

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA – UNIFOR-MG**  
**CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**MARIANA DE JESUS FREITAS**

**PRODUÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

**FORMIGA – MG**  
**2019**

MARIANA DE JESUS FREITAS

PRODUÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Engenharia Química do UNIFOR- MG, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Duarte Silva

FORMIGA-MG

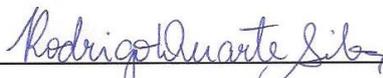
2019

Mariana de Jesus Freitas

PRODUÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Engenharia Química do UNIFOR-MG, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química.

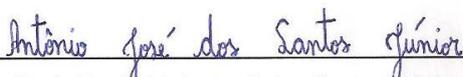
BANCA EXAMINADORA



---

Prof. Dr. Rodrigo Duarte Silva

Orientador



---

Prof. Me. Antônio José dos Santos Júnior

UNIFOR-MG



---

Prof. Neylor Makalister Ribeiro Vieira

UNIFOR-MG

Formiga, 05 de novembro de 2019

## RESUMO

Este trabalho mostra a nova descoberta do Ácido Hialurônico (HA), um polímero natural, encontrado nos seres humanos e produzido pela fermentação em cultivo de *Streptococcus*. O HA possui aplicação nas áreas, médicas, como em cirurgias ortopédicas, oftalmológicas, em cicatrização de ferimentos e na área da cosmetologia, aplicado em géis, cremes facial e corporal, *gloss* e até injetáveis. Há alguns aspectos para a operação da produção do HA pela fermentação. A temperatura muito elevada ou muito baixa, afeta na produção do HA, deixando o mesmo, com uma massa molar baixa ou muito elevada, com isso, perdendo o meio de cultivo. A produção de HA pode ocorrer na presença ou ausência de oxigênio. Na presença do oxigênio, a produção de HA é duvidosa, e com isso propõe que o HA atue como uma defesa protegendo o *Streptococcus* dos efeitos tóxicos do oxigênio. Mostrou-se no trabalho que HA tem inúmeras qualidades, e a tendência dele, é expandir.

Palavras-chave: Ácido Hialurônico. *Streptococcus*. Fermentação.

## **ABSTRACT**

This paper shows the new discovery of Hyaluronic Acid (HA), a natural polymer, found in humans and produced by fermentation in *Streptococcus* cultivation. It has application in the medical areas, such as orthopedic, ophthalmologic surgery, wound healing and cosmetology, applied to gels, facial and body creams, gloss, and even injectables. There are some aspects to the operation of HA production by fermentation, such as the temperature, too high or too low, affects HA production, leaving it with a low or very high spring mass, thereby losing the medium. cultivation. In aeration there is the production of HA in aerobic (presence of O<sub>2</sub>) and anaerobic (absence of O<sub>2</sub>), but the presence of oxygen in HA production is doubtful, and thus proposes that HA acts as a defense protecting *Streptococcus* from toxic effects of oxygen. The work has been shown that HA has innumerable qualities, and its tendency is to expand.

Keywords: Hyaluronic Acid. *Streptococcus*. Fermentation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura Molecular .....	13
Figura 2 – Demonstração das características viscosas e elásticas do HA .....	14
Figura 3 – Produto Chronos da Natura .....	18
Figura 4 – Produto Vichy .....	19
Figura 5 – Produto Biovea .....	19
Figura 6 – Produto da Phállebeauty .....	20
Figura 7 - Células de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (gram positivas) em meio aerado, revestidas por cápsulas de HA.....	24
Figura 8 – Reator BIOCLO III® .....	30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fontes de HA e algumas observações	
.....	22
Tabela 2 – Funções fisiológicas dos principais elementos requeridos pela célula	
.....	27

## LISTA DE NOMENCLATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
C	Celsius
Ca	Cálcio
Co	Cobalto
Cu	Cobre
Da	Deca
EL	Extrato de Leveduras
Fe	Ferro
Fig.	Figura
PT	Trigo
G	Gramas
HA	Ácido Hialurônico
K	Potássio
Kg	Quilograma
Mg	Magnésio
mL	Mililitros
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
Na	Sódio
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OS	Soja
PT	Trigo
Rpm	Rotação por minuto
Zn	Zinco

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. OBJETIVOS .....	10
3. JUSTIFICATIVA .....	11
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	12
4.1  ÁCIDO HIALURÔNICO .....	12
4.1.1  Estrutura Química.....	12
4.1.2  Breve Histórico .....	14
4.2  MERCADO DO ÁCIDO HIALURÔNICO.....	15
4.3  APLICAÇÕES DO ÁCIDO HIALURÔNICO.....	15
4.3.1  Oftalmologia.....	16
4.3.2  Cirurgia e Cicatrização de Ferimentos .....	16
4.3.3  Cirurgia Ortopedia e Reumatologia .....	17
4.3.4  Cosméticos .....	18
4.3.5  Produtos injetáveis.....	20
4.4  FONTES DO ÁCIDO HIALURÔNICO.....	21
4.5  PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO.....	23
4.5.1  Bactérias do Gênero <i>Streptococcus</i> .....	23
4.5.2  Meios de Cultura.....	25
4.5.3  Fontes de Carbono .....	25
4.5.4  Condições de Operações do Processo Fermentativo.....	28
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	31
REFERÊNCIAS.....	32

## 1. INTRODUÇÃO

A nomenclatura do biopolímero ácido hialurônico (HA) sucedeu da ligação entre os termos *hialóide*, que tem o conceito de vítreo, e ácido urônico, que é a denominação de uma das moléculas de monossacarídeo que o compõem (KAKEHI *et al.*, 2005). O HA é um polissacarídeo glicosaminoglicano, que está presente na matriz extracelular da pele, no tecido conectivo e no humor vítreo. Tem as essenciais funções de hidratação, lubrificação e estabilização desses meios. Ele também representa uma possibilidade no tratamento do envelhecimento facial humano e tem sido utilizado há mais de uma década no preenchimento de partes moles do corpo para corrigir depressões, rugas e sulcos (SALLES *et al.*, 2011).

O HA é abundante em nossos corpos quando nascemos, mas os níveis diminuem gradualmente com o passar do tempo. Esta diminuição nos níveis de HA pode ser um sinal do processo de envelhecimento (BIOVEA, 2001). Poucos órgãos são especialmente ricos em HA. São eles: o cordão umbilical, fluido sinovial e o humor vítreo (MACEDO, 2006).

O HA ainda está sendo conhecido pela população. Na área da estética, esse composto tem sido utilizado em abundância com o objetivo de tornar a pele rejuvenescida. Os polímeros resultantes de ambas as fontes de produção do HA mostram o mesmo arranjo química dos vistos em humanos, sendo capaz de distinguir-se apenas com relação à massa molar (PIRES, 2009).

A solução de HA tem um aspecto gelatinoso, com elevada viscoelasticidade e elevado grau de hidratação correspondente às suas características estruturais (KIM *et al.*, 1996). O HA é não-imunogênico e, com isso, existe uma enorme potencialidade de aplicações médicas e cosméticas nas áreas de oftalmologia, ortopedia, cicatrização de feridas, terapia de artrite, prevenção de adesão de cirurgias (HOLMSTRÖM *et al.*, 1967).

O número de investimentos destinados ao HA e o seu grande valor agregado, que pode chegar a U\$ 150/100 mL, explicam os esforços em elaborar alternativas à sua criação (MACEDO, 2006). Argumentando sobre a busca nos dias de hoje por uma sociedade sustentável, estudou-se o uso de derivados agroindustriais como fontes alternativas do carbono e nitrogênio orgânico (PIRES, 2009).

Nesse contexto, este trabalho visa realizar uma revisão sobre o HA, mostrando as principais rotas de sua obtenção e as possibilidades de sua aplicação.

## 2. OBJETIVOS

O atual trabalho, tem o objetivo, apresentar a produção do Ácido Hialurônico (HA) e as vantagens de sua utilização.

Os assuntos abordados neste trabalho foram:

- Produção do HA por meio fermentativo e em tecidos;
- Fontes de HA;
- As condições dos aspectos fermentativos;
- Utilização do HA;
- Aplicações do HA;

### **3. JUSTIFICATIVA**

O Ácido Hialurônico, pouco conhecido pela população, vem sendo conhecido nos últimos anos por meio da área da estética. Esse composto, além de ser produzido em laboratório, é produzido na pele humana. Entretanto, no decorrer da vida, ele vai perdendo a sua concentração. O HA vem ganhando seu espaço aos poucos, mas, por possuir inúmeras qualidades, podendo ser aplicado na área de cirurgias oftalmológicas, ortopédicas, abdominais e em cicatrizes de ferimentos.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica descreverá os principais estudos referentes à produção de ácido hialurônico (HA) pela rota microbiana, através das culturas *Streptococcus*. Também irá descrever suas funções e aplicações.

### 4.1 ÁCIDO HIALURÔNICO

O HA é um polissacarídeo glicosaminoglicano presente na matriz extracelular da pele, no tecido conectivo e no humor vítreo. Suas principais funções são hidratação, lubrificação e estabilização desses meios. Representa uma alternativa importante no tratamento do envelhecimento facial e tem sido empregado há mais de uma década no preenchimento de partes moles para corrigir depressões, rugas e sulcos (SALLES *et al.*, 2011).

O HA tem o catabolismo extremamente rápido, pelo que ao nível da pele, o próprio tempo de semi-vida é inferior a 24 horas. O desgaste do HA pelas enzimas hialuronidases é influenciada por fatores térmicos, enzimáticos e interações oxidativas (interferência de radicais livres). Apesar do seu arranjo simples, o HA detém funções de grande importância em numerosos fenômenos do organismo. As suas funções biológicas baseiam-se no seu peso molecular e resultam da sua interação com determinadas proteínas de ligação e receptores de superfície, pelo que o HA apresenta excelentes características de sinalização celular (OLIVEIRA, 2009).

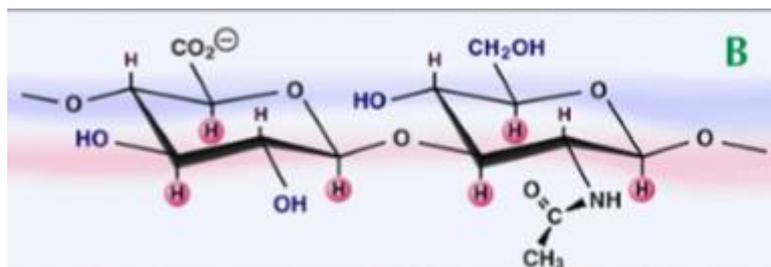
O HA é abundoso em nossos corpos quando nascemos, mas os níveis diminuem gradualmente com o passar do tempo. Esta diminuição nos níveis de HA pode ser uma grande parte do processo de envelhecimento que observamos. O HA, é um ótimo hidratante interno, o mesmo ocorre nas camadas mais profundas da nossa pele conhecida como derme, e aparenta ajudar a conservar a pele lisa devido às suas qualidades de retenção de água (COPYRIGHT; BIOVEA, 2001).

#### 4.1.1 Estrutura Química

O HA é da família dos glicosaminoglicanos, também chamada de mucopolissacarídeo. Ele está presente na substância fundamental ou cimento intercelular dos tecidos animais e nas cápsulas de algumas bactérias

(OGRODOWSKI, 2006). O HA é um polissacarídeo natural e possui uma elevada massa molar. É formado por inúmeras unidades de dissacarídeo, unidas pelas ligações glicosídicas  $\beta$ -1-3 e  $\beta$ -1-4. Sua massa molar varia entre 103 a 107 Da. (HASCALL, 1997; HELDIN, 2003). A FIG. 1, demonstra o arranjo molecular do HA.

Figura 1 – Estrutura Molecular.



Fonte: HASCALL *et. al*, 1997, p. 5.

O HA, pode ser classificado como polissacarídeo polianiónico. Em solução aquosa neutra, ocorrem ligações de hidrogênio no meio das moléculas de água e os grupos carboxila e N-acetil, transferindo ao polímero capacidade de retenção de água e dureza conformacional, que limita a sua maleabilidade (CHONG; BLANK, 1998). Os centros hidrofóbicos da cadeia do HA são responsáveis pelas interações inter e intramoleculares que fornecem rigidez à molécula (GÓMEZ; ALEJANDRE, 2000). O HA pode optar por diferentes conformações dependentes do nível de hidratação, do ambiente iônico e da temperatura (OGRODOWSKI, 2006).

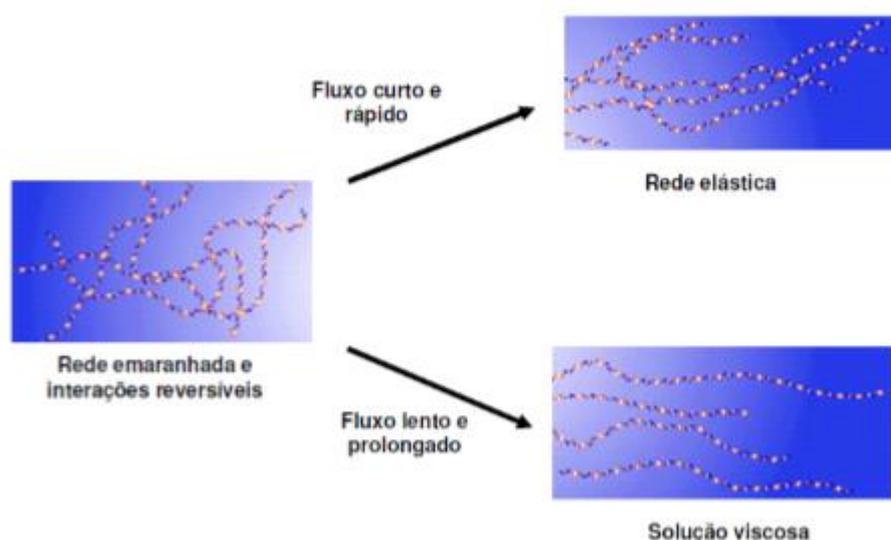
Nas soluções diluídas, em condições semelhantes a condições fisiológicas, HA possui um arranjo anovelado randômico semi-flexível. A solução do HA possui uma textura gelatinosa, alta viscoelasticidade e elevado grau de hidratação, devido os aspectos estruturais da molécula. (BENEDINI, 2012).

Em soluções semi-diluídas, os domínios hidrodinâmicos dos arranjos de HA se superpõem. Devido a essa sobreposição, pode ocorrer a baixas concentrações. Os arranjos do HA têm em sua massa molar  $3 \times 10^6$  Da e começam a se superpor mesmo com concentrações baixas de  $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ . Os arranjos se ajustam diminuindo a dimensão do domínio e a locomoção dos segmentos moleculares tornando-se mais limitados, formando um emaranhado de cadeias (FOUISSAC, 1993).

Assim sendo, o sistema molecular compacto mostra as suas características viscosas e com flexibilidades significantes, que baseia na sua primeira estrutura e comprimento da cadeia molecular, na sua conformação e concentração. As

propriedades elásticas são observadas em que o sistema pode resistir a um fluxo de fluido rápida com pouca duração, repartindo as cargas e forças de cisalhamento no interior da rede. Entretanto, os fluxos de fluido lento e de maior duração podem se dividir parcialmente e alinhar as moléculas, autorizando o seu movimento e expondo propriedades viscosas (HASCALL; LAURENT, 1997). Na FIG. 2, são mostradas as suas características viscosas e elásticas das soluções de HA.

Figura 2 – Demonstração das características viscosas e elásticas do HA.



Fonte: HASCALL; LAURENT, 1997, p. 11.

#### 4.1.2 Breve Histórico

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

Na década seguinte, Meyer e colaboradores se empenharam em isolar o HA presente na pele, articulações, cordão umbilical e crista de galo (LAURENT, T. C. 2002). A nomenclatura deste biopolímero sucedeu da junção entre os termos *hialóide*, que tem o significado de vítreo, e ácido urônico, que é a denominação de uma das moléculas de monossacarídeo que o compõem (LAURENT 2002; KAKEHI; YASUEDA; KINOSHITA, 2003; YAMADA; KAWASAKI, 2005).

## 4.2 MERCADO DO ÁCIDO HIALURÔNICO

O HA está sendo utilizado em inúmeras aplicações na medicina e cosmética desde a década de 60, quando era utilizado para tratamento de queimaduras e ferimentos. Em aplicações médicas, o produto primário comercializado foi Healon da Pharmacia, atualmente Pfizer (Nova Iorque, EUA), um auxiliar cirúrgico usado na extração de catarata, transplante de córnea e em cirurgia de adesão de retina. No ano de 2005, o mercado foi estimado em US \$140 milhões no mundo inteiro e está crescendo com o crescimento da população idosa (LIFECORE, 2019).

Outra aplicação de HA que vem crescendo é a viscosuplementação em articulações com artrite, que foi comercializada pela primeira vez pela Seikagaku (Tóquio, Japão) em 1987. Nos Estados Unidos, a primeira aprovação de HA para viscosuplementação foi em 1997. A partir de então, o mercado tem desenvolvido cerca de 15% ao ano (CHONG, 2005). Em contraste, até então não foi estabelecido um mercado forte de HA na Europa, apesar do mercado ter se iniciado primeiro que nos Estados Unidos. O valor atual do mercado mundial é aproximado de US \$300 milhões no Japão, aproximadamente o mesmo valor nos Estados Unidos e inferior a US \$100 milhões na Europa (QMED, 2019).

Produtos produzidos por HA destinados à administração para adesão têm sido desenvolvidos e, nos Estados Unidos, seu mercado potencial corresponde a US\$300 milhões por ano (GENZYMEBIO-SURGERY, 2019). O mercado mundial para o HA de grau médico corresponde a aproximadamente 1 (uma) tonelada por ano, sendo comercializado a US \$40,000 – 60,000/kg. O volume do mercado de HA empregado na área cosmética é em média de 10 a 20 vezes superior, enquanto o preço se encontra em aproximadamente US\$1,000 – 2,000/kg, dependendo da característica do produto (CHONG, 2005). O número de investimentos determinadas ao HA e o seu grande valor agregado, que pode chegar a US\$ 150/100 mL, explicam os esforços em elaborar alternativas à sua criação (MACEDO, 2006).

## 4.3 APLICAÇÕES DO ÁCIDO HIALURÔNICO

O HA não é imunogênico. Ele tem elevada capacidade de retenção de água e comportamento viscoelástico. Portanto, seu perfil peculiar torna-o adequado para

inúmeras aplicações médicas, cosméticas, nas áreas de oftalmologia, ortopedia, implante de próteses, cicatrização de feridas, terapia de artrite, prevenção de adesão de tecidos em cirurgias, oncologia e dermatologia (HOLMSTRÖM; RICICI, 1967).

Em estudos atuais, o HA não somente tem sido aplicado como fluido lubrificante, mas também como sistema de isenção controlada de fármacos, particularmente, no prolongamento da anestesia em articulações dos ossos e cavidades, tratamento de atropia (SUZUKI, 2001), isenção de agentes quimioterápicos em implantes cirúrgicos (JERNBERG, 1994, AEBISCHER, 2001), implantes de fármacos em cáries dentárias (SUHONEN; SCHUG, 2000), sistema de isenção controlada de antígenos para imunoterapia (PARDOLL, 2001).

#### **4.3.1 Oftalmologia**

O HA é o maior elemento do humor vítreo e é uma macromolécula chave em oftalmologia. Devido a suas propriedades viscoelásticas, o HA é empregado em diversas cirurgias oftalmológicas. Sua maior utilização encontra-se na substituição ou reposição de fluidos vítreos perdidos durante procedimentos como cirurgia de catarata ou implante de córneas (KOGAN, 2007).

Devido a suas propriedades viscosas, o HA tem sido incluído também na composição de colírios, crescendo seu tempo de residência na área e, conseqüentemente, melhorando a disponibilidade do fármaco propriamente dito. O produto primário a base de HA no mercado foi Healon®, derivado de crista de galo fabricado em 1979 pela Biotrics, Inc. (Arlington, MA) e logo após, pela Pharmacia na Suécia, agora Pfizer (Nova Iorque, EUA). Na atualidade, diversas preparações de variadas massas molares são disponíveis, incluindo uma combinação de HA e condroitina sulfato. A mistura binária de hialuronato de sódio e hidroxipropilmetil celulose atinge com mais sucesso os requerimentos para utilização em cirurgias oftalmológicas (MALTESE, 2006).

#### **4.3.2 Cirurgia e Cicatrização de Ferimentos**

Formulações contendo HA de elevada massa molar são aplicadas topicamente por favorecerem a cicatrização de ferimentos novos na pele, diminuindo adesões de tecidos após cirurgias abdominais e ortopédicas. Também promovem a cicatrização

de ferimentos venosos nas pernas e são úteis na administração de ferimentos crônicos (EDMOND; FOSTER, 2006).

Um recente produto, uma combinação de HA com dexpanthenol vem sendo utilizado como hidratante e preparação tópica protetora e regeneradora da pele. Devido a suas propriedades antioxidantes, HA também atua como um componente anti-inflamatório em materiais para recobrimento de ferimentos (MOSELEY, 2003).

### **4.3.3 Cirurgia Ortopedia e Reumatologia**

A aplicação de HA ocorre na viscosuplementação em articulações afetadas por artrite. Uma articulação saudável obtém movimento com menos fricção e livre de dores. A osteoartrite é uma doença degenerativa da cartilagem e osso que causa dores e enrijecimento da articulação afetada. A artrite reumatoide é classificada como uma doença inflamatória sistêmica, em que as dores nas articulações são frequentemente acompanhadas por alterações degenerativas em órgãos adicionais como o pulmão, coração e vasos sanguíneos (KOGAN, 2007).

A partir do final da década de 80, aplicações intra-articulares de HA (viscosuplementação) têm resultado em sucesso no tratamento de pacientes com osteoartrite. A massa molar do HA no fluido sinovial de um adulto saudável encontra-se na faixa entre 2 e 6 x 10<sup>6</sup> Da. Os tratamentos com preparações de maior massa molar normalmente requerem 3 injeções em 3 semanas, enquanto, medicamentos de menor massa molar devem ser aplicados no mínimo 5 vezes em 5 semanas (CHONG, 2005). As preparações de HA têm melhorado os sintomas e diminuído o uso de medicamentos anti-inflamatórios em pacientes com osteoartrite. São propostos 4 mecanismos para o efeito terapêutico do HA nesses casos (GREENBERG, 2006):

- 1) Restauração de propriedades elásticas e viscosas do fluido sinovial;
- 2) Efeito estimulante biosintético de HA exógeno nas células: HA injetado pode induzir a síntese endógena de HA pelas células sinoviais, estimulando a proliferação de condrócitos e inibindo a degradação de cartilagens;
- 3) Ação anti-inflamatória de HA, visto que a terapia está associada com diminuição da contagem de células inflamatórias no fluido sinovial, modulação da expressão de citocina e redução da concentração de espécies reativas de oxigênio;
- 4) Efeito analgésico observado da administração de HA.

#### 4.3.4 Cosméticos

Há anos, os hidratantes são os cosméticos mais utilizados devido às características umectantes e oclusivas, que de forma geral melhoram notavelmente a saúde da pele (AZULAY, 2006).

O HA é amplamente utilizado na área da dermocosmética, sendo agregado em produtos cosméticos de aplicação tópica, principalmente como agente hidratante e antienvhecimento. O HA é uma das moléculas mais higroscópicas da natureza, pois, quando hidratado, pode conter cerca de 1000 vezes o seu tamanho em moléculas de água. A utilização do HA se encontra predominantemente associada à injeção de agentes de preenchimento dérmico (“*dermal fillers*”). Também tem sido uma prática comum a sua aplicação tópica, através do uso de cremes (OLIVEIRA, 2009).

Algumas empresas de cosméticos bem conhecidas pela população, incluem o HA na criação de seus cremes, sérums e *gloss*. A seguir são mostrados alguns produtos que contém o HA em sua formulação:

Figura 3 – Produto Chronos da Natura



Fonte: NATURA, 2019.

Figura 4 – Produto da Vichy



Fonte: VICHY, 2019.

Figura 5 – Produto da Biovea



Fonte: BIOVEA, 2001.

Figura 6 – Produto da Phállebeauty



Fonte: VIRTUAL MAKE, 2019.

#### 4.3.5 Produtos injetáveis

A aplicação de preenchedores para tratamento de ríides e aumento do volume facial vem se desenvolvendo consideravelmente. Atualmente, diferentes tipos de preenchedores, divididos em temporários, semipermanentes (permanência de no mínimo 18 meses no tecido) e permanentes tem o HA sintético ou de origem animal. Dos variados produtos, o HA (preenchedor reabsorvível, temporário) tem sido um dos mais usados. A substância ideal nesses produtos deve oferecer ótimo resultado cosmético, ter duração longa, ser estável e seguro, com mínima complicação. Dos preenchedores, o HA é o que mais se adequa à essas características, mas, apresenta alguns efeitos colaterais que devem ser estudados e reconhecidos pelo médico que realiza o procedimento. O HA injetável é composto por polissacarídeos e glicosaminoglicanos, e é conhecido popularmente por ser não permanente, com duração média de seis meses. Os produtos existentes no mercado, que podem ter ou não anestésico (lidocaína) associado na ampola, são também passíveis de divisão em bifásicos e monofásicos. O HA injetável é composto por molécula de estrutura simples,

com elevado peso molecular e grande atração pela água (hidrofilicidade) (CROCCO; ALVES; ALESSI, 2012).

#### 4.4 FONTES DO ÁCIDO HIALURÔNICO

O HA é um componente funcional essencial praticamente em quase todos os tecidos de organismos vertebrados. O HA também está presente em tecidos animais, e ele é identificado em procariotos, essencialmente em *Streptococcus* dos grupos A e C de Lancefield, que sintetizam esse composto natural como parte de sua cápsula externa (ARMSTRONG; JOHNS, 1997).

A elevada concentração de HA está na pele, tendo uma massa média de 7 – 8 g/adulto, metade da quantia total encontrada no corpo todo. O HA está presente nas devidas camadas da pele, a derme e a epiderme, com o acúmulo de 0.5 e 0.1 mg/g de tecido seco, respectivamente. O acúmulo de HA ao redor das células da epiderme (cerca de 2 – 4 mg/ml) é uma ordem de magnitude mais elevada que na derme (cerca de 0.5 mg/ml). A matriz que há em volta dos queratinócitos, células diferenciadas do tecido epitelial, possui acúmulo de HA tão elevada quanto o presente no cordão umbilical, que é aproximadamente de 4 mg/ml (HASCALL, 1997).

Em materiais biológicos, o HA normalmente encontra-se complexado com outros biopolímeros, e com isso, são feitos diferentes procedimentos de separação no intuito de obter um composto puro, dentre eles digestão com proteases, precipitação de HA com solventes orgânicos como etanol, clorofórmio ou cloreto de cetilpiridina, ultrafiltração por membranas e/ou liofilização (ADAM; GHOSH, 2001). Porém, o atingimento do HA puro a partir dessas fontes apresentam duas enormes desvantagens: obrigação da purificação laboriosa e diminuição de sua massa molar, devido à degradação das cadeias nos procedimentos complexos requeridos para a purificação. (HASCALL, 1997). A TAB. 1, mostra melhor onde encontrar o HA com suas concentrações e algumas observações:

Tabela 1 – Fontes de HA e algumas observações

<b>Tecido ou Fluido</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Observações</b>
<b>Crista de galo</b>	7500	Tecido animal com maior concentração de HA
<b>Cordão umbilical humano</b>	4100	Apresenta HA com alta massa molar
<b>Fluido sinovial humano</b>	1400-3600	O volume sinovial aumenta sob condições inflamatórias, conduzindo a uma diminuição da concentração de HA
<b>Cartilagem nasal bovina</b>	1200	Frequentemente empregada como modelo de cartilagem em estudos experimentais
<b>Humor vítreo humano</b>	140-340	Concentração de HA aumenta próximo a maturação deste tecido
<b>Derme humana</b>	200-500	Sugerido como rejuvenescedor em dermatologia cosmética
<b>Epiderme humana</b>	100	Concentração de HA é muito maior em volta das células que sintetizam HA
<b>Cérebro de coelho</b>	65	Supõe-se que HA atue na redução da probabilidade de ocorrência de tumores cerebrais
<b>Coração de coelho</b>	27	HA é maior constituinte na matriz patológica que obstrui artérias coronárias
<b>Linfa torácica humana</b>	0,2-50	A baixa massa molar desse HA é explicada pela captação preferencial de moléculas maiores pelas células endoteliais do fígado
<b>Urina humana</b>	0,1-0,3	A urina é também uma importante fonte de hialuronidase
<b>Soro humano</b>	0,001-0,1	Concentrações de HA aumenta no soro de pessoas idosas assim como em pacientes como artrite reumatoide e cirrose no fígado

Fonte: PIRES, 2009.

## 4.5 PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO

O HA extraído de tecidos animais ou o produzido por fermentação microbiana, por meio de *Streptococcus equi*, apresenta o mesmo arranjo químico do polímero encontrado em seres humanos, podendo diferir apenas com relação à massa molar (COONEY, 1999).

Vários empenhos no avanço dos sistemas para a produção de HA através da via fermentativa têm sido implementados. Assim, a via fermentativa tem se apresentado como uma alternativa viável aos processos convencionais de extração dessa substância de tecidos. Os processos fermentativos apresentam aspectos interessantes, que englobam processos de purificação menos laboriosos (CHONG; BLANK, 1998).

A produção de HA se iniciou por meio da sua extração a partir de tecidos de origem animal, como, a crista de galo e o cordão umbilical humano. Entretanto, a sua produção por procedimentos biotecnológicos se tornou, nos dias de hoje, uma técnica usada em grande escala, utilizando a fermentação microbiológica, principalmente de duas espécies de bactérias: *Streptococcus* e *Bacillus*. O HA é produzido por métodos que limitam ou eliminam a presença de agentes infecciosos. Quando a produção é realizada por fermentação utilizando bactérias gram-positivas, é certificado que o processo usado permite limitar ou eliminar os componentes da parede celular com suas características pirogênicas ou inflamatórias (FARMACOPEIA PORTUGUESA VIII, 2005).

### 4.5.1 Bactérias do Gênero *Streptococcus*

A produção de HA por *Streptococcus* é popularmente conhecida há aproximadamente 50 anos, e muitas das vezes os sistemas divulgados na literatura referem-se o uso de *Streptococcus* do grupo de Lancefield, onde o grupo A é classificado como patógeno humano (KENDALL, 1937) e do grupo C (*Streptococcus equi*, *equisimilis* e *zooepidemicus*), patógeno de animais (OGRODOWSKI, 2006).

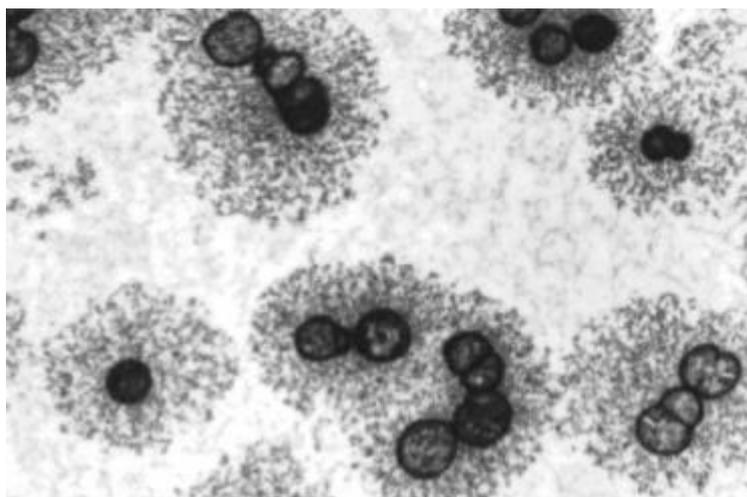
As bactérias do gênero *Streptococcus* são microorganismos gram-positivos e anaeróbicos. Possuem capacidade hemolítica e antigenicidade dos sacarídeos (carboidratos) presentes nas suas paredes celulares (KAYSER, 2005). Este gênero *Streptococcus* está ligado a um grupo muito abundante e heterogêneo de bactérias.

Elas se encontram divididas em mais de 40 (quarenta) espécies organizadas em 3 (três) grupos fundamentais: grupo piogênico, grupo oral e as “demais espécies” (SINGLETON *et al.*, 2006).

O grupo piogênico contém espécies ligadas a infecções piogênicas em homens e em alguns animais. Os exemplos desse grupo são *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. equi* e *S. pyogenes*. O grupo oral contém espécies que estão ligadas a diferentes infecções encontradas em vários locais do corpo, integrando a boca, coração, juntas, pele, músculo e no sistema nervoso central. As espécies do grupo em questão incluem *S. anginosus*, *S. mutans*, *S. oralis* e *S. salivarius*. E com relação às “demais espécies”, destacam-se *S. acidominimus*, *S. bovis*, *S. equinus* e *S. Suis*, encontradas em animais domesticados (SINGLETON; SAINSBURY, 2006).

A característica observada em *Streptococcus* é a criação de HA como o aspecto da proteção celular. O HA é expelido para o meio externo pela sua membrana celular, constituindo uma cápsula que é criada na face interna da membrana plasmática como um polímero linear solto. As enzimas encarregadas por sua criação são conhecidas como HA sintases, ligadas ao grupo das glicosiltransferases. Na FIG. 7, são mostradas imagens de *Streptococcus zooepidemicus* (BENEDINI, 2012).

Figura 7 – Células de *Streptococcus zooepidemicus* (gram-positivas) em meio aerado, revestidas por cápsulas de HA



Fonte: CHONG *et al.*, 2005, p. 14.

As cepas de *Streptococcus* são nutricionalmente fastidiosas, anaeróbias facultativas e produzem ácido láctico para assim ter um bioproduto para o catabolismo da glicose. Após isso, a energia recuperada por estas bactérias é relativamente menor

do que nas bactérias aeróbias. O rendimento de HA nas fermentações bacterianas é relativamente baixo (0,1 g/g de glicose). Os requerimentos nutricionais complexos da bactéria influenciam na economia da fermentação devido aos custos elevados (CHONG; BLANK, 1998).

#### 4.5.2 Meios de Cultura

Os meios de cultura do gênero *Streptococcus* apresentam elevada demanda nutricional para que os microrganismos se desenvolvam. A cultura destes tende a ocorrer em ambientes ricos em fontes de carbono e nitrogênio (PIRES, 2009).

#### 4.5.3 Fontes de Carbono

A fonte de carbono mais simples nos variados trabalhos sobre a produção de HA por fermentação é a glicose (ARMSTRONG *et al.*, 1997).

A porção de ATP (Trifosfato de adenosina) relacionado ao catabolismo dos *Streptococcus* poderá ser aumentada através de limitações de fontes de carbono. Porém, a limitação de quantidade de glicose no meio de cultura retém alguns efeitos indesejáveis, entre eles, a perda do peso molecular de HA produzido, devido ao pouco suprimento de sacarose (CHONG; NIELSEN, 2003).

Em 2009, foi estudado a otimização da criação de HA por cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* em batelada, baseado nas mudanças metabólicas e a acúmulo inicial da glicose. Em cultivo efetuado em biorreator sem o controle do pH, a expansão celular e a criação do HA foram rigorosamente dependentes do acúmulo inicial da glicose, com maior criação de HA (1,21 g.L<sup>-1</sup>) no cultivo realizado em meio com 25 g.L<sup>-1</sup> de glicose. A condição nutricional foi a única que mostrou a maior conversão de glicose em HA do que conversão de glicose em massa celular (PIRES, 2009).

##### 4.5.3.1 Fontes de Nitrogênio

As fontes de carbono orgânicas são muito importantes para o crescimento de células. Além do mais, o *Streptococcus* possui a necessidade nutricional de nitrogênio orgânico, sendo este um elemento fundamental à vida. Ele pode ser achado em quase todas as moléculas orgânicas presentes em organismos vivos. Com a vasta

diversidade de compostos nitrogenados que podem ser empregados como fontes nutricionais, realçam o íon amônio, os hidrolisados de caseína, os aminoácidos, as peptonas e o extrato de leveduras (BATISTOTE, 2006; PIRES, 2009).

A aplicação de fontes de nitrogênio vegetais é uma alternativa que tem sido estudada, já que minimiza o risco de contaminação no HA. Poucos estudos relatam a probabilidade de utilização de peptonas vegetais como fontes de nitrogênio, como peptonas de batata, trigo, pera, ervilha e soja (BENEDINI, 2012).

#### **4.5.3.2 Íons Minerais**

Os minerais oferecem elementos necessários ao cultivo da célula, sendo poucos como o magnésio ( $Mg^{++}$ ) e potássio ( $K^+$ ) considerados macronutrientes. Eles são necessários em concentrações acima de  $10^{-4}$  M, e outros necessários em quantidade menor, denominados elementos traço, como ferro ( $Fe^{++}$  e  $Fe^{++}$ ), zinco ( $Zn^{++}$ ), manganês ( $Mn^{++}$ ), molibdênio ( $Mo^{++}$ ), cobalto ( $Co^{++}$ ), cobre ( $Cu^{++}$ ) e cálcio ( $Ca^{++}$ ) (PIRES, 2009).

Os elementos citados acima, apresentam várias funções biológicas, atuando como cofatores enzimáticos de inúmeras reações, síntese de vitamina e transporte por meio da parede e membrana célula. Na tabela a seguir, são apresentadas as funções fisiológicas de cada elemento (VOGEL; TODARO, 1997) (TAB. 2).

Tabela 2 – Funções fisiológicas dos principais elementos requeridos pela célula.

<b>Elemento</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Função fisiológica</b>
Sódio	Na	Principal cátion extracelular, cofator enzimático.
Potássio	K	Principal cátion intracelular, cofator de enzimas, requerido do metabolismo de carboidratos.
Magnésio	Mg	Importante cátion divalente celular, cofator inorgânico de muitas reações enzimáticas.
Cálcio	Ca	Importante cátion celular, cofator de enzimas como proteases e amilases.
Manganês	Mn	Cofator de enzimas como proteases, atua na regulação do metabolismo secundário e excreção de metabólitos primários.
Ferro	Fe	Constituinte do citocromos e outras proteínas heme ou não heme, cofator de várias enzimas.
Cobalto	Co	Constituinte da vitamina B <sub>12</sub> e suas coenzimas derivadas.
Zinco	Zn	Constituintes inorgânicos de enzimas especiais.
Molibdênio	Mo	

Fonte: PIRES, 2009.

Entre os íons relacionados à síntese de HA, sobressaem o magnésio e manganês, que atuam como cofatores de glicosiltransferases responsáveis pela síntese da cadeia repetida de dissacarídeos (DEANGELIS, 2002).

Ainda não há muitos estudos avaliando a abrangência direta do íon sódio na síntese de HA. Entretanto, o efeito do mesmo pode afetar indiretamente a criação do polímero, pois para algumas bactérias ligadas ao gênero *Streptococcus*, o sódio está diretamente envolvido na excreção de lactato (WHITE, 2000).

Portanto, além dos sais, a adição de tampões ao meio de cultivo pode induzir o desenvolvimento e a formação de produto. A suplementação do meio quimicamente com citrato de sódio e bicarbonato de sódio foi favorável para o crescimento celular. (KLANDER, 1983).

#### **4.5.4 Condições de Operações do Processo Fermentativo**

A produção microbiana de HA possui condições ótimas para o crescimento, tais como a temperatura, agitação, aeração e o pH. (BENEDINI, 2012). Com isto, a produção de HA é realizada em sistemas providos de aeração e agitação (MACEDO, 2006).

##### **4.5.4.1 Temperatura**

A temperatura é um importante fator que tem interferência tanto no crescimento celular como na formação do produto fermentativo. Entretanto, a temperatura excelente para o crescimento e formação do produto podem ser discrepantes (SHULER; KARGI, 2002). Em 1996, Kim *et al.* encontraram a temperatura ótima de 37 °C para o crescimento e criação de HA por *Streptococcus equi*. Em temperaturas inferiores a 37 °C, foi observada diminuição na massa molar do HA produzido (BENEDINI, 2012).

##### **4.5.4.2 Agitação**

A agitação é um dos fatores essenciais para os processos aeróbicos e têm efeito significativo no rendimento da maior parte dos biopolímeros (RICHARD; MARGARITIS, 2003).

O HA pode ser produzido em condições anaeróbicas ou aeróbicas, sendo a última condição mais vantajosa para a obtenção de HA de maior massa molar (PIRES, 2009). No processo de HA, a massa molar produzida por *Streptococcus zooepidemicus* não

foi afetada pelas discrepâncias dos níveis de agitação (300 a 1000 rpm) no fermentador. As moléculas de HA são relativamente resistentes à potência de cisalhantes do agitador. Com isso, elevadas taxas de agitação, que melhoram o rendimento e taxa de produção, podem ser utilizadas sem deteriorar as moléculas do biopolímero (BENEDINI, 2012).

#### 4.5.4.3 Aeração

Os *Streptococcus* são bactérias aero tolerantes. Quer dizer, possuem reprodução em meios aerados. O fenômeno ocorre devido à presença da enzima superóxido dismutase, que diminui o efeito de radicais superóxidos, na presença de oxigênio. Bactérias do gênero *Streptococcus* desenvolvem mais aceleradamente e, também, criam HA com elevada massa molar ao se comparar com o cultivo anaeróbio (CHONG; NIELSEN, 2003).

Em condições anaeróbias, o rendimento do HA ocorre uma variação na faixa de 0,3 a 1,0 g.L<sup>-1</sup> (THONARD et al., 1964, HOLMSTROM; RICICA, 1967). O HA obtido nessas condições normalmente possui massa molar média de 7 x 10<sup>5</sup> Da ou menor. Nas condições aeróbias, um produto com massa molar elevada cerca de 2 x 10<sup>6</sup> Da ou mais pode ser obtido com rendimento equivalente (AKASAKA et al., 1988).

#### 4.5.4.4 Potencial Hidrogeniônico (pH)

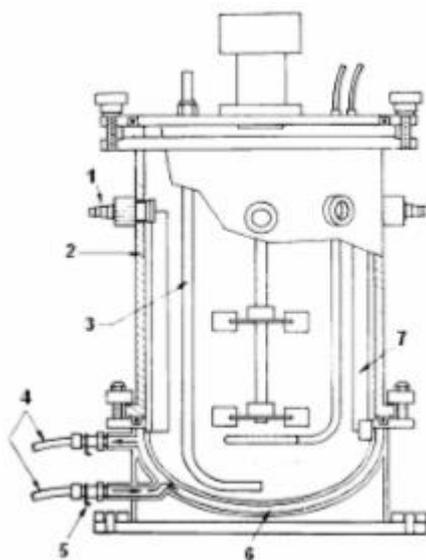
O pH é importantíssimo no meio de cultivo devido à sua atuação na atividade de enzimas e, em consequência, na velocidade de crescimento microbiana (SHULER; KARGI, 2002). O pH tem uma influência aceitável na taxa de produção e rendimento do biopolímero (BENEDINI, 2012).

O controle do pH ao longo do cultivo com 25 g.L<sup>-1</sup> de glicose resultou em maior produtividade de células (0,21 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e de HA (0,10 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). A combinação desses resultados relaciona o maior direcionamento da fonte de carbono para AH do que para células a uma resposta do microrganismo ao stress ácido ocorrido no cultivo sem controle do pH (PIRES, 2009).

#### 4.5.4.5 Ensaio em Reator BIOFLO III®

O foco principal deste ensaio foi analisar a produção de HA em sistemas providos de aeração e agitação. As situações exigidas ao processo foram: aeração estável de 2 volumes de oxigênio para cada volume de meio, agitação estável de 250 rpm, temperatura de 37° C. As amostras foram coletadas ao longo do experimento para que fossem realizadas as quantificações (MACEDO, 2006). A FIG. 8, demonstra o modelo do Reator BIOFLO III®, onde foi realizado o ensaio.

Figura 8 – Reator BIOFLO III®



Fonte: MACEDO, 2006, p. 77.

O reator utilizado nesta etapa do experimento foi o Reator BIOFLOIII®, constituído por uma cuba reacional de vidro (2), tomada de um sistema de alimentação de ar por meio de um dispersor de bolhas simples, com aparência de um tubo perfurado (3). Conectado à cuba há um trocador de calor com aparência de calota esférica na região abaixo do vaso de vidro (6), que, no que lhe diz respeito, é alimentado com água pela do trocador. Interiormente, há um sistema de chicanas para minimizar os efeitos de vórtice e maximizar a turbulência promovida pela agitação realizada por uma haste conectada ao rotor que transfere *momentum* a um par de impelidores da espécie turbina de 6 pás. A coleta de amostras é realizada através de um coletor lateral. Todo o sistema foi autoclavado, e foi incluso o conjunto de sensores (autoclaváveis) (MACEDO, 2006).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se no estudo do Ácido Hialurônico (HA) que, sua produção por meios fermentativos com a bactéria *Streptococcus* tem temperatura adequada para ser produzido. A não obediência de sua temperatura adequada, faz com que o HA tenha uma baixa ou elevada massa molar, causando a perda do seu meio. O HA não é só produzido em laboratório, pode ser extraído de tecidos animais. Ambos apresentam ter a mesma estrutura química de um HA produzido por *Streptococcus*, podendo, apenas, ter uma discrepância na sua massa molar.

Assim, por meio fermentativo, a produção deverá ter um controle especial no seu pH, não podendo deixar ultrapassar e nem diminuir seu pH adequado. A alternativa de se usar fontes de nitrogênio faz com que na produção do HA, não tenha riscos de contaminações. A agitação e aeração no processo da produção são importantes parâmetros para uma melhor produtividade do polímero HA.

## REFERÊNCIAS

ADAM, N., GHOSH P. **Hyaluronan molecular weight and polydispersity in some commercial intra-articular injectable preparations and in synovial fluid**, Austrália, v. 50, n. 2001, p. 294-299, dez. 2000.

AKASAKA, R; SUSUMU, S.; YANAGI, M.; FUKUSHIMA, S.; MITSUI, T.. *J Soc. Cosmet. Chem. Japan*, v.22, p. 35-42, 1988

ARMSTRONG, Davi; JOHNS, Michael. **Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus***. Austrália, v. 63, n. 7, p. 2759-2764, jul. 1997.

AZULAY, Rubem Davi. **Dermatologia**. Rio de Janeiro: Atlas, 2006.

BATISTOTE, M. **Estudo fisiológico do efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no meio de cultura no metabolismo de leveduras**. 2006. Doutorado (Doutor em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Instituto de Química de Araraquara, 2006.

BENEDINI, Leandro Junqueira. **Influência de Peptonas Vegetais no Cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* para a Produção de Ácido Hialurônico**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2012.

BIOVEA. **Site de vendas**. Disponível em: [https://www.biovea.com/br/product\\_detail.aspx?NAME=acido-hialuronico-pacote-promocional-capsulas-creme&PID=4006&OS=237](https://www.biovea.com/br/product_detail.aspx?NAME=acido-hialuronico-pacote-promocional-capsulas-creme&PID=4006&OS=237). Acesso em: 20 jun. 2019.

CHONG, Barrie Fong; BLANK, Lars. **Metabolic Engineering of Hyaluronic Acid Production**, Austrália, v. 66, n. 4, p. 341-351, jan. 2005.

CHONG, Barrie Fong; NIELSEN, Lars. **Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase**, Amsterdã, v.16, n. 2, p.153-162, nov. 2003.

CHONG, Barrie Fong; NIELSEN, Lars. **Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase**, *Amsterdã*, v.16, n. 2, p.153-162, nov. 2003.

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

CROCCO, Elisete Isabel. Research Grade Sodium Hyaluronate. *In*: ALVES, Renata Oliveira *et al.* **Lifecore**. Disponível em: <https://www.lifecore.com/sodium-hyaluronate/research-grade-sodium-hyaluronate/>. Acesso em 20 jun. 2019.

EDMOND, Michael; FOSTER, A. V. **Diabetic foot ulcers**. v. 332, n. 7538, p.407-410, fev. 2006.

FERRARI, Felipe Augusto, **ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR CULTIVO DE “*STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS*” EM ESPUMA DE POLIURETANO**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2012.

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

GREENBERG D.D. *et al.* **Biochemical effects of two different hyaluronic acid products in a co-culture model of osteoarthritis**, *Amsterdã*, v.14, n. 8, p. 814-822, agos. 2006.

GURNY, Robert *et al.* **Design and evaluation of controlled release systems for the eye**. *Amsterdã*, v. 6, n. 1, p.367-373, dez. 1987.

HASCALL, Vicente Charles. **Hyaluronan: structure and physical properties**, *América*, 1998, n. 98, ed.8, p. 2663-2684, nov. 1998.

HASCALL, Vincent; LAURENT, Torvard. **Hyaluronan: Structure and Physical Properties**, vol. 1, n. A2, dez. 1997. Disponível em:

<https://www.glycoforum.gr.jp/article/01A2.html>. Acesso em: 10 jun. 2019.

HOLMSTRÖM, Björn; RICICA, J.. **Production of hyaluronic acid by a Streptococcal strain in batch culture**, EUA, v.15, n. 6, p.1409-1413, jun. 1967.

KANDLER, O. **Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria**. Nova York: Cultura Acadêmica, 1983. E-book.

KAYSER, Fritz *et al.* **Medical Microbiology**. 14. ed. Nova York: Cultura Acadêmica, 2005. E-book.

KENDALL, Forrest; HEIDELBERGER, Michael; DAWSON, Martin. **A Serologically Inactive Polysaccharide Elaborated by Muroid Strains of group A Hemolytic Streptococcus**, Nova York, v.118, n. 1, p.61-69, dez. 1937.

KOGAN, Grigorij *et al.* **Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications**, Editores acadêmicos da Kluwer, v.29, n. 1, p.17-25, jan. 2007.

LAPCIK JR., Ludomir; DE SMEDT, Stefaan; DEMEESTE, Jo; CHABRECEK, Peter. **Hyaluronan: pre-paration, structute, properties and applications**. Chem, Suíça, v.98, n.8, p. 2663-2684, 1998.

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

MACEDO, André Casimiro. **PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR CULTIVO EM ESTADOS SÓLIDOS DE *Streptococcus zooepidemicus* EM BAGAÇO DE CAJU**. 2011. Doutorado (Doutor em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2011.

MCDONALD, John; HASCALL, Vicent. **Hyaluronan minireview series**, EUA, v. 277, n.7, p.4575-4579, nov. 2002.

MEYER, Karl; PALMER, John. **The polysaccharide of the vitreous humor**, Nova York, v.107, n. 3, p. 629–634, set. 1934.

MOSELEY, Ryan *et al.* **Comparison of the antioxidant properties of wound dressing materials - carboxymethylcellulose, hyaluronan benzyl ester and hyaluronan, towards polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species**, Amsterdã, v-24, n. 9, p.1549-1557, abr. 2003.

NATURA. **Site de vendas**. Disponível em <https://www.natura.com.br/p/chronos-elixir-reductor-de-rugas-15ml/59373>. Acesso em: 20 jun. 2019.

OGRODOWSKI, Christiane Saraiva. **PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR STREPTOCOCCUS: Estudo da Fermentação e Caracterização do Produto**. 2006. Tese de Doutorado (Doutor em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

OLIVEIRA, Ângela Zélia Moreira. **Desenvolvimento de formulações cosméticas com Ácido Hialurônico**. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Farmacêutica) – Universidade do Porto, Porto, 2009.

PAN, Nicole Caldas; VIGNOLI, Josiane Alessandra; BALDO, Cristiani; CELLIGOI, Maria Antonia Pedrine Colabone. **Ácido hialurônico: características, produção microbiana e aplicações industriais**, Londrina, v. 2, n. 4, p. 42-58, Jul./Dez. 2013.

PIRES, Aline Mara Barbosa. **Estudos Metabólicos para Otimização de Condições Nutricionais e de Cultivo para Produção Microbiana de Ácido Hialurônico**. 2009. Tese de Doutorado (Doutor em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2009.

RICHARD, Andrew; MARGARITIS, Argyrios. **Rheology, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly (glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis***. v. 82, n. 3, p. 299-305, fev. 2003.

SALLES, Alessandra Grassi; REMIGIO, Adelina Fátima do Nascimento; ZACCHI, Valeria Berton Liguori; SAITO, Osmar Cássio; FERREIRA, Marcus Castro. **Avaliação clínica e da espessura cutânea um ano após preenchimento de ácido hialurônico**, São Paulo, 2011, n. 26(1), p. 66-9, fev. 2011.

SÁNCHEZ, Enrique, *et al.* **Partial Specific Volume of Hyaluronic acid in Different media and conditions**, Espanha, v.27, n. 4, p. 287-290, jul. 2000.

SHULER, Michael; KARGI, Fikret. **Bioprocess engineering: basic concepts**. 2. ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2002. *E-book*.

SINGLETON, Paul; SAINSBURY, Daiana. **Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, third edition**. Reino Unido: Cultura Acadêmica, 2006. *E-book*.

THONARD, J. C; MIGLORE, S. A.; BLUSTEIN, Paul. **Isolation of hyaluronic acid from broth cultures of *Streptococci***, USA, v.239, p. 726-728, set. 1963.

VICHY. **Site de vendas**. Disponível em <https://www.vichy.com.br/Face/MIN%C3%89RAL-89-Min%C3%A9ral-89/p23456.aspx>. Acesso em: 20 jun. 2019.

VIRTUAL MAKE. **Site de vendas**. Disponível em: <https://www.virtualmake.com.br/Volume-Labial-Gloss-Incolor-BigMouth-Phallebeauty-PH008>. Acesso em: 20 jun. 2019.

VOGEL, Henry; TODARO, Celeste. **Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design, and equipment**, USA, 1997, 2 ed., p. 10-801, dez. 1997.

WHITE, David. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**, Nova York: Cultura Acadêmica, 2000. *E-book*.