

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**NOVAS TENDÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA E BIOTECNOLÓGICA PARA
BIOSSÍNTESE DE ÁCIDO HIALURÔNICO**

UBERLÂNDIA

2023

AMANDA FERREIRA DA CUNHA

**NOVAS TENDÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA E BIOTECNOLÓGICA PARA
BIOSSÍNTESE DE ÁCIDO HIALURÔNICO**

Trabalho de conclusão de curso para obtenção
do título de bacharel em engenharia química
apresentado à Universidade Federal de
Uberlândia.

Orientadora: Juliana de Sousa Ferreira

UBERLÂNDIA

2023

AMANDA FERREIRA DA CUNHA

**NOVAS TENDÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA E BIOTECNOLÓGICA PARA
BIOSSÍNTESE DE ÁCIDO HIALURÔNICO**

Trabalho de conclusão de curso para obtenção
do título de bacharel em engenharia química
apresentado à Universidade Federal de
Uberlândia

Aprovado em: 28/ 06/ 2023

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a. Dr.^a Juliana de Souza Ferreira
(Orientadora)

Prof.^o. Dr.^o Ubirajara Coutinho Filho
(FEQUI/UFU)

Gabriela Cunha e Souza
(Doutoranda - PPGEQ/FEQUI/UFU)

UBERLÂNDIA

2023

RESUMO

Um dos bioprodutos de grande interesse atualmente é o Ácido Hialurônico (HA), uma molécula descrita na literatura como um polissacarídeo do tipo glicosaminoglicanos (GAGs) ou mucopolissacarídeos. O HA é uma biomolécula polissacarídica linear e negativa, caracterizada por sua estrutura composta por sequências repetidas de dissacarídeos. O objetivo deste estudo é apresentar o processo de biossíntese mais difundido atualmente, além de resumir sistematicamente as novas tendências na produção de HA, levando em consideração os avanços tecnológicos e as aplicações práticas. Essa revisão crítica da literatura se baseia em artigos principalmente encontrados no banco de dados de pesquisa do portal de periódicos PUBMED, utilizando descritores de busca em inglês e seus sinônimos. Inicialmente, foram obtidos 125 resultados, dos quais 57 atenderam aos critérios de pesquisa, sendo selecionados 32 para análise adicional. Na etapa de revisão bibliográfica foi apresentada a forma mais difundida de produção de HA. Além disso, os artigos foram codificados, destacando seus objetivos, pontos-chave revisados pelos autores e suas conclusões sobre as novas tendências na biossíntese do HA. As bactérias *Bacillus sp.* e *Escherichia coli* são consideradas as mais promissoras para a produção em larga escala do HA microbiano, devido à sua disponibilidade comercial. No entanto, a instabilidade dos plasmídeos usados para a expressão gênica nesses microrganismos pode comprometer a confiabilidade e segurança do processo. Por outro lado, os fungos apresentam alta taxa de crescimento e são mais facilmente manipuláveis geneticamente, o que os torna organismos promissores para a produção moderna de HA, de acordo com os autores. Conclui-se que o processo de produção de HA por microrganismos, modificados geneticamente ou não, passa por etapas complexas para a obtenção em escala industrial, sendo necessário recriar cuidadosamente as condições normais do organismo da bactéria ou fungo utilizado para garantir um produto de qualidade e eficiente. Além disso, é essencial filtrar, purificar e otimizar o HA para obter um produto livre de resíduos e suficientemente puro para ser utilizado em processos e produtos de interesse da indústria.

Palavras-chave: Bioativos; Fermentação; Bioprocesso.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Fragmento da estrutura primária do HA	7
Figura 2: Fluxograma dos critérios de inclusão e exclusão dos artigos	10
Figura 3: Principais marcas no mercado que fazem uso de HA	12
Figura 4: Detalhamento da produção de HA por microrganismos	15
Quadro 1: Descritores de pesquisa	10
Quadro 2: Novas tendências na biossíntese do HA	17

SUMÁRIO

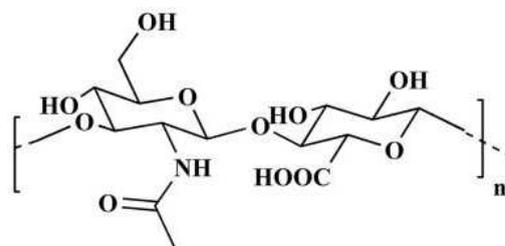
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3. RESULTADOS.....	11
3.1. Mercado do Ácido Hialurônico.....	11
3.2. Biossíntese do Ácido Hialurônico.....	13
3.2.1. Meio de Cultura.....	13
3.2.2. Temperatura.....	13
3.2.3. Potencial Hidrogeniônico (pH).....	14
3.2.4. Agitação e Aeração.....	14
3.2.5. Produção Industrial.....	14
3.3. Novas tendências para biossíntese do HA.....	18
4. DISCUSSÃO.....	31
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

O período hodierno demonstra um grande avanço em relação às ferramentas tecnológicas, com tal avanço estendido à produção industrial, sendo uma das maiores inovações à obtenção de bioprodutos. Através da biotecnologia, é possível produzir em larga escala, de maneira otimizada e segura, as mesmas moléculas produzidas por microrganismos, tendo grande serventia econômica e reduzindo o uso de animais durante as experimentações. Apesar de utilizar microrganismos, esses seres vivos possuem uma complexidade menor do que animais vertebrados, conseguindo assim refinar a técnica e obedecer a princípios bioéticos, corroborando ainda com os Princípios de Russel-Burch (1956) que enfatiza os 3Rs (*replacement, refinement e reduction*), propondo condições mais adequadas para o uso de animais.

Um dos bioprodutos de interesse atualmente é a molécula de Ácido Hialurônico (HA), sendo descrito na literatura como um polissacarídeo do tipo glicosaminoglicanos (GAGs) ou mucopolissacarídeos, um tipo de biomolécula polissacarídica linear e de carga negativa, tendo como principal característica a estrutura composta por sequências repetidas de dissacarídeos (SHIKINA *et al.*, 2022). Os GAGs também possuem uma outra classificação, podendo ser polissacarídeos sulfatados ou não sulfatados, sendo o HA englobado no grupo não sulfatado. De acordo com a literatura (PRYDZ, 2015) o HA é um polissacarídeo não sulfatado, sendo também um heteropolímero polianiónico sem ramificação linear, com característica biodegradável e estrutura química ligada covalentemente por resíduos de N-acetil-d-glucosamina e ácido d-glucurônico com cerca de 20 a 15.000 repetições em suas cadeias (OWEN *et al.*, 2017) (Fig. 1).

Figura 1. Fragmento da estrutura primária do HA (GUPTA *et al.*, 2019)



O HA é sintetizado a partir da enzima hialuronano sintase (HAS), sendo uma proteína comum de animais vertebrados e podendo variar em isoenzimas de tipo 1, 2 e 3. As HAS produzem polímeros de cadeias diferentes e possuem regulação diferencial através de níveis transcricionais, translacionais e também pós-traducionais, como por exemplo *splicing*

alternativo¹, a localização e processos epigenéticos (CSOKA, 2013). Palmer (1934) relata que a molécula de HA foi isolada pela primeira vez do humor vítreo de vacas² e também do cordão umbilical humano, além de fluido sinovial (encontrado nas articulações humanas) e crista de galos, por Karl Meyer e John Palmer. Ao longo dos anos, viu-se também que o ser humano em fase adulta também é capaz de produzir o HA numa proporção de 15 gramas de HA para cada 70 quilos de peso corpóreo. O principal órgão onde o HA pode ser encontrado nessas condições é na pele (a partir de fibroblastos, sinoviócitos e condrócitos) (GUPTA *et al*, 2019).

Gupta e colaboradores (2019) documentaram que o HA possui propriedade hidratante, já que por possuir carga negativa, é rico em grupos carboxilatos, conhecidos por serem fontes de sais de caráter hidrofílico, o que confere ao HA aspectos de viscoelasticidade e capacidade de reter a umidade. Com tais características, a molécula torna-se um possível produto a ser utilizado no equilíbrio de balanço hídrico, também como lubrificante e ainda como preenchedor e amortecedor em superfícies como a pele.

Para a obtenção do HA, foi aceito como padrão, por muitos anos, a extração a partir de animais, mas há algum tempo essa prática deixou de ser a realidade de indústrias de biotecnologia (LIU *et al.*, 2018). Em decorrência da bioética e o uso de animais, este método tem entrado em desuso, sendo substituído por técnicas que demandam um menor custo das empresas, com menos riscos de contaminação, maior grau de segurança e também maior potencial de otimizar e obter moléculas de interesse numa escala industrial. Golinska (2016) relata que é comum encontrar HA nas células, mas ainda mais em células bacterianas, pois é um componente de sua cápsula celular polissacarídica, servindo como um fator de virulência para as bactérias.

A partir desta confirmação, atualmente há a preferência pela fermentação bacteriana para se obter HA em escala industrial, tendo ainda a preferência para bactérias do gênero *Streptococcus sp.*, que demonstrou grande eficácia, confiança e segurança (CHONG *et al.*, 2004). A técnica também foi confirmada como a de menor risco para a ocorrência de contaminações, estando abaixo do limite permitido pelos requisitos atuais de segurança biológica no que tange às aplicações médicas e cosméticas (WESTBROOK, 2018; WOO, 2019; MANFRAO-NETTO, 2022).

Um fato interessante a respeito deste tipo de indústria é que, em 2020, quando a

¹ Processo de recombinação aleatória das sequências capazes de codificar informações a partir do gene, comum para formar diferentes proteínas nos seres humanos.

² Fluido que reveste a cavidade do globo ocular conferindo estrutura às partes do olho e mantendo transparência.

economia estava decaindo em decorrência à pandemia de Covid-19, o mercado de HA demonstrou um crescimento exponencial, com vendas significativas através de produtos cosméticos que tinham em sua composição o HA, tornando-se uma tendência em *E-commerces* (COSMETICS MARKET REPORT, 2020). A Sociedade Americana de Cirurgiões Plásticos (2021) percebeu também um crescimento exponencial em procedimentos não invasivos que utilizam o HA, tendo como público-alvo nas estatísticas, as mulheres (70%). Traduzindo essas informações para cifras, o mercado de HA no mundo chegou a movimentações de US\$ 1,1 bilhão em 2021 e US\$ 1,6 bilhão em 2022, sendo estimado uma marca de US\$ 2,60 bilhões em 2030 (um crescimento de 8% no período) (CMI, ano).

Estima-se que existam diferentes aplicações para o HA de acordo com os pesos moleculares da substância, podendo variar em torno de 10^4 a 10^7 Daltons. Tem-se as aplicações para a área de fármacos, pensando em tratamentos (inflamações cutâneas, doenças articulares, anticancerígeno e antiproliferativos) com faixas de peso molecular bastante variáveis; para a área de alimentação saudável (suplementação, estética e retardamento de envelhecimento), para a área de embalagens; e ainda para a área cosmética, sendo a mais conhecida (combate aos radicais livres, proliferação e diferenciação celular, conferir elasticidade à pele, redução de rugas, regulação de metabolismo e estímulo à síntese de colágeno), podendo também combater seletivamente as células cancerígenas (YIBIN et al., 2021).

Tendo em vista a relevância desta temática para a saúde, economia e meio ambiente, esta revisão crítica buscou apresentar o processo de biossíntese mais difundido atualmente e resumir sistematicamente as novas tendências na produção de HA a partir dos aspectos de avanços tecnológicos e aplicações práticas. Também discutiu-se os principais desafios da produção de HA em escala industrial, levantando-se os principais problemas relacionados aos processos de produção, projetando-se às perspectivas futuras.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

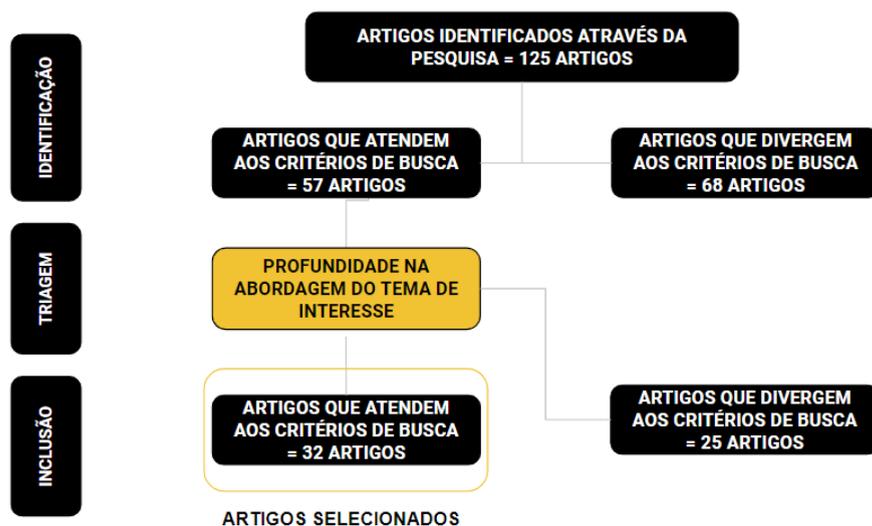
Trata-se de uma revisão crítica de literatura, baseada em artigos encontrados principalmente no banco de dados de pesquisa do portal de periódicos *PUBMED*, adotando-se descritores de busca em inglês e seus sinônimos (Quadro 1) na pesquisa por artigos publicados, acerca da biossíntese e de inovações tecnológicas nos processos de obtenção de ácido hialurônico.

Quadro 1. Descritores de pesquisa

Descritor nº 1	((Hyaluronic acid) OR (Hyaluronate) OR (Hyaluronan))
Descritor nº 2	((Microbial fermentation) OR (Fermentation) OR (Bacterial fermentation) OR (Fungal fermentation))

A análise científica de conteúdo contemplou duas etapas fundamentais: *i*) etapa de pré-análise e *ii*) etapa de leitura e estudo do material, onde selecionou-se aqueles de maior representatividade e pertinência aos objetivos desta revisão, conforme os critérios de inclusão e exclusão (Fig. 2).

Figura 2. Fluxograma dos critérios de inclusão e exclusão dos artigos



3. RESULTADOS

A pesquisa dos artigos, delimitada pelo cruzamento dos descritores, retornou, *a priori*, 125 resultados, 57 obedeciam aos filtros de pesquisa, dos quais, *a posteriori*, restaram 32. Na etapa seguinte, apresentou-se a forma de produção do HA mais difundida atualmente, a fermentação bacteriana estreptocócica, descrita no subitem 3.2 . Além disso, codificou-se os artigos, sendo discriminados os objetivos, os pontos chave revisados pelos autores e sua conclusão a respeito das novas tendências na biossíntese do HA (Quadro 2 do subitem 3.3).

3.1. Mercado do Ácido Hialurônico

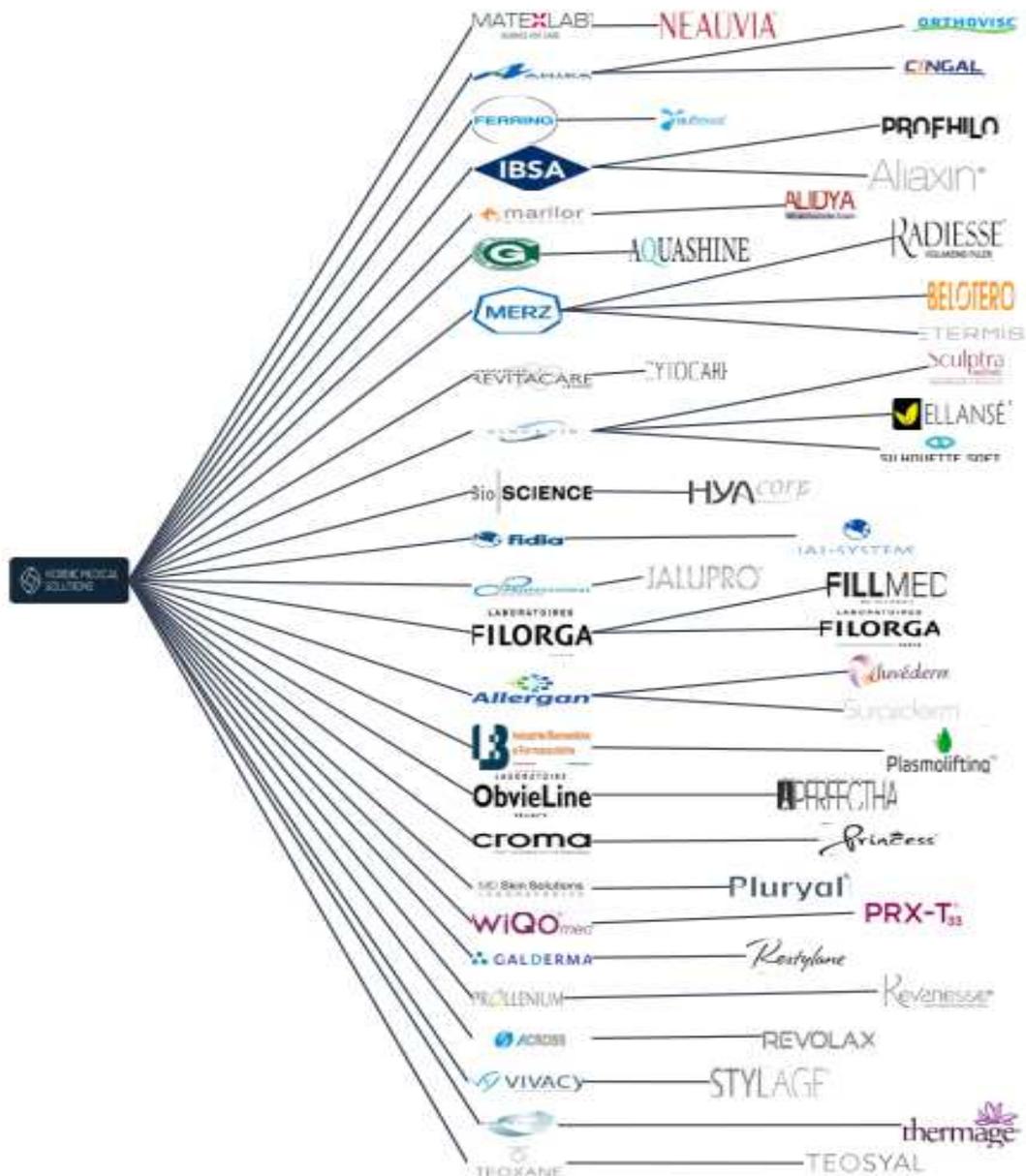
São diversas as possibilidades do uso do HA, e por isso hoje essa substância possui muitas aplicações, como o uso na indústria de alimentos, produtos médicos, procedimentos estéticos e ainda na produção de cosméticos. Por isso, a indústria de HA se apresenta como uma grande oportunidade, bastando compreender sobre seu processo de produção, estudar a sua aplicação e principalmente entender as necessidades do público-alvo, conseguindo entregar um produto que atenda às expectativas de quem fará uso (MARCELLIN *et al.*, 2009).

Os primeiros produtos que chegaram ao mercado que possuíam o HA como matéria-prima foram cremes para tratar úlceras e queimaduras da empresa Fidia na década de 60, e em 2003, a Genzyme e a Q-Med também fizeram uso da propriedade hidratante do HA e produziram cremes para a pele. O primeiro produto altamente puro foi uma substância utilizada para hidratação em cirurgias oftalmológicas em 1979, pela Pharmacia (Pfizer), já que os olhos são bastante sensíveis e demandam maiores cuidados (CHONG *et al.*, 2005; MARCELLIN *et al.*, 2009).

De acordo com Oliveira e Fontes (2020), a indústria médica tem demandado cerca de 1 tonelada de HA anual, com preço em dólar que corresponde a US\$1.000 a US\$25.000/kg. No entanto, o mercado de cosméticos consegue superar a indústria médica em quase 50 vezes, já que o HA tem grande mercado em produtos de beleza, o que reduz em muito o seu valor, correspondendo a US\$100 a US\$500/kg. O uso do HA não é somente devido à sua propriedade hidratante, mas corresponde também às propriedades antioxidante e viscoelástica; sendo o principal motivo para o mercado estético ser o principal detentor do uso de HA.

Na Figura 3, extraída de Oliveira e Fontes (2020), é possível observar as principais marcas que fazem uso do HA, e o que mais chama a atenção é a quantidade de empresas do ramo estético que dominam o mercado de HA.

Figura 3 – Principais marcas no mercado que fazem uso de HA. (OLIVEIRA; FONTES, 2020).



De acordo com a análise de Rezer e colaboradores (2022), atualmente produtos para os olhos e cremes de beleza e loções tônicas são as principais áreas que fazem o uso de quilogramas líquido do HA, ressaltando que em 2020 registrou o uso de mais de 2 toneladas e mais de 4 toneladas, respectivamente. Os autores observam que o Brasil importa o dobro de HA em comparação ao que exporta, explicitando que há a capacidade de produção no país, mas que carece de maiores incentivos.

3.2. Biossíntese do Ácido Hialurônico

Em seu estudo, Oliveira e colaboradores (2016) realizaram uma análise de microrganismos e alterações que tornam viável a produção de HA, conseguindo ainda quantificar por grama/litro (g/L) esta produção. Dentre as formas de vida estudadas, as três que demonstram maior produção são: I) a bactéria *Bacillus subtilis* com operon³ adicionado à enzima ácido hialurônico sintase do gênero *Streptococcus*, produzindo 6,8g/L; II) a bactéria *Streptomyces albulus* com gene para produzir ácido hialurônico sintase de *Streptococcus zooepidemicus*, produzindo 6,2g/L; e III) a bactéria *Escherichia coli* com plasmídeo modificado, produzindo 0,5g/L.

É documentado que nas condições adequadas, é comum a produção de 5 a 10g/L de HA, podendo essa quantidade demorar até 16 horas no meio de cultivo, sendo sugerido o biorreator do tipo descontínuo alimentado para que a cepa responsável pela produção não perca eficiência devido à falta de insumos (VASI *et al.*, 2014).

O processo mais difundido de produção industrial do HA é a fermentação microbiana, principalmente a estreptocócica, por demonstrar alta confiabilidade e segurança. (CHONG *et al.* 2004). No entanto, é de suma importância controlar as condições de operação do processo fermentativo, como meio de cultura, potencial hidrogeniônico (pH), temperatura, agitação e aeração, para que se obtenha êxito. (PIRES, 2009)

3.2.1. Meio de Cultura

As bactérias do gênero *Streptococcus zooepidemicus* necessitam de um meio rico em nutrientes para crescimento, com fontes de carbono, nitrogênio e íons minerais. A Glicose é a fonte de carbono mais utilizada, já como fonte de nitrogênio podem ser utilizados os hidrolisados de caseína, os aminoácidos, as peptonas e o extrato de leveduras. Além disso, os minerais, como magnésio, manganês, potássio, ferro, zinco e outros, fornecem elementos necessários ao cultivo da célula, especialmente os íons magnésio e manganês que possuem grande importância na produção de HA, por serem responsáveis pela síntese da cadeia repetida de dissacarídeos (PIRES, 2009).

3.2.2. Temperatura

A temperatura é um fator que interfere diretamente na formação do produto fermentativo por *Streptococcus zooepidemicus* como no crescimento celular, e não

³ Sinaliza o início da transcrição gênica.

necessariamente a temperatura ótima é igual para ambos. A temperatura de 37°C foi encontrada como ótima para o crescimento e produção do HA, porém o rendimento e massa molar do ácido diminui em temperaturas maiores, e a velocidade de crescimento diminui em temperaturas menores. Entretanto, estudos apontaram produção de HA com alta massa molar em temperaturas de 28°C (PIRES, 2009).

3.2.3. Potencial Hidrogeniônico (pH)

O pH do meio influencia tanto a taxa de produção como o rendimento do HA por *Streptococcus zooepidemicus*, visto que a atividade enzimática e a velocidade de crescimento microbiana dependem desse fator, no entanto, observou-se influência inexpressiva na massa molar. Os estudos apontaram atividade máxima da enzima catalítica da polimerização do HA em pH 7,1, produto com maior viscosidade em pH 7,4 e pH ótimo em torno de 6,7 na produção do ácido em cultivo em batelada (PIRES, 2009).

3.2.4. Agitação e Aeração

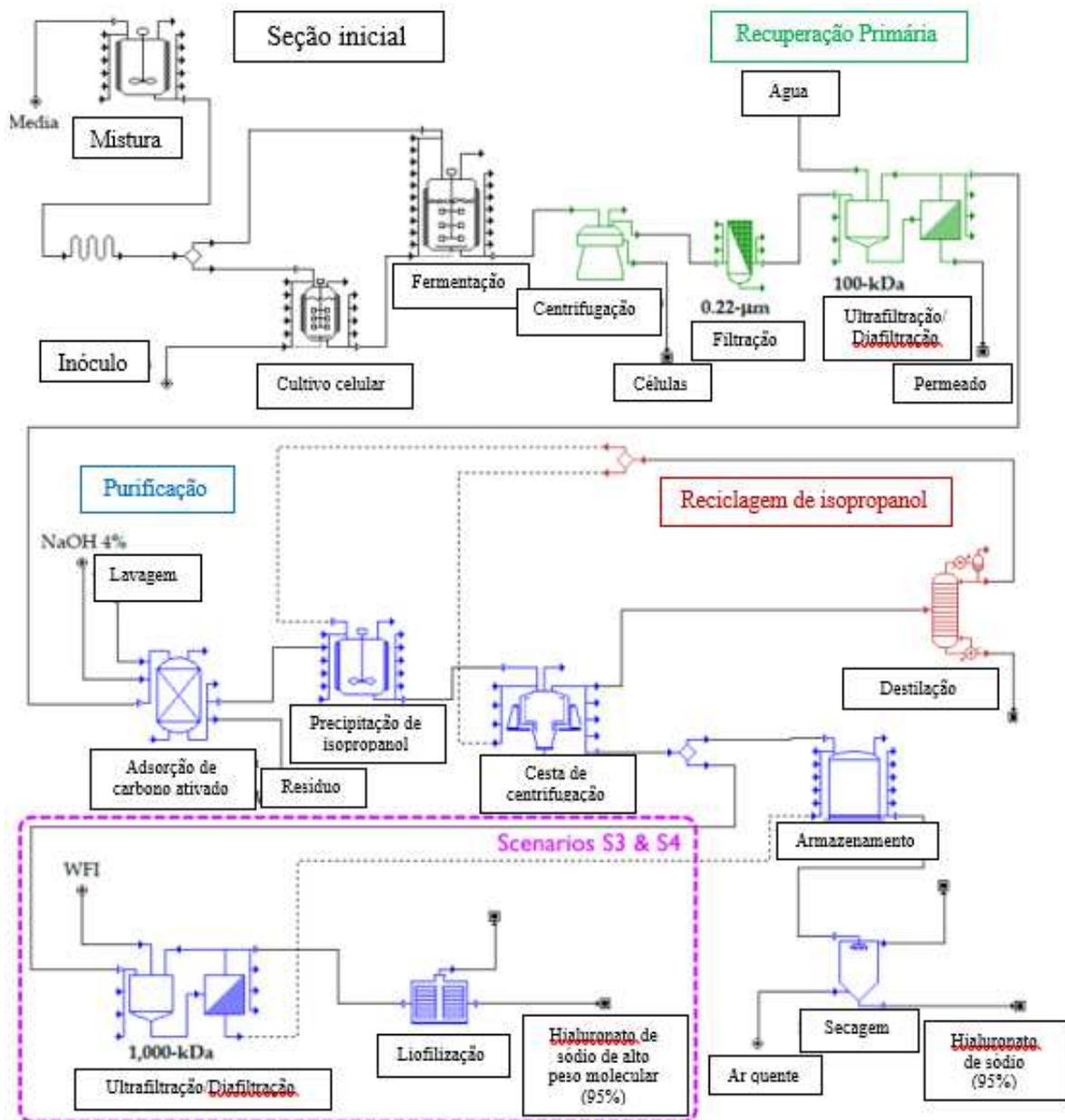
Streptococcus são microrganismos anaeróbios facultativos, porém o HA produzido em meio aeróbico apresentou maior eficiência para obtenção de HA de maior massa molar. Em condições anaeróbias, foi encontrado na literatura rendimento de 0,3 a 1,0 g/L com massa molar média de 7×10^5 , já em condições aeróbias, verificou-se ser possível obter um produto com maior massa molar (em média 2×10^6) e rendimento equivalente. Os autores constataam que a aeração e agitação são fatores importantes para o rendimento e taxa de produção de HA, sendo necessário e possível aplicar taxas de agitação sem danificar as moléculas do produto desejado (PIRES, 2009)

3.2.5. Produção Industrial

Apesar da biossíntese ser bastante estabelecida e estudada na literatura, Sadhasivam e colaboradores (2011) preconizam que seja substancial otimizar as características do processo, já que a escala industrial demanda mais insumos e por isso pode não ter a mesma eficiência que o organismo realizando o processo naturalmente em sua célula. Assim, as características químicas devem ser preservadas para o aumento de produção, de forma a garantir a degradação do produto, a compatibilidade e seu uso como insumo farmacêutico e cosmético. Para tal, é possível adicionar substâncias nos compostos de interesse e também é possível utilizar o método de reticulação, onde são criados compostos de estrutura e massa maiores. É comum realizar o método de reticulação para géis de fins estéticos.

Para obter os produtos biotecnológicos gerados pelos microrganismos, são necessárias três etapas essenciais, o *upstream*, a transformação e o *downstream*. A primeira etapa corresponde ao momento em que o microrganismo é escolhido, tratado e são preparados os reagentes. Já na transformação, os microrganismos produzirão os compostos de interesse. Por fim, a última etapa será responsável por separar e purificar estes compostos, sendo estes já intitulados como produtos (FERREIRA *et al.*, 2021). No entanto, estas etapas são bem mais complexas, o que é demonstrado na Figura 4 com maior detalhe.

Figura 4 – Detalhamento da produção de HA por microrganismos. (adaptado de FERREIRA *et al.*, 2021)



O modelo proposto por Ferreira e colaboradores (2021) foi baseado no modelo realizado na indústria que já foram testados previamente em outros trabalhos realizados pelo

seu grupo, patentes e também baseado na literatura. Manteve-se a planta em operação por um período de 330 dias, conseguindo obter no modelo de sistema descontínuo alimentado um total de 5,0g/L a cada ciclo de produção. O modelo utilizado pelos autores envolve uma ciclagem de etapas com pouco meio inserido constantemente nos reatores, conseguindo inserir uma etapa de purificação durante o procedimento para garantir que o HA produzido seja puro e estéril.

Já no estudo de Nasser e colaboradores (2022), a produção de HA foi baseada em cepas de *Escherichia coli* e *Bacillus megaterium*. Foi construído um plasmídeo modificado a partir de genes oriundos de *Streptococcus zoopedemicus*, produtores conhecidos de HA, sendo estes clonados e inoculados em ambas as espécies de bactérias que foram crescidas em meio específico. Na primeira modificação para *Escherichia coli*, não foi demonstrada produção significativamente estatística no processo, no entanto, ao entender a modificação necessária para produção, a comparação foi de 5mg/L a 50mg/L no primeiro experimento e 500mg/L no segundo experimento. Na modificação realizada para *Bacillus megaterium*, o mesmo plasmídeo resultou na produção de 2.476mg/L, sem a necessidade de novas modificações no plasmídeo. Os autores acreditam que bactérias Gram-positivas são capazes de produzir quantidades mais significativas de HA, devendo estas serem priorizadas no processo de produção, concordando ainda com Chong e colaboradores (2005).

Ao tentar entender a produção de HA em bactérias do gênero *Bacillus sp.*, Wang e colaboradores (2023) sequenciaram subespécies deste grupo para entender através da filogenética, os genes de produção de HA e sua conformação. Os autores descobriram que pequenas alterações de aminoácidos durante a sequenciação destes genes, faz com que as propriedades das enzimas – como as hialuronatos liases – sejam significativamente aumentadas, gerando uma quantidade maior de HA. Uma peculiaridade deste estudo é que, as bactérias foram isoladas de locais diversos, como solo profundo, ar e mar; sendo a enzima encontrada da *Bacillus sp.* isolada do ar mais abundante. A partir destes achados, os autores descobriram que é possível modificar biotecnologicamente estas proteínas, fazendo com que produzam HA em larga escala para a indústria.

Ainda durante a produção em larga escala, Ferreira e colaboradores (2021) demonstram no seu método que, durante o processo de obtenção do HA também são obtidos outros tipos de ácidos, tendo em vista os processos metabólicos comuns dos microrganismos. Alguns ácidos são os ácido acético e o ácido lático que são removidos no final da produção junto com ácidos nucleicos, biomassa e outros tipos de materiais que são considerados impurezas.

Na etapa de recuperação ocorre a clarificação e a filtração, momento em que o produto é centrifugado para que o HA seja obtido das moléculas resultantes da produção. Mesmo após este processo ainda há resíduos oriundos dos microrganismos, sendo necessário realizar uma ultrafiltração que fará uma rigorosa separação através de membranas. A partir daí, haverá uma nova filtração, de forma que o produto desta última filtração será mais de 90% do HA de interesse do processo. Apesar da sequência de filtrações, ainda é necessário realizar a purificação do produto obtido, absorvendo o carvão e precipitando álcoois, assim o HA obtido no final das filtrações poderá ser ressuspensionado, centrifugado e pulverizado e então resultando no produto desejado (FERREIRA *et al.*, 2021).

3.3. Novas tendências para biossíntese do HA

Quadro 2. Novas tendências na biossíntese do HA

Referência	Objetivos	Constatações dos autores	Conclusão
Shikina et al., 2023	Revisar as características, atividade biológica e biossíntese de ácido hialurônico de várias origens, abordando o estado atual da produção de ácido hialurônico (HA) por organismos bacterianos e fúngicos recombinantes.	O ácido hialurônico pode ser obtido através de diferentes métodos, incluindo: i) Síntese química, utilizando reações click e irradiação por luz UV; ii) Reações enzimáticas, como a degradação por hialuronidase; iii) Reações quimioenzimáticas; iv) Extração de fontes animais, através da hidrólise de tecidos animais, especialmente a crista de galo; v) Fermentação microbiana em bactérias do gênero <i>Streptococcus</i> (<i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i> , <i>Streptococcus equi subsp. equi</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>); vi) Fermentação microbiana em bactérias gram-positivas (incluindo 12 espécies do gênero <i>Lactobacillus</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Synechococcus</i> , gênero <i>Bacillus</i> , <i>Lactococcus lactis</i>); vii) Fermentação microbiana em bactérias gram-negativas (<i>Pasteurella multocida</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Agrobacterium</i>); viii) Fermentação microbiana com fungos (<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Pichia pastoris</i>).	<i>S. zooepidemicus</i> tem sido amplamente estudado como fonte biológica de ácido hialurônico (HA). Organismos recombinantes são considerados opções seguras e econômicas para a produção de HA, uma vez que não requerem purificação de toxinas. Entre as bactérias, <i>Bacillus sp.</i> e <i>Escherichia coli</i> apresentam alto potencial devido à sua disponibilidade comercial. No entanto, sua produtividade ainda não se equipara à dos produtores nativos, devido à instabilidade dos plasmídeos utilizados para a expressão gênica. Em contraste, os fungos superam as bactérias em taxa de crescimento, são menos exigentes em termos de nutrientes e são mais facilmente manipuláveis geneticamente. Esses fatores tornam os fungos organismos altamente promissores para a produção moderna de HA.

Referência	Objetivos	Constatações dos autores	Conclusão
Qui Yet <i>et al.</i> , 2021	Resumir a pesquisa sobre características bioquímicas e aplicações de HA com diferentes pesos moleculares e os métodos atuais para a preparação biológica de HA.	Os métodos de preparação biológica do ácido hialurônico (HA) envolvem diversas abordagens, incluindo: i) Extração de tecido animal, como pentes/cristas de galo, cordões umbilicais humanos e globos oculares de animais; ii) Fermentação por <i>Streptococcus</i> sp.; iii) Fermentação por <i>E. coli</i> ; iv) Fermentação por <i>B. subtilis</i> ; v) Fermentação por <i>C. glutamicum</i> ; vi) Fermentação por <i>Streptomyces albus</i> ; vii) Fermentação por <i>Pichia pastoris</i> ; e viii) Fermentação por <i>Lactococcus lactis</i> . Além disso, existem estratégias para regular a síntese de HA com pesos moleculares variáveis, que incluem: i) Degradação física, através de processos como degradação por calor, ultrasonicação, feixe de elétrons, raios X e microondas, bem como tratamento térmico; ii) Degradação química, envolvendo hidrólise ácida, ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio; iii) Métodos biológicos, como ajuste de parâmetros físico-químicos, uso de HA-sintase e controle da hidrólise de HA através da atividade de HAase.	Foram realizados avanços significativos na triagem e modificação de cepas para produção de ácido hialurônico (HA), assim como na otimização das condições de fermentação e purificação dos produtos. As aplicações industriais do HA foram amplamente reconhecidas, impulsionando pesquisas detalhadas sobre suas vias metabólicas e enzimas-chave. Isso resultou em um progresso notável no campo.
Humaira <i>et al.</i> , 2022	Destacar as características estruturais e físico- químicas do ácido hialurônico via fermentação microbiana, com foco particular na fabricação de nanofibras à base de HA por eletrofiação e parâmetros que afetam sua síntese, progresso atual em aplicações médicas dessas nanofibras à base de HA por eletrofiação, suas limitações e perspectivas futuras sobre o potencial dessas nanofibras à base de HA na área médica	Inicialmente, as cepas de estreptococos A e C foram utilizadas na produção industrial de ácido hialurônico (HA). Atualmente, diversos produtos comerciais à base de HA, como Juvederm® da Allergan e Restylane® da Q-med AB, são produzidos por meio do uso de <i>Streptococcus equi</i> . Recentemente, a literatura científica descreveu vários protocolos para a produção microbiana de HA por meio da fermentação, utilizando cepas de referência de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i> , em diferentes condições de cultivo. Além disso, foram relatados estudos sobre as aplicações médicas de nanofibras derivadas de HA, produzidas por meio de eletrofiação, como a fabricação de curativos, engenharia de tecidos utilizando andares de nanofibras e como carreadores de medicamentos.	Embora tenham sido realizados diversos estudos sobre a fabricação de nanofibras (NFs) à base de ácido hialurônico (HA), ainda há desafios técnicos a serem superados. Questões como quebras de circuito e parâmetros de solução, como alta viscosidade e condutividade do HA, precisam ser gerenciadas para melhorar a estabilidade, resistência à tração e características estruturais, como porosidade, que afetam a atividade biológica dessas NFs. O avanço no desenvolvimento de protocolos otimizados de eletrofiação e estratégias de implantação pode ampliar as aplicações médicas dessas NFs baseadas em biopolímeros.

Referência	Objetivos	Constatações dos autores	Conclusão
Rodríguez <i>et al.</i> , 2022	Lançar luz sobre as principais vias de produção de HA, vantagens e desvantagens, juntamente com os esforços atuais na extração e purificação desta molécula de alto valor agregado de diferentes fontes.	Houve progressos significativos na extração e produção de ácido hialurônico (HA) por meio de diversas abordagens bacterianas. Esses avanços abrangem a obtenção de HA com diferentes pesos moleculares para uma variedade de finalidades, especialmente aplicações médicas. <i>Streptococcus equi ssp.</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> geneticamente modificado, <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> e <i>Lactococcus lactis</i> são algumas das bactérias utilizadas nesse processo, com a concentração do HA expressa em kilodaltons.	Até o momento, a fermentação bacteriana se destaca como a rota mais promissora para a produção de ácido hialurônico (HA) de alto peso molecular. Embora haja várias fontes para a produção de HA, a ampla diversidade de bactérias capazes de sintetizar essa molécula tem impulsionado esforços significativos nessa área. No que diz respeito às estratégias de extração e purificação, as etapas iniciais de pré-purificação envolvem operações unitárias convencionais, como centrifugação e diversas precipitações utilizando solventes polares. Por outro lado, a ultrafiltração (UF), a diafiltração (DF) e a cromatografia de exclusão de tamanho são os métodos de purificação final mais preferidos. Um importante escopo de pesquisa proposto para a melhoria da produção de cepas bacterianas existentes é a engenharia genética.
Gunasekaran V, D G, V P, 2020	Entender o papel das proteínas de membrana na síntese de HA em bactérias e o papel que desempenham no rendimento e peso molecular de HA, propondo baseado na literatura, como as proteínas de membrana e mecanismos celulares, como o controle da transcrição, podem ser utilizados para desenvolver cepas industriais eficientes que aumentam o rendimento e o tamanho do HA produzido.	Em cepas não modificadas, apenas algumas espécies de <i>Streptococcus</i> e <i>Pasteurella</i> têm sido observadas produzindo quantidades consideráveis de cápsula de ácido hialurônico (HA). Em todos os <i>Streptococcus sp.</i> identificados como produtores de HA, foi constatado que as proteínas HasA desempenham um papel crucial tanto na síntese quanto no transporte do HA. No caso de algumas <i>Pasteurella sp.</i> , as proteínas envolvidas na síntese e no transporte do HA são diferentes. Além disso, as proteínas responsáveis exclusivamente pela síntese do HA não são proteínas de membrana.	Existem proteínas de membrana específicas que acredita-se estarem envolvidas na transferência de ácido hialurônico (HA) através da membrana. A produção de HA ocorre sempre nas fases de crescimento e não na fase estacionária em estirpes de tipo selvagem, devido ao controle transcricional do operon has ⁴ . Tanto os ativadores quanto os repressores da transcrição foram identificados em bactérias estudadas para a produção de HA. A cepa mais comumente utilizada para a produção industrial é <i>S. zooepidemicus</i> , despertando um grande interesse entre os pesquisadores. Portanto, há um interesse significativo nas cepas de <i>S. zooepidemicus</i> na comunidade científica.

⁴ Início da transcrição com três genes, hasA, hasB e hasC.

Referência	Objetivos	Constatações dos autores	Conclusão
Serra M <i>et al.</i> , 2023	Apresentar e discutir as estratégias de fermentação disponíveis para produzir ácido hialurônico.	Os autores destacam como variáveis nas estratégias de fermentação do ácido hialurônico a seleção do microrganismo e do meio de cultivo. Isso levanta a discussão sobre a utilização de potenciais meios de cultivo obtidos a partir de fontes alternativas, bem como a suplementação desses meios, as condições de cultivo, a configuração do fermentador e o modo de cultura. Os microrganismos mencionados nesse contexto são <i>Streptococcus ssp.</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> e <i>Lactococcus lactis</i> .	A produção de ácido hialurônico (HA) por meio de microrganismos requer a escolha cuidadosa do substrato, suplementos e condições de cultura. É possível utilizar fontes alternativas como substratos nos meios de cultura. A suplementação do meio, juntamente com o controle da temperatura, pH, aeração, agitação e concentração do substrato, desempenha um papel fundamental nesse processo.
Ucm R <i>et al.</i> , 2022	Apresentar o progresso da pesquisa tecnológica de HA, discutindo os aspectos biossintéticos microbianos	A produção de ácido hialurônico (HA) através de diferentes rotas microbianas e em diferentes meios de fermentação envolve a utilização de microrganismos como <i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> e <i>Corynebacterium glutamicum</i> . No que diz respeito aos avanços nos modos de fermentação, são aplicados diferentes métodos, incluindo batelada, batelada repetida, batelada alimentada e fermentação contínua. Os processos de purificação e separação, conhecidos como <i>downstream</i> , geralmente empregam o isopropanol como agente precipitante preferido. Para alcançar altos níveis de pureza, um requisito essencial no mercado consumidor de HA, são necessários métodos robustos de purificação, como ultrafiltração, diafiltração, adsorção com carvão ativado, entre outros.	A produção biotecnológica emerge como uma abordagem viável para atender à demanda do mercado de ácido hialurônico (HA), desde que sejam considerados cuidadosamente a seleção precisa de microrganismos, a fermentação e as etapas de purificação. No entanto, a produção biotecnológica de HA ainda requer mais pesquisas, especialmente no campo da biologia sintética, integração de abordagens de engenharia genética e avanços tecnológicos em biorreatores estratégicos. Esses esforços adicionais podem aprimorar significativamente a eficiência e a qualidade da produção de HA baseada em biotecnologia.

Referência	Objetivos	Constatações dos autores	Conclusão
Yao ZY et al., 2021	Apresentar a produção de HA por microrganismos e demonstrar seu mecanismo de síntese, com foco no estado atual em vários sistemas de produção, bem como estratégias comuns de biologia sintética, incluindo direcionar mais fluxo de carbono para a biossíntese de HA e regular o peso molecular (MW) e finalmente discutir os principais desafios e perspectivas.	Os autores observaram uma limitação de cepas recombinantes competitivas na biotecnologia industrial, com pouca utilização de hospedeiros promissores, como <i>Saccharomyces</i> sp. e células de mamíferos. No entanto, com o avanço das tecnologias de integração e modificação do genoma, surgem novas possibilidades para aprimorar as cepas produtoras de HA. Uma solução pode ser o aumento do espaço extracelular através da modificação do volume das células bacterianas que acumulam HA. Para isso, os inibidores da divisão celular, como as proteínas Sula e MinCD, podem ser utilizados para inibir a função dos genes-chave da divisão celular bacteriana, como o <i>ftsZ</i> . A superexpressão desses genes inibe a formação do anel FtsZ (anel Z), impedindo a divisão celular normal e resultando em células com maior espaço interno para a acumulação de produtos. Isso pode aumentar a taxa de sedimentação bacteriana, o que é importante para a extração subsequente do HA na etapa de purificação. Combinando essas estratégias, é possível melhorar a eficiência da produção de HA e explorar novos hospedeiros para a biotecnologia industrial.	A pesquisa sobre estratégias de engenharia metabólica para alcançar uma alta produção de HA envolve diversas abordagens. Isso inclui bloquear vias de competição, aumentar o fluxo na biossíntese de HA e aprimorar as enzimas envolvidas nessa via. Além disso, estratégias de regulação do peso molecular, como ajustar a proporção de precursores e utilizar abordagens enzimáticas combinadas são importantes para obter HA com distribuição de peso molecular específica. A aplicação dessas estratégias de regulação de peso molecular, por meio da biologia sintética, permite a produção de oligossacarídeos de HA específicos, o que impulsionará a ampla utilização do HA em áreas como medicina clínica, cosméticos e indústrias de alimentos.
Nazari A et al., 2021	Desenvolver um método de extração de HA de raízes pilosas de <i>Nicotiana tabacum</i> .	A sequência otimizada da enzima sintase2 do ácido hialurônico humano (hHAS2) foi introduzida em plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> por meio de transformação com <i>Agrobacterium rhizogenes</i> . Nas raízes transgênicas de tabaco, foi observada a maior concentração de hHAS2, alcançando 65,72 ng/kg, com uma atividade antioxidante, medida pela capacidade de sequestro do radical DPPH, de 46% a uma concentração de 0,56 g/kg. O ácido hialurônico produzido por essa modificação genética possui um alto peso molecular, superior a 0,8 MDa.	Foi desenvolvido um sistema de expressão vegetal eficiente e rápido para a produção de ácido hialurônico (HA), uma substância que não é naturalmente sintetizada pelas plantas. As raízes pilosas de tabaco transgênico mostraram-se promissoras e seguras como um sistema para a produção de HA. Além disso, o HA acumulado em tubérculos, frutas e raízes pode ser facilmente coletado e utilizado em alimentos e produtos cosméticos, reduzindo os custos de extração e purificação. Com a produção de HA em plantas transgênicas sendo uma opção de baixo custo, espera-se que as pesquisas nesse campo se expandam rapidamente em diversas indústrias.

Referência	Objetivos	Constatações dos autores	Conclusão
Cemilli S et al, 2011	Explorar as características fenotípicas da cepa <i>Bacillus subtilis</i> 3NA para criar uma plataforma para produção de biomoléculas usando HA como prova de conceito.	Foi desenvolvida a cepa 3NA com o objetivo de produzir ácido hialurônico (HA). Um meio de cultura quimicamente definido foi formulado, contendo sais inorgânicos nas proporções estequiométricas adequadas para sustentar o crescimento da biomassa e a produção de HA. Além disso, foi desenvolvido um processo de fermentação escalonável que permite a produção de HA com alta produtividade volumétrica.	Uma análise econômica comparativa em relação a outros métodos revela que o novo processo pode resultar em um aumento de mais de 100% no lucro operacional de uma fábrica. O uso do hospedeiro, do meio de cultura e da abordagem lógica empregada no desenvolvimento do processo de fermentação descrito aqui estabelece uma plataforma adaptável para a produção de diversas outras biomoléculas.
Ozean A, Germec M, Turhan I, 2022	Avaliar vantagens de alfarroba para produção microbiana de HA e modelagem cinética da fermentação de HA.	Através da associação do extrato de alfarroba com <i>Streptococcus zooepidemicus</i> , foi determinada a composição ideal do meio de cultura. A produção máxima de ácido hialurônico (HA) obtida em uma fermentação em frasco agitado foi de 2,6 g/L ($1,25 \times 10^6$) no meio otimizado. Essa composição ideal do meio foi utilizada para realizar a fermentação, e o processo foi modelado por meio de três modelos distintos: o modelo logístico para a produção de biomassa, o modelo Luedeking-Piret para a produção de HA e o modelo Luedeking-Piret modificado para o consumo do substrato. Ao estimar os dados reais utilizando esses modelos cinéticos, foram obtidos valores de R^2 superiores a 0,80, indicando uma consistência adequada entre os dados estimados e os dados reais.	Este estudo demonstrou que a alfarroba possui potencial como fonte de carbono para a produção de ácido hialurônico (HA). O HA produzido em meio contendo alfarroba apresentou um alto peso molecular, classificado como HA de alto peso molecular ($> 1,0$ MDa). Esse tipo de HA pode ser utilizado em diversas aplicações, incluindo alimentos, cosméticos e especialmente em aplicações clínicas.

Referência	Objetivos	Constatações dos autores	Conclusão
Gao W <i>et al.</i> , 2022	Identificar repressores transcricionais putativos em <i>S. zooepidemicus</i> e compreender sua capacidade ou incapacidade de regular ou não a síntese de HA	Foi realizada a construção de uma cepa com deleção do gene individual, e foram detectadas alterações fenotípicas nas cepas correspondentes em relação à tolerância ao estresse e produção de HA. Uma das cepas apresentou maior sensibilidade à alta temperatura, enquanto a outra demonstrou maior resistência ao estresse oxidativo. A deleção de três repressores transcricionais resultou em níveis significativamente reduzidos de transcrição do gene <i>hasA</i> . O impacto da proteína ScrR na regulação da produção de HA foi investigado através da análise da expressão transcricional dos genes <i>scrA</i> e <i>scrB</i> , que são alvos diretos do regulon ⁵ ScrR. A deficiência de ScrR resultou em uma expressão desequilibrada de <i>scrA</i> e <i>scrB</i> , o que pode contribuir parcialmente para a redução na produção de HA.	A regulação da síntese de HA e a resistência a estresses ambientais em <i>S. zooepidemicus</i> são controladas por diversos repressores transcricionais. Uma abordagem genética sistêmica pode aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de regulação fisiológica em <i>S. zooepidemicus</i> , contribuindo para o desenvolvimento de cepas industriais de alto desempenho na produção de HA.
Wang J <i>et al.</i> , 2021	Determinar a influência de nanopartículas no rendimento de HA, além dos efeitos da adição de nanopartículas no peso molecular médio de HA e no mecanismo de absorção de células bacterianas para algumas das nanopartículas de interesse.	Foram realizados testes utilizando diferentes doadores de ferro, como FeSO ₄ ·7H ₂ O, nanopartículas de ferro de valência zero (Fe NPs) e nanopartículas de óxido férrico (α -Fe ₂ O ₃ NPs), para investigar seu impacto na produção de HA. O bioprocessamento que utilizou uma adição de 30 mg/L de Fe NPs resultou na maior produção de HA em comparação com os demais grupos. No entanto, as Fe NPs foram limitadas devido ao efeito sinérgico do geomagnetismo e à alta energia de superfície, o que levou a uma aglomeração evidente. Para solucionar esse problema, foram desenvolvidas novas nanopartículas de ferro modificadas com sacarose (SM-Fe NPs), que apresentaram uma dispersão e aglomeração mais efetivas. Com relação aos aditivos de SM-Fe NP, um suprimento adequado de nutrientes e oligoelementos proporcionou substratos e energia suficientes para a reprodução do <i>Streptococcus zooepidemicus</i> .	A adição de sacarose durante o processo de preparação foi efetiva para melhorar a dispersão das nanopartículas de ferro (Fe NPs). As nanopartículas modificadas com sacarose (NPs SM-Fe) demonstraram excelente estabilidade e forneceram nutrientes e oligoelementos adequados para a proliferação e atividade das células microbianas, resultando em um aumento significativo na produção de HA. Com a adição de 30 mg/L de NPs SM-Fe, a produção de HA aumentou 3,28 vezes em comparação com o grupo controle, enquanto a adição de FeSO ₄ ·7H ₂ O e α -Fe ₂ O ₃ NPs apresentou baixa atividade. Portanto, a utilização eficiente das NPs SM-Fe para a produção de HA é um método promissor, especialmente no âmbito da produção industrial.

⁵ Conjunto de genes regulados pela mesma proteína.

Referência	Objetivos	Constatações dos autores	Conclusão
Flares-Cuticle M et al, 2021	Explorar o uso de PEG-citrato ATPS para a recuperação primária e purificação parcial de HA produzido em <i>S. zooepidemicus</i> .	O citrato de sódio foi escolhido devido às suas propriedades biodegradáveis e não tóxicas, o que torna o descarte dos sais de citrato mais ecologicamente correto em comparação com os sais de fosfato, especialmente em escala industrial. Na primeira etapa, foram estudados os efeitos do peso molecular do PEG no comprimento da fase de amarração, na razão de volume e no comportamento de partição, bem como na recuperação de amostras puras de HA. Em seguida, o sistema de duas fases aquosas PEG-citrato com a melhor recuperação foi selecionado e testado diretamente no caldo de fermentação de <i>S. zooepidemicus</i> .	Neste estudo, foi comprovado que o sistema PEG-citrato ATPS apresenta um grande potencial como uma estratégia eficaz de recuperação primária para o processo de produção de HA microbiano.
Jafarizadeh B et al, 2021	Utilizar a mutagênese química aleatória para o desenvolvimento de cepas mutantes de <i>Streptococcus equisimilis</i> grupo G com alta produtividade de HA.	Após o isolamento inicial de 10 cepas não patogênicas de GCS e GGS, uma cepa da GGS foi submetida a mutagênese química aleatória, resultando na supressão de mutações estáveis de transição entre GC e AT na cadeia de DNA. Em seguida, foram identificados mutantes com alta produção de estreptolisina ⁶ e hialuronidase negativas por meio de rastreamento. A consistência na morfologia e na produção de HA de alta produção foi avaliada por meio de 10 passagens em uma placa de ágar sangue. Por fim, o peso molecular dos HAs purificados foi determinado por meio de eletroforese em gel de agarose	No geral, foram identificadas cepas mutantes do tipo selvagem GGS com a capacidade de produzir HA em um pH mais baixo e em um tempo menor em comparação com as condições de fermentação estreptocócica convencionais. Esses mutantes demonstraram um título em massa ⁷ mais elevado de HA do que o tipo selvagem, o que os torna candidatos promissores para produção em larga escala. Além disso, é importante ressaltar que os HAs produzidos por essas cepas mutantes apresentaram baixo peso molecular e propriedades polidispersas, o que sugere seu potencial de aplicação em áreas como biologia e medicina.

⁶ Exotoxina estreptocócica.

⁷ Calcula concentração de uma solução.

Referência	Objetivos	Constatações dos autores	Conclusão
Pan L <i>et al.</i> , 2021	Lançar luz sobre o metabolismo do HA e entender a biodisponibilidade do HA do ponto de vista da microbiota intestinal.	Foi realizado um estudo para avaliar e comparar a degradação do HA pela microbiota intestinal de dez indivíduos chineses. O sequenciamento de alto rendimento do rRNA 16S foi utilizado para investigar como a fermentação do HA é modulada pela comunidade da microbiota intestinal. Foram realizadas análises sistemáticas dos produtos de degradação do HA, incluindo oligossacarídeos derivados de HA, bem como dos ácidos graxos de cadeia curta benéficos fermentados pela microbiota intestinal humana. Além disso, três bactérias isoladas da microbiota (<i>Bacteroides xylanisolvens</i> G25, <i>Bacteroides uniformis</i> L8 e <i>Bacteroides ovatus</i> E3) foram utilizadas para investigar o mecanismo de degradação do HA. Durante o estudo, também foram identificadas as enzimas responsáveis pela degradação do HA na microbiota intestinal.	A microbiota intestinal humana demonstrou ser capaz de degradar o HA em oligossacarídeos de números pares e ímpares, apresentando diferentes taxas de degradação. A fermentação do HA resultou no aumento da abundância de várias espécies bacterianas, como <i>Bacteroides spp.</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Dialister spp.</i> e <i>Faecalibacterium spp.</i> , capazes de fermentar o HA e produzir ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato, em quantidades significativas. Foi observado que <i>B. ovatus</i> E3 e <i>B. xylanisolvens</i> G25 são microrganismos intestinais que têm capacidade positiva de degradação do HA. Além disso, foram identificadas enzimas ativas no HA, como GH 88, PL 8, PL 29, PL 35 e PL 33, provenientes de <i>B. ovatus</i> E3. Esses achados proporcionam <i>insights</i> importantes sobre o metabolismo do HA pela microbiota intestinal humana, com possíveis aplicações no desenvolvimento de suplementos dietéticos e aditivos alimentares saudáveis.
Nasser H <i>et al.</i> , 2022	Investigar a aplicabilidade de quatro cepas de <i>E. coli</i> como plataformas potenciais para a produção de HA.	Foram desenvolvidos sistemas de expressão episomal para o gene <i>hasA</i> , juntamente com outros genes do operon envolvidos na via biossintética do HA. A produção de HA foi confirmada em todas as cepas estudadas (<i>pLys Y/Iq</i> , <i>Rosetta2</i> , <i>Rosetta2 (DE3) pLysS</i> , <i>Rosetta-gami B (DE3) pLysS</i> e <i>B. megaterium (MS941)</i>). A presença do HA foi verificada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), enquanto seu teor foi monitorado em diferentes meios de cultura através de ensaios turbidimétricos. O peso molecular do HA foi caracterizado por cromatografia de permeação em gel. Além disso, cepas recombinantes selecionadas foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).	Os resultados indicam que as bactérias Gram-positivas são preferenciais como hospedeiras para a produção recombinante de HA em comparação com as bactérias Gram-negativas. Tanto os títulos em massa quanto o peso molecular (MW) do HA produzido por <i>B. megaterium</i> foram significativamente maiores do que os obtidos pelas diferentes cepas hospedeiras de <i>E. coli</i> utilizadas neste estudo.

Referência	Objetivos	Constatações dos autores	Conclusão
Cavalcanti ADD <i>et al.</i> , 2019	Estudar os efeitos das proporções etanol/caldo e o número de etapas (pH variável, presença ou ausência de cloreto de sódio), como estratégias de precipitação para a recuperação e purificação de ácido bio-hialurônico de alta massa molar (Bio-HA).	Por meio do estudo dos efeitos da proporção de etanol, pH e NaCl na precipitação de HA com etanol, foi possível compreender como essas variações afetam a produção do Bio-HA. Os resultados foram analisados considerando a recuperação e a pureza como parâmetros de desempenho da precipitação. Além disso, a análise de espalhamento de luz permitiu observar a distribuição de tamanho dos precipitados, fornecendo <i>insights</i> sobre as mudanças estruturais em diferentes valores de pH. O HA foi obtido a partir de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> , cultivado em um meio contendo apenas glicose e peptona de soja. Esses resultados contribuíram para uma melhor compreensão da purificação do HA, uma vez que a precipitação geralmente é o primeiro passo no processo global de purificação.	O pH e o NaCl exercem influência na pureza e recuperação do HA durante a precipitação com etanol. As diferentes estruturas do HA em diferentes valores de pH desempenham papéis importantes no processo de precipitação. Observou-se que as distribuições de massa molar do HA não foram significativamente afetadas pelas condições de precipitação. Estudos futuros podem explorar o uso de outros solventes para otimizar a precipitação em condições específicas, bem como investigar a proporção HA/proteína e os efeitos de superfície, especialmente quando se busca obter HA purificado para aplicações clínicas.
Hao L <i>et al.</i> , 2019		Foram realizadas otimizações nas condições de fermentação da cepa <i>Pseudoalteromonas agarivorans</i> , resultando em um rendimento médio de EPS de $2,604 \pm 0,022$ g/L. O EPS obtido apresentou uma concentração de $n = 2,26 \times 10^5$ g/mol e $M_w = 2,81 \times 10^5$ g/mol. Observou-se um coeficiente de dispersão de 1,24, indicando uma dispersão moderada. Além disso, o EPS apresentou uma pureza relativa uniforme.	A pesquisa revelou que a glicose é o componente principal do EPS, representando mais de 90,28% de sua composição. Além disso, constatou-se que o EPS possui excelente capacidade de absorção de umidade e retenção de água, comparável à quitosana e ao hialuronato de sódio, amplamente utilizados como hidratantes. O EPS também demonstrou uma capacidade significativa de remoção de radicais hidroxila (OH) com uma taxa de depuração de até 12%. Além disso, o EPS exibiu um efeito notável na eliminação de O_2 . Em relação à adsorção de íons metálicos, o EPS apresentou uma alta capacidade de adsorção para Cu^{2+} e Pb^{2+} , com taxas de adsorção alcançando 69,79% e 82,46%, respectivamente. O efeito de adsorção do EPS para Pb^{2+} foi particularmente superior ao do Cu^{2+} . Essas características tornam o EPS altamente promissor em diversos campos, como cosméticos e proteção ambiental.

Referência	Objetivos	Constatações dos autores	Conclusão
Gottschalk J <i>et al.</i> , 2019	Entender e controlar os fatores-chave para a síntese complexa de HA	A síntese "one-pot" do ácido hialurônico (HA) envolve a utilização de seis enzimas distintas para a construção da cadeia de HA a partir dos monossacarídeos GlcA e GlcNAc, que são facilmente obtidos e de baixo custo. Para essa síntese, é essencial uma composição específica de íons metálicos, incluindo Mg^{2+} , Mn^{2+} e K^+ , que são ajustados para otimizar a atividade das enzimas PmHAS e EM UDP-GlcNAc. O íon K^+ também melhora a atividade da enzima AtGlcAK. O pH e a concentração de Mg^{2+} são fatores cruciais para controlar a síntese de HA. Condições ideais de síntese foram alcançadas em um tampão HEPES-NaOH com pH 8, utilizando uma alta concentração (25 mM) de Mg^{2+} . Nessa configuração, foi possível obter HA de alto peso molecular (1,54 MDa), com baixa dispersão (1,05) e um rendimento de 80,2%, resultando em uma concentração final de HA de 1,4 g/L. Em outra configuração, com 15 mM de Mg^{2+} em HEPES-NaOH (pH 8,5), foi alcançada uma alta concentração de HA (2,7 g/L) com um rendimento de 86,3%, tamanho médio de 1,49 MDa e dispersão de 1,2.	Foi comprovado que a síntese in vitro "one-pot" pode ser adaptada para a produção de ácido hialurônico (HA) de alto peso molecular e baixa dispersão.
Gao W <i>et al.</i> , 2022	Explorar os papéis dos sistemas R-M na transformação genética de DNA estranho, construindo mutantes deficientes em R-M e avaliando os fenótipos de mutantes individuais.	Este estudo investigou os papéis do sistema tipo IR-M e do sistema tipo II R-M em <i>S. zooepidemicus</i> . Foram criados mutantes <i>knockout</i> do gene do sistema R-M e seus efeitos na eficiência da transformação foram avaliados. Além disso, os mutantes com deficiência no sistema R-M foram submetidos à análise de crescimento e fermentação de HA para avaliar os efeitos da deleção do gene no metabolismo global.	Este estudo teve como objetivo analisar os papéis da subunidade tipo IR-M e da endonuclease de restrição da família ScaI tipo II por meio da deleção in-frame. Como resultado, foi criado um mutante deficiente na endonuclease de restrição da família ScaI tipo II, o qual apresentou uma eficiência de transformação significativamente aumentada. Esse mutante pode ser uma ferramenta valiosa para acelerar o desenvolvimento de linhagens mais eficientes e robustas na produção industrial de HA e outros produtos químicos finos. A eliminação bem-sucedida dos sistemas R-M proporcionará maior eficiência na transformação genética de <i>S. zooepidemicus</i> , acelerando assim o desenvolvimento de cepas comerciais para a produção eficiente de HA.

Referência	Objetivos	Constatações dos autores	Conclusão
Wang Y <i>et al.</i> , 2020	Descrever a engenharia metabólica de <i>Corynebacterium glutamicum</i> e a aplicação de uma estratégia de fermentação para fabricar hialuronano com diferentes pesos moleculares.	Foi realizado o projeto de <i>C. glutamicum</i> para a produção eficiente de HA, por meio da seleção da via de síntese mais produtiva. Isso envolveu a superexpressão de enzimas intermediárias que convertem glicose em UDP-GlcA e UDP-GlcNAc, os blocos de construção do HA, além de reduzir a produção endógena de polissacarídeo extracelular. A cepa modificada alcançou uma produção de 34,2 g/L de HA em culturas descontínuas alimentadas. No entanto, a formação de uma camada semelhante a uma cápsula de HA limitou a absorção de nutrientes e inibiu ainda mais a síntese de HA. Para superar esse efeito inibitório, a hialuronidase de sanguessugas (LHYal, hidrolase) foi adicionada à cultura descontínua alimentada, promovendo a quebra da cápsula celular e reduzindo a viscosidade do meio de cultura. Essa estratégia melhorou a captação de glicose e a produção de HA. O uso da hialuronidase de sanguessugas resultou em hiperprodução de hialuronano, atingindo uma concentração de 74,1 g/L.	A otimização da via de biossíntese do HA, a desativação da produção de polissacarídeos extracelulares, a quebra do encapsulamento celular e a solução do problema de transferência de massa através da suplementação com LHYal, levaram ao desenvolvimento de uma fábrica de células <i>C. glutamicum</i> altamente eficiente e a uma abordagem de fermentação. Os resultados e estratégias descritos neste estudo têm potencial para serem aplicados também na produção de outros biopolímeros.
Wei C <i>et al.</i> , 2019	Sintetizar com eficiência os oligossacarídeos de HA e resolver o oxigênio dissolvido no processo de fermentação	Neste estudo, realizou-se a superexpressão da enzima sintase de HA (HasA) e a introdução e otimização da sanguessuga hialuronidase LHAase em <i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24. Como resultado, foi obtida uma produção eficiente de oligossacarídeos de HA com melhor oxigênio dissolvido. Após 24 horas, a taxa de produção de oligossacarídeos de HA atingiu 294,2 mg/(L·h), com uma concentração acumulada de 0,97 g/L em frascos de cultura, o que representa um aumento de 1,82 vezes em relação à cepa selvagem. A produção de oligossacarídeos de HA foi aumentada para 7,06 g/L em um fermentador de 3 L.	A cepa de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> desenvolvida para a produção de oligossacarídeos de HA apresenta um grande potencial de aplicação.

Referência	Objetivos	Constatações dos autores	Conclusão
Huang H <i>et al.</i> , 2020	Utilizar estratégias combinadas para alcançar a expressão constitutiva e secretora de LHyal em <i>P. pastoris</i> .	Para obter uma expressão constitutiva de LHyal em níveis elevados em <i>P. pastoris</i> , adotou-se uma estratégia combinatória que envolveu a otimização simultânea do promotor e do peptídeo sinal. Diversos marcadores foram investigados para aprimorar a expressão de LHyal. Além disso, três fatores de transcrição (Aft1, Gal4-like, Yap1), que desempenham papéis na regulação do metabolismo de carboidratos e no estresse oxidativo, foram superexpressos. Através dessas modificações, a expressão da LHyal recombinante aumentou de $4,24 \times 10^4$ para $3,03 \times 10^5$ U/mL em culturas em frascos. Por fim, a produção de LHyal foi aprimorada para $2,12 \times 10^6$ U/mL em um fermentador de 3 L.	Após otimizar o cassete de expressão de LHyal com o promotor GAP(m) e o peptídeo sinal sp23, além de realizar a modificação N-terminal com a adição de uma tag de glutamina e co-superexpressão do fator de transcrição Aft1, foi obtida uma expressão constitutiva de LHyal. Isso resultou em um aumento na atividade de $4,24 \times 10^4$ U/mL para $3,03 \times 10^5$ U/mL em culturas em frascos. Por fim, a produção de LHyal foi significativamente aprimorada para $2,12 \times 10^6$ U/mL em um fermentador de 3 L. As linhagens recombinantes desenvolvidas neste estudo são altamente promissoras para a produção industrial de LHyal.
Xie Z <i>et al.</i> , 2019	Compreender a forma como a virulência e a produção de polissacarídeos da cápsula de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> é regulada.	No genoma de <i>S. zooepidemicus</i> , há um gene que codifica o regulador Rgg. Esse gene tem baixa semelhança com os genes rgg2 e rgg3 encontrados em <i>Streptococcus pyogenes</i> . Foi descoberto que a forma ativa do feromônio é curta e hidrofóbica (LLLLKLA), consistindo dos 7 aminoácidos C-terminais do pré-peptídeo Shp. Essa sequência difere de todos os feromônios peptídicos relatados em estreptococos. Em resposta ao SHP ativo, o regulador Rgg atua como um ativador transcricional, induzindo a expressão de shp e estabelecendo um circuito de feedback positivo.	Até onde sabemos, este estudo é a primeira evidência de sinalização célula-célula mediada por Rgg/SHP em <i>S. zooepidemicus</i> , uma espécie de estreptococos de grande importância tanto na área clínica quanto na industrial. Esta descoberta tem relevância no desenvolvimento de estratégias de detecção de quórum ⁸ para o controle de infecções por <i>S. zooepidemicus</i> , além de ser importante para a engenharia metabólica dessa espécie na produção comercial de produtos HA, fornecendo um módulo de regulação autossuficiente.

⁸ Densidade microbiana.

4. DISCUSSÃO

Preconiza-se que as moléculas escolhidas para otimização do HA, devem ser estudadas não somente de acordo com a literatura, mas também testadas de acordo com as condições da produção, haja vista que podem não agir de acordo com o descrito. Condições como alimentação, temperatura, pH, agitação, aeração e meio influenciam fortemente na produção e nos resíduos dos microrganismos, sendo necessária uma experimentação mais apurada para as condições necessárias (DUFFECK *et al.*, 2020).

Para obter-se o HA bio sintético, reações de click e irradiação através de luz UV têm sido utilizadas para realizar a síntese da molécula, além disso também são feitas reações enzimáticas através da via hialuronidase, reações quimioenzimáticas através da extração de origem animal, promovendo a hidrólise dos tecidos – principalmente de tecidos de crista de galo – e também a fermentação de microrganismos do gênero *Streptococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Streptomyces sp.*, *Synechococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Pasteurella sp.*, *Escherichia coli* e *Agyobacterium sp.* A literatura também documenta que fungos do tipo levedura também são capazes de realizar fermentação e, conseqüentemente, produzir HA, como *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* e *Pichia pastoris* (SHIKINA *et al.*, 2022).

Na produção de HA, os métodos de extração e purificação que envolvem microrganismos desempenham um papel crucial. A separação a jusante e o processo de purificação são etapas fundamentais para obter um HA com alto peso molecular e alta pureza. Devido à sua importância nessas etapas críticas, eles continuam sendo obstáculos para a produção industrial de HA de qualidade superior (YAO *et al.*, 2021).

Com o objetivo de aprimorar o processo de produção de HA, muitos microrganismos passaram por modificações moleculares e genéticas. Esses organismos recombinantes são considerados pelos especialistas como fontes alternativas seguras e econômicas de HA, uma vez que não exigem purificação de toxinas. Além disso, diversos estudos mencionam o uso de espécies vegetais e organismos recombinantes na produção de HA, como a associação de *Nicotiana tabacum* com *Agrobacterium rhizogenes* ou vagens de alfarroba com *Streptococcus zooepidemicus*.

Inicialmente, as bactérias *Bacillus sp.* e *Escherichia coli* são consideradas as mais promissoras para a produção em larga escala do HA microbiano, devido à sua disponibilidade comercial. No entanto, a instabilidade dos plasmídeos usados para a expressão gênica nesses

microrganismos pode comprometer a confiabilidade e a segurança do processo. Por outro lado, os fungos apresentam uma alta taxa de crescimento e são mais facilmente manipuláveis geneticamente, o que os torna um dos organismos mais promissores para a produção moderna de HA, conforme apontado pelos autores.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de produção de HA por microrganismos passa por etapas complexas para obtenção em escala industrial, considerando que as condições normais do organismo da bactéria ou fungo utilizado devem ser recriadas cuidadosamente para garantir um produto de qualidade e eficiente. Além disso, é imprescindível que o produto seja filtrado, purificado e otimizado a fim de obter o HA livre de resíduos e puro suficiente para ser incrementado em processos e produtos de interesse para a indústria.

As novas tendências em engenharia química e biotecnológica para biossíntese de ácido hialurônico têm favorecido a obtenção do HA em condições ótimas para as diferentes finalidades de uso, além da desobrigação da exploração de tecidos animais, a redução de resíduos prejudiciais ao meio ambiente e o fortalecimento da economia através do aumento da produção do HA para uma escala industrial. O melhoramento genético dos microrganismos, configura fonte promissora de obtenção do HA, o que representa um panorama positivo para a saúde e para a estética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVALCANTI ADD, Melo BAG, Oliveira RC, Santana MHA. **Recovery and Purity of High Molar Mass Bio-hyaluronic Acid Via Precipitation Strategies Modulated by pH and Sodium Chloride.** *Appl Biochem Biotechnol.* 2019 Jun;188(2):527-539. doi: 10.1007/s12010-018-02935-6. Epub 2018 Dec 12. PMID: 30542796.

CERMINATI S, Leroux M, Anselmi P, Peirú S, Alonso JC, Priem B, Menzella HG. **Low cost and sustainable hyaluronic acid production in a manufacturing platform based on Bacillus subtilis 3NA strain.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021 Apr;105(8):3075-3086. doi: 10.1007/s00253-021-11246-6. Epub 2021 Apr 5. Erratum in: *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021 Aug;105(16-17):6529. PMID: 33818671.

CHONG BF, Blank LM, Mclaughlin R, Nielsen LK. **Microbial hyaluronic acid production.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005 Jan;66(4):341-51. doi: 10.1007/s00253-004-1774-4. Epub 2004 Nov 13. PMID: 15599518.

CMI. **Custom Marketing Insights.** Disponível em: <https://www.custommarketinsights.com/report/hyaluronic-acid-market/> Acesso em: 18 abr. 2023

CSOKA AB, Stern R. **Hypotheses on the evolution of hyaluronan: a highly ionic acid.** *Glycobiology.* 2013 Apr;23(4):398-411. doi: 10.1093/glycob/cws218. Epub 2013 Jan 12. Erratum in: *Glycobiology.* 2013 Jul;23(7):917. PMID: 23315448; PMCID: PMC3581078.

FLORES-GATICA M, Castañeda-Aponte H, Gil-Garzon MR, Mora-Galvez LM, Banda-Magaña MP, Jáuregui-Jáuregui JA, Torres-Acosta MA, Mayolo-Deloisa K, Licon-Cassani C. **Primary recovery of hyaluronic acid produced in Streptococcus equi subsp. zooepidemicus using PEG-citrate aqueous two-phase systems.** *AMB Express.* 2021 Aug 30;11(1):123. doi: 10.1186/s13568-021-01287-5. PMID: 34460012; PMCID: PMC8405770.

GAO W, Xie Y, Zuo M, Zhang G, Liu H. **Improved genetic transformation by disarmament of type II Restriction-Modification system in Streptococcus zooepidemicus.** *3 Biotech.* 2022 Sep;12(9):192. doi: 10.1007/s13205-022-03227-x. Epub 2022 Jul 26. PMID: 35910286; PMCID: PMC9325941.

GAO W, Zhang X, Zhang G, Zuo M, Cao W, Xie Z, Liu H. **Is hyaluronic acid production transcriptionally regulated? A transcriptional repressor gene deletion study in Streptococcus zooepidemicus.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021 Nov;105(21-22):8495-8504. doi: 10.1007/s00253-021-11481-x. Epub 2021 Oct 18. PMID: 34661707.

GOLIŃSKA, E., van der Linden, M., Więcek, G. et al. **Virulence factors of Streptococcus pyogenes strains from women in peri-labor with invasive infections.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35, 747–754 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2593-0>

GOTTSCHALK J, Zaun H, Eisele A, Kuballa J, Elling L. **Key Factors for A One-Pot Enzyme Cascade Synthesis of High Molecular Weight Hyaluronic Acid.** *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 12;20(22):5664. doi: 10.3390/ijms20225664. PMID: 31726754; PMCID: PMC6888640.

GUNASEKARAN V, D G, V P. **Role of membrane proteins in bacterial synthesis of hyaluronic acid and their potential in industrial production.** *Int J Biol Macromol.* 2020 Dec 1;164:1916-1926. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.077. Epub 2020 Aug 10. PMID: 32791275.

GUPTA RC, Lall R, Srivastava A, Sinha A. **Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory.** *Front Vet Sci.* 2019 Jun 25;6:192. doi: 10.3389/fvets.2019.00192. PMID: 31294035; PMCID: PMC6603175.

HAO L, Liu W, Liu K, Shan K, Wang C, Xi C, Liu J, Fan Q, Zhang X, Lu X, Xu Y, Cao R, Ma Y, Zheng L, Cui B. **Isolation, Optimization of Fermentation Conditions, and Characterization of an Exopolysaccharide from Pseudoalteromonas agarivorans** Hao 2018. *Mar Drugs.* 2019 Dec 13;17(12):703. doi: 10.3390/md17120703. PMID: 31847202; PMCID: PMC6950073.

HUANG H, Liang Q, Wang Y, Chen J, Kang Z. **High-level constitutive expression of leech hyaluronidase with combined strategies in recombinant Pichia pastoris.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Feb;104(4):1621-1632. doi: 10.1007/s00253-019-10282-7. Epub 2020 Jan 7. PMID: 31907577.

HUMAIRA, Raza Bukhari SA, Shakir HA, Khan M, Saeed S, Ahmad I, Muzammil K, Franco M, Irfan M, Li K. **Hyaluronic acid-based nanofibers: Electrospun synthesis and their medical applications; recent developments and future perspective.** *Front Chem.* 2022 Dec 23;10:1092123. doi: 10.3389/fchem.2022.1092123. PMID: 36618861; PMCID: PMC9816904.

JAFARI B, Keramati M, Ahangari Cohan R, Atyabi SM, Ali Hosseinzadeh S. **Development of Streptococcus equisimilis Group G Mutant Strains with Ability to Produce Low Polydisperse and Low-Molecular-Weight Hyaluronic Acid.** *Iran Biomed J.* 2022 Nov 1;26(6):454-62. doi: 10.52547/ibj.3789. PMID: 36437793; PMCID: PMC9841222.

KARL MEYER, John W. **Palmer, The Polysaccharide Of The Vitreous Humor, Journal of Biological Chemistry, Volume 107, Issue 3, 1934, Pages 629-634, ISSN 0021-9258, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)75338-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)75338-6)**

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 Adv.* 2018 Oct 24;8(63):36167-36171. doi: 10.1039/c8ra07349j. PMID: 35558483; PMCID: PMC9088804.

MANFRÃO-NETTO JHC, Queiroz EB, de Oliveira Junqueira AC, Gomes AMV, Gusmão de Moraes D, Paes HC, Parachin NS. **Genetic strategies for improving hyaluronic acid production in recombinant bacterial culture.** *J Appl Microbiol.* 2022 Feb;132(2):822-840. doi: 10.1111/jam.15242. Epub 2021 Aug 24. PMID: 34327773.

NASSER H, Eikmanns BJ, Tolba MM, El-Azizi M, Abou-Aisha K. **The Superiority of *Bacillus megaterium* over *Escherichia coli* as a Recombinant Bacterial Host for Hyaluronic Acid Production.** *Microorganisms*. 2022 Nov 28;10(12):2347. doi: 10.3390/microorganisms10122347. PMID: 36557601; PMCID: PMC9787986.

NAZERI A, Niazi A, Afsharifar A, Taghavi SM, Moghadam A, Aram F. **Heterologous production of hyaluronic acid in *Nicotiana tabacum* hairy roots expressing a human hyaluronan synthase 2.** *Sci Rep*. 2021 Sep 9;11(1):17966. doi: 10.1038/s41598-021-97139-0. PMID: 34504153; PMCID: PMC8429445.

OWEN SC, Kuo JW, Prestwich GD. 2.14 **Ácido hialurônico.** *Em Biomateriais Abrangentes II*. Elsevier; 2017. pp. 306–331.

OZCAN A, Germec M, Turhan I. **Optimization and kinetic modeling of media composition for hyaluronic acid production from carob extract with *Streptococcus zooepidemicus*.** *Bioprocess Biosyst Eng*. 2022 Dec;45(12):2019-2029. doi: 10.1007/s00449-022-02806-9. Epub 2022 Nov 3. PMID: 36329267.

PAN L, Ai X, Fu T, Ren L, Shang Q, Li G, Yu G. **In vitro fermentation of hyaluronan by human gut microbiota: Changes in microbiota community and potential degradation mechanism.** *Carbohydr Polym*. 2021 Oct 1;269:118313. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118313. Epub 2021 Jun 9. PMID: 34294327.

PRYDZ K. **Determinantes da Estrutura de Glicosaminoglicanos (GAG).** *Biomoléculas*. 21 de agosto de 2015;5(3):2003-22. doi: 10.3390/biom5032003. PMID: 26308067; PMCID: PMC4598785.

QIU Y, Ma Y, Huang Y, Li S, Xu H, Su E. **Current advances in the biosynthesis of hyaluronic acid with variable molecular weights.** *Carbohydr Polym*. 2021 Oct 1;269:118320. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118320. Epub 2021 Jun 9. PMID: 34294332.

RODRIGUEZ-MARQUEZ CD, Arteaga-Marin S, Rivas-Sánchez A, Autrique-Hernández R, Castro-Muñoz R. **A Review on Current Strategies for Extraction and Purification of Hyaluronic Acid.** *Int J Mol Sci*. 2022 May 27;23(11):6038. doi: 10.3390/ijms23116038. PMID: 35682710; PMCID: PMC9181718.

SERRA M, Casas A, Toubarro D, Barros AN, Teixeira JA. **Microbial Hyaluronic Acid Production: A Review.** *Molecules*. 2023 Feb 23;28(5):2084. doi: 10.3390/molecules28052084. PMID: 36903332; PMCID: PMC10004376.

SHIKINA EV, Kovalevsky RA, Shirkovskaya AI, Toukach PV. **Prospective bacterial and fungal sources of hyaluronic acid: A review.** *Comput Struct Biotechnol J*. 2022 Nov 10;20:6214-6236. doi: 10.1016/j.csbj.2022.11.013. PMID: 36420162; PMCID: PMC9676211.

UCM R, Aem M, Lhb Z, Kumar V, Taherzadeh MJ, Garlapati VK, Chandel AK. **Comprehensive review on biotechnological production of hyaluronic acid:**

status, innovation, market and applications. Bioengineered. 2022 Apr;13(4):9645-9661. doi: 10.1080/21655979.2022.2057760. PMID: 35436410; PMCID: PMC9161949.

WANG J, He W, Wang T, Li M, Li X. **Sucrose-modified iron nanoparticles for highly efficient microbial production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus*.** Colloids Surf B Biointerfaces. 2021 Sep;205:111854. doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111854. Epub 2021 May 17. PMID: 34022706.

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*.** Nat Commun. 2020 Jun 19;11(1):3120. doi: 10.1038/s41467-020-16962-7. PMID: 32561727; PMCID: PMC7305114.

WEI C, Du G, Chen J, Kang Z. **Construction of engineered *Streptococcus zooepidemicus* for the production of hyaluronic acid ligosaccharide.** Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2019 May 25;35(5):805-815. Chinese. doi: 10.13345/j.cjb.180405. PMID: 31222999.

WESTBROOK AW, Ren X., Oh J., Moo-Young M., Chou CP **Engenharia metabólica para aumentar a produção heteróloga de ácido hialurônico em *Bacillus subtilis*.** Metab Eng. 2018; 47 :401–413. doi: 10.1016/j.ymben.2018.04.016.

WOO JE, Seong HJ, Lee SY, Jang YS **Engenharia metabólica de *Escherichia coli* para a produção de ácido hialurônico a partir de glicose e galactose.** Frente Bioeng Biotechnol. 2019; 7 :351. doi: 10.3389/fbioe.2019.00351.

XIE Z, Meng K, Yang X, Liu J, Yu J, Zheng C, Cao W, Liu H. **Identification of a Quorum Sensing System Regulating Capsule Polysaccharide Production and Biofilm Formation in *Streptococcus zooepidemicus*.** Front Cell Infect Microbiol. 2019 Apr 18;9:121. doi: 10.3389/fcimb.2019.00121. PMID: 31058104; PMCID: PMC6482233.

YAO ZY, Qin J, Gong JS, Ye YH, Qian JY, Li H, Xu ZH, Shi JS. **Versatile strategies for bioproduction of hyaluronic acid driven by synthetic biology.** Carbohydr Polym. 2021 Jul 15;264:118015. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118015. Epub 2021 Apr 2. PMID: 33910717.

VASI A M, Popa M I, Butnaru M, Dodi G, Verestiuc L. **Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications.** Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2014 May 1;38:177-85. doi: 10.1016/j.msec.2014.01.052. Epub 2014 Feb 7. PMID: 24656366.

SADHASIVAM G, Muthuvel A, Pachaiyappan A, Thangavel B. **Isolation and characterization of hyaluronic acid from the liver of marine stingray *Aetobatus narinari*.** Int J Biol Macromol. 2012 Mar;54:84-9. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.11.028. Epub 2012 Dec 7. PMID: 23220595

FERREIRA R F, Azzoni A R, Santana M H A, Petrides D. **Techno-Economic Analysis of a Hyaluronic Acid Production Process Utilizing Streptococcal Fermentation.** Processes. 2021, 9, 241. doi: 10.3390/pr9020241

DUFFECK, H C B P, Pan N C, Saikawa G I A, Rocha S P D, Baldo C, Celligoi M A P C. **Biomedical Potential of Hyaluronic Acid from Streptococcus zooepidemicus Produced in Sugarcane Molasse.** Brazilian Journal of Development. 2020, Jul 6(7): 49962-49979. doi:10.34117/bjdv6n7-592

WANG L, Liu Q, Gong X, Jian W, Cui Y, Jia Q, Zhang J, Zhang Y, Guo Y, Lu H, Tu Z. **Cloning and Biochemical Characterization of a Hyaluronate Lyase from Bacillus sp.** CQMU-D. J Microbiol Biotechnol. 2023 Feb 28;33(2):235-241. doi: 10.4014/jmb.2209.09036. Epub 2022 Dec 7. PMID: 36524342

NASSER H, Eikmanns B, Tolba M, El-Azizi M, Abou-Aisha K. **The Superiority of Bacillus megaterium over Escherichia coli as a Recombinant Bacterial Host for Hyaluronic Acid Production.** Microorganisms. 2022 Nov 28;10(12):2347. doi: 10.3390/microorganisms10122347. PMID: 36557601

PIRES, Aline Mara Barbosa. **Estudos metabólicos para otimização de condições nutricionais e de cultivo para produção microbiana de ácido hialurônico.** 2009. 184p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/1610617>. Acesso em: 31 mai. 2023.

OLIVEIRA J D, Carvalho L S, Gomes A M V, Queiroz L R, Magalhães B S, Parachin N S. **Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms.** Microb Cell Fact. 2016 Jul 1;15(1):119. doi: 10.1186/s12934-016-0517-4. PMID: 27370777

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

OLIVEIRA, Igor Rodrigues; FONTES, Lorena Vasconcelos. **Roadmap tecnológico do ácido hialurônico.** 2020. 98 p. Monografia (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. Disponível em: <https://pantheon.ufrj.br/bitstream/11422/12683/1/IROliveira%20-%20LVFontes.pdf>. Acesso em 03 jul. 2023.

REZER, Bárbara dos Reis; GODOY, Gabriela Viana; SILVA, Leonardo Zapola; MOREIRA, Luísa Dorneles. **AH Biotics: produção de ácido hialurônico cosmético via rota biotecnológica a partir do bagaço de caju.** 2022. 247 p. Monografia (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/25071/Rezer_Barbara_Godoy_Gabriel

