão

Nesta seção serão apresentados os resultados e discussão da imobilização *in situ*, dos ensaios de bioconversão para produção de AH, otimização das condições operacionais, a estabilidade operacional e de estocagem do imobilizado.

### 3.3.1. Produção de ácido hialurônico empregando imobilizados sintetizados com diferentes carregamentos de biomassa

A Figura 3.2 apresenta a evolução temporal da concentração de AH no meio reacional para os imobilizados sintetizados com diferentes carregamentos de biomassa junto a formulação da espuma de poliuretano.

**Figura 3.2-** Produção de ácido hialurônico em função do tempo utilizando biomassa de *Streptococcus zooepidemicus* imobilizada em espuma de poliuretano.



Fonte: O autor (2024).

Independentemente da forma e carregamento de biomassa empregadas na etapa de imobilização, todos os imobilizados apresentaram uma mesma tendência em relação a produção de AH em função do tempo reacional, com um aumento da quantidade de AH produzida até as 4 h reacionais, seguido de decaimento brusco para os tempos subsequentes.

As variações mais significativas foram observadas para os imobilizados sintetizados com carregamentos de 6 e 8 g de biomassa, os quais correspondem aos imobilizados com maior produção de AH, com concentrações de 0,34 e 0,47 g/l, respectivamente, para 4 h reacionais.

Esta tendência sugere que o emprego de até 8 g de biomassa (correspondente à 1,75 g de célula seca) permite uma distribuição relativamente mais homogênea da mesma na estrutura polimérica do imobilizado, também observado no MEV, permitindo o livre acesso do substrato ao microrganismo, contribuindo assim para uma efetiva produção de AH. Portanto, esta quantidade de biomassa foi a escolhida para dar sequência à produção de AH por *S. zooepidemicus* imobilizado.

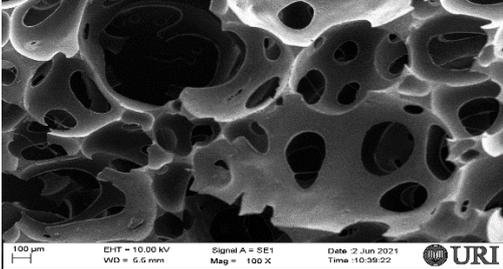
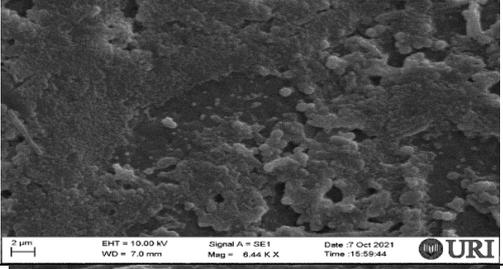
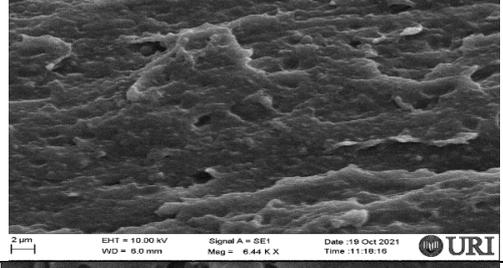
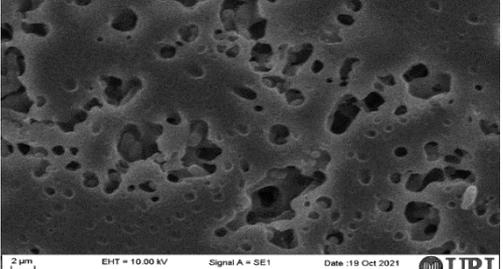
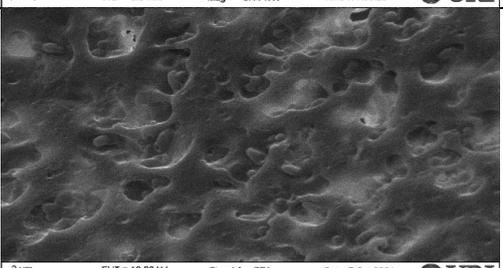
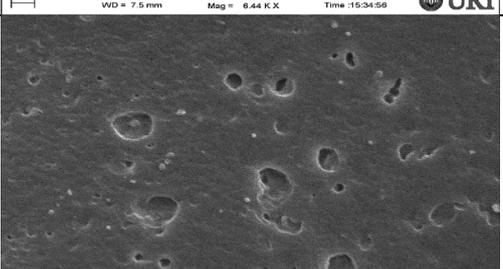
Carregamentos acima de 8 g de biomassa, ou seja, como no caso do imobilizado sintetizado com 10 g denotam um efeito negativo, apresentando uma concentração de AH de 0,088 g/L em 4 h de fermentação. Esta tendência foi relacionada a possível formação de

aglomerados devido ao excesso de biomassa, os quais tendem a limitar o acesso do substrato ao microrganismo e conseqüentemente, há menor produção de AH (LEI et al., 2015; WU et al., 2014).

Em relação à forma (bruta ou diluída) da biomassa adicionada observa-se similaridade em relação aos resultados da concentração de AH (0,075 a 0,12 g/L) para os ensaios conduzidos com a mesma massa de biomassa bruta – ensaios com 4 g de biomassa bruta e 4 g de biomassa diluída com 2 g de água, sugerindo que a diluição não afeta de maneira relevante na forma de incorporação e, conseqüentemente, na atividade do microrganismo.

As amostras dos imobilizados sintetizados com diferentes massas de biomassa foram caracterizadas quanto a sua estrutura morfológica por MEV. A Tabela 3.2 apresenta as condições empregadas, o aspecto visual macroscópico do imobilizado sintetizado e as imagens microscópicas obtidas para os referidos imobilizados. Podemos observar que a conformação macroscópica da espuma apresentou mudanças estruturais em função da quantidade de massa adicionada. Os imobilizados sintetizados com os menores carregamentos de biomassa (4 e 6 g) apresentaram visualmente uma estrutura mais compacta. No entanto, microscopicamente observa-se estruturas similares para os imobilizados sintetizados com 4, 6, 8 g de biomassa bruta e 4 g de biomassa diluída, os quais diferem expressivamente em compactação em relação ao imobilizado sintetizado com 10 g de biomassa bruta (Tabela 3.2), cuja maior compactação pode estar dificultando o acesso do substrato aos sítios ativos da enzima presente na estrutura do microrganismo/suporte, bem como a oxigenação durante a fermentação, justificando assim a menor produção de AH observada para este imobilizado, com uma concentração de 0,088 g/L em 4 h reacionais (Figura 3.2).

**Tabela 3.2-** Comparação da formulação das espumas sem biomassa, com 4, 6, 8 e 10 g de biomassa bruta e 6 g de biomassa diluída e imagem obtida pelo MEV.

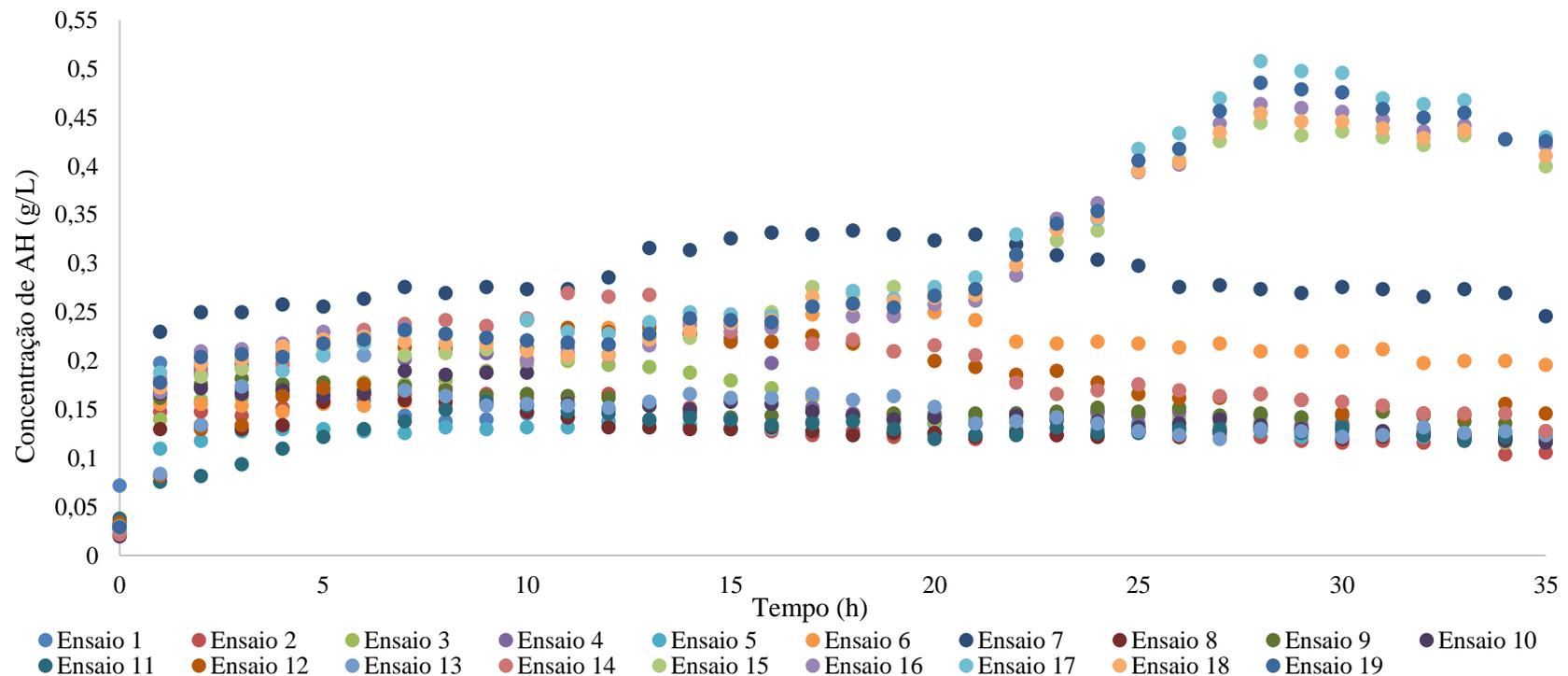
Biomassa (g)	Formação espuma	MEV
Sem biomassa		 100 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 2 Jun 2021 WD = 6.6 mm Mag = 100 X Time: 10:36:22 URI
4 g bruta		 2 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 17 Oct 2021 WD = 7.0 mm Mag = 6.44 K X Time: 15:59:44 URI
4 g diluída		 2 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 19 Oct 2021 WD = 6.0 mm Mag = 6.44 K X Time: 11:18:19 URI
6 g bruta		 2 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 19 Oct 2021 WD = 5.5 mm Mag = 6.44 K X Time: 11:09:58 URI
8 g bruta		 2 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 7 Oct 2021 WD = 7.5 mm Mag = 6.44 K X Time: 15:34:58 URI
10 g bruta		 2 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 9 Oct 2021 WD = 9.0 mm Mag = 6.44 K X Time: 11:04:23 URI

Fonte: O autor (2024).

### 3.3.2. Maximização da bioprodução de ácido hialurônico

A Figura 3.3 apresenta o comportamento da concentração de AH liberado pelo microrganismo imobilizado em função do tempo de bioprodução, para as condições operacionais (temperatura, agitação, aeração) dos 19 ensaios do delineamento experimental completo  $2^3$ .

**Figura 3.32-** Concentração de AH em função do tempo de bioprodução quando utilizado diferentes condições operacionais (temperatura, agitação, aeração) dos 19 ensaios do delineamento composto central rotacional.



Fonte: O autor (2024).

De acordo com a Figura 3.3, observa-se que os melhores resultados foram obtidos para os ensaios do ponto central 15 a 19, (500 rpm, 2 vvm e 35°C), os quais apresentam as maiores concentrações de AH ( $\cong 0,5$  g/L), com 28 h de bioprodução. Após este período, observa-se um declínio da concentração de AH, que pode ser justificada pelo balanço energético negativo do meio reacional aliado às condições operacionais adequadas à situação. Condições de produção de AH otimizadas similares (37°C, 1 vvm e 500 rpm) foram encontradas por Amado et al. (2017) utilizando o microrganismo de forma livre.

Os demais ensaios apresentaram concentrações de AH inferiores as observadas para os pontos centrais. Esta tendência foi relacionada a combinação das variáveis estudadas que não favoreceram a produção de ácido hialurônico pelo microrganismo, seja por condições de agitação muito baixas, como no caso dos ensaios 1, 2, 5, 6 (300 rpm) e 11 (164 rpm) interferindo na homogeneização do meio reacional com o imobilizado, desfavorecendo, assim, o acesso do substrato pelo microrganismo, ou em condições exageradas de agitação como no ensaio 12 utilizando 836 rpm proporcionando o cisalhamento das células. As condições com menor taxa de oxigenação do meio (ensaios 1, 2, 3 e 13), considerando que o microrganismo se encontrava aprisionado/imobilizado, podem ter prejudicado as trocas gasosas, interferindo na produção de AH. A temperatura também influencia diretamente o metabolismo e sobrevivência dos microrganismos e observa-se neste estudo que em condições mais brandas de temperatura (35 °C), o processo fermentativo se torna mais eficaz.

Todos esses resultados corroboram com os achados da literatura, onde uma temperatura ideal ao microrganismo pode ser determinante para a produção de AH e até mesmo para a sobrevivência das células (SHOPEWARE et al, 2020). O mesmo serve para a agitação e aeração, pois utilizando uma agitação muito elevada pode gerar o rompimento celular ou então, em uma condição muito baixa, pode facilitar a agregação das espumas nas paredes do biorreator, enquanto que um déficit de oxigênio pode dificultar a respiração celular e auxiliar na viscosidade do meio reacional, o que pode dificultar o metabolismo microbiano (YAO, 2021).

Portanto, as condições de 35°C, 2 vvm e 500 rpm e tempo de 28 h de produção foram definidas como as melhores condições para dar continuidade as próximas etapas do estudo e para a realização de tratamento estatístico (Tabela 3.3). No tempo de 28 h obteve-se um  $Y_{P/S}$  de 0,01484,  $P_m$  de 0,01486 g/L.h,  $q$  de 0,00849 g/(L.g.h) e  $\mu_{m\acute{a}x}$  de 0,00847 g/(g.h).

A Tabela 3.3 apresenta a matriz do DCCR (valores codificados e reais) e a resposta em concentração de AH (g/L) obtida em 28 h de bioprodução.

**Tabela 3.3-** Matriz do DCCR (valores codificados e reais das variáveis independentes) e resposta em concentração de AH (g/L) em 28 h de produção

Ensaio	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	AH (g/L)	AH <sub>Predita</sub> (g/L)	Desvio	DR (%)
1	-1 (26)	-1 (300)	-1 (1,4)	0,130	0,093	0,037	28,46
2	1 (44)	-1 (300)	-1 (1,4)	0,122	0,161	-0,039	-31,97
3	-1 (26)	1 (700)	-1 (1,4)	0,138	0,161	-0,023	-16,67
4	1 (44)	1 (700)	-1 (2,6)	0,144	0,093	0,051	35,42
5	-1 (26)	-1 (300)	1 (2,6)	0,128	0,141	-0,013	-10,16
6	1 (44)	-1 (300)	1 (2,6)	0,210	0,209	0,001	0,48
7	-1 (26)	1 (700)	1 (2,6)	0,334	0,209	0,125	37,43
8	1 (44)	1 (700)	1 (2,6)	0,132	0,141	-0,009	-6,82
9	-1,68 (20)	0 (500)	0 (2)	0,146	0,164	-0,018	-12,45
10	1,68 (50)	0 (500)	0 (2)	0,134	0,164	-0,030	-22,52
11	0 (35)	-1,68 (164)	0 (2)	0,130	0,173	-0,043	-32,81
12	0 (35)	1,68 (836)	0 (2)	0,166	0,173	-0,007	-4,00
13	0 (35)	0 (500)	-1,68 (1)	0,130	0,132	-0,002	-1,79
14	0 (35)	0 (500)	1,68 (3)	0,166	0,213	-0,047	-28,29
15	0 (35)	0 (500)	0 (2)	0,445	0,469	-0,024	-5,39
16	0 (35)	0 (500)	0 (2)	0,464	0,469	-0,005	-1,08
17	0 (35)	0 (500)	0 (2)	0,508	0,469	0,039	7,68
18	0 (35)	0 (500)	0 (2)	0,454	0,469	-0,015	-3,30
19	0 (35)	0 (500)	0 (2)	0,486	0,469	0,017	3,50

Variáveis fixas: glicose (30 g/L), extrato de levedura (7,5 g/L) e sais (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5g/L), MgSO<sub>4</sub> (0,5g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5g/L) e L-asparagina (0,1g/L).

DR - Desvio relativo.

**Fonte:** A autor (2024).

Conforme os resultados apresentados na Tabela 3.3, foi possível observar que a média de concentração de AH obtida em 14, dos 17 ensaios realizados foi de aproximadamente 0,16 g/L em 28 h reacionais. A menor concentração foi observada no ensaio 2 (0,122 g/L), o qual utilizou as variáveis de 26 °C para temperatura, sendo esta inferior ao ideal para o microrganismo manter suas funções metabólicas, 700 rpm de agitação que pode ter auxiliado no cisalhamento das células e do próprio AH e uma aeração de 1,4 vvm que pode ter sido insuficiente para a distribuição do oxigênio dissolvido.

As maiores concentrações de AH podem ser observadas nos ensaios 15, 16, 17, 18 e 19 (0,445; 0,464; 0,508; 0,454 e 0,486 g/L, respectivamente) sendo estes os pontos centrais

do planejamento com uma média de 0,47 g/L de AH. Estes resultados foram superiores em aproximadamente 66% dos demais 14 ensaios estudados o que torna esta etapa de extrema importância para a continuação dos estudos. Os valores preditos de AH (0,469 g/L) obtidos pelo tratamento estatístico também reforçam que as otimizações das condições operacionais estudadas neste estudo são satisfatórias, visto que estes se assemelham muito com os valores obtidos nos ensaios dos pontos centrais (média de 0,472 g/L), onde também se encontram valores de desvio padrão baixos quando comparados com os demais ensaios do DCCR.

A Tabela 3.4 apresenta os coeficientes de regressão, erro puro, valores de p e t(2) para a concentração de ácido hialurônico a nível de confiança de 95%, onde mostra que as interações das variáveis temperatura x agitação foram estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) neste processo fermentativo.

**Tabela 3.4-** Coeficientes de regressão e erro puro, valores de p e t do DCCR para a produção de ácido hialurônico.

	<b>Coeficiente de regressão</b>	<b>Erro puro</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	0,47	0,0114	41,34	0,0000
(1)Temperatura°C(L)	-0,01	0,0069	-1,51	0,2050
Temperatura°C(Q)	-0,11	0,0069	-15,71	0,0001
(2)Agitação (rpm)(L)	0,02	0,0069	2,32	0,0807
Agitação (rpm)(Q)	-0,11	0,0069	-15,30	0,0001
(3)Aeração (vvm)(L)	0,02	0,0069	3,52	0,0245
Aeração (vvm)(Q)	-0,11	0,0069	-15,30	0,0001
1L. 2L	-0,03	0,0090	-3,75	0,0199
1L. 3L	-0,01	0,0090	-1,64	0,1764
2L. 3L	0,01	0,0090	1,36	0,2450

**Fonte:** O autor (2024).

O modelo foi validado pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 3.5), com um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,96 e um F calculado (32,74) de 10,82 vezes superior ao F tabelado (3,025).

**Tabela 3.5-**Análise de variância para avaliação da significância estatística do modelo para a concentração de AH (g/L) obtida durante 28 h reacionais em cada ensaio do DCCR.

	SQ	GL	QM	F calc
<b>Efeitos</b>	0,375537	5	0,075107	32,73931
<b>Resíduo</b>	0,029823	13	0,002294	
<b>Falta de ajuste</b>	0,027233	9		
<b>Erro puro</b>	0,002590	4		
<b>Total</b>	0,405360	18		

$F_{\text{tab}} = 3,025$ .

Fonte: O autor (2024).

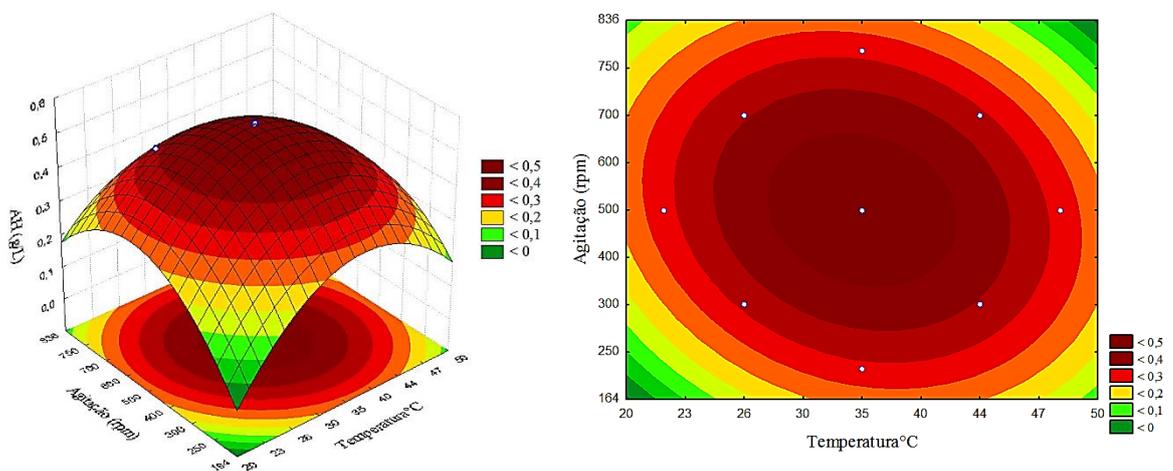
A Equação 5 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a concentração de AH, em g/L, em cada um dos estudos realizados em função das variáveis independentes (agitação, aeração e temperatura).

$$\text{AH (g/L)} = 0,469 - 0,108X_1^{(2)} - 0,105X_2^{(2)} + 0,024X_3 - 0,105X_3^{(2)} - 0,034X_1X_2 \quad (5)$$

Onde: AH (g/L) = quantidade de ácido hialurônico produzido;  $X_1$  = temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ );  $X_2$  = agitação (rpm);  $X_3$  = Aeração (vvm).

A análise de variância também permitiu a construção da superfície de resposta e curva de contorno (Figura 3.4) que mostra que a concentração de AH (g/L) em relação à combinação das variáveis estudadas (temperatura e agitação).

**Figura 3.4-** Superfície de resposta e curva de contorno de produção de AH (g/L) em função das variáveis independentes temperatura x agitação.

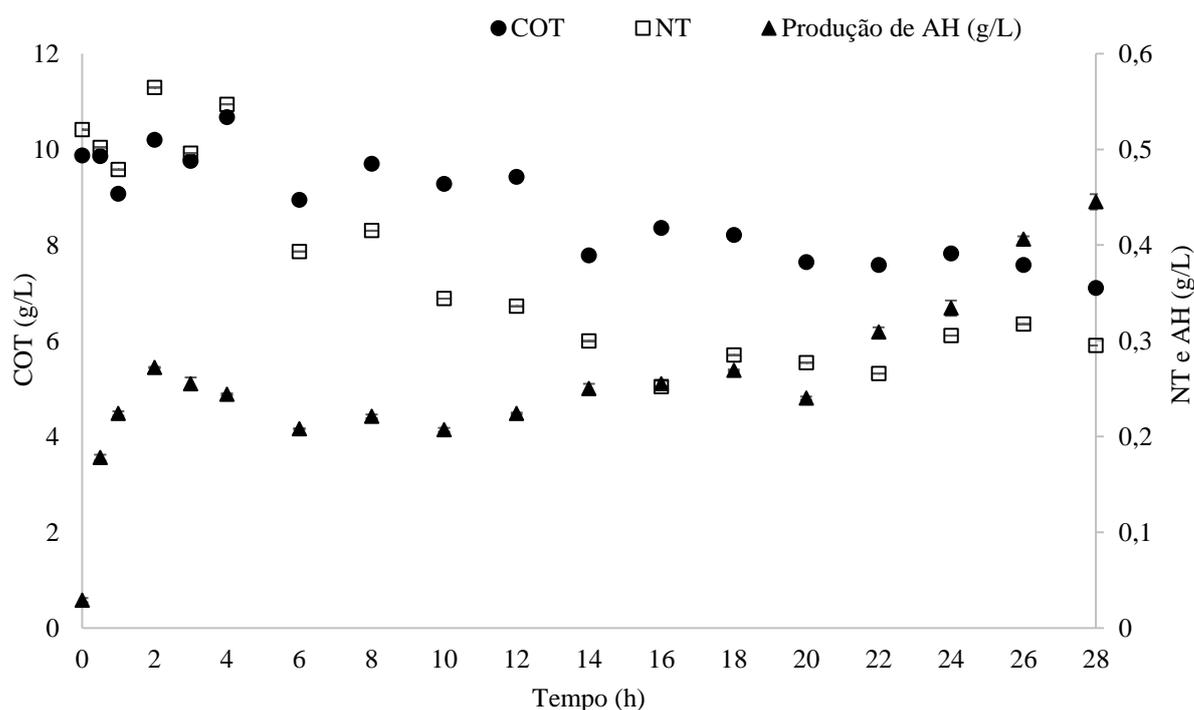


Fonte: O autor (2024).

É possível observar na superfície de resposta e curva de contorno que a tendência para a máxima concentração de AH (g/L) encontra-se na região de temperatura, agitação e aeração de 35 °C, 500 rpm e 2 vvm, respectivamente, ou seja, condições estas que foram indicadas no ponto central e que são próximas às condições de bioprodução utilizando o *Streptococcus zooepidemicus* livre.

Após a maximização das condições operacionais, bem como a definição do tempo de bioprodução de 28 h, foram realizadas as análises de consumo de substratos em termos de COT e nitrogênio total onde, ao analisar o consumo destes substratos (Figura 3.5), observa-se que houveram tendências de consumo semelhantes.

**Figura 3.53-** Consumo de carbono orgânico total e nitrogênio total durante as 28 h de bioprodução de AH.



**Fonte:** O autor (2024).

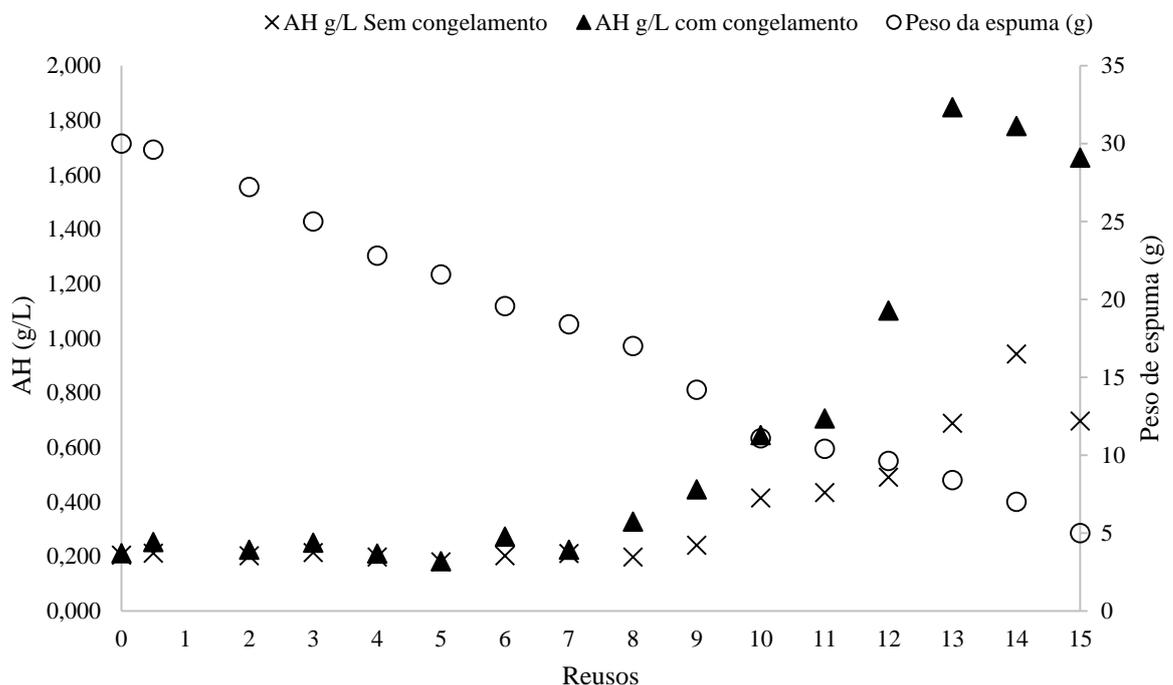
À medida que o tempo de bioprodução transcorreu, observou-se uma relação inversamente proporcional entre a concentração de AH e os teores de carbono e nitrogênio. Isso significa que à medida que os nutrientes eram consumidos gradualmente, a concentração de AH aumentava no meio reacional. Ao final de 28 h, a concentração de AH atingiu 0,445 g/L, enquanto 28% do carbono orgânico total (COT) e 43% do nitrogênio foram consumidos.

É importante notar que a concentração de carbono adicionada ao meio reacional era quatro vezes maior do que a concentração de nitrogênio.

### 3.3.3. Estabilidade operacional

A possibilidade de reutilização de microrganismos imobilizados é uma das principais vantagens para o sucesso econômico em processos industriais. A Figura 3.6 apresenta os resultados dos ensaios de estabilidade operacional para as células de imobilizadas em PU ao longo de ciclos reacionais sequenciais. Após 28 h de cultivo, parte do caldo foi utilizada para quantificação imediata da concentração de AH e parte do caldo obtido foi congelado (-20°C) por 24 h para posterior quantificação do biopolímero.

**Figura 3.64-** Estabilidade operacional das células de *Streptococcus zooepidemicus* imobilizadas em poliuretano.



**Fonte:** O autor (2024).

Conforme observado na Figura 3.6, o reuso das células manteve-se com poucas alterações do primeiro ao sétimo ciclo tanto para o caldo não congelado como para o caldo congelado. Do 8º ciclo em diante houve um aumento constante e significativo da

concentração de AH atingindo um pico máximo de aproximadamente 0,94 e 1,77 g/L no 13º reciclo para o caldo não congelado e congelado, respectivamente. Ou seja, o processo de congelamento do caldo aumenta aproximadamente 1,88 vezes a liberação de AH. Após o 15º reciclo não foi mais possível quantificar o AH devido a formação de um aglomerado, que não permitia a separação do sobrenadante com o restante do caldo. Nota-se também que, o processo de congelamento do caldo praticamente dobra a concentração de AH, podendo ser justificado pelo fato de que o frio auxilia na abertura das cápsulas expelidas pelo microrganismo através da formação de cristais ocasionadas pelo congelamento lento (BULUT et al., 2018).

Outro importante fator avaliado durante os reciclos foi a perda de massa de imobilizado, visto que, de 30 g utilizados na primeira bioprodução sobraram apenas aproximadamente 5 g ao final do reciclo número 15, uma perda média de aproximadamente 1,77 g de imobilizado por reciclo, totalizando aproximadamente 84% de perda durante os processos de filtração e inserção em nova batelada. Fato este ocorrido pela diminuição do tamanho de partícula em função da agitação e aeração utilizadas fazendo com que o imobilizado ficasse preso no filtro e/ou nas próprias paredes do biorreator (Figura 3.7 a e b).

**Figura 5-** Aspecto visual do imobilizado: a) antes do primeiro reciclo e b) após o 15º reciclo.



a)

b)

**Fonte:** O autor (2024).

A coimição do imobilizado, vinculada principalmente ao processo de agitação, se por um lado dificulta sua recuperação do meio reacional, contribuindo assim para a perda de

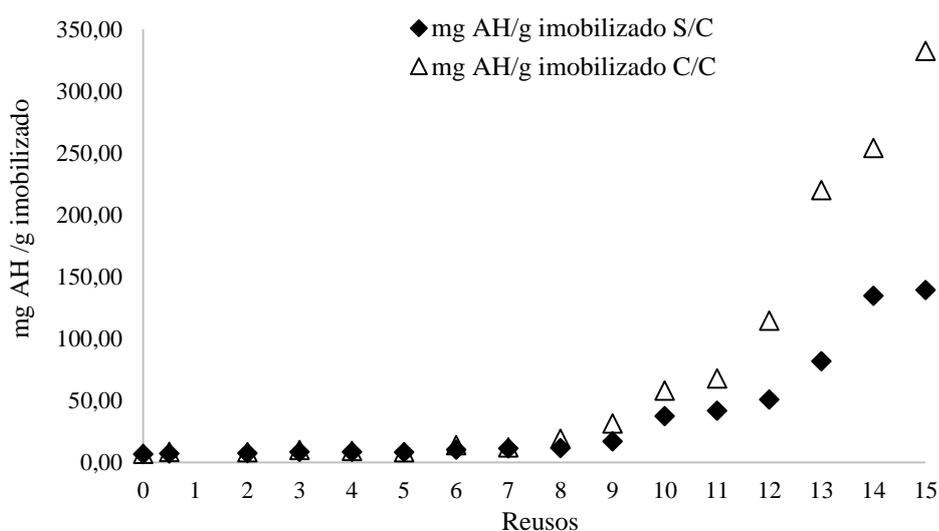
massa entre os ciclos, por outro lado pode estar contribuindo/favorecendo diminuindo efeitos difusionais, favorecendo o acesso do substrato aos microrganismos imobilizados, refletindo em uma maior produção de AH.

Mesquita et al. (2018) imobilizaram a bactéria *Xanthomonas campestris* em poliuretano para produção de goma xantana. As bioproduções em batelada contínua demonstraram a possibilidade de reaproveitar as células imobilizadas em até 6 vezes, considerando 50% da produção inicial de goma xantana. O armazenamento em diferentes temperaturas ( $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por trinta dias não afetou a capacidade metabólica das células imobilizadas de produzir goma xantana, embora o armazenamento em  $-80^{\circ}\text{C}$  tenha mostrado maior produção de goma xantana e menor perda de células da matriz polimérica.

Souza et al. (2021) imobilizaram a enzima periplasmática de *Zymomonas mobilis* em espuma flexível de poliuretano (PU). Na produção de ácido maltobiônico e seus sais o imobilizado apresentou capacidade de conversão por 15 ciclos.

Na Figura 3.8 observa-se o aumento da concentração de AH em relação a perda de imobilizado no decorrer dos reusos. Em média, para o caldo sem congelamento o aumento da concentração foi de  $36\text{ mgAH/g}$  de imobilizado enquanto que para o caldo após o congelamento este aumento foi de  $73,5\text{ g/L mgAH/g}$  de imobilizado.

**Figura 3.8-** Relação entre concentração de ácido hialurônico e perda de massa de imobilizado durante os reciclos.

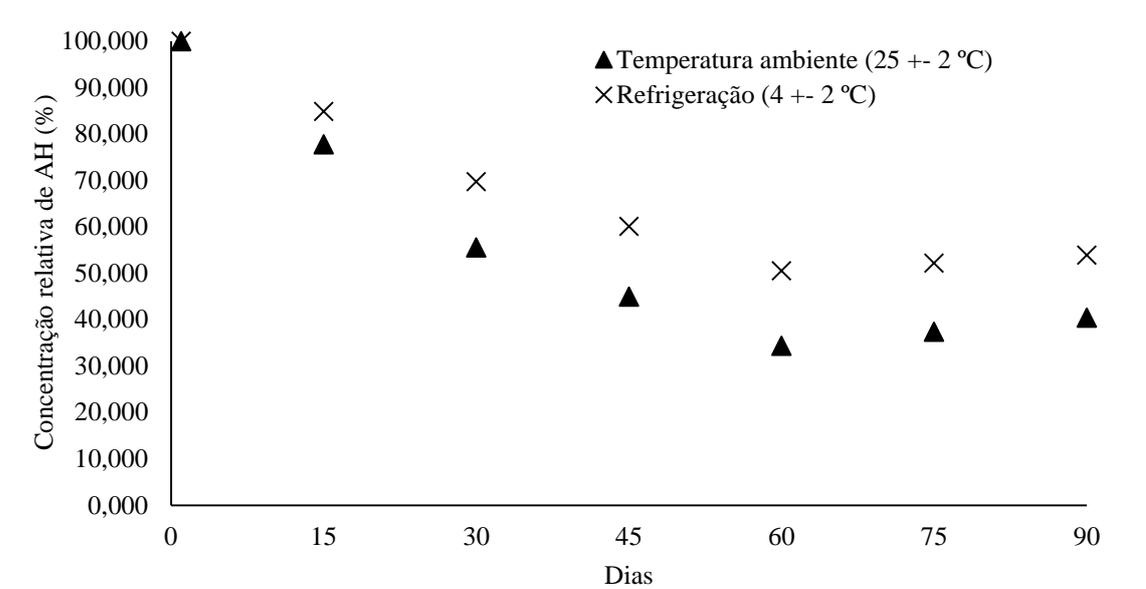


Fonte: O autor (2024).

### 3.3.4. Estabilidade de estocagem

A estabilidade de estocagem do imobilizado foi avaliada em duas condições: temperatura ambiente ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e refrigeração ( $4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A atividade residual foi acompanhada por 90 dias, sendo os resultados apresentados na Figura 3.9.

**Figura 3.96-** Estabilidade de estocagem do imobilizado em temperatura ambiente e refrigeração expressa concentração relativa de ácido hialurônico (%).



**Fonte:** O autor (2024).

O imobilizado mantido sob refrigeração apresentou durante todo o período avaliado (90 dias) uma performance superior ao imobilizado a temperatura ambiente. Ambas as amostras apresentam uma mesma tendência, com uma perda gradativa e constante da atividade até o 60º dia, mantendo-se constante até os 90 dias, onde a atividade residual para a amostra armazenada em refrigeração foi aproximadamente 50%, ou seja, 1,33 vezes superior à observada para a amostra armazenada a temperatura ambiente.

Estes resultados sugerem que a refrigeração contribui mais efetivamente na minimização de efeitos relacionados a perda da atividade catalítica das células de *S. zooepidemicus* imobilizadas em poliuretano, mantendo sua capacidade de produção de AH mais elevada em relação a amostra armazenada em temperatura ambiente. Souza et al. (2022), observaram tendência semelhante para o *Z. mobilis* imobilizado em poliuretano, com as amostras armazenadas em menores temperaturas preservando sua atividade catalítica por mais tempo e com melhores conversões em relação as armazenadas a temperatura ambiente.

### 3.4. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que a produção máxima de ácido hialurônico (AH) foi alcançada utilizando um processo de imobilização com 8g de biomassa em 28 horas, operando a 500 rpm, 2 vvm e 35°C. Este processo resultou em uma alta eficiência de conversão de substrato, com um consumo de 28% de carbono orgânico total (COT) e 43% de nitrogênio total (NT). Além disso, os parâmetros cinéticos indicaram uma alta capacidade de produção, com um YP/S de 0,01484, Pm de 0,01486 g/L.h, q de 0,00849 g/L.g.h e  $\mu_{\text{máx}}$  de 0,00847 g/g.h.

A reutilização das células imobilizadas por 15 ciclos demonstra a robustez e a viabilidade econômica do processo. Além disso, a estabilidade de estocagem a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  por 90 dias e a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 30 dias destaca a importância do controle de temperatura para manter a produtividade do AH ao longo do tempo.

Esses resultados fornecem uma base sólida para futuros estudos na produção de ácido hialurônico utilizando *S. zooepidemicus* imobilizado em espuma de poliuretano. A otimização dessas condições operacionais pode levar a um aumento ainda maior na produtividade e eficiência do processo, contribuindo para o desenvolvimento de métodos de produção mais sustentáveis e economicamente viáveis para o AH.

### 3.5. Referências

- AMADO, I. R.; VÁZQUEZ, J. A.; PASTRANA, L.; TEIXEIRA, J. A. Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: Molasses and corn steep liquor. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 117, p. 181–187, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.09.017>
- BRUGNOLI, M.; MAZZINI, I.; LA CHINA, S.; DE VERO, L.; GULLO, M. A Microbial Co-Culturing System for Producing Cellulose-Hyaluronic Acid Composites. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1504, 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/11/6/1504>>
- BULUT, M.; BAYER, Ö.; KIRTIL, E.; BAYINDIRLI, A. Effect of freezing rate and storage on the texture and quality parameters of strawberry and green bean frozen in home type freezer. **International Journal of Refrigeration**, [s. l.], v. 88, p. 360–369, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140700718300823>>
- BUSTAMANTE-VARGAS, C. D.; DE OLIVEIRA, D.; NYARIA, N. L. D.; VALDUGA, E.; SOARES, M. B. A.; BACKES, G. T.; DALLAGO, R. M. *In situ* immobilization of commercial pectinase in rigid polyurethane foam and application in the hydrolysis of pectic oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 35–43, 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.08.009>

- CIRIMINNA, R.; SCURRIA, A.; PAGLIARO, M. Microbial production of hyaluronic acid: the case of an emergent technology in the bioeconomy. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 1604–1610, 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bbb.2285>>
- LU, J.; PENG, W.; LV, Y.; JIANG, Y.; XU, B.; ZHANG, W.; ZHOU, J.; DONG, W.; XIN, F.; JIANG, M. Application of Cell Immobilization Technology in Microbial Cocultivation Systems for Biochemicals Production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 59, n. 39, p. 17026–17034, 2020.
- LEI, M. et al. Preparation and characterization of holw magnetic composite nanoparticles for immobilized pectinase, **Surface & Coatings Technology**, v. 271 p. 2–7, 2015.
- MESQUITA, R. A.; HASSEMER, G.; MARCHIORI, V.; KIEDIS, J.; VALDUGA, E.; JUNGES, A.; MALVESSI, E.; CANSIAN, R. L.; ZENI, J. Synthesis of xanthan gum from xanthomonas campestris immobilized in polyurethane. **Industrial Biotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 276–281, 2018.
- ROHIT, S. G.; JYOTI, P. K.; SUBBI, R. R. T.; NARESH, M.; SENTHILKUMAR, S. Kinetic modeling of hyaluronic acid production in palmyra palm (*Borassus flabellifer*) based medium by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523. [s.l.] : **Elsevier B.V.**, 2018. v. 137 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.06.011>
- ROSSATTO, A.; TROCADO DOS SANTOS, J.; ZIMMER FERREIRA ARLINDO, M.; SARAIVA DE MORAIS, M.; DENARDI DE SOUZA, T.; SARAIVA OGRODOWSKI, C. Hyaluronic acid production and purification techniques: a review. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 1–11, 2023. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10826068.2022.2042822>>
- SILVA, L. M.; RIGO, D.; DALLAGO, R. M.; ZENI, J. Produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em fermentação submersa. **Expressões acadêmicas 2021: Engenharia de Alimentos e Engenharia Química/URI** / organizadora: Luciana Dornelles Venquiarutto. - Santo Ângelo : Metrics, 2021. 310 p.
- SOUZA R. C.; SILVA L. M.; CARRA S.; FLORES L. M.; PUTON B. M. S.; MALVESSI E.; VALDUGA E.; ZENI J. Immobilization of *Zymomonas mobilis* In situ in Flexible Polyurethane and Potential for Bioconversion in Sodium Maltobionate. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 279–291, 2021.
- SOUZA, R. C.; DA SILVA, L. M.; CARRA, S.; FLORES, M.; PUTON, B. M.; MALVESSI, E.; VALDUGA, E.; ZENI, J. High-sodium maltobionate production by immobilized *Zymomonas mobilis* cells in polyurethane. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 45, n. 9, p. 1465–1476, 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s00449-022-02756-2>>
- SHOPARWE, N. F.; KEW, W. S.; MOHAMAD, M.; AMERAM, N.; ZAINI MAKHTAR, M. M. Optimization and Kinetic Analysis on the Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus Zooepidemicus* in A Batch System. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, [s. l.], v. 596, n. 1, 2020.
- YAO, Z. Y.; QIN, J.; GONG, J. S.; YE, Y. H.; QIAN, J. Y.; LI, H.; XU, Z. H.; SHI, J. S. Versatile strategies for bioproduction of hyaluronic acid driven by synthetic biology.

**Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 264, p. 118015, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118015>>

WU, R. et al. Immobilization of pectinase on polyethyleneimine-coated pulp fiber for treatment of whitewater from papermaking, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 163-168, 2014.

## **CAPÍTULO 4: RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO HIALURONATO DE SÓDIO PRODUZIDO POR *Streptococcus Zooepidemicus* IMOBILIZADO EM POLIURETANO**

### **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi purificar o hialuronato de sódio produzido por células de *Streptococcus zooepidemicus* imobilizadas *in situ* em poliuretano flexível (PU) e avaliar as propriedades físicas (morfologia, grupos funcionais, estabilidade e degradação térmica) e biológicas (citotoxicidade, atividade antioxidante e antimicrobiana). A purificação do hialuronato de sódio foi realizada utilizando etanol e cloreto de sódio. O hialuronato de sódio apresentou 56,65% de purificação e/ou recuperação, não exibiu citotoxicidade em células HEK-293 em concentrações até 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , apresentou concentrações inibitórias mínimas (MIC) para as bactérias *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 em uma concentração acima de 50 mg/mL. A ação antioxidante do hialuronato de sódio apresentou valor de 77,82 mg/ml de hialuronato de sódio para eliminar 50% do radical ABTS. A análise morfológica (MEV) realizado mostrou as partículas de hialuronato de sódio presentes no pó, os dados de FTIR apresentaram os grupos funcionais respectivos ao hialuronato de sódio e o comportamento termogravimétrico indica que o pico de degradação do hialuronato de sódio ocorreu na temperatura de 280 °C. Estes resultados são satisfatórios e indicam que o hialuronato de sódio produzido pode ser utilizado para possíveis aplicações, principalmente para a área de alimentos, em função de apresentar atividade antioxidante e antimicrobiana.

**Palavras-chave:** Precipitação, solvente, ácido hialurônico.

#### **4.1. Introdução**

O ácido hialurônico (AH) é um biomaterial de amplas aplicações. Devido às suas propriedades físicas e biológicas, como não toxicidade, atuação como agente antimicrobiano e antioxidante, o hialuronato de sódio pode ter suas aplicações destinadas à indústria alimentícia (filmes, suplemento alimentar, indústria de leites e derivados), indústria cosmética (cremes, preenchedores, antienvhecimento), indústria farmacêutica (nanopartículas de medicamentos, colírios, injeções para osteoartrite), dentre outras exigindo elevados graus de pureza.

Com a comercialização de AH cada vez mais elevada, a produção industrial deste biopolímero depende da fermentação microbiana realizada, principalmente, por cepas de *Streptococcus zooepidemicus*, sendo o modo de operação mais utilizado a cultura em batelada (FLORES-MÉNDEZ et al., 2024).

Uma vez concluída a bioprodução, o caldo de cultura contendo o AH sintetizado é obtido e o AH é extraído do meio reacional usando vários métodos, incluindo o uso de surfactantes, precipitação e purificação para remover impurezas e obter uma forma altamente pura do polímero.

Os processos de purificação em si, geralmente incluem a combinação de diferentes técnicas como a centrifugação, precipitação, filtração, cromatografia ou ultrafiltração. O uso de solventes como etanol, metanol, acetona e propanol que agem promovendo a desidratação e reduzem a constante dielétrica do meio, aumentando as interações eletrostáticas, levando à agregação intra e intermolecular. Esta é uma das operações mais utilizadas para a remoção de proteínas. Nestes casos, o uso de etanol e propanol são preferíveis, devido à não toxicidade. Além disso, o custo do etanol é mais barato quando comparado a outros álcoois e cetonas, por isso, este é o solvente mais utilizado para precipitação de AH (CAVALCANTI et al., 2020). Também o uso de cloreto de sódio serve para auxiliar na precipitação do biopolímero resultando em partículas mais homogêneas e devido à esta etapa do processo de purificação, o ácido hialurônico é convertido no hialuronato de sódio.

Apesar da existência destas inúmeras metodologias e combinações das mesmas, ainda se tem diversas dificuldades de se chegar a resultados com excelência devido, muitas vezes, às falhas na descrição destas técnicas pela literatura. Por isso, nos últimos anos, os estudos em torno do AH tem se voltado à otimização dos métodos de purificação, pois é importante para garantir um isolamento eficiente e de alta pureza, mas que também implique em técnicas de baixo custo, alto rendimento, uniformidade, e ambientalmente segura (ABDALLAH et al., 2020).

Neste sentido, o objetivo desta etapa do estudo foi purificar o ácido hialurônico produzido por fermentação submersa de *S. zooepidemicus* imobilizado em espuma de PU (descrito no capítulo 3) e avaliar suas propriedades físicas e biológicas.

## **4.2. Materiais e Métodos**

### **4.2.1. Produção de ácido hialurônico por células de *Streptococcus zooepidemicus* imobilizadas *in situ* em poliuretano flexível**

A produção do AH foi realizada adicionando-se 30 g de imobilizado (8g de biomassa) em biorreator contendo 1 L de meio composto por glicose (30 g/L), extrato de levedura (7,5 g/L) e sais ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2 g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,5 g/L),  $\text{MgSO}_4$  (0,5 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,5 g/L) e L-

asparagina (0,1 g/L)) e em condições operacionais de 500 rpm, 2 vvm e 35 °C por 28 h de bioprodução.

#### 4.2.2. Recuperação do ácido hialurônico

A recuperação/purificação do AH foi realizada segundo Amado et al. (2016), com modificações. O sobrenadante obtido da etapa de centrifugação contendo o AH foi transferido para um frasco, acrescentado 20 mL de etanol 99% e armazenado em geladeira por 1 h. Após, foi realizada nova centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 15 mL de uma solução de NaCl 1,5 M, homogeneizando até sua dissolução. Essa solução foi armazenada em freezer (-20°C) por aproximadamente 8 h. Posterior à remoção do freezer, após seu descongelamento, foram acrescentados 20 mL de etanol e centrifugado novamente, sendo que o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi diluído em 20 mL de água destilada e armazenado sob refrigeração (4°C +- 2°C) para ser quantificado e/ou liofilizado (Equação 1).

$$AH \text{ purificado (\%)} = \frac{AH_{\text{purificado}}}{AH_{\text{sem purificar}}} * 100 \quad (1)$$

Onde:  $AH_{\text{purificado}}$  é a quantidade de AH em g/L após o processo de purificação;  $AH_{\text{sem purificar}}$  é a quantidade de AH em g/L antes do processo de purificação.

#### 4.2.3. Quantificação do ácido hialurônico purificado

Esta etapa do trabalho foi realizada conforme descrito no item 3.2.3.

#### 4.2.4. Obtenção do hialuronato de sódio em pó

Para a obtenção do hialuronato de sódio em pó, o precipitado diluído em 20 mL de água destilada foi congelado por 24 h e posteriormente liofilizado em Liofilizador (modelo: Modulyo; fabricante: Edwards), acoplado a uma bomba de vácuo (modelo: RV8; fabricante: Edwards); a temperatura de -40 °C a -60 °C por 48 h, como ilustrado na Figura 4.1

**Figura 4.1-** Aspecto geral do liofilizador utilizado na secagem do ácido hialurônico.



**Fonte:** O autor (2024).

#### 4.2.4.1. Avaliação da citotoxicidade

##### *Cultivo*

Para os ensaios de citotoxicidade do hialuronato de sódio foi utilizada a linhagem celular endotelial de rim de macaco Vero, adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células Vero foram cultivadas em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) *low glucose*, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de anfotericina. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) até atingirem confluência ideal para os ensaios.

Para os ensaios, foi utilizado ácido hialurônico dissolvido em água ultrapura (sistema Milli-Q®) e filtrado com filtro de seringa esterilizado (0,22 µm; polietersulfona). As células foram tratadas com concentrações crescentes (10, 50, 100, 500 e 1000 µg/mL) da solução de ácido hialurônico (m/v) por 24, 48 e 72 h. As condições testadas foram definidas a partir da literatura (Chen et al., 2019; Nascimento et al., 2021; Zerbinati et al., 2021; Totu et al., 2023) e de ensaios prévios do grupo. O meio extracelular foi utilizado para os ensaios de óxido nítrico (ON), produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e liberação de ds-DNA.

Estas análises foram realizadas em parceria com a Universidade de Caxias do Sul (UCS) – Caxias do Sul, Rio grande do Sul.

##### *Ensaio de viabilidade celular (MTT)*

Para avaliar a viabilidade celular, o ensaio MTT foi realizado de acordo com Denizot e Lang (1986). O inóculo equivalente a  $1 \times 10^5$  de células foi semeado em placas de 96 poços e cultivado por 24 h. Após os tratamentos, o meio de cultura foi removido em seu devido tempo, e a solução estoque de MTT (1 mg / mL) foi adicionada. As placas foram incubadas por 1 h a 37 ° C. Em seguida, o MTT foi removido e a placa colocada para secagem por 24 h. Os cristais de formazan foram diluídos com 100 µL de DMSO e a absorbância foi lida a 517 nm usando um leitor de microplacas (Victor-X3, Perkin Elmer, Finlândia). Os resultados foram expressos em porcentagem (%) em relação ao controle.

#### *Produção de óxido nítrico (ON)*

Após os tratamentos com o ácido hialurônico, os sobrenadantes foram coletados para realização do ensaio. Os níveis de óxido nítrico (NO) foram determinados através de um método indireto (GREEN, 1892) baseado no uso do reagente de Greiss. O reagente de Greiss é capaz de detectar nitrito orgânico (metabólito do NO) na amostra. A sulfanilamida pode interagir com o nitrito da amostra formando sais de diazônio. Esses sais em contato com N-(1-dicloridrato de naftil)etilenodiamina torna-se rosa ou roxo. A intensidade da cor é indiretamente proporcional para produção de NO. A absorbância foi quantificada a 540 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) em relação ao controle.

#### *Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) extracelular*

O ensaio fluorimétrico da 2,7 diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) baseia-se na capacidade desta substância ser desacetilada por esterases citosólicas para diclorodihidrofluoresceína (DCFH), produto não fluorescente, que por sua vez, é convertido por espécies reativas para diclorofluoresceína (DCF). O DCF pode ser facilmente visualizado por sua fluorescência a 525nm quando excitada a 488 nm (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). O resultado foi expresso em percentual do controle (%).

#### *Avaliação da liberação de DNA de fita dupla (ds-DNA)*

O ensaio de PicoGreen é utilizado para a quantificação do ds-DNA liberado no meio devido a danos a membrana da célula, com o objetivo de investigar citotoxicidade. Para o ensaio, é utilizado o reagente fluorescente ultrasensível Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA

Reagent (Invitrogen®), o qual quantifica as duplas fitas de DNA em solução e emite fluorescência quando se liga com o DNA dupla fita (HA et al., 2011). O resultado foi expresso em percentual do controle (%).

#### 4.2.4.2. Propriedades biológicas

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) a avaliação da atividade antimicrobiana do hialuronato de sódio foi realizada utilizando quatro bactérias diferentes, sendo elas: duas bactérias Gram-positivas (*Escherichia coli* ATCC 8739 e *Listeria monocytogenes* NCTC 11994) e duas bactérias Gram-negativas (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923).

Diferentes diluições seriadas de hialuronato de sódio (de 50 a 0,018 mg/mL) foram realizadas em placas de ELISA utilizando como solvente meio nutriente Luria Bertani (LB) (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl) e BHI (infusão de cérebro e coração de carneiro) (37 g/L). Após 10 µL da solução da suspensão bacteriana foram adicionados aos poços contendo 150 µL da solução de hialuronato de sódio. As placas foram incubadas por 24 h a 35 +/- 2°C em estufa bacteriológica. O controle negativo foi feito substituindo a suspensão bacteriana por meio nutriente e o controle positivo utilizando 150 µL de meio sem hialuronato de sódio passando pelo mesmo processo de incubação.

Após as 24 h, realizou-se a leitura das placas em leitor de microplaca ELISA (Bio Tek Instruments, EL 800) a 490 nm. O resultado de CIM é de acordo com Gaio et al. (2015), a menor concentração de hialuronato de sódio capaz de inibir o crescimento bacteriano, verificado pelo não surgimento de turvação, sendo determinada conforme a Equação 2.

$$CIM/CBM \text{ (mg/mL)} = Abs \text{ (amostra)} - Abs \text{ (controle)} \quad (2)$$

A CBM é a concentração mínima capaz de eliminar os microrganismos. Para verificar esta, em outra placa de ELISA foi adicionado 150 µL meio nutriente e então 10 µL de cada amostra da CIM foram inoculados nos poços contendo meio da placa de ELISA, desta forma foi possível realizar uma leitura logo após a inoculação (Controle) e outra após 24 h de incubação (Amostra) em estufa bacteriológica a 35°C, a CBM também pode ser calculada por meio da Equação 2.

#### 4.2.4.3. Avaliação da atividade antioxidante

Existem diversos métodos para se avaliar a capacidade antioxidante de um composto. Geralmente, estes testes são baseados na transferência de elétrons (TE), como: ABTS; DPPH; oxidação ferrosa-laranja de xilenol (FOX); tiocianato férrico (FTC), poder antioxidante/redutor férrico (FRAP); poder redutor de ferricianeto de potássio (PFRAP); e poder antioxidante redutor cúprico (CUPRAC). Através destas metodologias os antioxidantes reagem com um agente oxidante e são quantificados por espectrofotometria, obtendo, assim, a capacidade de um antioxidante na redução de um oxidante. O grau de mudança de cor (aumento ou diminuição da absorvância) está correlacionado à concentração de antioxidantes na amostra (XIAO et al., 2020).

Neste trabalho, a atividade antioxidante foi realizada frente ao radical ABTS $\bullet$ + de acordo com o método descrito por Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997) com adaptações.

Uma solução contendo ABTS (7 mM) – 1000  $\mu$ L – e de Persulfato de Potássio (140 mM) - 17,6  $\mu$ L – foi preparada e armazenada ao abrigo da luz, permanecendo em repouso por 16 h. Decorrido o tempo, a solução foi diluída com água destilada até se obter a absorvância de 0,700 abs +/- 0,05 em 734 nm. Após isto uma curva de calibração foi preparada utilizando uma solução de Trolox nas concentrações de 50 a 2000  $\mu$ mol/L.

Para a quantificação, uma solução de hialuronato de sódio foi preparada ressuspendendo o sal em água destilada (5 a 75 mg/mL). Assim, 20  $\mu$ L destas diluições foram colocados para reagir com 2,0 mL do radical ABTS $\bullet$ +, a mistura foi homogeneizada e após 6 minutos no escuro foi realizada uma leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 734 nm. A água destilada foi utilizada como branco e o controle é o valor da leitura de 2 mL da solução de ABTS $\bullet$ + acrescida de 20  $\mu$ L de água destilada. Os resultados foram expressos em IC50 ou em mM de Trolox por mg de amostra com uso da curva de calibração.

#### 4.2.4.4. Avaliação da morfologia do hialuronato de sódio

As análises da morfologia do hialuronato de sódio por microscopia eletrônica de varredura (MEV) seguiram tal qual a descrição do item 3.2.4.1.

#### 4.2.4.5. Avaliação de grupos funcionais

Os grupos funcionais do hialuronato de sódio foram avaliados por espectrômetro de infravermelho (FTIR) (Agilent, modelo Cary 630 ZnSe PC Bundle) equipado com um acessório de reflexão total atenuada (Diamond ATR). Os espectros da superfície foram coletados no modo transmitância, na região de  $650$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$  com resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.2.4.6. Avaliação da estabilidade e degradação térmica

A estabilidade térmica foi analisada por análise termogravimétrica (TG) e análise térmica diferencial (DTG) usando Amostra de  $1,668\text{ mg}$  de hialuronato de sódio em um DTG- (Shimadzu, modelo DTG-60, Kyoto, Japão). Os seguintes parâmetros foram utilizados na análise: taxa de aquecimento de  $5\text{ C/minuto}$ ; fluxo atmosférico de nitrogênio de  $50\text{ mL/minuto}$ ; faixa de temperatura de  $30\text{--}800\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; e recipiente de platina. Os resultados foram obtidos usando o TA Software de status de aquisição versão 2.21 e TA60 versão 2.21 programas. A análise foi realizada em parceria com a Universidade Tiradentes (UNIT) – Aracajú, Sergipe.

#### 4.2.4.7. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

O estudo de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi realizado empregando um calorímetro de varredura diferencial (Shimadzu DSC-60 (Shimadzu, Kyoto, Japão)). Uma amostra de  $5,3\text{ mg}$  foi adicionada em recipiente de alumínio sob atmosfera de nitrogênio, com vazão de  $50\text{ mL/minuto}$ . Os termogramas foram escaneados em ida e volta a uma taxa de aquecimento constante de  $5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$  na temperatura de  $10$  a  $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A análise foi realizada em parceria com a Universidade Tiradentes (UNIT) – Aracajú, Sergipe.

#### 4.2.5. Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a nível de  $95\%$  de confiança, utilizando o software Statistica (versão 5.0 StatSoft, Inc., Tulsa OK, USA).

### 4.3. Resultados e discussão

#### 4.3.1. Purificação do ácido hialurônico

Os processos de separação e purificação mais amplamente estudados envolvem a precipitação, filtração, adsorção, eletroforese e troca iônica. A combinação de operações e uso de solventes orgânicos como etanol, acetona e isopropanol para purificação podem levar a processos otimizados em termos de eficácia e eficiência para a remoção de impurezas (CAVALCANTI et al., 2020).

A metodologia utilizada, a qual conduziu a formação de hialuronato de sódio, possibilitou uma purificação e/ou recuperação de 56,65% do AH, ou seja, algumas impurezas ainda ficaram presentes no produto e/ou na conversão no hialuronato de sódio. Güngör et al. (2019) obtiveram 72% de purificação, utilizando em sua metodologia NaCl e coluna de diálise, ou seja, aproximadamente 21% superior.

A Figura 4.2 apresenta o aspecto visual do hialuronato de sódio obtido após o processo de liofilização, onde é possível verificar um pó com característica de cor clara e aspecto parcialmente uniforme.

**Figura 7-** Aspecto visual do hialuronato de sódio.



**Fonte:** O autor (2024).

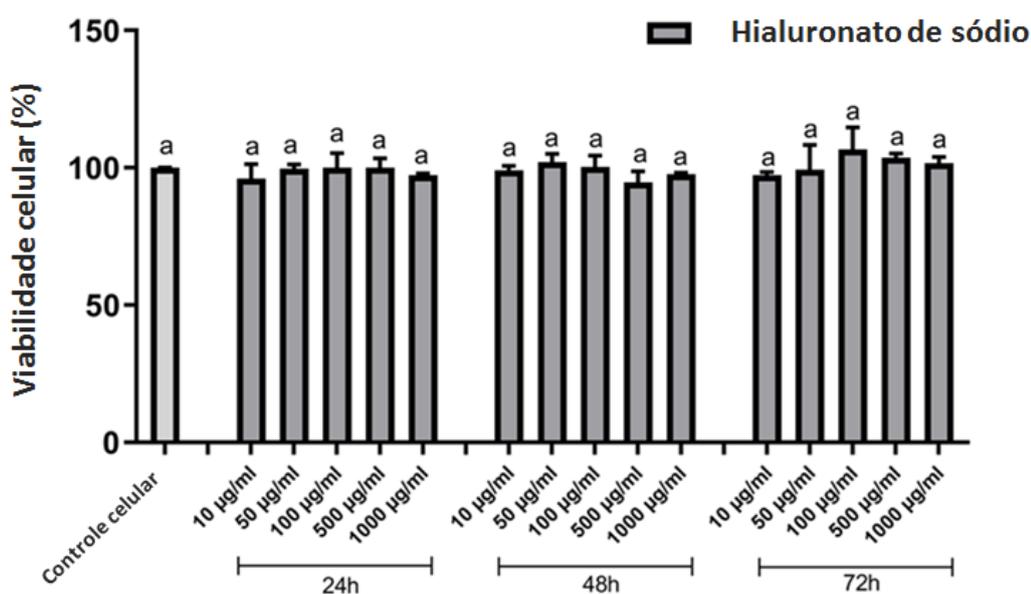
#### 4.3.1.1. Citotoxicidade do hialuronato de sódio

##### *Avaliação da Citotoxicidade pelo Ensaio MTT*

Os ensaios de citotoxicidade são essenciais para determinar o impacto do produto na sobrevivência celular, bem como para identificar as concentrações ótimas em que não ocorra redução da taxa de metabolismo celular superior a 20% (ZERBINATI et al., 2021).

A Figura 4.3 apresenta a viabilidade celular após 24, 48 e 72 h de tratamento de células de linhagem VERO (macaco) com diferentes concentrações (10, 50, 100, 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) de hialuronato de sódio, expressa através de uma porcentagem em comparação com células não tratadas (células controle). Nota-se que o hialuronato de sódio produzido com as condições apresentadas neste trabalho, não apresentou atividade citotóxica em todas as concentrações testadas, bem como demonstrou ausência de citotoxicidade prolongada (até 72 h).

**Figura 4.3-** Efeito do hialuronato de sódio na viabilidade das células VERO. Células tratadas com diferentes concentrações de hialuronato de sódio (10, 50, 100, 500 e 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) por 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos de acordo com a análise de variância (ANOVA) seguida do teste post hoc (b) de Tukey. A significância estatística foi determinada em  $p \leq 0,05$ .



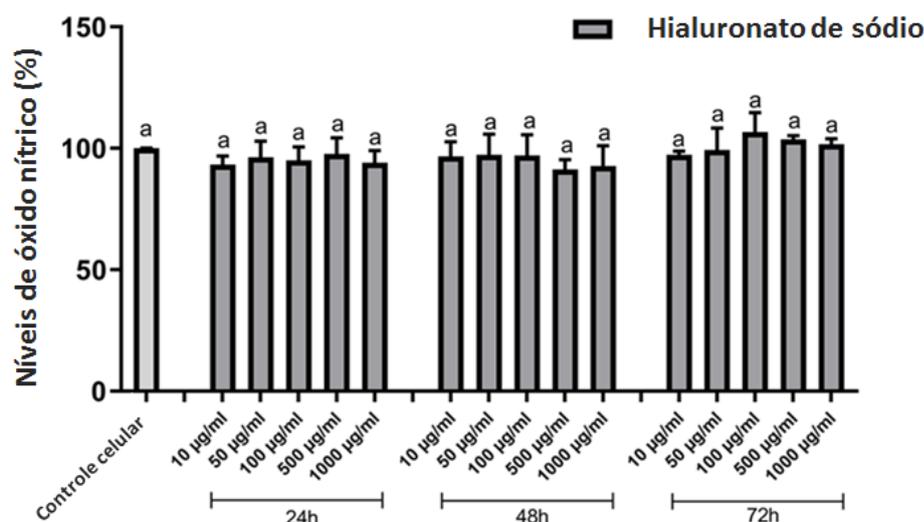
**Fonte:** O autor (2024).

A exposição das células de condrócitos humanos SW1353 ao hialuronato de sódio, foram testadas por Lee; Kim; Lee (2016) em concentrações de até 800  $\mu\text{g/mL}$ , a lidocaína e com as duas substâncias combinadas. A exposição ao hialuronato de sódio resultou em pouco efeito na viabilidade celular enquanto que a lidocaína inibiu a viabilidade de maneira dependente da dose. No tratamento combinado, a citotoxicidade induzida pela lidocaína foi minimizada pelo hialuronato de sódio, cujo efeito protetor em relação a toxicidade da lidocaína ficou evidente após 24 h de tratamento.

### Produção de óxido nítrico (ON)

A geração de moléculas de radicais livres, como o óxido nítrico (NO), é um marcador indicativo de inflamação celular. Neste contexto, dentro da faixa de concentração de hialuronato de sódio avaliada, de 10 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ , observou-se ausência de alteração nos níveis de NO nas células VERO (Figura 4.4), o que sugere que o hialuronato de sódio exibe atividade anti-inflamatória.

**Figura 4.4-** Efeito do hialuronato de sódio nos níveis de óxido nítrico nas células VERO. Células tratadas com diferentes concentrações de hialuronato de sódio (10, 50, 100, 500 e 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) por 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos de acordo com a análise de variância (ANOVA) seguida do teste post hoc (b) de Tukey. A significância estatística foi determinada em  $p \leq 0,05$ .



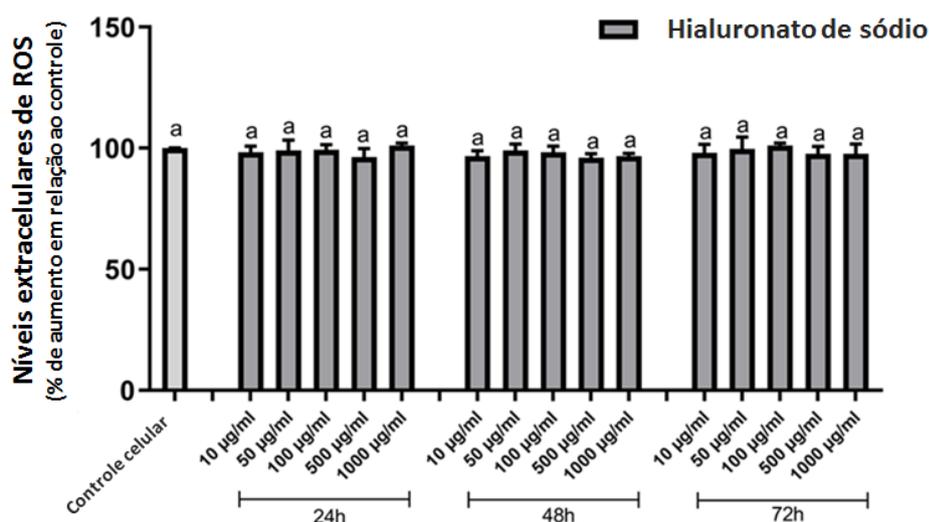
Fonte: O autor (2024).

### Quantificação de ROS extracelular

A atividade antioxidante das amostras foi estudada quanto à sua capacidade de não alterar os níveis de Espécies de reação de oxigênio (ERO) em células VERO. Os níveis ERO são mediadores importantes em diversas vias e são produtos tóxicos conhecidos no metabolismo celular. Algumas EROs como o radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOOH}$ ) e o radical hidroxila ( $\text{OH}$ ), são formadas nas células como consequência da atividade aeróbica normal (SUN et al., 2021).

Através da Figura 4.5 foi possível observar que nas concentrações de hialuronato de sódio (10, 50, 100, 500 e 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) estudadas, não constatou-se a geração de estresse oxidativo, mantendo a mesma quantidade de espécies reativas de oxigênio por até 72 h em células VERO, valor este estatisticamente igual ao controle celular.

**Figura 4.5-** Efeito do hialuronato de sódio os níveis de ERO nas células VERO. Células tratadas com diferentes concentrações de hialuronato de sódio (10, 50, 100, 500 e 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) por 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos de acordo com a análise de variância (ANOVA) seguida do teste post hoc (b) de Tukey. A significância estatística foi determinada em  $p \leq 0,05$ . ROS= Espécies reativas ao oxigênio.



Fonte: O autor (2024).

O hialuronato de sódio é considerado um potencial eliminador de EROs. Segundo pesquisas, este biopolímero quando formado com elevado peso molecular (HMW-HA, 1000 kDa) pode proteger as células epiteliais da córnea contra danos oxidativos induzidos por luz ultravioleta, cloreto de benzalcônio, lauril sulfato de sódio, dentre outros (WU et al., 2017).

Também pode ser empregado como adjuvante com outras substâncias como sílica mesoporosa, quitosana e carboximetilcelulose sódica oxidada, o hialuronato de sódio, apresentando potencial redutor de EROs por quelação de cátions metálicos, demonstrando que pode desempenhar um importante papel na entrega controlada de medicamentos (SHAO et al., 2022).

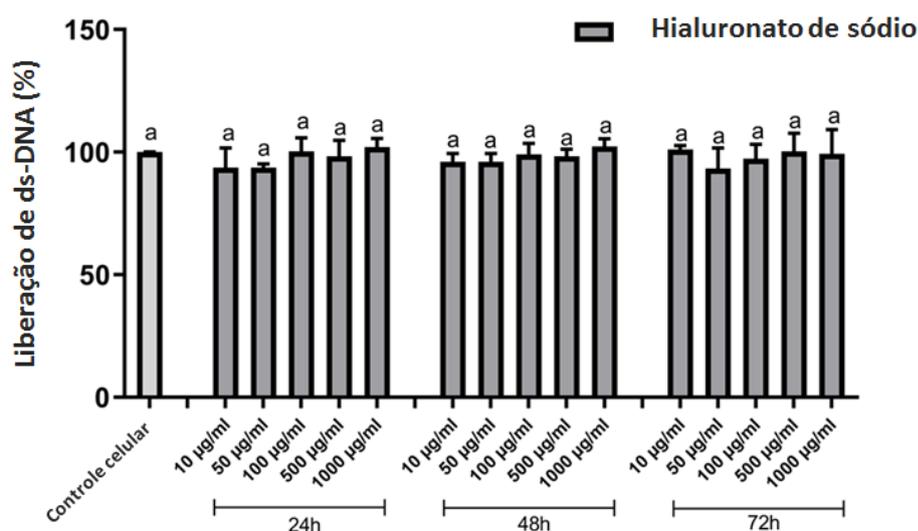
### Avaliação da liberação de DNA de fita dupla (ds-DNA)

O DNA tem um papel vital nos processos que transportam informação genética e fornecem o direcionamento para a síntese biológica de proteínas e enzimas através dos processos de replicação e transcrição da informação genética (XU et al., 2020).

Neste sentido, o ensaio de PicoGreen é utilizado para a quantificação do ds-DNA liberado no meio devido a danos a membrana da célula, com o objetivo de investigar citotoxicidade.

Conforme mostra a Figura 4.6, é possível observar que os níveis de ds-DNA nas células VERO não apresentaram mudanças significativas ( $p > 0,05$ ) em nenhuma das condições de exposição ao hialuronato de sódio submetidas (10, 50, 100, 500 e 1000  $\mu\text{g/ml}$  por 24, 48 e 72 h).

**Figura 4.6-** Citotoxicidade do hialuronato de sódio de acordo com o reagente ds-DNA Quant-iT™ PicoGreen® em células VERO. Células tratadas com diferentes concentrações de hialuronato de sódio (10, 50, 100, 500 e 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) por 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos conforme análise de variância (ANOVA) seguida de testes post hoc (b) de Tukey. A significância estatística foi determinada em  $p \leq 0,05$ .



Fonte: O autor (2024).

Dessa forma, pode-se concluir que o hialuronato de sódio produzido e purificado neste trabalho não representa um papel tóxico para as células VERO estudadas, no entanto, não apresenta respostas satisfatórias como antioxidante.

#### 4.3.1.2. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do hialuronato de sódio foi testada frente à quatro bactérias, sendo elas: *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella typhimurium*; e *Staphylococcus aureus* e os resultados da concentração inibitória e bactericida mínima estão apresentados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1-** Concentração inibitória e bactericida mínimas do hialuronato de sódio.

Patogenicidade	Bactéria	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
Gram-positiva	<i>Escherichia coli</i>	50	> 50
	<i>Listeria monocytogenes</i>	50	> 50
Gram-negativa	<i>Salmonella typhimurium</i>	50	> 50
	<i>Staphylococcus aureus</i>	> 50	> 50

Fonte: O autor (2024).

O hialuronato de sódio apresentou atividade antimicrobiana com concentração inibitória mínima (CIM) de 50 mg/mL em 3 das 4 bactérias estudadas (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*). Contudo, os estudos sobre o potencial de concentração bactericida mínima (CBM) do hialuronato de sódio não produziram resultados favoráveis para nenhum dos microrganismos examinados, uma vez que nenhuma das bactérias demonstrou suscetibilidade à morte celular.

Em estudo realizado por Chuc-Gamboa et al. (2021) aplicando o hialuronato de sódio em filmes de quitosana não obtiveram resultados positivos para atividade antimicrobiana testadas contra *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, e moderada atividade contra *Salmonella typhimurion*. A justificativa relatada pelos autores sugere que a baixa atividade antibacteriana pode ser devida à baixa densidade de quitosana na camada mais superficial da amostra.

Segundo Jasenská et al. (2021), embora o hialuronato de sódio possuir atividade antimicrobiana contra diversas espécies de microrganismos, no entanto esta macromolécula não é comumente considerada como um agente antibacteriano. Além disso, sua atividade pode ter correlação com o peso molecular.

A literatura sugere que o hialuronato de sódio com alto peso molecular (1300 kDa) pode reduzir significativamente o número de *S. aureus*, e que com baixa massa (141 kDa) não inibe o crescimento na concentração de 1 mg/mL. No caso de cepas de *S. mutans*, o sal de baixo peso molecular resultou em um aumento no número de células em relação ao controle, indicando que o AH pode ter sido utilizado como uma fonte de nutrientes para os microrganismos (GUZIŃSKA et al., 2018).

Também existem controversas sobre as propriedades pró ou antiproliferativas do hialuronato de sódio isolado/sozinho, ou seja, sem estar associado a outras substâncias. Os seus efeitos na proliferação celular são complexos e ainda dependem da concentração de AH, do tamanho molecular e do tipo de célula (SPITZER et al., 2008).

#### 4.3.1.3. Propriedades antioxidantes

Considerando que a capacidade antioxidante é definida como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com um substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação desse substrato, pode-se afirmar que fisiologicamente, o papel dos antioxidantes é prevenir danos aos componentes celulares decorrentes de reações químicas promovidas por radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995).

Nos últimos anos, inúmeras investigações científicas demonstram que o hialuronato de sódio apresenta efeitos antioxidantes *in vivo* e *in vitro*. Mohammed e Niamah (2022) analisaram a atividade antioxidante de ácido hialurônico extraído de *Streptococcus thermophilus* e obtiveram resultados em concentrações de 1300 µg/ml, com 69,18%, 78,42% e 73,74% de atividades de DPPH, peróxido de hidrogênio e eliminação de quelantes de ferro, respectivamente.

O método DPPH foi testado neste estudo, porém não foi possível quantificar a capacidade antioxidante da amostra, visto que o hialuronato de sódio precipitou ao entrar em contato com o solvente (etanol) utilizado no método. Neste sentido, foi então utilizado o método ABTS utilizando água destilada como solvente.

Os resultados obtidos indicam que 1 g de hialuronato de sódio foi capaz de inibir o cátion radicalar ABTS de maneira equivalente a 15,36 µmol trolox e que são necessários 77,82 mg/ml de hialuronato de sódio para eliminar 50% do radical ABTS. Estes resultados corroboram com a avaliação dos níveis de EROs avaliados como parte da citotoxicidade e indicam baixa capacidade antioxidante da amostra.

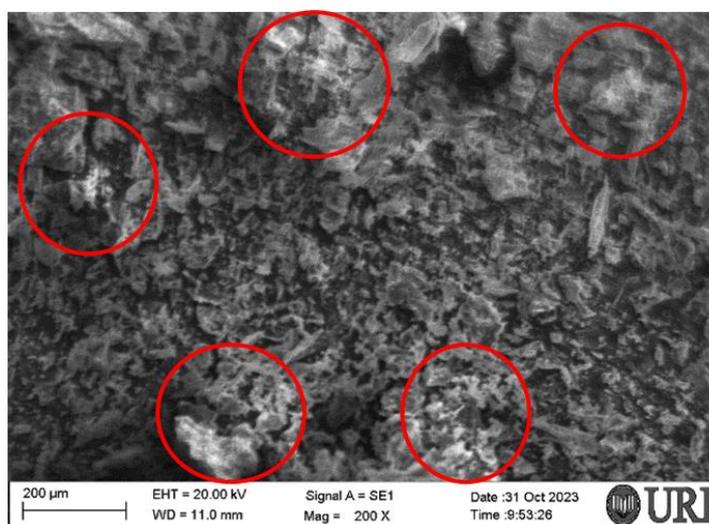
Segundo KADERLI et al. (2015) o fato de o hialuronato de sódio não ter apresentado boa capacidade antioxidante neste trabalho, pode estar relacionado ao fato de que alguns antioxidantes quando em elevadas concentrações, podem ter efeito contrário e catalisar sua própria oxidação, ou seja, tendo efeito pró-oxidação.

#### 4.3.1.4. Características estruturais do hialuronato de sódio

O resultado do MEV do hialuronato de sódio é apresentado na Figura 4.7. Através das imagens ampliadas em 200 x, pode-se observar uma estrutura polimérica maciça, com certas granulometrias não uniformes, mas semelhantes entre si.

Os cristais em maior quantidade, menores e mais escuros são atribuídos ao NaCl, o qual foi utilizado para a purificação/precipitação de AH, além de possíveis restos celulares de *S. zooepidemicus* que não foram totalmente eliminados na etapa de purificação. Por fim, os maiores cristais, com uma cor mais clara (esbranquiçada) são atribuídos aos cristais de hialuronato de sódio corroborando com os achados por Paiva et al. (2022).

**Figura 8-** Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de hialuronato de sódio.



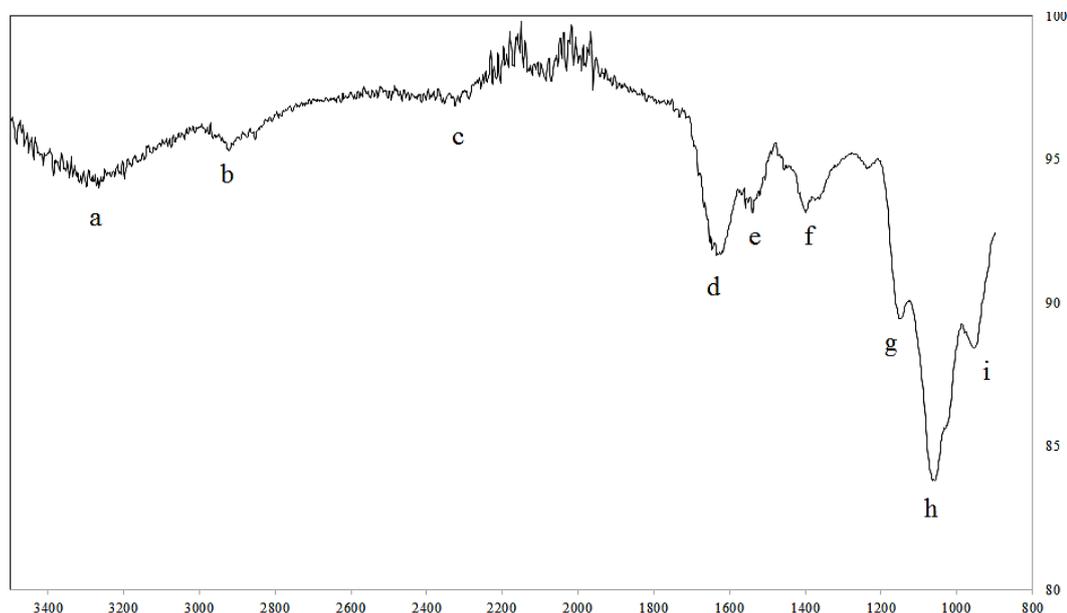
**Fonte:** O autor (2024).

#### 4.3.1.5. Grupamentos funcionais do hialuronato de sódio

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é um método prático utilizado para detectar grupos orgânicos característicos em polissacarídeos. Todas as bandas identificadas e seus respectivos comprimentos de onda são mostrados na

Figura 4.8 e na Tabela 4.2, que apresenta a lista os grupos orgânicos identificados no espectro FTIR do hialuronato de sódio.

**Figura 4.8-** Espectros de FTIR de hialuronato de sódio.



**Fonte:** O autor (2024).

Na Tabela 4.2 estão listados os grupos orgânicos identificados no espectro FTIR do hialuronato de sódio.

A banda “a”, localizada na faixa de  $3296\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento do grupo N - H e O - H, enquanto que a banda “b” é correspondente ao alongamento C - H na área de  $2922\text{ cm}^{-1}$  (ALKRAD et al., 2003). Já na banda “c”, em  $2323\text{ cm}^{-1}$ , encontra-se o trecho tiol SH e nas bandas “d” e “e”, nas faixas de  $1628$  e  $1539\text{ cm}^{-1}$ , são atribuídas às amidas I e II (CHUC-GAMBOA et al., 2021).

O pico relacionado à banda “f”, em  $1397\text{ cm}^{-1}$ , é referente ao alongamento simétrico do grupo C - O - C e a banda “g”, em  $1146\text{ cm}^{-1}$ , refere-se ao alongamento assimétrico C - O - C, deformação O - H e deformação C = O (MENDES et al., 2010; WÓJCIK-PASTUSZKA; SKRZYPCZYK; MUSIAŁ, 2021).

As bandas observadas na faixa de  $1056\text{ cm}^{-1}$  (bandas “h”) e  $952\text{ cm}^{-1}$  (banda “i”) no biopolímero de hialuronato de sódio referem-se ao estiramento C - O - C, ao estiramento C - O - C e deformações  $\text{CH}_2\text{OH}$  (SAFAEI; TARAN, 2017).

A banda nomeada como “a”, cujo valor se encontra na faixa de  $3296\text{ cm}^{-1}$ , também foi observada por Paiva et al. (2022) em hialuronato de sódio produzido por *S.*

*zooepidemicus* CCT 7546, e foi vinculada aos grupamentos hidroxila (OH).

**Tabela 4.2-** Grupos orgânicos encontrados no espectro FTIR do hialuronato de sódio.

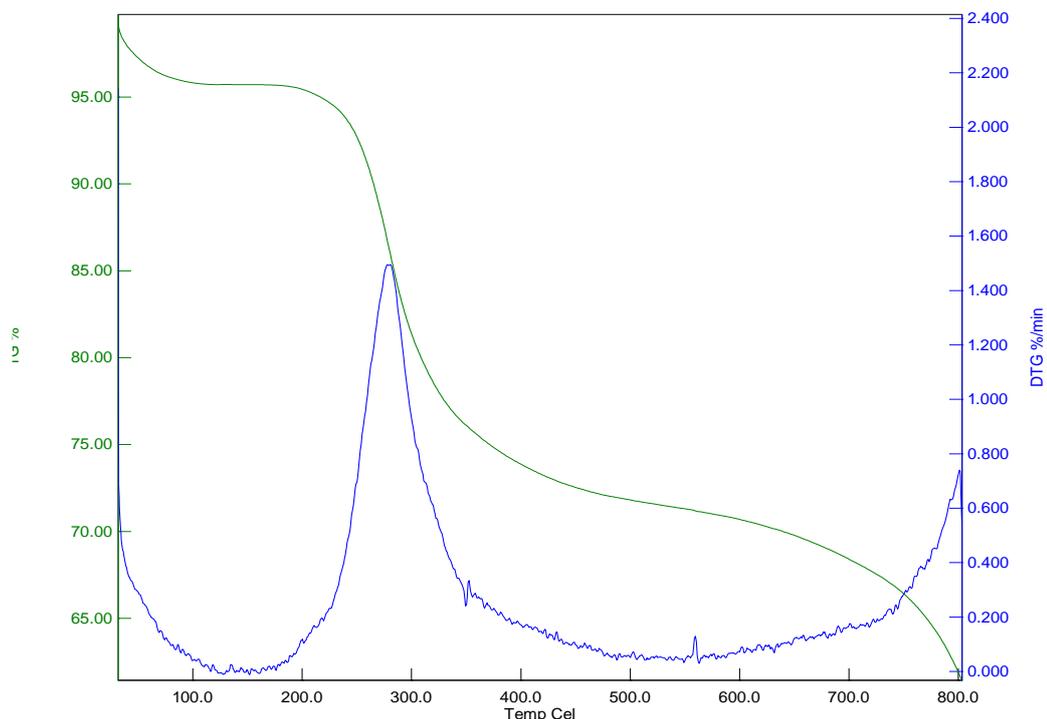
Banda	Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupos e ligações orgânicas
a	3296	Estiramento N – H e O - H
b	2922	Alongamento do C - H
c	2323	Trecho Tiols SH
d	1628	Amida I e amida II
e	1539	Amida I e amida II
f	1397	Alongamento simétrico C - O - O
g	1146	Alongamento assimétrico C – O - C, deformação O - H e deformação C = O
h	1056	Estiramento C - O - C
i	952	Estiramento C - O - C e deformações CH <sub>2</sub> OH

**Fonte:** O autor (2024).

#### 4.3.1.6. Propriedades térmicas

A Figura 4.9 corresponde à análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA) do hialuronato de sódio produzido por *S. zooepidemicus* ATCC 39920. A técnica TGA acompanha a perda ou ganho de massa de uma amostra em função do tempo ou da temperatura, enquanto que a termogravimetria derivada (DTG) é um arranjo matemático no qual a derivada da variação de massa em relação ao tempo (dm/dt) registrada em função do tempo ou da temperatura (DENARI; CARVALHO, 2012).

**Figura 4.9-** Análise termogravimétrica (TGA) e curvas de termogravimetria derivada (DTG).



**Fonte:** O autor (2024).

Observa-se duas regiões de perda de massa, uma em aproximadamente em 115 °C, correspondendo a 4,04% em peso, e foi associada à perda de água. A segunda ocorre na faixa de temperatura de 190 a 460 °C, com uma perda de peso de aproximadamente 22,15%, e foi relacionada a degradação da estrutura do próprio biopolímero. A curva DTG indica que o pico de degradação do hialuronato de sódio ocorreu na temperatura de 280 °C, apresentando a maior taxa de perda de massa (1,5%/min).

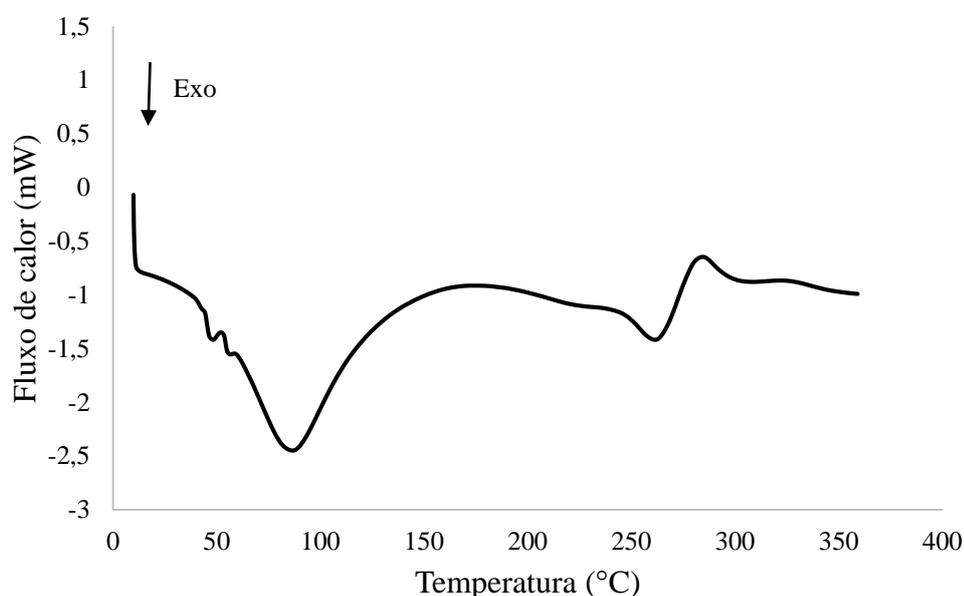
Dois etapas de degradação térmica para o hialuronato de sódio produzido por *Streptococcus zooepidemicus*, também foram observadas por Safaei; Taran, (2017), com a primeira ocorrendo na faixa abaixo de 150 °C com 13,75% de perda de peso, enquanto que a segunda fase ocorreu em aproximadamente 220 a 460 °C com uma perda de peso de 53,99% relacionadas à perda de água e degradação do hialuronato de sódio, respectivamente.

#### 4.3.1.7. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O comportamento térmico do hialuronato de sódio obtido foi avaliado mediante análises de DSC, apresentadas na Figura 4.10.

A análise DSC é uma ferramenta poderosa e versátil para estudar as propriedades térmicas de uma ampla variedade de materiais, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento, na caracterização e no controle de qualidade de produtos em várias indústrias. As principais funções e aplicações da análise DSC são: determinação de transições térmicas; estudo da estabilidade térmica; caracterização de polímeros; desenvolvimento de materiais, entre outras.

**Figura 4.10-** Termograma DSC de hialuronato de sódio.



**Fonte:** O autor (2024).

A análise térmica diferencial do polímero de hialuronato de sódio apresentou dois eventos, sendo um deles exotérmico, em 87 °C e outro evento endotérmico em 286 °C.

Os resultados obtidos por Wójcik-Pastuszka; Skrzypczyk; Musiał, (2021), ao avaliarem uma amostra de AH pura, revelaram a presença de dois picos endotérmicos semelhantes, ocorrendo a 228,5 e 246,7 °C, os quais foram associados à degradação do polímero. Contudo, as discrepâncias nas temperaturas registradas entre este estudo e os do referido autor podem ser atribuídas à fusão das interações intermoleculares entre as cadeias de hialuronato de sódio ou à possível presença de impurezas na amostra.

#### 4.4. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o ácido hialurônico (AH) produzido, embora não tenha alcançado o nível máximo de pureza relatado em outros estudos, demonstrou ser um material seguro e promissor para uma variedade de aplicações industriais. A metodologia de purificação empregada, utilizando etanol como solvente em conjunto com NaCl, resultou em uma eficiente purificação do hialuronato de sódio, com uma taxa de remoção de impurezas de 56,65%. A análise de citotoxicidade indicou a segurança do AH produzido em concentrações testadas, sugerindo seu potencial para uso em aplicações biológicas.

Além disso, o AH apresentou atividade antioxidante moderada e atividade antimicrobiana contra algumas bactérias, o que o torna particularmente interessante para aplicações na indústria de alimentos.

As técnicas de caracterização utilizadas forneceram informações detalhadas sobre a estrutura e as propriedades térmicas do hialuronato de sódio produzido, contribuindo para o entendimento de suas características e possíveis aplicações.

Apesar das limitações identificadas, como a necessidade de otimização dos processos de purificação e caracterização, bem como estudos adicionais para explorar mais a fundo suas propriedades e aplicações em diferentes contextos, os resultados obtidos sugerem que o AH produzido tem potencial para ser utilizado em uma variedade de aplicações industriais, especialmente na indústria de alimentos, devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes.

#### 4.5. Referências

- ABDALLAH, M. M.; FERNÁNDEZ, N.; MATIAS, A. A.; BRONZE, M. do R. Hyaluronic acid and Chondroitin sulfate from marine and terrestrial sources: Extraction and purification methods. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 243, p. 116441, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861720306159>>
- ALKRAD, J. A.; MRESTANI, Y.; STROEHL, D.; WARTEWIG, S.; NEUBERT, R. Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 545–550, 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708502006829>>
- AMADO, I. R.; VÁZQUEZ, J. A.; PASTRANA, L.; TEIXEIRA, J. A. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 198, p. 54–61, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.062>>

- CAVALCANTI, A. D. D.; MELO, B. A. G. De; FERREIRA, B. A. M.; SANTANA, M. H. A. Performance of the main downstream operations on hyaluronic acid purification. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 99, p. 160–170, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511320302026>>
- CHEN, M.; LI, L.; WANG, Z.; LI, P.; FENG, F.; ZHENG, X. High molecular weight hyaluronic acid regulates *P. gingivalis*-induced inflammation and migration in human gingival fibroblasts via MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Archives of Oral Biology**, [s. l.], v. 98, p. 75–80, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003996918303273>>
- CHUC-GAMBOA, M. G.; CÁMARA PERERA, C. M.; AGUILAR AYALA, F. J.; VARGAS-CORONADO, R. F.; CAUICH-RODRÍGUEZ, J. V.; ESCOBAR-GARCÍA, D. M.; SÁNCHEZ-VARGAS, L. O.; PACHECO, N.; SAN ROMÁN DEL BARRIO, J. Antibacterial Behavior of Chitosan-Sodium Hyaluronate-PEGDE Crosslinked Films. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 1267, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3417/11/3/1267>>
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol Methods**. v. 89, n. 2, p.271-7. 1986 doi: 10.1016/0022-1759(86)90368-6. PMID: 3486233.
- DENARI, G. B.; ÉDER TADEU GOMES CARVALHO. **Princípios e Aplicações de Análises Térmicas**. [s.l.] : Universidade de São Paulo - Instituto de Química de São Carlos, 2012.
- FLORES-MÉNDEZ, D. A.; GRANADOS-VALLEJO, M.; GUATEMALA-MORALES, G. M.; CORONA-GONZÁLEZ, R. I.; PELAYO-ORTIZ, C.; ARRIOLA-GUEVARA, E. Influence of initial glucose and lactic acid concentration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*: Kinetic and modeling. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], p. 109262, 2024. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X24000494>>
- GAIO, I.; SAGGIORATO, A. G.; TREICHEL, H.; CICHOSKI, A. J.; ASTOLFI, V.; CARDOSO, R. I.; TONIAZZO, G.; VALDUGA, E.; PAROUL, N.; CANSIAN, R. L. Antibacterial activity of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) in Italian-type sausage. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 323–329, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00003-015-0936-x>>
- GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**. v. 126, n. 1, p. 131-8, 1982. doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-x. PMID: 7181105.
- GÜNGÖR, G.; GEDIKLI, S.; TOPTAŞ, Y.; AKGÜN, D. E.; DEMIRBILEK, M.; YAZIHAN, N.; AYTAR ÇELİK, P.; DENKBAŞ, E. B.; ÇABUK, A. Bacterial hyaluronic acid production through an alternative extraction method and its characterization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 94, n. 6, p. 1843–1852, 2019.

- GUZIŃSKA, K.; KAŹMIERCZAK, D.; DYMEL, M.; PABJAŃCZYK-WLAZŁO, E.; BOGUŃ, M. Anti-bacterial materials based on hyaluronic acid: Selection of research methodology and analysis of their anti-bacterial properties. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 93, p. 800–808, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092849311734016X>>
- HA, T. T.; HUY, N. T.; MURAO, L. A.; LAN, N. T.; THUY, T. T.; TUAN, H. M.; NGA, C. T.; TUONG, V. V.; DAT, T. V.; KIKUCHI, M.; YASUNAMI, M.; MORITA, K.; HUONG, V. T.; HIRAYAMA, K. Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. **PLoS One**. v. 6, n. 10, p. e25969, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0025969. Epub 2011 Oct 7. PMID: 22016795; PMCID: PMC3189230.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 125–126, 1995. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0891584995914573>>
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**. v. 142, n. 2, p. 231–55, 2004. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776. PMID: 15155533; PMCID: PMC1574951.
- JASENSKÁ, D.; KAŠPÁRKOVÁ, V.; RADASZKIEWICZ, K. A.; CAPÁKOVÁ, Z.; PACHERNÍK, J.; TRCHOVÁ, M.; MINAŘÍK, A.; VAJĎÁK, J.; BÁRTA, T.; STEJSKAL, J.; LEHOCKÝ, M.; TRUONG, T. H.; MOUČKA, R.; HUMPOLÍČEK, P. Conducting composite films based on chitosan or sodium hyaluronate. Properties and cytocompatibility with human induced pluripotent stem cells. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 253, p. 117244, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486172031417X>>
- KADERLI, S.; BOULOCHER, C.; PILLET, E.; WATRELOT-VIRIEUX, D.; ROGER, T.; VIGUIER, E.; GURNY, R.; SCAPOZZA, L.; MÖLLER, M. A novel oxido-viscosifying Hyaluronic Acid-antioxidant conjugate for osteoarthritis therapy: Biocompatibility assessments. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 90, p. 70–79, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641114003154>>
- LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 1390–1393, 1997. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf960282f>
- LEE, Y.-J.; KIM, S. A.; LEE, S.-H. Hyaluronan suppresses lidocaine-induced apoptosis of human chondrocytes in vitro by inhibiting the p53-dependent mitochondrial apoptotic pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 664–673, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/aps2015151>>
- MENDES, R. M.; SILVA, G. A. B.; CALIARI, M. V.; SILVA, E. E.; LADEIRA, L. O.; FERREIRA, A. J. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. **Life Sciences**, [s. l.], v. 87, n. 7–8, p. 215–222, 2010.

Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320510002626>>

MOHAMMED, A. A.; NIAMAH, A. K. Identification and antioxidant activity of hyaluronic acid extracted from local isolates of *Streptococcus thermophilus*. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 60, p. 1523–1529, 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214785321077129>>

NASCIMENTO, L. Do; NICOLETTI, N. F.; PELETTI-FIGUEIRÓ, M.; MARINOWIC, D.; FALAVIGNA, A. Hyaluronic Acid In Vitro Response: Viability and Proliferation Profile of Human Chondrocytes in 3D-Based Culture. **CARTILAGE**, [s. l.], v. 13, n. 2\_suppl, p. 1077S-1087S, 2021. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/19476035211057244>>

PAIVA, W. K. V. De; MEDEIROS, W. R. D. B. De; ASSIS, C. F. De; DOS SANTOS, E. S.; DE SOUSA JÚNIOR, F. C. Physicochemical characterization and in vitro antioxidant activity of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* CCT 7546. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 234–243, 2022. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10826068.2021.1929320>>

SAFAEI, M.; TARAN, M. Optimal conditions for producing bactericidal sodium hyaluronate-TiO<sub>2</sub> bionanocomposite and its characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 104, p. 449–456, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017307900>>

SHAO, D.; GAO, Q.; SHENG, Y.; LI, S.; KONG, Y. Construction of a dual-responsive dual-drug delivery platform based on the hybrids of mesoporous silica, sodium hyaluronate, chitosan and oxidized sodium carboxymethyl cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 202, p. 37–45, 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181302200040X>>

SPITZER, M. S.; YOERUEK, E.; KACZMAREK, R. T.; SIERRA, A.; AISENBREY, S.; GRISANTI, S.; BARTZ-SCHMIDT, K. U.; SZURMAN, P. Sodium hyaluronate gels as a drug-release system for corticosteroids: release kinetics and antiproliferative potential for glaucoma surgery. **Acta Ophthalmologica**, [s. l.], v. 86, n. 8, p. 842–848, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-3768.2007.01149.x>>

SUN, P.; JIN, J.; WANG, L.; WANG, J.; ZHOU, H.; ZHANG, Q.; XU, X. Porcine epidemic diarrhea virus infections induce autophagy in Vero cells via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress through PERK and IRE1 pathways. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 253, p. 108959, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037811352031097X>>

TOTU, E. E.; MĂNUC, D.; TOTU, T.; CRISTACHE, C. M.; BUGA, R.-M.; ERCI, F.; CRISTEA, C.; ISILDAK, I. Considerations on the Controlled Delivery of Bioactive Compounds through Hyaluronic Acid Membrane. **Membranes**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 303, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2077-0375/12/3/303>>

WÓJCIK-PASTUSZKA, D.; SKRZYPCZYK, A.; MUSIAŁ, W. The Interactions and Release Kinetics of Sodium Hyaluronate Implemented in Nonionic and Anionic

Polymeric Hydrogels, Studied by Immunoenzymatic ELISA Test. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 58, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4923/14/1/58>>

WU, W.; JIANG, H.; GUO, X.; WANG, Y.; YING, S.; FENG, L.; LI, T.; XIA, H.; ZHANG, Y.; CHEN, R.; CHEN, T.; LOU, J. The Protective Role of Hyaluronic Acid in Cr(VI)-Induced Oxidative Damage in Corneal Epithelial Cells. **Journal of Ophthalmology**, [s. l.], v. 2017, p. 1–6, 2017. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/joph/2017/3678586/>>

XIAO, F.; XU, T.; LU, B.; LIU, R. Guidelines for antioxidant assays for food components. **Food Frontiers**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 60–69, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/fft2.10>>

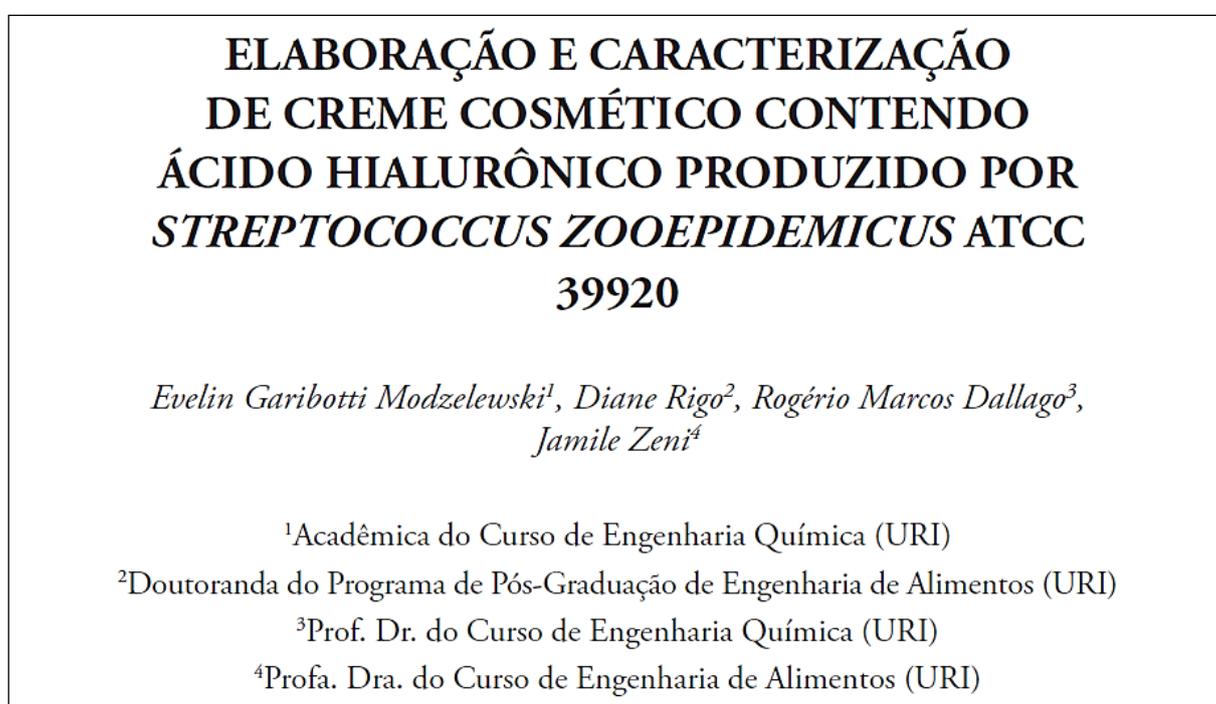
XU, N.; MA, N.; YANG, X.; LING, G.; YU, J.; ZHANG, P. Preparation of intelligent DNA hydrogel and its applications in biosensing. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 137, p. 109951, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305720316657>>

ZERBINATI, N.; SOMMATIS, S.; MACCARIO, C.; CAPILLO, M. C.; DI FRANCESCO, S.; RAUSO, R.; PROTASONI, M.; D'ESTE, E.; GASPERINA, D. D.; MOCCHI, R. In Vitro Hair Growth Promoting Effect of a Noncrosslinked Hyaluronic Acid in Human Dermal Papilla Cells. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2021, p. 1–6, 2021. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2021/5598110/>>

**CAPÍTULO 5: ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CREME  
COSMÉTICO CONTENDO ÁCIDO HIALURÔNICO PRODUZIDO POR  
*STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS* ATCC 39920**

O capítulo apresentado a seguir corresponde a um Trabalho de Conclusão de Curso elaborado a partir do projeto de tese inicial e está publicado no livro Expressões Acadêmicas 2022 - ENGENHARIA DE ALIMENTOS E ENGENHARIA QUÍMICA/URI (Figura 5.1).

**Figura 5.1-** Cabeçalho do capítulo do livro Expressões Acadêmicas 2022 - ENGENHARIA DE ALIMENTOS E ENGENHARIA QUÍMICA/URI.



**Fonte:** O autor (2022).

### **5.1. Introdução**

A pele é considerada um dos principais órgãos do corpo humano devido a sua função de regulação e imunidade, além da proteção contra agentes externos, controle de temperatura, defesa orgânica, controle do fluxo sanguíneo, entre outros (FERREIRA; CAPOBIANCO, 2016).

Toda pele necessita de cuidados especiais, seja de cunho funcional ou estético. Quando estético, a pele do rosto se destaca das demais. Quando não está bem hidratada, as

células responsáveis por manter a boa elasticidade não produzem colágeno e elastina de forma suficiente, favorecendo a formação de sulcos na pele. Outro aspecto a considerar, está relacionado aos melanócitos, que na ausência de água não produzem melanina suficiente para a absorção dos raios ultravioleta (RASCHE, 2014).

Normalmente, estas características se intensificam com a idade/envelhecimento. De acordo com Oliveira (2009), o envelhecimento cutâneo é um processo biológico contínuo caracterizado por múltiplos fatores que interagem entre si, levando ao desgaste natural da pele. Dentre estes fatores, destacam-se: os genéticos, a exposição solar crônica, tabagismo, alcoolismo, estresse emocional, repercussão de doenças cutâneas e sistêmicas que podem ser genéticas e/ou endócrinas.

Durante o envelhecimento humano, há alterações bioquímicas e estruturais das fibras de colágeno, reduzindo sua síntese e aumentando sua degradação e, por consequência, proporcionando alteração do volume facial, perda de elasticidade, ríttides, sulcos e marcas de expressões (VASCONCELOS et al., 2020). A rigidez e a perda de moléculas de água dificultam a difusão dos nutrientes com consequente diminuição da capacidade de regeneração dos tecidos.

Maia; Salvi (2018) denotam que a derme e epiderme tendem a decair quantitativa e qualitativamente com a idade através da redução da atividade mitocondrial e da degradação e diminuição do colágeno da matriz celular. O envelhecimento está associado, ainda, à perda progressiva dos coxins de gordura da face e ao declínio da elasticidade da pele.

Para melhorar a aparência, a humanidade faz uso de diferentes substâncias/compostos há milhares de anos. Preliminarmente, essas substâncias apresentavam pigmentos de origem animal e vegetal que eram aplicados topicamente na tentativa de melhorar somente a aparência facial (GOMES; DAMAZÍO, 2009). Com o passar do tempo, o mercado de cosméticos evoluiu, passando a proporcionar preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas utilizadas na manutenção e aperfeiçoamento da estética do corpo humano, com o objetivo principal de limpá-lo, perfumá-lo, alterar ou corrigir sua aparência, colaborando de modo a melhorar a qualidade da pele e seus anexos (BRASIL, 2015).

A ação de rejuvenescimento pode se dar de duas maneiras: i) com tratamentos preventivos e paliativos, que remete a um conjunto de ações que visam evitar e reduzir o aparecimento dos sinais de envelhecimento cutâneo; ii) formulações cosméticas como o ácido hialurônico (AH), que visa reverter determinadas manifestações clínicas visíveis de uma pele envelhecida (OLIVEIRA, 2009).

A procura do método mais eficaz de preenchimento cutâneo permitiu uma evolução na prevenção e rejuvenescimento natural da pele. Neste contexto, o ácido hialurônico se coloca no mercado como uma alternativa para o tratamento do envelhecimento facial e tem sido utilizado no preenchimento de partes moles para corrigir depressões, rugas e sulcos. Seu comportamento biológico é bem conhecido, com estudos histológicos, sendo absorvido gradativamente ao longo dos meses (SALLES et al., 2011; BERNARDES et al., 2018).

O AH é um biopolímero glicosaminoglicano (GAG) linear com unidades repetidas de  $\beta$ -1,3-N-acetil glucosamina e  $\beta$ -1,4-D-ácido glucurônico ligados entre si. Suas características estruturais e suas propriedades físicas, químicas e biológicas permitem que a sua utilização seja ampla e abranja diversas áreas, incluindo a estética (GUPTA et al., 2019; AL-KHATEEB; OLSZEWSKA-CZYZ, 2020). Através da sua aplicação, o AH se adapta aos contornos do rosto, tratando as rugas, recuperando o volume e a hidratação natural da pele (SANTONI, 2018).

Originalmente, o AH era obtido de fontes animais, principalmente de crista de galo, no entanto, devido a possibilidade de contaminação, sazonalidade, apelo ambiental e outros fatores, foram desenvolvidas alternativas de obtenção de AH, sendo uma destas, através do emprego de culturas bacterianas, como o *Streptococcus*, gerando rendimentos com maior concentração de AH. Entre as linhagens de bactérias, *S. zooepidemicus* é um dos mais utilizados devido sua elevada produção (até 7 g/L) (HARTH et al., 2018).

O mesmo autor ainda ressalta que o AH produzido por bactérias apresenta as mesmas características reológicas que o AH de origem animal e é capaz de diminuir os riscos de contaminação por proteínas e vírus animais. Além disso, os custos de purificação se tornam menores, o que torna a rota microbiológica ainda mais promissora. Tipicamente, utiliza-se glicose como fonte de carbono e uma fonte de nitrogênio complexa (como peptona de soja) para compor o meio nutricional de produção.

Tendo em vista todas as informações postas, a incorporação de AH de origem microbiana em creme cosmético é uma alternativa promissora em substituição ao AH de origem animal. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo formular creme cosmético do tipo óleo/água (O/A) com adição de ácido hialurônico (0,1 e 0,5%, m/m) produzido por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 e avaliar a estabilidade de estocagem em 48 h e durante 15, 30 e 60 dias frente às temperaturas de 20 e 40 °C, realizando-se análises organolépticas, estabilidade acelerada por centrifugação, viscosidade, densidade, atividade de água, umidade, pH e cor instrumental.

## 5.2. Metodologia

### 5.2.1. Preparação da emulsão semi-sólida O/A e incorporação do AH em creme cosmético

A emulsão semi-sólida O/A foi preparada por adição da fase aquosa (EDTA-dissódico; metilparabeno (4-hidroxibenzoato de metilo); glicerina e água purificada) a fase oleosa (Polawax (álcool Cetoestearílico e Monoestearato de Sorbitano Etoxilado); propilparabeno (propyl 4-hydroxybenzoate); butil-hidroxitolueno e vaselina líquida), mediante agitação automática (agitador Unguator) até a formação de creme durante 2 min para homogeneização completa, manteve-se esta agitação até o resfriamento. Partindo da formulação-base, foram preparadas emulsões contendo AH nas percentagens de 0,1 e 0,5% (m/m), a incorporação foi realizada com o AH em pó, manualmente.

### 5.2.2. Caracterização das formulações cosméticas

Estabilidade de estocagem: As formulações (sem AH (creme base) e com 0,1% e 0,5%, m/m, de AH), foram acondicionadas em recipientes de plástico e armazenadas em estufa a 20 °C e 40 °C, durante 60 dias, sendo realizadas análises de aspecto visual, estabilidade acelerada por centrifugação, viscosidade, densidade, atividade de água, umidade, pH e cor instrumental. As análises foram realizadas no tempo 0 (48 h), em 15, 30 e 60 dias.

Análise organoléptica/aspecto visual: é o que pode assegurar o desempenho de um item, a avaliação sensorial, como já diz o nome, é uma avaliação através dos órgãos dos sentidos. Foi realizada por análise visual, olfactiva e táctil.

Estabilidade acelerada por centrifugação: O ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação foi realizado a primeira vez 48 h após a preparação das amostras. Colocou-se cerca de 3 mL de cada amostra em tubos graduados, que foram submetidos a 2 ciclos de centrifugação (Centrífuga Eppendorf 5804) de 30 minutos cada, a 5000 rpm, a temperatura de 25 °C e analisados quanto ao volume de líquido (mL) liberados e aspecto visual.

Viscosidade: A determinação da viscosidade foi realizada a temperatura constante de 25 °C utilizando viscosímetro Thermo Haake T550.

Densidade: A densidade das formulações foi obtida através da relação massa/volume determinada em proveta.

Atividade de água: A atividade de água foi determinada em analisador de atividade de água DECAGON, modelo Pawkit, com amostra a temperatura ambiente.

Umidade: A umidade das formulações cosméticas foi determinada em estufa com recirculação de ar (Fanem, modelo 320-SE), com aproximadamente 2 g de amostra a 105 °C por aproximadamente 4 h ou até massa constante de acordo com AOAC (2005).

pH: O pH das formulações cosméticas foi medido em pHmetro (Digimed, modelo DM-22) de acordo com AOAC (2005), na proporção de 1/10 (v/v).

Cor instrumental: A cor foi determinada através de colorímetro (Minolta Chroma Meter, modelo CR-400), no sistema de cor CIELAB, com os três componentes, L\* (luminosidade ou brilho) cujo valor varia entre zero (preto) e 100 (branco), e as coordenadas de cromaticidade a\* e b\* que variam de -a\* (verde) até +a\* (vermelho), e de -b\* (azul) até +b\* (amarelo). O cálculo da tonalidade cromática (C\*) foi realizado através dos valores obtidos diretamente do colorímetro, através da Equação 1.

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (1)$$

Análise estatística: Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 95% de confiança utilizando o software Statistica (versão 5.0 StatSoft, Inc., Tulsa OK, USA).

### **5.3. Resultados e discussões**

#### **5.3.1. Preparação e incorporação do AH em creme cosmético**

Foram elaboradas 3 formulações de creme cosmético do tipo O/A (creme base - sem AH, com adição de 0,1 e 0,5% de AH). O aspecto visual das 3 formulações pode ser observado na Figura 5.2.

**Figura 5.2-** Aspecto visual das formulações do creme-base e com adição de AH.



**Fonte:** O autor (2022).

“Os caracteres organolépticos constituem o indicativo mais acessível para se avaliar a qualidade de uma preparação semi-sólida e para detectar alterações. O simples exame visual pode funcionar como um indicativo, por vezes perfeito, da homogeneidade da preparação. Qualquer indivíduo, após a aplicação de um creme na pele, submete-o, involuntariamente, a uma análise visual, olfactiva e táctil. A cor e o aroma são dois índices seguros para elucidar quanto ao estado de conservação da preparação, pelo que uma mudança de cor ou um cheiro diferente, mais ou menos pronunciado, são indícios de que houve alteração” (OLIVEIRA, 2009).

De acordo com a análise organoléptica realizada, as amostras de creme, após 60 dias de armazenamento, apresentaram aspecto visual de coloração branca, cheiro característico de creme comercial e aspecto homogêneo (Figura 3), indicando que não houve oxidação do AH.

### 5.3.2. Caracterização das formulações cosméticas

#### *Estabilidade acelerada por centrifugação*

A estabilidade de uma preparação farmacêutica está relacionada com a sua capacidade de resistir a alterações físicas e/ou químicas. No método de centrifugação, a força gravitacional atua sobre o produto, promovendo o movimento das suas partículas. A centrifugação gera estresse na preparação ao simular um aumento da força da gravidade, permitindo, assim, antecipar possíveis alterações de estabilidade. Estas alterações podem ser observadas sob a forma de precipitados, ocorrência de separação de fases, formação de sedimentos compactos, coalescência, entre outros. As amostras são centrifugadas a

temperatura, tempo e velocidade padronizados e depois são verificadas visualmente (OLIVEIRA, 2009).

No que faz referência à análise de estabilidade acelerada, nenhuma formulação apresentou separação de fases, permanecendo homogêneas durante todo o período em que ficaram armazenadas, independente da temperatura (20 e 40 °C), como apresentado na Figura 5.3.

**Figura 5.3-** Aspecto visual das formulações de creme após a análise de estabilidade acelerada.



**Fonte:** O autor (2022).

### *Viscosidade*

A viscosidade é uma força de atrito entre as camadas adjacentes dos fluidos. Em outras palavras, a viscosidade é uma resistência sob a forma de atrito interno. Esta grandeza também depende da temperatura, isto é, quanto maior a temperatura, maior a agitação das moléculas e com maior facilidade escorre um líquido ou um sólido, portanto, temperatura e viscosidade são grandezas inversamente proporcionais: quando a temperatura aumenta, a viscosidade tende a diminuir (BERTULANI, 1999).

Alguns fluidos apresentam mudanças na viscosidade em função do tempo, sob condições constantes de tensão de corte, pelo que se consideram duas categorias: os fluidos com tixotropia e os fluidos com reopexia. Os materiais plásticos não fluem quando lhes é

aplicada uma baixa tensão de corte, podendo, nestas circunstâncias, apresentar propriedades elásticas. Contudo, estes materiais necessitam de um valor mínimo de tensão de corte (valor de cedência), a partir do qual iniciam o escoamento (é o que acontece com determinados cremes) (OLIVEIRA, 2009).

São diversos os métodos utilizados para se determinar a viscosidade. Os mais comumente empregados utilizam viscosímetros rotativos, de orifício e capilares. A determinação por viscosímetro rotativo consiste na medição do torque requerido para rodar uma agulha imersa numa amostra. Dependendo da faixa de viscosidade da amostra, seleciona-se a agulha (*spindle*) adequada (OLIVEIRA, 2009). No presente estudo, o *spindle* utilizado foi de 25, a temperatura de 25°C e rotação de 10 rpm. Os resultados obtidos para as amostras de cosméticos armazenadas em diferentes condições são apresentados na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1-** Resultados de viscosidade do creme cosmético contendo AH armazenado a 20 e 40 °C por um período de 60 dias.

Temp. de estocagem (°C)	Amostras	Armazenamento (dias)			
		0	15	30	60
20 °C	Sem AH	17494 <sup>cBa</sup> ± 646	23115 <sup>bBa</sup> ± 347	18299 <sup>cBb</sup> ± 487	24224 <sup>aBb</sup> ± 94
	0,1% de AH	21953 <sup>aAa</sup> ± 628	19326 <sup>cCb</sup> ± 241	17260 <sup>dBb</sup> ± 735	20202 <sup>bCb</sup> ± 81
	0,5% de AH	22505 <sup>dAa</sup> ± 68	24351 <sup>cAa</sup> ± 415	25051 <sup>bAa</sup> ± 220	31142 <sup>aAa</sup> ± 91
	Sem AH	8944 <sup>dCb</sup> ± 232	22011 <sup>bAb</sup> ± 264	20844 <sup>cAa</sup> ± 402	30423 <sup>aAa</sup> ± 44
	0,1% de AH	19499 <sup>cBb</sup> ± 808	21259 <sup>bCa</sup> ± 48	18379 <sup>dBa</sup> ± 128	26412 <sup>aBa</sup> ± 69
40 °C	0,5% de AH	23464 <sup>aAa</sup> ± 1570	22167 <sup>aAb</sup> ± 122	18796 <sup>cBb</sup> ± 147	2195 <sup>bCb</sup> ± 168

\*Médias±Desvio Padrão seguidas de letra iguais minúsculas/maiúsculas/minúsculas na linha/coluna/coluna indicam não diferem estatisticamente entre si, a nível de confiança de 95%.

Fonte: O autor (2022).

Analisando os resultados obtidos, percebeu-se que o creme-base (sem AH) teve um aumento na viscosidade ao final dos 60 dias em ambas as temperaturas de estocagem (20 e 40°C).

Para o creme contendo 0,1% (m/m) de AH a 20°C, observa-se a maior viscosidade no tempo 0 (48 h), não apresentando diferença significativa nos períodos de 15, 30 e 60 dias.

O cosmético armazenado a 40°C, apresentou um comportamento oposto, com a maior viscosidade sendo observada ao final dos 60 dias, porém, assim como em 20°C, também não apresentou diferença significativa em relação aos demais tempos. Para o creme contendo 0,5% (m/m) de AH a 20°C, observa-se uma tendência contrária ao armazenado a 40°C, apresentando a maior viscosidade em 60 dias de armazenamento.

Ao analisar todas as formulações, nota-se que o creme contendo 0,5% (m/m) de AH, na temperatura de 20°C ao final dos 60 dias, apresentou a maior viscosidade, 31.142 cP. Esse valor pode ter sido conduzido pelo fato de que a formulação ficou em temperatura ambiente até a análise de viscosidade ter sido realizada, há a possibilidade de ter tido influência da temperatura externa.

Os limites de aceitação no que faz referência à viscosidade devem ser definidos pelo formulador considerando-se a percepção visual decorridas de alterações. Deve-se levar em conta a possibilidade de o consumidor também reconhecê-las (BRASIL, 2004).

Segundo Amiralian e Fernandes (2018), os cremes apresentam alta viscosidade e, de acordo com as análises organolépticas, os resultados obtidos são aceitáveis.

### *Densidade*

A densidade dos materiais é inversamente proporcional ao volume, e o volume, por sua vez, é uma grandeza que varia com a temperatura e a pressão. Portanto, se aumentar a temperatura, as partículas ou moléculas constituintes da substância irão se expandir, aumentando o volume e, conseqüentemente, diminuindo a densidade. O contrário também é verdadeiro. Conclui-se, portanto, que a densidade é inversamente proporcional à temperatura, isto é, com o aumento da temperatura a densidade diminui e, diminuindo a temperatura, a densidade aumenta.

Os resultados de densidade para os cosméticos armazenados em diferentes condições são apresentados na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2-** Resultados de densidade do creme cosmético contendo AH armazenado a 20 e 40 °C por um período de 60 dias.

Temp. de estocagem (°C)	Amostras	Armazenamento (dias)			
		0	15	30	60
20 °C	Sem AH	1,02 <sup>bAa</sup> ± 0,08	1,07 <sup>bAa</sup> ± 0,06	1,18 <sup>aAa</sup> ± 0,03	1,01 <sup>bBa</sup> ± 0,00
	0,1% de	0,98 <sup>bcAa</sup>	1,27 <sup>aAa</sup>	1,05 <sup>bBa</sup>	0,95 <sup>cBb</sup>
	AH	± 0,08	± 0,13	± 0,04	± 0,02

40 °C	0,5% de AH	0,91 <sup>cAb</sup> ± 0,03	1,16 <sup>bAa</sup> ± 0,07	1,11 <sup>bABa</sup> ± 0,03	1,35 <sup>aAa</sup> ± 0,03
	Sem AH	1,01 <sup>bAa</sup> ± 0,08	1,15 <sup>aAa</sup> ± 0,06	1,05 <sup>abAb</sup> ± 0,03	1,01 <sup>bAa</sup> ± 0,03
	0,1% de AH	0,96 <sup>bcAa</sup> ± 0,05	0,90 <sup>cBb</sup> ± 0,03	0,96 <sup>bAb</sup> ± 0,02	1,03 <sup>aAa</sup> ± 0,01
	0,5% de AH	1,09 <sup>aAa</sup> ± 0,07	1,08 <sup>aAa</sup> ± 0,02	0,92 <sup>bAb</sup> ± 0,09	0,95 <sup>bBb</sup> ± 0,01

\*Médias±Desvio Padrão seguidas de letras iguais minúsculas/maiúsculas/minúsculas na linha/coluna/coluna indicam que não diferem estatisticamente entre si, a nível de confiança de 95%.

Fonte: O autor (2022).

Os valores de densidade oscilaram entre 0,90 e 1,35 g/mL. Esta oscilação possivelmente ocorreu devido à metodologia utilizada, já que foi determinada a densidade em provetas, não sendo um método tão preciso.

O Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos preconiza que a densidade em cremes deve apresentar valores entre 0,95 e 1,05 g/cm<sup>3</sup> (BRASIL, 2008).

Para o creme adicionado de 0,1% de AH a 20°C, a densidade aumentou significativamente ao final dos 15 dias. Na temperatura de 40°C, observa-se um aumento ao final dos 60 dias. Para o creme contendo 0,5% de AH a 20°C, a densidade aumentou ao longo do tempo de armazenamento. Já quando armazenado a 40°C ocorreu o oposto, a densidade diminuiu ao longo do período de armazenamento.

Estão dentro dos limites de aceitação as formulações sem AH, aos 20°C, no tempo 0 e ao final dos 60 dias e com 0,1% de AH no tempo 0, aos 30 e 60 dias. Aos 40°C, atendem ao referido guia as formulações sem AH no tempo 0, aos 30 e 60 dias. Para o creme com 0,1%, somente não se encaixa a formulação armazenada ao final dos 15 dias. Por fim, para 0,5% de AH, o valor está dentro do limite apenas ao final dos 60 dias.

### *Atividade de água*

Para a atividade de água (Tabela 5.3), os valores obtidos em todas as formulações foram muito próximos, entre 0,90 e 0,98, com baixos desvios padrões. Não se observam variações estatisticamente significativas entre as amostras com o tempo de armazenamento a 20°C. As variações se manifestam entre as temperaturas e tempos de armazenamento a 40°C, onde a temperatura por ser mais elevada proporciona efeitos mais intensos sobre as amostras, conduzindo a tais diferenças.

**Tabela 5.3-** Resultados de aw do creme cosmético contendo AH armazenado a 20 e 40 °C por um período de 60 dias.

Temp. de estocagem (°C)	Amostras	Armazenamento (dias)			
		0	15	30	60
20 °C	Sem AH	0,97 <sup>aAa</sup>	0,98 <sup>aAa</sup>	0,97 <sup>aBb</sup>	0,96 <sup>aAa</sup>
		± 0,01	± 0,00	± 0,00	± 0,01
	0,1% de AH	0,97 <sup>aAa</sup>	0,98 <sup>aAa</sup>	0,98 <sup>aAa</sup>	0,96 <sup>aAa</sup>
		± 0,01	± 0,01	± 0,00	± 0,01
	0,5% de AH	0,97 <sup>aAa</sup>	0,98 <sup>aAa</sup>	0,97 <sup>aAa</sup>	0,97 <sup>aAa</sup>
		± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,01
40 °C	Sem AH	0,94 <sup>cAa</sup>	0,97 <sup>bAb</sup>	0,98 <sup>aAa</sup>	0,90 <sup>cBb</sup>
		± 0,05	± 0,00	± 0,00	± 0,01
	0,1% de AH	0,97 <sup>bAa</sup>	0,98 <sup>aAa</sup>	0,96 <sup>cAb</sup>	0,97 <sup>bAa</sup>
		± 0,00	± 0,01	± 0,01	± 0,01
	0,5% de AH	0,97 <sup>bAa</sup>	0,98 <sup>aAa</sup>	0,98 <sup>abAa</sup>	0,97 <sup>abAa</sup>
		± 0,00	± 0,00	± 0,01	± 0,01

\*Médias±Desvio Padrão seguidas de letras iguais minúsculas/maiúsculas/minúsculas na linha/coluna/coluna indicam que não diferem estatisticamente entre si, a nível de confiança de 95%.

Fonte: O autor (2022).

### Umidade

Este fator pode afetar diversas formas cosméticas, mas principalmente as sólidas como talco, sabonete em barra, sombra, sais de banho, entre outras. Podem ocorrer alterações no aspecto físico do produto, tornando-o amolecido, pegajoso ou modificando peso ou volume, como também contaminação microbiológica (BRASIL, 2004). Segundo a Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos, uma abordagem sobre ensaios físico-químicos de 2008, a umidade não é um ensaio aplicável para creme, loção, gel ou óleo para o rosto/corpo/cabelos/mãos/pés, no entanto, foi realizado para verificar os valores que seriam obtidos.

A Tabela 5.4 apresenta os resultados de umidade para os cremes cosméticos produzidos com e sem a incorporação de AH, armazenados por 60 dias a diferentes temperaturas.

**Tabela 5-** Resultados de umidade do creme cosmético contendo AH armazenado a 20 e 40 °C por um período de 60 dias.

Temp. de estocagem (°C)	Amostras	Armazenamento (dias)			
		0	15	30	60
20 °C	Sem AH	15,30 <sup>bAa</sup> ± 0,01	14,51 <sup>cAa</sup> ± 0,60	16,32 <sup>aAa</sup> ± 1,05	15,95 <sup>aBb</sup> ± 0,13
	0,1% de AH	10,82 <sup>bBa</sup> ± 1,00	14,61 <sup>aBa</sup> ± 1,0	15,41 <sup>aAa</sup> ± 0,99	16,01 <sup>aBa</sup> ± 0,62
	0,5% de AH	14,29 <sup>cBa</sup> ± 0,6	16,09 <sup>bBa</sup> ± 0,1	16,35 <sup>abAa</sup> ± 1,10	17,49 <sup>aAa</sup> ± 0,16
	Sem AH	12,79 <sup>dAb</sup> ± 0,02	14,83 <sup>cAa</sup> ± 0,12	15,30 <sup>bBa</sup> ± 0,1	16,99 <sup>aAa</sup> ± 0,17
	0,1% de AH	12,12 <sup>cAb</sup> ± 0,02	14,35 <sup>bAa</sup> ± 0,62	16,54 <sup>aAa</sup> ± 0,86	16,60 <sup>aAa</sup> ± 0,53
40 °C	0,5% de AH	12,41 <sup>cAb</sup> ± 1,00	14,32 <sup>bAb</sup> ± 0,09	16,43 <sup>aAa</sup> ± 0,61	16,20 <sup>aAb</sup> ± 0,11

\*Médias±Desvio Padrão seguidas de letras iguais minúsculas/maiúsculas/minúsculas na linha/coluna/coluna indicam que não diferem estatisticamente entre si, a nível de confiança de 95%.

**Fonte:** O autor (2022).

Os resultados demonstram um aumento da umidade dos cremes com o decorrer do tempo de estocagem, independentemente da temperatura de armazenamento. Pode ter ocorrido uma condensação de água na tampa, e esta, portanto, escorreu para a formulação cosmética, aumentando a umidade.

### *pH*

O pH de uma preparação para aplicação cutânea constitui um parâmetro extremamente importante, uma vez que cada produto deve apresentar pH compatível com a região do corpo onde se aplica. A pele tem, normalmente, um pH médio de 5,5, embora este valor possa variar ligeiramente conforme as diferentes zonas do corpo (OLIVEIRA, 2009).

Os produtos cosméticos de aplicação cutânea são frequentemente formulados com um pH ligeiramente ácido, uma vez que a pele, em resultado de fatores endógenos encontra-se revestida por um manto ácido: o filme hidrolipídico. Assim, um pH entre 4 e 4,5 favorece a integridade cutânea, evitando a instalação de organismos patogênicos que têm frequentemente preferência por meios mais alcalinos. Além disso, o pH ligeiramente ácido poderá contribuir para melhorar a estabilidade química e microbiológica do produto cosmético, assim como aumentar a sua eficácia (PORTO, 2018).

Os resultados de pH das amostras de creme cosmético contendo AH armazenado a 20 e 40°C por um período de 60 dias são apresentados na Tabela 5.5.

**Tabela 5.5-** Resultados de pH do creme cosmético contendo AH armazenado a 20 e 40 °C por um período de 60 dias.

Temp. de estocagem (°C)	Amostras	Armazenamento (dias)			
		0	15	30	60
20 °C	Sem AH	6,03 <sup>aAa</sup> ± 0,21	5,27 <sup>bAa</sup> ± 0,17	4,7 <sup>cAa</sup> ± 0,12	4,47 <sup>cAa</sup> ± 0,11
	0,1% de AH	5,19 <sup>aBb</sup> ± 0,07	4,67 <sup>bBa</sup> ± 0,04	4,81 <sup>bcAa</sup> ± 0,26	4,38 <sup>cAa</sup> ± 0,20
	0,5% de AH	6,07 <sup>aAa</sup> ± 0,16	4,93 <sup>bABa</sup> ± 0,08	4,76 <sup>bAa</sup> ± 0,25	4,20 <sup>cAb</sup> ± 0,06
	Sem AH	6,21 <sup>aAa</sup> ± 0,01	4,58 <sup>bBb</sup> ± 0,09	4,40 <sup>bBb</sup> ± 0,09	3,80 <sup>cBb</sup> ± 0,04
	0,1% de AH	6,15 <sup>aAa</sup> ± 0,09	4,58 <sup>bBa</sup> ± 0,06	4,19 <sup>cCb</sup> ± 0,10	3,95 <sup>dBa</sup> ± 0,13
40 °C	0,5% de AH	6,14 <sup>aAa</sup> ± 0,12	6,14 <sup>aAa</sup> ± 0,12	5,35 <sup>bAb</sup> ± 0,22	5,03 <sup>bAa</sup> ± 0,25

\*Médias±Desvio Padrão seguidas de letras iguais minúsculas/maiúsculas/minúsculas na linha/coluna/coluna indicam que não diferem estatisticamente entre si, a nível de confiança de 95%.

Fonte: O autor (2022).

Os valores de pH oscilaram entre 3,80 e 6,21. Observa-se que todas as formulações de creme, independente da temperatura (20 e 40 °C), apresentaram uma diminuição do pH em função do tempo de armazenamento, com as maiores variações sendo observadas a 40 °C e apresentaram valores de pH < 5,0 com 60 dias de armazenamento. Em alguns casos, como na amostra sem AH a 40 °C, esta diferença é superior a duas (2) unidades de pH com 60 dias de armazenamento, o que corresponde a um aumento da concentração de íons protônicos (H+(aq)) superior a 100 vezes.

Esta tendência, com uma maior variação do pH com o armazenamento, para as amostras a 40 °C, foi vinculada ao processo de acidificação, o que provavelmente ocorre por reações de oxidação, conduzindo a formação de ácidos orgânicos, que são favorecidas pela temperatura, um parâmetro reconhecido por aumentar a velocidade das reações, favorecendo assim a acidificação das amostras armazenadas a 40 °C, em relação as armazenadas a 20 °C (ATKINS; JONES; LAVERMAN, 2018). As reações de oxidação podem ser evitadas com o uso de antioxidantes e melhores condições de armazenamento. O lugar ideal para se armazenar um creme é em armário seco, ao abrigo da luz.

As formulações sem AH e com 0,1% armazenados a 40 °C ao final dos 60 dias, obtiveram um pH mais ácido (3,80 e 3,95, respectivamente) em relação às outras formulações, não sendo tão ideais para a pele. Já os outros cremes estão na faixa ideal de pH.

### *Cor*

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasil (2008), a análise da cor (colorimetria) pode ser realizada por meio visual ou instrumental. Na análise visual (colorimetria visual) compara-se visualmente a cor da amostra com a cor de um padrão armazenado em frasco da mesma especificação. Pode-se efetuar essa análise sob condições de luz “branca” natural ou artificial ou ainda em câmaras especiais, com várias fontes de luz (ou seja, vários comprimentos de onda). A análise instrumental substitui o olho humano como detector e pode ser feita por meio da colorimetria fotoelétrica ou da colorimetria espectrofotométrica. A colorimetria fotoelétrica é o método que utiliza uma célula fotoelétrica como detector. É usualmente empregado com luz contida em um intervalo relativamente estreito de comprimento de onda obtido pela passagem da luz branca através de filtros. Os aparelhos utilizados nesse método são conhecidos como colorímetros ou fotômetros de filtro (BRASIL, 2008).

Por meio de um colorímetro, obtiveram-se os seguintes resultados (Tabela 5.6): para o creme-base a temperatura de 20 °C, o maior valor de L\* (luminosidade ou brilho), 64,32, foi ao final dos 30 dias, contudo, os valores não diferiram significativamente entre si. Para a coordenada de cromaticidade a\*, que varia de -a\* (verde) até +a\* (vermelho), o maior valor obtido, 0,70, foi no tempo 0. Para a coordenada b\* que varia de -b\* (azul) até +b\* (amarelo), o valor maior foi ao final dos 60 dias, -3,07, os outros valores não apresentaram diferença significativa. Comparando com o creme-base a 40 °C, todos os valores apresentaram semelhança.

Para o creme com 0,1% de AH, os maiores valores de L\* se deram na temperatura maior, embora aos 20 °C os valores ainda sejam próximos. Para a\*, os maiores valores estão na temperatura de 20 °C. Para b\*, os maiores valores prevaleceram na temperatura de 40 °C.

Já para o creme produzido com 0,5% de AH, os valores de L\* foram aproximados em ambas as temperaturas. Para a coordenada a\*, os valores foram maiores na temperatura de 40 °C para o tempo 0, aos 15 e 60 dias. E, por fim, para b\*, na menor temperatura os valores foram maiores.

**Tabela 5.6-** Resultado de cor instrumental (L\*, a\*, b\* e C\*) do creme cosmético contendo AH armazenado a 20 e 40 °C por período de 60 dias.

Temperatura de estocagem das amostras (°C)	Armazenamento (dias)																
	0				15				30				60				
	Parâmetros de cor				Parâmetros de cor				Parâmetros de cor				Parâmetros de cor				
	L*	a*	b*	C*	L*	a*	b*	C*	L*	a*	b*	C*	L*	a*	b*	C*	
20 °C	Sem AH	52,73 <sup>dCb</sup>	0,70 <sup>aBa</sup>	-3,22 <sup>cAa</sup>	3,3 <sup>cAb</sup>	61,60 <sup>bAa</sup>	0,30 <sup>cBb</sup>	-4,27 <sup>aAa</sup>	4,28 <sup>aAa</sup>	64,32 <sup>aBa</sup>	0,21 <sup>dAa</sup>	-3,77 <sup>bAa</sup>	3,78 <sup>bAa</sup>	58,48 <sup>cBa</sup>	0,68 <sup>bBa</sup>	-3,07 <sup>cAb</sup>	3,14 <sup>dAb</sup>
		± 0,46	± 0,06	± 0,03	± 0,12	± 1,15	± 0,03	± 0,13	± 0,1	± 0,12	± 0,05	± 0,01	± 0,14	± 1,06	± 0,01	± 0,17	± 0,09
	0,1% de AH	59,10 <sup>cAb</sup>	1,25 <sup>aAa</sup>	-2,91 <sup>cBb</sup>	3,17 <sup>cBb</sup>	62,43 <sup>bAb</sup>	0,50 <sup>bAa</sup>	-4,14 <sup>aAa</sup>	4,18 <sup>aBa</sup>	67,49 <sup>aAa</sup>	0,16 <sup>cAa</sup>	-3,64 <sup>bBa</sup>	3,64 <sup>bBa</sup>	53,73 <sup>dCb</sup>	1,37 <sup>aAa</sup>	-2,73 <sup>cAa</sup>	3,05 <sup>dBa</sup>
		± 0,31	± 0,07	± 0,15	± 0,12	± 0,08	± 0,02	± 0,02	± 0,12	± 0,22	± 0,13	± 0,03	± 0,16	± 0,61	± 0,24	± 0,27	± 0,1
	0,5% de AH	57,16 <sup>cBa</sup>	0,32 <sup>aCa</sup>	2,64 <sup>aCb</sup>	2,66 <sup>aCb</sup>	57,35 <sup>cBb</sup>	0,23 <sup>cCb</sup>	-2,56 <sup>bBb</sup>	2,57 <sup>bCb</sup>	61,92 <sup>bCb</sup>	0,20 <sup>dAa</sup>	-2,30 <sup>cBb</sup>	2,31 <sup>cCb</sup>	62,65 <sup>aAa</sup>	0,24 <sup>bCb</sup>	-2,06 <sup>dBb</sup>	2,08 <sup>dCb</sup>
		± 0,13	± 0,05	± 0,01	± 0,51	± 0,14	± 0,01	± 0,02	± 1,61	± 0,03	± 0,06	± 0,03	± 1,33	± 0,09	± 0,01	± 0,01	± 0,97
40 °C	Sem AH	56,4 <sup>dBa</sup>	0,68 <sup>aAa</sup>	-3,30 <sup>cAa</sup>	3,77 <sup>bBa</sup>	61,15 <sup>bBa</sup>	0,42 <sup>cBa</sup>	-3,52 <sup>aAb</sup>	3,54 <sup>aAb</sup>	63,56 <sup>aAb</sup>	0,24 <sup>dAa</sup>	-3,29 <sup>bAb</sup>	3,3 <sup>bAb</sup>	57,77 <sup>cBa</sup>	0,45 <sup>bABb</sup>	-3,48 <sup>bAa</sup>	3,51 <sup>aAa</sup>
		± 0,77	± 0,02	± 0,14	± 0,09	± 0,01	± 0,02	± 0,01	± 0,56	± 0,36	± 0,04	± 0,05	± 0,22	0,34	± 0,01	± 0,01	± 2,53
	0,1% de AH	60,34 <sup>cAa</sup>	0,42 <sup>bBb</sup>	-3,43 <sup>bAa</sup>	3,46 <sup>aAa</sup> ±	64,19 <sup>aAa</sup>	0,50 <sup>aAa</sup>	-2,92 <sup>dBb</sup>	2,96 <sup>cBb</sup>	64,09 <sup>bAb</sup>	0,2 <sup>cCa</sup> ±	- 3,08 <sup>cBb</sup>	3,08 <sup>bBb</sup>	61,49 <sup>cAa</sup>	0,39 <sup>bBb</sup>	-0,9 <sup>aBb</sup> ±	3,98 <sup>dCb</sup>
		± 0,33	± 0,01	± 0,02	0,1	± 0,25	± 0,01	± 0,03	± 0,03	± 0,17	0,02	± 0,01	± 0,21	± 0,77	± 0,06	0,11	± 1,73
	0,5% de AH	57,4 <sup>dBa</sup>	0,34 <sup>cCa</sup>	-2,70 <sup>bBa</sup>	2,72 <sup>bCa</sup>	61,52 <sup>bBa</sup>	0,43 <sup>bBa</sup>	-2,91 <sup>aBa</sup>	2,94 <sup>aBa</sup>	63,63 <sup>aAa</sup>	0,15 <sup>dBa</sup>	-2,71 <sup>bCa</sup>	2,71 <sup>bCa</sup>	60,75 <sup>cAb</sup>	0,48 <sup>aAa</sup>	-2,66 <sup>cBa</sup>	2,7 <sup>bBa</sup>
		± 0,18	± 0,03	± 0,01	± 0,74	± 0,09	± 0,02	± 0,01	± 0,02	± 0,83	± 0,03	± 0,01	± 0,37	± 0,08	± 0,02	± 0,01	± 0,81

\*Médias±Desvio Padrão seguidas de letras iguais minúsculas/maiúsculas/minúsculas na linha/coluna/coluna indicam que não diferem estatisticamente entre si, a nível de confiança de 95%.

Fonte: O autor (2022).

#### 5.4. Conclusão

A elaboração de creme cosmético tipo O/A com AH produzido por fermentação submersa apresentou características organolépticas adequadas para um produto com fins de uso estético. Observou-se também uma boa estabilidade, não havendo separação de fases nos testes realizados, em vista disso, conclui-se que houve uma homogeneização das fases O/A de forma adequada durante o seu preparo.

De forma geral, não houve diferenças significativas no que tange as análises físicas do creme, entre as diferentes composições (0,1 e 0,5%) e entre as temperaturas de armazenamento (20 e 40 °C), sugerindo que todas as formulações podem ser utilizadas em trabalhos futuros.

#### 5.5. Referências

- AL-KHATEEB, R.; OLSZEWSKA-CZYŻ, I. Biological molecules in dental applications: hyaluronic acid as a companion biomaterial for diverse dental applications. **Heliyon**, v. 6, n. 4, p. 1-6, 2020.
- AMIRALIAN, L.; FERNANDES, C. R. Fundamentos da Cosmetologia: Cremes e loções. **Cosmetics & Toiletries**, v. 30, p. 1-3, 2018.
- AOAC. Método Oficial de Análise. 18ª Edição, **Association of Officiating Analytical Chemists**, Washington DC, Método 935.14 e 992.24. 2005.
- ATKINS, P.; JONES, L.; LAVERMAN, L. **Princípios de Química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Porto Alegre: Bookman, 2018.
- BERNARDES, I. N.; COLI, B. A.; MACHADO, M. G.; OZOLINS, B. C.; SILVÉRIO, F. R.; VILELA, C. A.; ASSIS, I. B. de.; PEREIRA, L. Preenchimento com ácido hialurônico – revisão de literatura. **Revista Saúde em Foco**, Minas Gerais, n. 10, p. 603-612, 2018.
- BERTULANI, C. **Viscosidade, turbulência e tensão superficial**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 30 ago. 1999. Disponível em: <https://www.if.ufrj.br/~bertu/fis2/hidrodinamica/viscosidade.html>. Acesso em: 12 jun. 2022.
- BRASIL. Cosméticos. **Guia da estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, DF, v. 01, 2004.
- BRASIL. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. **Uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos**. Brasília, DF, 2008.

- BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 7**, de 10 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2015.
- FERREIRA, N. R.; CAPOBIANCO, M. P. Uso do ácido hialurônico na prevenção do envelhecimento facial. **Revista Científica UNILAGO**. v. 1, n. 1, p. 1-10, 2016.
- GOMES, R. K.; DAMAZIO, M. G. **Cosmetologia: descomplicando os princípios ativos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2009.
- GUPTA, R. C.; LALL, R.; SRIVASTAVA, A.; SINHA, A. Hyaluronic acid: molecular mechanisms and therapeutic trajectory. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 1-24, 2019.
- HARTH, M. L.; SARGO, C. R.; SANTANA, M. H. A.; ZANGIROLAMI, T. C.; GIORDANO, R. C.; HORTA, A. C. L. Produção de ácido hialurônico: modelagem do cultivo de *Streptococcus zooepidemicus*. In: **XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA**, n. 5, 2018, São Paulo. Pôster. São Paulo, 2018, p. 1-4.
- MAIA, I. E. F.; SALVI, D. O. O Uso Do Ácido Hialurônico Na Harmonização Facial: Uma Breve Revisão. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**, [s. l.], v. 23, p. 135–139, 2018.
- OLIVEIRA, Â. Z. M. **Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico**. 2009. 100f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Farmacêutica) – Universidade do Porto, Portugal, 2009.
- PORTO, Universidade do. Faculdade de Farmácia. **Qual o pH ideal de um produto cosmético?** Porto, 2018.
- RASCHE, W. D. Formulação e análise de gel-creme hidratante facial. **UNIVATES**, p. 1-19, 2014.
- SALLES, A. G.; REMIGIO, A. F. N.; ZACCHI, V. B. L.; SAITO, O. C.; MARCUS CASTRO FERREIRA, M. C. Avaliação clínica e da espessura cutânea um ano após preenchimento de ácido hialurônico. **Revista Brasileira de Cirurgias Plásticas**, São Paulo, p. 66-69, fevereiro, 2011.
- SANTONI, M. T. S. **Uso de ácido hialurônico injetável na estética facial**: uma revisão da literatura. 2018. 24f. Monografia (Estética e Saúde) - Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ, Ijuí, 2018.
- VASCONCELOS, S. C. B.; NASCENTE, F. M.; SOUZA, C. M. D. De; ROCHA SOBRINHO, H. M. Da. O USO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NO REJUVENESCIMENTO FACIAL. **Revista Brasileira Militar de Ciências**, [s. l.], v. 6, n. 14, 2020. Disponível em: <https://rbmc.emnuvens.com.br/rbmc/article/view/28>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com um vasto leque de aplicações, o ácido hialurônico (AH) experimenta uma crescente demanda a cada ano, e os métodos de produção utilizando microrganismos têm se destacado por oferecerem maior rendimento e qualidade do produto. Entre esses métodos, as cepas de *Streptococcus zooepidemicus* se destacam devido à sua notável capacidade de produção de AH.

A utilização desta bactéria imobilizada em espuma de poliuretano, juntamente com as condições operacionais otimizadas, representa uma inovação significativa na comunidade científica, abrindo caminho para uma nova abordagem na produção deste biopolímero.

Adicionalmente, o ácido hialurônico (AH) purificado exibiu notáveis propriedades físicas e biológicas, demonstrando-se não tóxico e abrindo portas para sua aplicação em cremes cosméticos. Essas características promissoras também sugerem perspectivas encorajadoras para sua utilização em produtos alimentícios, incluindo a produção de biofilmes.

## REFERÊNCIAS

- CHO, S. Y.; LEE, S.; YANG, K.; KIM, Y. M.; CHOE, D.; KIM, J. U.; LEE, D.-U.; PARK, J.; ROH, Y. H. Hyaluronic acid hydrolysis using vacuum ultraviolet TiO<sub>2</sub> photocatalysis combined with an oxygen nanobubble system. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 299, p. 120178, 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861722010839>>
- FERREIRA, R. G.; AZZONI, A. R.; SANTANA, M. H. A.; PETRIDES, D. Techno-economic analysis of a hyaluronic acid production process utilizing streptococcal fermentation. **Processes**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 1–16, 2021.
- LU, J.; PENG, W.; LV, Y.; JIANG, Y.; XU, B.; ZHANG, W.; ZHOU, J.; DONG, W.; XIN, F.; JIANG, M. Application of Cell Immobilization Technology in Microbial Cocultivation Systems for Biochemicals Production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 59, n. 39, p. 17026–17034, 2020.
- MA, F.-X.; ACHAGRI, G.; ZHOU, L.-C.; HAO, B.; MA, P.-C. Enhanced performance of polyurethane foam with presence of silica nanoparticles. **Composites Communications**, [s. l.], v. 46, p. 101841, 2024. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452213924000329>>
- MOHAN, N.; PAVAN, S. S.; ACHAR, A.; SWAMINATHAN, N.; SIVAPRAKASAM, S. Calorespirometric investigation of *Streptococcus zooepidemicus* metabolism: Thermodynamics of anabolic payload contribution by growth and hyaluronic acid synthesis. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 152, n. August, p. 107367, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107367>>
- MOON, H.; KIM, S.; JO, B. H.; CHA, H. J. Immobilization of genetically engineered whole-cell biocatalysts with periplasmic carbonic anhydrase in polyurethane foam for enzymatic CO<sub>2</sub> capture and utilization. **Journal of CO<sub>2</sub> Utilization**, [s. l.], v. 39, n. March, p. 101172, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.101172>
- JABBARI, F.; BABAEIPOUR, V.; SAHARKHIZ, S. Comprehensive review on biosynthesis of hyaluronic acid with different molecular weights and its biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 240, p. 124484, 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813023013788>>
- ROSSATTO, A.; TROCADO DOS SANTOS, J.; ZIMMER FERREIRA ARLINDO, M.; SARAIVA DE MORAIS, M.; DENARDI DE SOUZA, T.; SARAIVA OGRODOWSKI, C. Hyaluronic acid production and purification techniques: a review. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 1–11, 2023. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10826068.2022.2042822>>
- SADEGHI; YASAMAN. Produção de Fermentação Processo de Ácido Hialurônico. 2022. [s. l.], 2022.
- SERRA, M.; CASAS, A.; TOUBARRO, D.; BARROS, A. N.; TEIXEIRA, J. A. Microbial Hyaluronic Acid Production: A Review. **Molecules**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 2084, 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/28/5/2084>>

ZHANG, Y.; DONG, J.; XU, G.; HAN, R.; ZHOU, J.; NI, Y. Efficient production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using two-stage semi-continuous fermentation. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 377, p. 128896, 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085242300322X>>