

Estratégias de cultivo para a produção de polissacarídeo capsular por *Haemophilus influenzae* tipo b e determinação de parâmetros de qualidade para o produto

MATEUS RIBEIRO DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadores: Dra. Mickie Takagi
Dra. Teresa Cristina Zangirolami

São Carlos

2010

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

S586ec

Silva, Mateus Ribeiro da.

Estratégias de cultivo para a produção de polissacarídeo capsular por *Haemophilus influenzae* tipo b e determinação de parâmetros de qualidade para o produto / Mateus Ribeiro da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
233 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Engenharia bioquímica. 2. *Haemophilus influenzae* tipo b. 3. Fermentação. 4. Polissacarídeo capsular. I. Título.

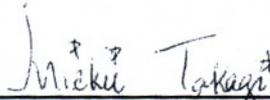
CDD: 660.63 (20ª)

Mateus Ribeiro da Silva

Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 27/08/2010

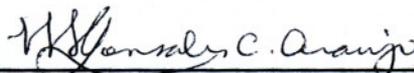
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Mickie Takagi (Orientador)
(Instituto Butantan)



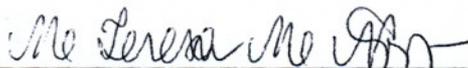
Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolmi (Orientadora)
(DEQ/UFSCar)



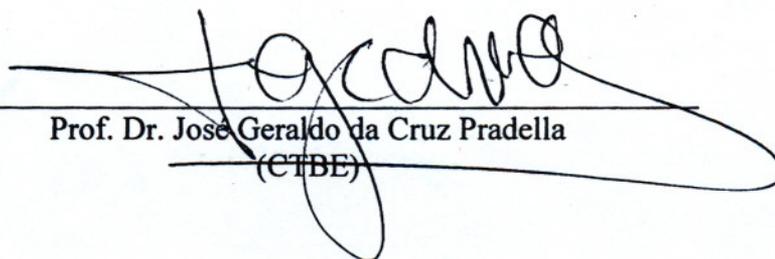
Profa. Dra. Maria Lucia Gonsales da Costa Araújo
(Inst. Química/UNESP)



Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior
(DEQ/UFSCar)



Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo
(DGE/UFSCar)



Prof. Dr. José Geraldo da Cruz Pradella
(CTBE)

*À minha mãe, Fátima, exemplo de caráter,
dedicação e honestidade.*

*Aos meus amigos pelo companheirismo,
apoio e motivação*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Mickie Takagi pela orientação, paciência e dedicação, pela contribuição direta na minha formação profissional e pessoal, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho e companheirismo nas longas jornadas de cultivo.

À Dra. Teresa Cristina Zangirolami pela orientação, aconselhamento e compreensão, pela dedicação e paciência no ensino dos desgastantes tratamentos de dados e, pela contribuição direta na minha formação profissional e pessoal.

Ao Dr. José Geraldo da Cruz Pradella pelos conselhos e contribuições nos ensaios de maior relevância descritos neste trabalho.

À Dra. Elizabeth Sbrogio pelos conselhos, puxões de orelha e dedicação na correção deste trabalho.

À Mcs. Silvia Albani pelas sugestões e ensinamentos, auxílio na execução de ensaios decisivos, e grande amizade adquirida no decorrer deste trabalho.

Ao Dr. Joaquin Cabrera-Crespo pelos ensinamentos, companheirismo e até mesmo o “terrorismo” que me fez abrir os olhos para os imprevistos que a vida nos reserva.

À Dra. Viviane Maimone que esteve sempre à disposição para ajudar, pelos seus ensinamentos e companheirismo.

À Dona Inez e Mr. Lorivaldo pelo engajamento e dedicação nos dias de cultivo, pelos conselhos, por ensinar o ABC do laboratório, preparo de materiais, soluções, vidrarias e reatores, e pela amizade.

À Dra. Sylvia Mendes Carneiro e a técnica Simone Jared, ambas do Laboratório de Biologia Celular do Centro de Biotecnologia - Instituto Butantan pela contribuição com as excelentes fotografias de Microscopia Eletrônica, que sem dúvida deram vida a este trabalho.

Ao Dr. José Gregório C. Gomez, e aos alunos Rogério de Sousa Gomes e Mariana Rendeiro Gonçalves do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB II) - Universidade de São Paulo (USP) pela contribuição com sugestões e execução das análises de PHAS por cromatografia gasosa.

Aos técnicos Tiago Martins Pereira e Amadeus Gomes de Azevedo, ambos do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos, pela análise de aminoácidos e carboidratos.

Aos Dr. Alberto Colli Badino Jr e Dra. Cristiane Sanchez Farinas que participaram da banca de qualificação e contribuíram com importantes sugestões para o desfecho deste trabalho.

À Dra. Maria Isabel Rodrigues da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela valiosa contribuição no auxílio do planejamento dos experimentos fatorial.

À Dra. Maria Elizabeth Angélica Leme Martins do Instituto Butantan pela oportunidade de desenvolver meu trabalho de iniciação científica que me motivou a continuar no Instituto Butantan, e por ter me encaminhado ao laboratório de Bioprocessos, o que permitiu a realização deste trabalho.

Ao Antônio Carlos (KK) pelo auxílio e companheirismo.

À Dona Ana, Senhor Hélio e Máximo pelo auxílio no desenvolvimento de diversas tarefas realizadas durante os processos fermentativos.

Aos amigos de cachaça Bruno, Julians Marcur e Paulo Pancada, pela excelente amizade e companheirismo em todos os momentos, bons e ruins.

Aos amigos e colegas de laboratório Dany Boy, Douglas, Erika, Grazieli, Jéssica, Luana, Mônica, Natália, Patrícia, Rimenys, Roberta, Roger, Talita e Verônica.

À secretária do PPGBiotec Cláudia Pastega pelo auxílio administrativo

À minha família, em especial minha mãe que sempre me apoiou independente das minhas decisões, e ao Rosalvinho que esteve sempre ao meu lado desde o início, ainda nos tempos da faculdade.

À Nina, pelo apoio, carinho e paciência, mesmo quando ausente fisicamente, suas palavras trouxeram paz, tranquilidade e harmonia, me dando forças para chegar até aqui.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Programa de Aprimoramento Profissional (FUNDAP) e a Fundação Butantan pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

*“O homem sereno descobre em si mesmo a
fonte da felicidade e do conhecimento,
fonte que nunca seca.”*

James Allen

RESUMO

SILVA, M. R. Estratégias de cultivo para a produção de polissacarídeo capsular por *Haemophilus influenzae* tipo b e determinação de parâmetros de qualidade para o produto. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, 2010

Haemophilus influenzae tipo b (Hib) é uma bactéria Gram negativa responsável por causar meningite em todo o mundo. O polissacarídeo capsular b, um polímero composto por unidades repetidas de ribosil-ribitol-fosfato (PRP) é o principal fator de virulência, sendo utilizado na formulação da vacina contra este microrganismo. Apesar de sua elevada eficiência, a vacina conjugada contra Hib é um produto de alto custo de produção por envolver processos de fermentação, purificação e conjugação para obtenção de um produto final dentro das especificações da Organização Mundial da Saúde (OMS). O melhoramento do meio de cultura e das condições de cultivo pode contribuir para redução do custo desta vacina de forma a facilitar sua difusão nos países subdesenvolvidos. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi identificar condições de cultivo que resultem em maior produção de polissacarídeo capsular, contribuindo para reduzir os custos nas etapas de purificação e conjugação. Os ensaios foram conduzidos em frascos agitados ou em biorreatores com 7 a 13 litros de capacidade nominal. A temperatura foi mantida em 37°C, o pH controlado em 7,5 através da adição de NaOH 5M e a concentração de oxigênio dissolvido (COD) mantida em 30 % da saturação do ar. A vazão específica de ar variou entre 0,2 e 1 VVM. Amostras foram coletadas em intervalos regulares de tempo para mensurar densidade óptica (DO_{540nm}), concentração celular, produção de polissacarídeo capsular (PRP) e concentrações de glicose e metabólitos. Duas possibilidades para aumentar a produção de polissacarídeo foram estudadas: 1) diferentes estratégias de cultivo descontínuo alimentado consistindo por: a) adição intermitente de glicose (CDAIG), b) vazão constante (CDAVC), c) vazão exponencial (CDAVE), e d) reciclo de células seguido de perfusão (CDAVE+P)); e 2) o melhoramento da composição do meio de cultura quanto à relação carbono/nitrogênio através do uso da metodologia de delineamento composto central rotacional (DCCR), tendo como variáveis independentes: Peptona de Soja (S), Extrato de Levedura (EL) e Glicose (G). Parâmetros de qualidade também foram avaliados para verificar o perfil da massa molecular do produto (PRP) e os aspectos morfológicos do microrganismo. Os resultados das diferentes estratégias de cultivo juntamente com os resultados da análise econômica do custo dos processos estudados mostraram que o CDAVC, com custo de US\$ 425.50/g PRP por ano e produtividade de 88 mg/(L.h), demonstrou ser a melhor alternativa para o processo de

produção de PRP por apresentar menor custo com boa produtividade. Já o estudo da composição do meio de cultura através da análise estatística dos resultados do DCCR mostraram que a melhor composição do meio de cultivo (MMC) consistia em S de 5 g/L, EL de 5,5 g/L e G de 15,25 g/L. Valores de DO_{540nm} de 8,4 e de produção volumétrica de polissacarídeo de 410 mg PRP/L foram alcançados em experimentos de validação na condição MMC realizados em *shaker*. Para o ensaio de validação da condição MMC em reator, a concentração de biomassa de 3,0 g MS/L e a produção de polissacarídeo capsular de 600 mg PRP/L foram observadas. Valores semelhantes foram obtidos em experimentos de validação realizados em *shaker* e biorreator na condição CPC, mostrando que tanto a condição CPC como a MMC pertencem à região de ótimo. A análise dos parâmetros de qualidade mostrou que o tempo de cultivo influencia fortemente no tamanho da molécula do polissacarídeo, sendo que quanto maior o tempo de cultivo, menor a sua massa molecular. A análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das células de *H. influenzae* mostrou a predominância de células com morfologia arredondada na sexta hora de cultivo, enquanto que, na décima segunda hora de cultivo, as células apresentaram morfologia mais alongada e exibiram a presença de inclusões citoplasmáticas na forma de grânulos, possivelmente devido ao acúmulo de algum material de reserva. Diante dos resultados obtidos, a nova composição de meio resultou em maior crescimento celular e produção de polissacarídeo capsular, com metade das concentrações das fontes de nitrogênio (peptona de soja e extrato de levedura), o que reduz o custo de produção. Os cultivos que resultaram em maior produção e produtividade foram o CDAVC (1600 mg PRP/L e 88 mg PRP/L.h) e o CDAVE+P (1800 mg PRP/L e 129 mg PRP/L.h), sendo que este último (CDAVE+P) atingiu produtividade 30 % maior que o melhor resultado até então descrito na literatura (90 mg PRP/L.h). No entanto, o cultivo CDAVC apresentou maior viabilidade do ponto de vista econômico e de execução e passível de escalonamento.

Palavras - chave: *Haemophilus influenzae* tipo b; polissacarídeo capsular; cultivo descontínuo alimentado; Delineamento Composto Central Rotacional; parâmetros de qualidade; análise econômica.

ABSTRACT

SILVA, M. R. Cultivation strategies for capsular polysaccharide production by *Haemophilus influenzae* type b and determination of quality parameters for the product. Master Thesis (Biotechnology) -Universidade Federal de São Carlos, 2010.

Haemophilus influenzae type b (Hib) is a Gram negative bacterium responsible for causing meningitis worldwide. The capsular polysaccharide b, a polymer composed by repeating units of ribosyl-ribitol phosphate (PRP), is the major virulence factor and it is used in the formulation of the vaccine against this microorganism. Despite their high efficiency, the conjugated vaccine against Hib is a product of high production cost, which involves fermentation, purification and conjugation processes to obtain a final product within the specifications of the World Health Organization (WHO). The improvement of the culture medium and cultivation conditions can contribute to reduce the cost of this vaccine in order to facilitate its dissemination in developing countries. The main objective of this work was to identify culture conditions that result in higher production of capsular polysaccharide, helping to reduce costs in the steps of purification and conjugation. The experiments were carried out in shake flasks or in bioreactors with 7-13 liters of capacity. The temperature was maintained at 37 °C, pH controlled at 7.5 by adding NaOH 5M and the concentration of dissolved oxygen (CDO) maintained at 30% of air saturation. The specific flow rate of air ranged between 0.2 and 1 VVM. Samples were collected at regular time intervals to measure optical density (DO540nm), biomass concentration, capsular polysaccharide (PRP) production and concentrations of glucose and metabolites. Two possibilities for increasing polysaccharide production were studied: 1) different strategies of fed-batch cultivation consisting of: a) intermittent addition of glucose (FBIG), b) constant feeding (FBCF), c) exponential feeding (FBEF), e d) exponential feeding with cell recycle and perfusion (FBER + P); 2) improvement of culture media composition regarding the carbon/nitrogen ratio through the use of central composite rotational design (CCRD) methodology, having as independent variables: Soy Peptone (S), Yeast Extract (YE) and Glucose (G). Quality parameters were also evaluated to assess the molecular weight profile of the product (PRP) as well as morphological aspects of the microorganism. Economic analysis of different cultivation strategies was used to identify the more economically viable process. The results of the different cultivation strategies together with the outputs of the studied processes cost analysis showed that FBCF, with a cost of U.S.\$ 425.50/g PRP and productivity of 88 mg/L.h, showed to be the best alternative among PRP production processes due to its lower cost with a good

productivity. In the study of the culture media composition through the statistical analysis of the CCRD results showed that the best culture media composition (BCM) consisted of S 5 g/L; YE 5.5g /L and G of 15.25 g/L. DO_{540nm} and PRP volumetric production values of 8.4 and 410 mg/L, respectively, were attained in validation experiments carried out in shake flasks at the BCM condition. For the bioreactor BCM validation experiment, biomass concentration of 3 g DW/L and polysaccharide production of 600 mg PRP/L were observed. Similar values were reached at validation runs performed in shake flasks and bioreactor for the central point CP condition, showing that both BCM and CP conditions belong to the optimum region. The analysis of quality parameters showed that the cultivation time influences strongly the size of the polysaccharide molecule. The longer the cultivation time, the lower molecular weight was found. The analysis by transmission electron microscopy (TEM) of *H. influenzae* cells revealed a predominance of round cells in the sixth hour of cultivation, whereas in the twelfth hour of cultivation the cells exhibited a more elongated morphology with the presence of cytoplasmic inclusions in the shape of granules, possibly due to the accumulation of some reserve material. Based on these results, the new composition of the culture medium resulted in an increased of cell growth and capsular polysaccharide production with half of the sources nitrogen (soybean peptone and yeast extract) concentrations, which reduces the production cost. The cultivations that resulted in higher production and productivity of polysaccharide were FBCF (1600 mg PRP/L and 88 mg PRP/(L.h)) and FBER+ P (1800 mg PRP/L and 129 mg PRP/(L.h)). The FBER+P reached 30% higher productivity of polysaccharide than the best result described in the literature (90 mg PRP/(L.h)). However, the FBCF cultivation was economically more viable.

Keywords: *Haemophilus influenzae* type b; capsular polysaccharide; fed-bach cultivation; Central Composite Rotational Design; quality parameters; economical analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACIP	<i>Advisory Committee on Immunization Practices</i>
ALA	ácido aminolevulínico
AMP	adenosina monofosfato
ANOVA	análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCB	Banco Central do Brasil
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CDAIG	Cultivo Descontínuo Alimentado com Adição Intermitente de Glicose
CDAVC	Cultivo Descontínuo Alimentado com Vazão Constante
CDAVE	Cultivo Descontínuo Alimentado com Vazão Exponencial
CDAVE+P	Cultivo Descontínuo Alimentado com Vazão Exponencial, Reciclo de Células e Perfusão
CDC	<i>Centers of Disease Control and Prevention</i>
C _{HA}	concentração de ácido acético na corrente de microfiltrado
CNTP	Condição Normal de Temperatura e Pressão
CG	cromatografia gasosa
COD	concentração de oxigênio dissolvido
C _P	concentração de produto
CPC	Condição do Ponto Central
C _S	concentração de substrato
C _{SF}	concentração de substrato no meio de alimentação
C _X	concentração de biomassa
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DO	densidade óptica
DTP	Difteria-Tétano-Pertrussis
E	Energia
EC	<i>Enzyme commission</i>
EC _A	estimativa de custo de consumo de água
EC _d	estimativa de custo da depreciação
EC _E	estimativa de custo de consumo de energia

EC _I	estimativa de custo dos insumos
E _{cons}	Energia consumida
EC _S	estimativa de custo dos salários
EL	extrato de Levedura
G	glicose
GL	grau de liberdade
HA	ácido acético
HAF	ácido acético formado
HA _{Max}	concentração máxima de ácido acético
HepB	Hepatite B
Hia	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo a
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
HIV	Human immunodeficiency vírus
HMW	<i>high molecular weight</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Hsf	<i>Haemophilus surface fibrils</i>
Hup	<i>haem-utilization protein</i>
hxu	<i>hemopexin-binding protein</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IPV	inativada poliovírus
Kdo	<i>3-deoxy-D-manno-octulosonic acid</i>
KS	constante de saturação
LPS	lipopolissacarídeo
m	coeficiente específico de manutenção
m _{HAc}	massa acumulada de ácido acético no reservatório
MP	meio composto de peptona de soja e extrato de levedura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmitância
MF	microfiltrado
MMC	Melhor Meio de Cultivo
MS	massa celular seca
M _S	velocidade de fluxo de massa da fonte de carbono
MCL	massa celular liofilizada

MS _{Max}	concentração máxima de biomassa
Mtc	massa do tubo contendo pellet
Mtv	massa do tubo vazio
n	agitação (rpm)
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaOHcons	hidróxido de sódio consumido
NMN	nicotinamida mononucleotídeo
NMNAT	<i>nicotinamide mononucleotide activity</i>
NR	<i>nicotinamide riboside</i>
NRK	<i>nicotinamide riboside kinase</i>
OMP	<i>outer membrane protein</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OP	orçamento do processo
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
P	Potência
Prod	produtividade
PC	Ponto Central
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCV	<i>pneumococcal conjugate vaccine</i>
PEP	fosfoenolpiruvato
PHA	polihidroxidoalcanoato
PHB	polihidroxibutirato
PRP	poliribosil-ribitol-fosfato
PRP-D	PRP conjugado ao toxóide diftérico
PRP _{Max}	concentração máxima de polissacarídeo capsular
PRP-OMP	PRP conjugado a <i>Outer Membrane Protein</i>
PRP-T	PRP conjugado ao toxóide tetânico
PTS	<i>phosphotransferase system</i>
Qesp	vazão específica de ar (VVM)
QM	quadrado médio
RF	recursos físicos
RH	recursos humanos
rpm	rotação por minuto
S	peptona de soja

Soytone	peptona de soja
SQ	soma dos quadrados
t	tempo
t_0	tempo do início da alimentação
TA	taxa de aplicação
t_{alim}	tempo de alimentação
TCA	<i>tricarboxylic cycle acid</i>
TT	toxóide tetânico
t_{uso}	tempo de uso do equipamento
UF	ultrafiltrado
Var	vazão volumétrica de ar
V_{F13L}	volume de cultura final no reator de 13L de capacidade nominal
V_{F7L}	volume de cultura final no reator de 5L de capacidade nominal
V_{i13L}	volume de cultura inicial no reator de 13L de capacidade nominal
V_{i7L}	volume de cultura inicial no reator de 5L de capacidade nominal
VPC	velocidade de produção de CO ₂
VVM	vazão de ar L / minuto / volume de meio L
WHO	<i>World Health Organization</i>
C _x	concentração de células
$Y_{P/S}^G$	coeficiente de rendimento de substrato em produto
$Y_{P/X}^G$	coeficiente de rendimento em produto por biomassa formada
$Y_{X/S}^G$	coeficiente de rendimento de substrato em biomassa

SIMBOLOS

α	coeficiente angular de pentose medido a 668 nm
β	coeficiente angular de glicose medido a 668 nm
θ	coeficiente angular de pentose medido a 540 nm
μ	velocidade específica de crescimento
$\mu_{m\acute{a}x}$	velocidade específica máxima de crescimento
Ω	coeficiente angular de glicose medido a 540 nm

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Modelo tridimensional das proteínas de membrana externa P1 e P2.....	39
Figura 2.2. Estrutura da lipoproteína P4.....	39
Figura 2.3. Cluster do gene pili de <i>H. influenzae</i>	41
Figura 2.4. Modelo das proteínas HifA a HifE de <i>H. influenzae</i>	41
Figura 2.5. Representação esquemática da estrutura do lipopolissacarídeo.	44
Figura 2.6. Estrutura do polissacarídeo capsular de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b.	45
Figura 2.7. Estrutura do locus cap	46
Figura 2.8. Esquema de biossíntese e transporte do polissacarídeo capsular.....	47
Figura 2.9. Ciclo patogênico do <i>Haemophilus influenzae</i>	48
Figura 2.10. Mecanismo de invasão do <i>Haemophilus influenzae</i>	48
Figura 2.11. Reação global catalisada pelo sistema PTS.	50
Figura 2.12. Reação de fosforilação e translocação de carboidratos pelo sistema PTS.....	50
Figura 2.13. Mapa com as principais vias do metabolismo do <i>H. influenzae</i> KW20 Rd.....	54
Figura 2.14. Mecanismo de aquisição de NAD e NMN pelo <i>H. influenzae</i>	57
Figura 2.15. Estrutura secundária do monômero NadR.	58
Figura 2.16. Mecanismo de controle de abertura e fechamento do canal PnuC.....	58
Figura 2.17. Mecanismos de aquisição de ferro pelo <i>Haemophilus influenzae</i>	60
Figura 2.18. Incidência de meningite	61
Figura 2.19. Incidência de doenças	61
Figura 2.20. Mortalidade de crianças menores de cinco anos	62
Figura 2.21. Incidência de mortes causadas por <i>H. influenzae</i> b.	62
Figura 2.22. Países que introduziram a vacina contra o Hib	64
Figura 2.23. Incidência e letalidade por meningite	64
Figura 3.1. Processo descontínuo.	77
Figura 3.2. Processo descontínuo alimentado.	78
Figura 3.3. Processo contínuo com reciclo de células.....	79
Figura 3.4. Biorreatores Bioflo 2000 e Bioflo 3000.....	87
Figura 3.5. Tampa de aço inoxidável do biorreator com as principais tubulações.....	88
Figura 3.6. Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose.....	90
Figura 3.7. Cultivo descontínuo alimentado com vazão de alimentação constante ou exponencial.....	93
Figura 3.8. Cultivo descontínuo alimentado com vazão de alimentação exponencial seguido de reciclo de células e perfusão	94

Figura 3.9. Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose, peptona de soja da Sigma com suprimento de ar em 0,2 VVM.....	102
Figura 3.10. Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose, peptona de soja da BD com suprimento de ar em 0,2 VVM.	102
Figura 3.11. Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose, peptona de soja da Sigma, com suprimento de ar em 0,5 VVM.....	104
Figura 3.12. Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose, peptona de soja da BD com suprimento de ar em 0,5 VVM.	105
Figura 3.13. Cultivo descontínuo alimentado com vazão constante de 77 mL/h e 0,3 a 1 VVM.....	108
Figura 3.14. Cultivo descontínuo alimentado com vazão constante 131 mL/h e 1 VVM.	110
Figura 3.15. Taxa de aplicação em cultivos descontínuos alimentados com vazão constante.	110
Figura 3.16: Parâmetros cinéticos do CDAVC - 1VVM utilizados no software AnaBio 1.0.	112
Figura 3.17. Perfil da velocidade específica de crescimento (μ).....	113
Figura 3.18. Taxa de aplicação e perfil da velocidade específica de crescimento celular em cultivo com limitação no fornecimento de glicose.....	114
Figura 3.19. Cultivo descontínuo alimentado com vazão exponencial e μ 0,07	115
Figura 3.20. Glicose residual, produção de CO ₂ e de ácido acético no cultivo com alimentação exponencial e limitação no fornecimento de glicose.....	115
Figura 3.21. Taxa de aplicação e perfil da velocidade específica de crescimento celular do cultivo com vazão exponencial $\mu=0,2 \text{ h}^{-1}$ com sistema de reciclo de células e perfusão.....	117
Figura 3.22. Curva de calibração para estimar a formação de ácido acético através do consumo de hidróxido de sódio.....	117
Figura 3.23. Cultivo descontínuo alimentado com vazão exponencial e μ constante em $0,2 \text{ h}^{-1}$ com sistema de reciclo de células e perfusão	119
Figura 3.24. Tipos de resistência (R) encontrados na membrana de microfiltração tangencial.	121
Figura 3.25. Perfil de crescimento celular e formação de polissacarídeo capsular (PRP) nas diferentes estratégias de cultivo descontínuo alimentado.	125
Figura 4.1. Superfície de resposta do 1º DCCR, densidade óptica (DO _{540nm}) em função da concentração de extrato de levedura (EL) e peptona de soja (S).....	142
Figura 4.2. Superfície de resposta do 1º DCCR, densidade óptica (DO _{540nm}) em função da concentração de glicose (G) e peptona de soja (S).....	142
Figura 4.3. Superfície de resposta do 1º DCCR, densidade óptica (DO _{540nm}) em função da concentração de glicose (G) e extrato de levedura (EL).	143
Figura 4.4. Pareto do 1º DCCR, variável dependente polissacarídeo capsular (PRP); $\alpha = 0,1$	144
Figura 4.5. Superfície de resposta do 2º DCCR, densidade óptica (DO _{540nm}) em função da concentração do extrato de levedura (EL) e peptona de soja (S)	147

Figura 4.6. Superfície de resposta do 2º DCCR, polissacarídeo capsular (PRP) em função da concentração do extrato de levedura (EL) e peptona de soja (S).	150
Figura 4.7. Superfície de resposta do 2º DCCR, polissacarídeo capsular (PRP) em função da concentração de glicose (G) e peptona de soja (S).	150
Figura 4.8. Superfície de resposta do 2º DCCR, polissacarídeo capsular (PRP) em função da concentração de glicose (G) e extrato de levedura (S).	151
Figura 4.9. Superfície de resposta do 2º DCCR + ensaios complementares, densidade óptica (DO _{540nm}) em função do extrato de levedura (EL) e peptona de soja (S).	156
Figura 4.10. Superfície de resposta do 2º DCCR, polissacarídeo capsular (PRP) em função da concentração do extrato de levedura (EL) e peptona de soja (S)	157
Figura 4.11. Superfície de resposta do 2º DCCR, polissacarídeo capsular (PRP) em função da concentração de glicose (G) e peptona de soja (S)	157
Figura 4.12. Superfície de resposta do 2º DCCR, polissacarídeo capsular (PRP) em função da concentração de glicose (G) e extrato de levedura (EL)	158
Figura 4.13. Ensaios em shaker - Condição no Ponto Central (CPC) e Melhor Meio de Cultivo (MMC).	160
Figura 4.14. Cultivo descontínuo, condição do ponto central (CPC).	161
Figura 4.15. Cultivo descontínuo, melhor meio de cultivo (MMC).	162
Figura 5.1. Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose com suprimento de ar em 0,25 VVM.	178
Figura 5.2. Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose com suprimento de ar em 0,5 VVM.	179
Figura 5.3. Cromatograma de gel filtração das amostras dos cultivos de <i>H. influenzae</i> b em diferentes tempos de cultivo e vazões específica de ar.	181
Figura 5.4. Gel filtração dos padrões de dextranas e das amostras	182
Figura 5.5. Perfil de consumo dos aminoácidos presente no meio de cultura para cultivos de <i>H. influenzae</i> b.	184
Figura 5.6. Perfil de consumos dos aminoácidos durante o cultivo.	185
Figura 5.7. Microscopia Óptica (MO) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) – CDAIG: 0,25 VVM	188
Figura 5.8. Microscopia Óptica (MO) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) – CDAIG: 0,5 VVM	189
Figura 5.9. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) - Condição no Ponto Central (CPC).	190
Figura 5.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) - Melhor Meio de Cultivo (MMC).	191
Figura 5.11. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) – CDAIG 0,25VVM; CDAIG 0,5VVM; CPC; MMC.	192
Figura 5.12. Cromatografia Gasosa (CG) – Cromatogramas	196
Figura 5.13. Imunoeletroforese em foguete (<i>Rocket</i>) realizadas nas frações após ruptura celular oriunda do cultivo CDAIG 0,2VVM.	198

Figura 5.14. Comparação das concentrações de polissacarídeo de <i>H. influenzae</i> tipo b na célula e no sobrenadante do cultivo do experimento CDAIG 0,25 VVM.....	199
Figura 6.1. Fluxograma do processo Cultivo Descontínuo Alimentado com Adição Intermitente de Glicose (CDAIG)	209
Figura 6.2. Fluxograma de processo Cultivo Descontínuo Alimentado com Vazão Constante (CDAVC) e vazão exponencial (CDAVE).....	210
Figura 6.3. Fluxograma de processo Cultivo Descontínuo Alimentado com Vazão Exponencial, Reciclo de Células e Perfusão (CDAVE+P).	211
Figura Anexo 2A. Mapa do metabolismo dos aminoácidos aspartato, glutamato e glutamina pelo <i>H. influenzae</i> b.	228
Figura Anexo 2B. Mapa do metabolismo do aminoácido cisteína pelo <i>H. influenzae</i> b.....	229
Figura Anexo 2C. Mapa do metabolismo do aminoácido serina pelo <i>H. influenzae</i> b.	230

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Condições de cultivo de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b realizados em biorreator descritos na literatura.....	81
Tabela 3.1A. Composição do meio de cultura descontínuo.....	84
Tabela 3.1B. Composição do meio de alimentação.....	84
Tabela 3.2. Ensaio realizados.....	89
Tabela 3.3. Parâmetros e condições de cultivo usado na simulação.....	91
Tabela 3.4. Formação de biomassa e produção de polissacarídeo em cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose.....	106
Tabela 3.5. Formação de biomassa e produção de polissacarídeo em cultivo descontínuo alimentado com vazão constante.....	111
Tabela 3.6. Formação de ácido acético e produção de polissacarídeo em cultivo descontínuo alimentado com vazão exponencial com sistema de reciclo de células e perfusão.....	120
Tabela 3.7. Valores máximos de biomassa, ácido e produto nas diferentes estratégias de cultivo descontínuo alimentado.....	124
Tabela 3.8. Fatores de conversão das diferentes estratégias de cultivo descontínuo alimentado.....	124
Tabela 3.9. Volume de cultura e número de fermentações em biorreatores com 80 litros.....	126
Tabela 4.1. Concentração das variáveis independentes nos diferentes níveis (1º DCCR).....	135
Tabela 4.2. Concentração das variáveis independentes nos diferentes níveis (2º DCCR).....	136
Tabela 4.3. Matriz do 1º DCCR com os níveis codificados e as respostas.....	140
Tabela 4.4. Regressão do 1º DCCR, variável dependente maior densidade óptica.....	141
Tabela 4.5. Análise de variância do 1º DCCR, variável dependente maior densidade óptica.....	141
Tabela 4.6. Matriz do 2º DCCR com os níveis codificados e as respostas.....	145
Tabela 4.7. Regressão do 2º DCCR, variável dependente densidade óptica na décima hora de cultivo.....	146
Tabela 4.8. Análise de variância do 2º DCCR, variável dependente densidade óptica da décima hora de cultivo.....	147
Tabela 4.9. Regressão do 2º DCCR, variável dependente produção de polissacarídeo na décima hora de cultivo.....	148
Tabela 4.10. Análise de variância do 2º DCCR, variável dependente produção de polissacarídeo capsular na décima hora de cultivo.....	149
Tabela 4.11. Matriz do 2º DCCR incluindo dados dos ensaios complementares com os níveis codificados e as respostas.....	153
Tabela 4.12. Regressão do DCCR variável dependente densidade óptica.....	154
Tabela 4.13. Regressão do DCCR variável dependente polissacarídeo capsular.....	154
Tabela 4.14. Análise de variância do DCCR variável dependente densidade óptica.....	155

Tabela 4.15. Análise de variância do DCCR variável dependente polissacarídeo capsular. .	155
Tabela 4.16. Concentração dos fatores do melhor meio de cultivo (MMC) e da condição no ponto central (CPC).	159
Tabela 5.1. Itens alterados no processo descontínuo alimentado com vazão intermitente de glicose para produção de polissacarídeo de <i>H. influenzae</i> tipo b.	177
Tabela 5.2. Influência da vazão de ar e do tempo de cultivo na formação de biomassa, e na produção e massa molecular do polissacarídeo	180
Tabela 5.3. Área (nm ²) e perímetro (nm) das células de <i>H. influenzae</i> b determinados por análise de microscopia eletrônica de transmissão	193
Tabela 5.4. Densidade de volume (Vv) e diâmetro (nm) dos grânulos observados em células de <i>H. influenzae</i> b na décima segunda hora de cultivo.....	194
Tabela 5.5. Condições dos cultivos, no início e no momento de retirada de amostras para MET	195
Tabela 5.6. Determinação do polissacarídeo na célula de <i>H. influenzae</i> b com as amostras do ensaio CDAIG 0,25 VVM	198
Tabela 5.7. Análise Elementar dos elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio na célula de <i>H. influenzae</i> b.....	200
Tabela 6.1. Número de ensaios possíveis de serem realizados no período de um ano	206
Tabela 6.2A. Recursos físicos: equipamentos de uso contínuo.....	206
Tabela 6.2B. Recursos físicos: equipamentos de uso específico.....	207
Tabela 6.2C. Insumos.	208
Tabela 6.2D. Recursos humanos.	208
Tabela 6.3. Custo estimado da água purificada pelo Rios 90.....	213
Tabela 6.4. Consumo de energia anual dos equipamentos de uso específico e contínuo.....	215
Tabela 6.5. Valores monetários dos equipamentos necessários para a realização dos cultivos.	215
Tabela 6.6. Estimativa de custo dos insumos.....	216
Tabela 6.7. Orçamento anual dos diferentes tipos de processos descontínuos alimentados. .	218
Tabela 6.8. Produção, produtividade e orçamento dos diferentes tipos de processos descontínuos alimentados.....	219
Tabela Anexo 3. Relação de enzimas descritas no mapa das principais vias metabólicas do metabolismo de <i>H. influenzae</i> b.	231

LISTA DE FÓRMULAS

$$M_S = \left(\frac{\mu}{Y_{XS}} + m \right) \cdot C_X(t_0) \cdot V(t_0) \cdot \exp[\mu(t-t_0)] \quad (3.1)$$

$$\frac{dC_X}{dt} = \left(\mu - \frac{F}{V} \right) \cdot C_X \quad (3.2)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = \left(\frac{F}{V} \right) \cdot (C_{SF} - C_S) - \left(\frac{1}{Y_{XS}} + \frac{\alpha}{Y_{SP}} \right) \cdot \mu \cdot C_X \quad (3.3)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = (\alpha \cdot \mu) \cdot C_X - \frac{F}{V} C_P \quad (3.4)$$

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*} \right)^n \quad (3.5)$$

$$MS = \frac{Mtc - Mtv}{V} \quad (3.6)$$

$$[\text{ribose}] = \frac{\alpha \theta (\beta \text{ Abs } 668 \text{ nm} - \Omega \text{ Abs } 540 \text{ nm})}{(\theta \cdot \beta - \alpha \cdot \Omega)} \quad (3.7)$$

$$TA = \frac{F \cdot C_{SF}}{V} \quad (3.8)$$

$$Prod = \frac{FRP_{\max}}{t} \quad (3.9)$$

$$VPC = P \left(Y_{CO_2} - Y_{CO_2AR} \right) Q_{ar} \cdot \frac{600}{R.T} \quad (3.10)$$

$$\ln \frac{C_X}{C_{X_0}} = \mu_{\max} \cdot (t - t_i) \quad (3.11)$$

$$F = \frac{V_{F_{asL}} - V_{i_{asL}}}{t_{atim}} \quad (3.12)$$

$$V_{i_{asL}} = \frac{V_{F_{asL}}}{V_{F_{7L}}} \quad (3.13)$$

$$HA_F = 0,0469. NaOH_{cons} + 1,263 \quad (3.14)$$

$$m_{HA_c} = 20,3 + \int_{1\frac{1}{2}}^{9,2} C_{HA_c} F dt \quad (3.15)$$

$$V_V = \frac{P_E}{P_T} \cdot 100 \quad (5.1)$$

$$Pt = \frac{1 - Pp}{e^2 - Pp} \quad (5.2)$$

$$E = P \cdot t \quad (6.1)$$

$$E_{cons} = P \cdot t_{uso} \cdot C \quad (6.2)$$

$$OP = EC_A + EC_E + EC_d + EC_I + EC_S \quad (6.3)$$

SUMÁRIO

Capítulo 1 - *Introdução e Motivação*

1.1 INTRODUÇÃO.....	29
1.1.1 Contexto e Motivação.....	29
1.2 OBJETIVOS.....	31
1.3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

Capítulo 2 - *O Microrganismo*

2.1 INTRODUÇÃO.....	35
2.1.1 Histórico.....	35
2.1.2 Agente Etiológico.....	36
2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	37
2.2.1 Proteínas de Membrana Externa.....	38
2.2.2 Proteínas de Adesão.....	40
2.2.3 Proteases.....	42
2.2.4 Bacteriocina.....	42
2.2.5 Lipopolissacarídeo.....	42
2.2.6 Polissacarídeo Capsular.....	45
2.3 PATOGENICIDADE.....	47
2.4 METABOLISMO.....	49
2.4.1 Captação de Carboidratos.....	49
2.4.2 Via Glicolítica.....	51
2.4.3 Via das Pentoses.....	52
2.4.4 Metabolismo do Piruvato.....	52
2.4.5 Ciclo de Krebs.....	53
2.4.6 Outras Fontes Energéticas.....	55
2.4 IMUNOGENICIDADE.....	55
2.5 FATORES DE CRESCIMENTO.....	56
2.6 AQUISIÇÃO DE FERRO.....	58
2.7 INCIDÊNCIA.....	60
2.8 VACINAS.....	65
REFERÊNCIAS.....	69

Capítulo 3 - *Cultivos de Haemophilus influenzae tipo b*

3.1 PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	76
3.1.1 Cultivo Descontínuo.....	76
3.1.2 Cultivo Descontínuo Alimentado.....	77
3.1.3 Cultivo Contínuo.....	78
3.1.4 Cultivos de <i>Haemophilus influenzae</i>	79

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	82
3.2.1 Microrganismo	82
3.2.2 Preparo do lote trabalho	82
3.2.3 Meios de Cultura	83
3.2.3.1 Ágar chocolate	83
3.2.3.2 Meio Greaves	83
3.2.3.3 Meio de cultivo	83
3.2.3.4 Preparo dos Meios de Cultura.....	84
3.2.3.5 Preparo da solução de Hemina	85
3.2.3.6 Preparo do meio de cultura para os cultivos descontínuos	85
3.2.3.7 Preparo do meio de alimentação	86
3.2.4 Inóculo.....	86
3.2.5 Biorreator	86
3.2.6 Condições de cultivo	88
3.2.7 Descrições dos Cultivos	89
3.2.7.1 Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose	89
3.2.7.2 Cultivo descontínuo alimentado com vazão constante.....	90
3.2.7.3 Cultivo descontínuo alimentado com vazão exponencial.....	90
3.2.7.4 Cultivo descontínuo alimentado com vazão exponencial seguido de reciclo de células	93
3.2.8 Metodologia Analítica.....	95
3.2.8.1 Coloração de Gram.....	95
3.2.8.2 Crescimento celular	95
3.2.8.3 Viabilidade celular.....	96
3.2.8.4 Determinação da concentração de polissacarídeo capsular.....	96
3.2.8.5 Determinação da concentração de glicose e ácido acético	97
3.2.8.6 Estimativa da taxa de aplicação, produtividade máxima, velocidade de produção de CO ₂ e velocidade específica de crescimento.....	98
3.2.8.7 Determinação dos fatores de conversão e da velocidade específica máxima de crescimento	98
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
3.3.1 Cultivos descontínuos alimentados - adição intermitente de glicose	101
3.3.1.1 Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose e suprimento de ar em 0,2 VVM	101
3.3.1.2 Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose e suprimento de ar em 0,5 VVM	103
3.3.2 Cultivos descontínuos alimentados	106
3.3.2.1 Cultivo descontínuo alimentado com vazão constante.....	106
3.3.2.2 Cultivo descontínuo alimentado com limitação no fornecimento de glicose.....	111
3.3.2.3 Cultivo descontínuo alimentado com reciclo de células e perfusão.....	116
3.4 CONCLUSÃO.....	127
REFERÊNCIAS	129
Capítulo 4 - Planejamento Experimental	
4.1 O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	131
4.1.1 Meio de Cultura para <i>Haemophilus influenzae</i>	132
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	134

4.2.1	Microrganismo	134
4.2.2	Meio de cultivo	134
4.2.3	Planejamento Experimental	134
4.2.4	Primeiro Delineamento Composto Central Rotacional	134
4.2.4.1	Meio de cultivo do 1º Delineamento Composto Central Rotacional	135
4.2.4.2	Procedimento experimental do 1º DCCR	135
4.2.5	Segundo Delineamento Composto Central Rotacional	136
4.2.5.1	Meio de cultivo do 2º Delineamento Central Rotacional	136
4.2.5.2	Procedimento experimental do 2º DCCR	136
4.2.6	Validação dos Experimentos em Frascos Agitados e em Biorreator	137
4.2.6.1	Validação em frascos agitados	137
4.2.6.2	Validação em Biorreator	137
4.2.7	Análise Estatística	137
4.2.8	Escolha do Melhor Meio de Cultivo	138
4.2.9	Metodologia Analítica	138
4.2.9.1	Crescimento celular	138
4.2.9.2	Determinação da concentração de polissacarídeo capsular	138
4.2.9.3	Determinação da concentração de glicose e ácido acético	138
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	139
4.3.1	Planejamento Experimental 1– Primeiro Delineamento Composto Central Rotacional	139
4.3.1.1	Análise estatística e da superfície de resposta - variável dependente densidade óptica (1º DCCR)	1460
4.3.1.2	Análise estatística e da superfície de resposta - variável dependente polissacarídeo capsular (1º DCCR)	1463
4.3.2	Planejamento Experimental 2 - Segundo Delineamento Composto Central Rotacional	144
4.3.2.1	Análise estatística e da superfície de resposta - variável dependente densidade óptica (2º DCCR)	146
4.3.2.2	Análise estatística e da superfície de resposta - variável dependente produção de polissacarídeo capsular (2º DCCR)	148
4.3.3	Ensaio Complementares	151
4.3.4	Ensaio de validação	158
4.4	CONCLUSÃO	163
	REFERÊNCIAS	164

Capítulo 5 - Parâmetros de Qualidade

5.1	CONTROLE DE QUALIDADE	166
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	168
5.2.1	Metodologia Analítica	168
5.2.1.1	Coloração de Gram	168
5.2.1.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão	168
5.2.1.3	Determinação da concentração de polissacarídeo capsular	170
5.2.1.4	Determinação da massa molecular do polissacarídeo capsular	170
5.2.1.5	Determinação de polissacarídeo na célula	170
5.2.1.6	Determinação de aminoácidos do sobrenadante do cultivo	173

5.2.1.7	Determinação de polihidroxidoalcanoato (PHA)	173
5.2.1.8	Determinação dos elementos Carbono, Nitrogênio e Hidrogênio	175
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	176
5.3.1	Influência do tempo e vazão específica de ar na massa molecular do polissacarídeo capsular (PRP)	177
5.3.2	Análise de aminoácidos	183
5.3.3	Aspectos Morfológicos	186
5.3.4	Identificação das inclusões na forma de grânulos nas células de <i>H. influenzae</i> b ...	195
5.3.4.1	Determinação de polihidroxialcanoato	195
5.3.4.2	Determinação de polissacarídeo na célula de <i>H. influenzae</i> b	197
5.3.4.3	Determinação dos elementos C-N-H	199
5.4	CONCLUSÃO	201
	REFERÊNCIAS	202
Capítulo 6 - Análise econômica		
6.1	PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS	204
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS	206
6.2.1	Recursos Requeridos	206
6.2.2	Estimativa de Custo	212
6.2.2.1	Estimativa de custo da água purificada	212
6.2.2.2	Estimativa de custo da energia	213
6.2.2.3	Estimativa de custo dos equipamentos	215
6.2.2.4	Estimativa de custo de serviços terceirizados	216
6.2.2.5	Estimativa de custo dos insumos	216
6.2.2.6	Salário dos profissionais especializados	216
6.2.3	Orçamento	216
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	217
6.4	CONCLUSÃO	221
	REFERÊNCIAS	222
Capítulo 7 - Conclusões gerais e Perspectivas		
7.1	CONCLUSÕES	223
7.2	PERSPECTIVAS	225

Capítulo 1

Introdução, Objetivos e Organização da dissertação

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Contexto e Motivação

Haemophilus influenzae é um microrganismo Gram negativo que possui como principal fator de virulência a cápsula polissacarídica. O polissacarídeo da cápsula do *H. influenzae* é reconhecido por anticorpos específicos, permitindo classificá-lo em seis sorotipos antigênicos (a- f). O sorotipo b, formado por subunidades de ribosil-ribitol-fosfato (PRP) é o principal agente causador de pneumonia, bacteremia e meningite em crianças menores de cinco anos de idade (KONEMAM *et al.*, 1997).

A vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), constituída pelo polissacarídeo capsular ligado quimicamente a uma proteína (PRP-proteína), confere proteção e induz memória imunológica (WARD *et al.*, 1994). Antes da introdução da vacina conjugada contra Hib no Brasil, o contágio por *H. influenzae* tipo b constituía a causa mais frequente de meningite na infância, com alta incidência (aproximadamente 5% da população infantil) e grande impacto na mortalidade infantil, além de ser responsável por sequelas no sistema nervoso (RESEGUE *et al.*, 1994; MIRANZI *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2004).

A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), em 1997, recomendou a implantação na rotina de vacinação da vacina conjugada contra o Hib em toda a América Latina. No Brasil, em setembro de 1999, a vacina contra Hib foi implantada em todo o território nacional dentro do Programa Nacional de Imunização (CDC, 1993; CDC, 1994; KMETZSCH *et al.*, 2003).

Em 2000, a vacina quádrupla combinada DTPHib foi inserida no Programa Nacional de Imunização. Nesta vacina, o componente constituído pelo polissacarídeo capsular tipo b de *H. influenzae* (Hib) conjugado ao Toxóide Tetânico (PRP-TT) é produzido pela Bio-Manguinhos enquanto a vacina tríplice Difteria-Tétano-Pertrussis (DTP) é produzida pelo Instituto Butantan. Após a inclusão desta vacina no programa nacional de imunização, houve

uma redução drástica nos casos de meningite causada pelo Hib o que demonstra a alta eficácia desta vacina (RIBEIRO *et al.*, 2007).

A vacina conjugada Hib produzida pela Bio-Manguinhos é o resultado de um processo de transferência de tecnologia envolvendo a empresa multinacional *GlaxoSmithKline*. Os esforços para a inovação e domínio integral da tecnologia de produção dessa vacina permanecem como um desafio tanto para o Instituto Butantan (São Paulo) quanto para o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos, unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz, localizada no Rio de Janeiro), que são as duas instituições públicas e de referência que dividem a responsabilidade da missão de produzir imunobiológicos e vacinas no Brasil (TEMPORÃO, 2002; GADELHA, 2003).

Neste contexto, o Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan vem investindo há anos na inovação tecnológica e contribuindo com *know-how* para o estabelecimento das condições de cultivo do *Haemophilus influenzae* b de modo a aumentar a produção e a produtividade do polissacarídeo e aprimorar o processo de purificação do polissacarídeo com o objetivo de tornar o procedimento simples e fácil de escalonar, assim como desenvolver um processo de conjugação que resulte em elevado rendimento do produto final conjugado e de boa qualidade (TEMPORÃO, 2002).

No Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, os estudos relacionados à produção da vacina conjugada Hib tiveram início em 2000, e resultaram na tese de doutorado de Takagi (2003), na qual foram estabelecidas as condições de cultivo submerso em biorreatores, alcançando-se uma produção de polissacarídeo capsular de 2000 mg PRP/L e produtividade de 90 mg PRP/(L.h). Dando continuidade ao trabalho iniciado por Takagi, outros estudos vêm sendo desenvolvidos, objetivando o melhoramento das condições de cultivo, assim como o estabelecimento de um processo de purificação do polissacarídeo capsular e processo de conjugação do polissacarídeo com o toxóide tetânico (TAKAGI, 2003; TAKAGI *et al.*, 2003; TAKAGI *et al.*, 2006; LORTHIOIS, 2007; TAKAGI *et al.*; 2007; ALBANI, 2008; TAKAGI *et al.*, 2008).

O presente trabalho teve início em 2007 no Laboratório de Bioprocessos do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan e contribui para a ambiciosa proposta de no futuro próximo produzir uma vacina combinada pentavalente, composta por antígenos para Difteria, Tétano, Pertussis, Hepatite B e *H. influenzae* b (DTP - HepB - Hib), um produto de alta qualidade, com todos os antígenos produzidos pelo Instituto Butantan com tecnologia nacional.

1.2 OBJETIVOS

Os principais objetivos do presente trabalho foram:

- ✓ estudar diferentes estratégias de cultivo descontínuo alimentado, visando alcançar maior produção e produtividade de polissacarídeo capsular;
- ✓ melhorar a composição do meio de cultura para aumentar o crescimento celular e a produção de polissacarídeo capsular;
- ✓ analisar a qualidade do produto (polissacarídeo capsular) e aspectos morfológicos do microrganismo;
- ✓ realizar análise econômica das diferentes estratégias de cultivo conduzidas em função da produção de polissacarídeo capsular.

1.3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Com a finalidade de apresentar os resultados das diferentes atividades realizadas de maneira mais clara e objetiva, esta dissertação de mestrado foi organizada em sete capítulos cujo conteúdo é resumido a seguir:

Capítulo 1 - Apresentação do contexto e motivação para a realização do trabalho;

Capítulo 2 - Revisão bibliográfica sobre o microrganismo *Haemophilus influenzae*;

Capítulo 3 - Diferentes estratégias de cultivo: apresentação de aspectos teóricos relacionados e discussão dos resultados da aplicação dessas estratégias em cultivos de *Haemophilus influenzae* b (Hib);

Capítulo 4 - Planejamento experimental: utilização da metodologia de análise por superfície de resposta buscando a melhor composição do meio de cultura de forma a obter aumento no crescimento celular e na produção de polissacarídeo capsular;

Capítulo 5 - Parâmetros de qualidade: a) avaliação da massa molecular do polissacarídeo em diferentes vazões específicas de ar e com o tempo de cultivo; b) caracterização de aspectos morfológicos do microrganismo durante o cultivo;

Capítulo 6 - Análise econômica: estudo comparativo da viabilidade econômica das diferentes estratégias de cultivo empregadas;

Capítulo 7 - Conclusões gerais e perspectivas do projeto: discussão e perspectivas para futuros estudos.

REFERÊNCIAS

- ALBANI, S. M. F. Métodos alternativos de purificação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b. Dissertação (mestrado em biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- CDC - CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Recommendations for use of *Haemophilus* b conjugate vaccines and a combined *Diphtheria, Tetanus, Pertussis*, and *Haemophilus* b vaccine: Recommendations of the Advisory Committee Immunization Practices. p. 1-15, 1993.
- CDC - CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. General recommendations on immunization: Recommendations of the Advisory Committee Immunization Practices. p. 1, 1994.
- GADELHA, C. Inovação em Vacinas no Brasil: Experiência Recente e Constrangimentos Estruturais. *Manguinhos: História, Ciências, Saúde*. v. 10, p. 697-724, 2003.
- KMETZSCH, C. I.; SCHERMANN, M. T.; SANTANA, J. C. B.; ESTIMA, C. L.; FARACO, F. J.; SILVA, C. M.; CONCEIÇÃO, R. Meningites por *Haemophilus influenzae* b após a implantação da vacina específica. *Jornal de Pediatria*., v. 79, n. 6, p. 530-536, 2003.
- KONEMAM, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. J. *Diag.Microbiol.. Color Atlas and Textbook*, 5th ed **Lippincott**., v. 7, p. 363-384, 1997.
- LORTHIOIS, A. P. A. A. Desenvolvimento de processo para obtenção do método de conjugação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b com toxóide tetânico. Tese (doutorado em biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- MIRANZI, S. S. C.; CAMACHO, L. A. B.; VALENTE, J. G. *Haemophilus influenzae* tipo b: Situação epidemiológica no estado de Minas Gerais, Brasil, 1993 a 1997. Rio de Janeiro: **Saúde Pública**., v. 19, n. 5, p. 1267-1275, 2003.
- RESEGUE, R.; BRICKS, L. F.; RODRIGUES, D. Vacina anti-*Haemophilus Influenzae* tipo b (Hib) - Atualização. **Pediatria**., v. 16, n. 4, p. 168-175, 1994.
- RIBEIRO, G. S.; LIMA, J. B. T.; REIS, J. N.; GOUVEIA, E. L.; CORDEIRO, S. M.; LOBO, T. S.; PINHEIRO, R. M.; RIBEIRO, C. T.; NEVES, A. B.; SALGADO, K.; SILVA, H. R.; REIS, M. G.; KO, A. I. *Haemophilus influenzae* meningitis 5 years after intyroduction of the *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Brazil. **Vaccine**., p. 4420-4428, 2007.
- SIMÕES, L. L. P.; ANDRADE, A. L. S. S.; LAVAL, C. A.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, S. A.; MARTELLI, C. M. T.; ALVES, S. L. A.; ALMEIDA, R. M.; ANDRADE, J. G. Impacto da vacinação contra o *Haemophilus influenzae* b na redução de meningites, Goiás. **Saúde Pública**., v. 38, n. 5, p. 664-670, 2004.
- TAKAGI, M. Produção e purificação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b. Tese (Doutorado em biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- TAKAGI, M.; CABRERA-CRESPO, J.; BARUQUE-RAMOS, J.; ZANGIROLAMI, T. C.; RAW, I. E TANIZAKI, M. Characterization of polysaccharide production of *Haemophilus influenzae* type b and its relationship to bacterial cell growth. **Biochemistry and Biotechnology**., v. 110, p. 91-100, 2003.
- TAKAGI, M.; CABRERA-CRESPO, J.; ZANGIROLAMI, T. C.; RAW, I.; TANIZAKI, M. Improved cultivated conditions for polysaccharide production by *H. influenzae* type b. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**., v. 81, p. 182-188, 2006.
- TAKAGI, M.; TANIZAKI, M. M.; ZANGIROLAMI, T. C.; CABRERA-CRESPO, J. Improvement of simple cultivation conditions for polysaccharide synthesis by *Haemophilus influenzae* type b. In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**. Sevilha: **Formatex**., v. 1, p. 602-608, 2007.

TAKAGI, M.; LIMA, R. B.; ALBANI, S. M. F.; ZANGIROLAMI, T. C. Purification of capsular polysaccharide produced by *Haemophilus influenzae* type b through a simple, efficient and suitable method for scale-up. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1217-1222, 2008.

TEMPORÃO, J. G. O complexo industrial da saúde: público e privado na produção e consumo de vacinas no Brasil. Tese (Doutorado em Saúde Coletiva), Instituto de Medicina Social, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

WARD, J.; LIEBERMAN, J. M.; E COCH, S. L. Vaccines. Plotkin Stanley. 2. ed. W.B. Saunders Company., cap. 12, p. 337-381, 1994.

Capítulo 2

O Microrganismo – Revisão Bibliográfica

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Histórico

Em 1892, o bacteriologista alemão Richard Pfeiffer isolou uma bactéria coco bacilar da saliva dos pacientes infectados (com gripe) durante a grande pandemia de gripe ocorrida entre 1889 e 1892. Ele denominou este microrganismo como Bacilo de *Pfeiffer* e sugeriu erroneamente que esta bactéria era a grande responsável pela pandemia. Já durante a pandemia de gripe que ocorreu entre 1918 e 1919 ficou evidente que este microrganismo era constituinte da flora normal do trato respiratório superior e não o agente etiológico responsável pela gripe.

Em 1920, Winslow comprovou que este microrganismo necessitava de fatores do sangue para o seu crescimento e este passou a se chamar *Haemophilus influenzae*, cujo significado é afinidade pelo sangue (WARD *et al.*, 1994).

No princípio de 1930, Margaret Pittman definiu duas categorias de *H. influenzae*: não capsulada (acapsular) e a capsulada, e caracterizou este último sorologicamente em seis sorotipos diferentes denominando-os de a-f. Pittman observou que a linhagem de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) era encontrada em amostras do fluido cérebro-espinhal (FCE) e de sangue de crianças pequenas afetadas pela meningite, e as linhagens acapsuladas eram recuperadas em amostras do trato respiratório de adultos. Demonstrou também em experimentos realizados com animais que o anticorpo contra o polissacarídeo capsular tipo b conferia proteção específica contra infecção por Hib. A partir destas observações, deu-se início ao tratamento com o uso de soros e este foi aplicado mais tarde a crianças com meningite reduzindo a mortalidade (LIGON, 1998).

O uso de antibióticos contra o *H. influenzae* não evitou a morbidade e mortalidade, ocorrendo casos de doença contra Hib mesmo para aqueles que receberam tratamento com antibióticos. Estes fatos motivaram o desenvolvimento de uma vacina contra o Hib (WARD *et al.*, 1994).

Em 1933, Fothergill e Wright observaram que crianças menores de cinco anos eram mais vulneráveis a contrair meningite pelo *H. influenzae*. Demonstraram também que quase todos

os soros de adultos possuíam atividade bactericida diante do Hib. Em seguida, verificaram que o polissacarídeo capsular tipo b é que apresentava atividade imunogênica.

A partir destas descobertas deu-se origem a primeira vacina contra Hib, composta por polissacarídeo capsular purificado, registrada em 1985 nos Estados Unidos e aplicada em crianças com idade entre 24 e 59 meses (WARD *et al.*, 1994). Esta vacina mostrou-se ineficaz quando aplicada em crianças menores de 18 meses, tornando-se assim, inviável a introdução desta na campanha de vacinação (PELTOLA *et al.*, 1977).

As limitações da vacina de polissacarídeo capsular foram superadas ao associar o polissacarídeo à proteína de toxóide diftérico por meio de reação química, obtendo deste modo a vacina conjugada. Esta nova vacina, mais imunogênica que a polissacarídica, foi disponibilizada para uso em 1987 em crianças de 15 meses de idade ou maiores. Ainda assim, as crianças abaixo desta idade continuavam em risco. Deste modo, outras vacinas foram desenvolvidas empregando como componente de conjugação a proteína não tóxica derivada de uma cepa mutante do *Corynebacterium diphtheriae* (CRM197) ou o complexo protéico da membrana externa da *Neisseria meningitidis* (OMP) ou ainda o toxóide tetânico (TT). Estas novas vacinas conjugadas mostraram-se imunogênicas, podendo ser administradas em crianças desde os três meses de idade (ROBBINS e SCHNEERSON, 1990).

H. influenzae Rd foi o primeiro microrganismo que teve o genoma sequenciado por completo, em 1995. A partir destas informações estão sendo decifradas biomoléculas com o propósito de explicar o mecanismo de patogênese deste microrganismo, e encontrar novos candidatos vacinais, assim como compreender o mecanismo de biossíntese do polissacarídeo capsular até então desconhecido (FLEISCHMANN *et al.*, 1995).

2.1.2 Agente Etiológico

Haemophilus influenzae pertence à família Pasteurellaceae que inclui os membros do gênero *Pasteurella* e *Actinobacillus*. A exigência dos fatores, derivados do sangue, X (Hemina) e V (NAD) para o seu crescimento é a base para diferenciação laboratorial do *H. influenzae* de outras espécies de *Haemophilus*.

H. influenzae é uma bactéria Gram-negativa, não possui flagelos e tampouco forma esporo, é fastidiosa e anaeróbica facultativa. Apresenta morfologia coco-bacilar e dependendo das condições a qual é submetida pode apresentar formato bacilar ou de filamento, o que caracteriza o seu pleomorfismo. O seu hospedeiro natural é o homem sendo normalmente

encontrada no trato respiratório superior de crianças e adultos. As linhagens comensais raramente apresentam cápsulas, já as linhagens invasivas são capsuladas. A cápsula polissacarídica aparece como principal fator de virulência. Seis sorotipos são descritos com base em anticorpos específicos para diferentes cápsulas polissacarídicas. As linhagens capsuladas estão relacionadas com infecções mais severas, sendo o sorotipo b (Hib) o principal agente causador de doenças. Já as linhagens acapsuladas carecem do polissacarídeo capsular podendo causar otite média e infecção do trato respiratório (LEE, 1987; SMITH, 1993; WARD *et al.*, 1994; FLEISCHMANN *et al.*, 1995; KONEMAM, 1997; FEIKIN *et al.*, 2001).

As infecções causadas pelo *H. influenzae* tipo b normalmente são precedidas de infecção viral das vias aéreas superiores. As infecções mais comuns causadas pelo Hib são meningite, epiglote, bacteremia, pneumonia, sinusite, otite e artrite. A sinusite, otite e epiglote ocorrem por disseminação direta da bactéria para os seios paranasais, ouvido médio e tecido supraglótico, respectivamente. Já a pneumonia ocorre pela aspiração da bactéria e a meningite e bacteremia por invasão da corrente circulatória (TRABULSI *et al.*, 1999).

O Hib induz resposta inflamatória com a presença de fagócitos que leva à lise bacteriana, liberando endotoxinas e outros componentes que têm efeitos sobre os tecidos. As endotoxinas são responsáveis por causar febre, coagulação intravascular e outras manifestações sistêmicas (KONEMAM *et al.*, 1997).

A maioria das pessoas adquire imunidade contra *H. influenzae* tipo b no primeiro ano de vida sem desenvolver a doença. Isto se dá através da colonização faríngea ou colonização entérica assintomática de microrganismos que tem reatividade cruzada com o Hib.

O uso de antibióticos como rifamicina que alcança o meio intracelular, saliva e outras secreções, elimina uma possível colonização e pode ser utilizado como profilaxia de curto prazo, assim como a vacina conjugada contra o Hib para uma profilaxia de longo prazo (TRABULSI *et al.*, 1999).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

Além do polissacarídeo capsular, que tradicionalmente é conhecido como sendo o principal fator de virulência das linhagens de *Haemophilus influenzae* invasivas, algumas proteínas como as de membrana externa e o lipopolissacarídeo são também considerados fatores de virulência (WARD *et al.*, 1994).

2.2.1 Proteínas de Membrana Externa

As proteínas de membrana externa estão envolvidas com transporte de nutrientes particulados, metabólitos ou íons, e funcionam como receptores que detectam sinais químicos do meio extracelular e os transmitem para o meio intracelular atuando como enzimas (ALBERTS *et al.*, 2002).

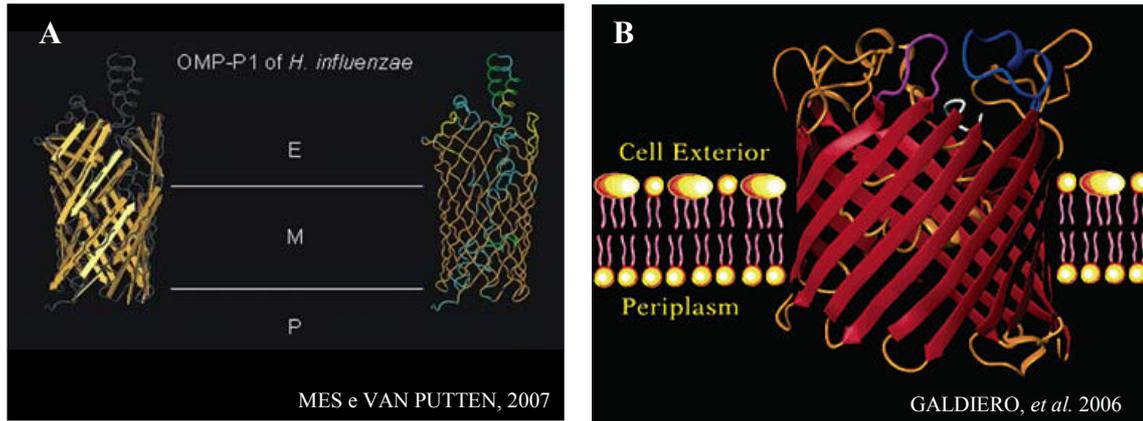
A conjugação do polissacarídeo capsular tipo b com uma proteína de membrana externa que seja conservada entre as diferentes linhagens vem sendo alvo para o desenvolvimento de uma nova vacina. A vacina atualmente disponível contra Hib (PRP conjugado a uma proteína), mesmo sendo altamente eficiente, não cobre linhagens acapsuladas que são responsáveis por uma série de doenças como infecção de ouvido, sinusite e infecção respiratória (KONEMAM *et al.*, 1997; MES e VAN PUTTEN, 2007).

As proteínas de membrana externa OMP P1, P2, P4 e P6 (*outer membrane protein* – OMP) de *H. influenzae* são consideradas potenciais candidatos vacinais por serem alvos de anticorpos bactericidas (MURPHY *et al.*, 1986; LOEB, 1987; HETHERINGTON *et al.*, 1993; KONEMAM *et al.*, 1997; ALBERTS *et al.*, 2002; BERENSON *et al.*, 2005; FELTS *et al.*, 2007; OSTBERG *et al.*, 2009).

As OMP P1 e P2, proteínas de massa molecular de 46kDa e 40kDa respectivamente, apresentam sítios de ligação para o fragmento C3 do sistema complemento que apresenta um importante papel na proteção do hospedeiro contra *H. influenzae*. Pertencem a classe de proteínas denominadas como porinas, proteínas de importância vital para as células, formando poros nas membranas e permitindo a passagem de substâncias através da mesma (figura 2.1A e B) (LOEB, 1987; HETHERINGTON *et al.*, 1993; KONEMAM *et al.*, 1997; ALBERTS *et al.*, 2002).

A OMP P1 parece não ter papel na virulência do Hib, mas apresenta estruturas que são expostas à superfície da célula e capazes de induzir a síntese de anticorpos que conferem proteção contra o Hib em modelo animal (LOEB, 1987; HANSON *et al.*, 1989).

A OMP P2 é uma das porinas mais caracterizadas em termo funcional e constitui mais de 50% das proteínas de membrana externa. Anticorpos contra a OMP P2 mostraram-se bactericidas e conferiram proteção contra infecção causada pelo Hib em modelo animal (KONEMAM *et al.*, 1997; GALDIERO *et al.*, 2006), assim como a proteína recombinante rP2 (OSTBERG *et al.*, 2009).



(P) periplasma, (M) membrana e (E) extracelular.

Figura 2.1. Modelo tridimensional das proteínas de membrana externa P1 e P2 de *H. influenzae*. A) OMP P1; B) OMP P2.

A OMP P4 (figura 2.2) é uma das proteínas de membrana externa mais conservadas do *H. influenzae*, sendo encontrada em linhagens capsuladas e acapsuladas. A P4 é uma lipoproteína com massa molecular entre 28 e 30 kDa e está envolvida na desfosforilação de NMN (nicotinamida mononucleotídeo). O NMN é de extrema importância para o *H. influenzae*, uma vez que este carece de quase todas as enzimas necessárias para biossíntese de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo). A lipoproteína P4 tem sido um dos alvos na investigação para uma vacina contra linhagens acapsuladas de *H. influenzae*. Anticorpo contra OMP P4 apresenta atividade bactericida (HOTOMI *et al.*, 2005).



HOTOMI *et al.*, 2005

Figura 2.2. Estrutura da lipoproteína P4, dímero com uma subunidade em azul e outra em rosa.

A OMP P6, também uma lipoproteína, constitui de 1 a 6% das proteínas de membrana externa do *H. influenzae*. Esta lipoproteína apresenta massa molecular de 16 kDa e o gene é

muito conservado entre as linhagens. A OMP P6 é alvo de anticorpos bactericidas em humanos e se mostrou um potente e seletivo indutor de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para doença inflamatória em humanos (MURPHY *et al.*, 1986; BERENSON *et al.*, 2005). Em modelo animal, a OMP P6 induziu anticorpos bactericidas e protetores contra infecção pelo *H. influenzae* (DE'MARIA *et al.*, 1996; KONEMAM *et al.*, 1997).

Uma limitação no uso da OMP P6 nativa é a baixa expressão pela bactéria e a dificuldade de expressão na forma solúvel. A proteína rP6 expressa por *E.coli* recombinante, apesar de apresentar características físico-químicas diferentes quando comparada com a proteína nativa, mostrou-se imunogênica e capaz de induzir anticorpo específico podendo ser um candidato para substituir a proteína nativa P6 (YANG *et al.*, 1997).

2.2.2 Proteínas de Adesão

As proteínas de adesão são moléculas que promovem a adesão do microrganismo à superfície da mucosa do hospedeiro. Os receptores para estas moléculas são os carboidratos de glicoproteínas e glicolipídios presentes nas células epiteliais (TRABULSI *et al.*, 1999).

O pili ou fimbria são estruturas prolongadas que se estendem além da superfície do microrganismo conferindo um mecanismo de aderência. Este mecanismo permite a associação com a superfície epitelial do hospedeiro de forma a favorecer a colonização do trato respiratório superior (WARD *et al.*, 1994; GILSDORF *et al.*, 1997; KONEMAM *et al.*, 1997).

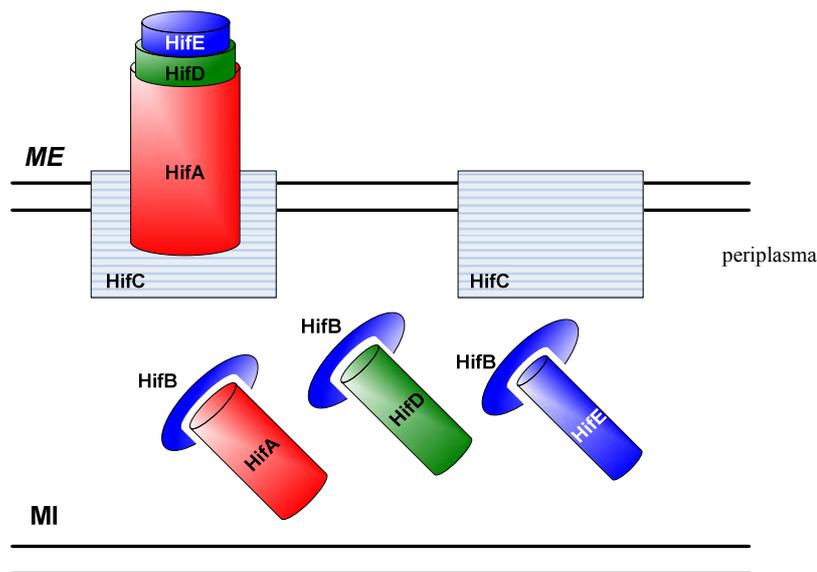
O pili possui importante papel em mediar a aderência na superfície de mucosa sendo um atrativo candidato vacinal. O *H. influenzae* possui cinco genes que estão envolvidos na formação do pili. Os genes *hifA*, *hifB*, *hifC*, *hifD* e *hifE* (figura 2.3) codificam respectivamente uma proteína estrutural, uma chaperona, uma proteína líder, uma proteína estrutural e uma adesina estrutural.

A proteína HifB se liga as proteínas HifA, HifD e HifE, formando um complexo protegendo estas de uma possível degradação no periplasma. Através de uma interação com a proteína HifC, que forma uma plataforma líder, o complexo é montado na superfície da célula bacteriana (figura 2.4) (GILSDORF *et al.*, 1997).



modificado GILSDORF *et al.*, 1997

Figura 2.3. Cluster do gene pili de *H. influenzae*.



modificado GILSDORF *et al.*, 1997

(ME) membrana externa; (MI) membrana interna.

Figura 2.4. Modelo das proteínas HifA a HifE de *H. influenzae*.

Winter demonstrou que as proteínas de adesão HMW1 e HMW2 (*high molecular weight*) apresentam epitopos que são reconhecidos por anticorpos opsonofagocíticos contra linhagens acapsuladas de *Haemophilus influenzae*. Estas proteínas fazem parte de uma família de proteínas imunogênicas que são comuns em 70 a 75% das linhagens acapsuladas e são possíveis candidatos vacinais (WINTER e BARENKAMP, 2003).

As linhagens de *H. influenzae* que não expressam as proteínas HMW1 e HMW2 apresentam um gene denominado *hia* (*Haemophilus influenzae adhesin*) que é predito como codificador de uma proteína de adesão de 114 kDa. Uma vacina combinada com as proteínas HMW e Hia poderia conferir proteção contra a maioria das linhagens acapsuladas (BARENKAMP e ST GEME III, 1996).

A proteína Hsf (*Haemophilus surface fibrils*) com massa molecular de 240 kDa, apresenta 81% de similaridade e 72% de identidade com a proteína Hia de *H. influenzae* acapsular (ST GEME III *et al.*, 1996) e é o maior ligante de vibronectina em *H. influenzae*. A

glicoproteína vibronectina regula o complexo de ataque à membrana do sistema complemento. A interação da proteína Hsf com a vibronectina inibe o complemento mediador de atividade bactericida podendo contribuir na colonização e conferir ao *H. influenzae* maior fator de virulência (HALLSTRÖM *et al.*, 2006).

2.2.3 Proteases

As IgA-proteases são enzimas específicas que reconhecem e degradam imunoglobulinas do tipo A (IgA). As bactérias patogênicas como *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguis* e *Haemophilus influenzae* são capazes de sintetizar e liberar IgA-proteases. A síntese aparentemente independe de plasmídeos ou outros elementos genéticos extracromossômicos (PLAUT, 1983). A produção de IgA-proteases pelo *Haemophilus influenzae* inativa anticorpos específicos e deste modo facilita a colonização do trato respiratório superior (KONEMAM *et al.*, 1997).

2.2.4 Bacteriocina

As bacteriocinas normalmente são proteínas de elevada massa molecular que atuam em linhagens e espécies próximas. Estas proteínas atuam sobre a célula alvo reconhecendo receptores específicos de superfície e matam a célula através da formação de canais na membrana citoplasmática permeáveis a íons, degradação não específica do DNA, inibição da síntese protéica, ou lise da célula pela inibição de síntese de peptídeoglicano (RILEY, 1998).

Em 1975, Venezia e Robertson descreveram um fator bactericida, denominado Haemocina, produzido pelo Hib com atividade sobre outras espécies de *Haemophilus*. Esta proteína de tamanho e mecanismo de ação similar ao de outras bacteriocinas, é produzida por mais de 90% das linhagens do sorotipo b de *Haemophilus influenzae* conferindo vantagem competitiva em relação a outras linhagens e espécies, facilitando a colonização da nasofaringe (LIPUMA *et al.*, 1990; KONEMAM *et al.*, 1997).

2.2.5 Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (LPS), também conhecido como endotoxina, é o maior componente da membrana externa das bactérias Gram-negativas (SCHWEDA *et al.*, 2007). O

LPS confere propriedades importantes à membrana externa da bactéria como facilitar o influxo de nutrientes que atuam como barreira para moléculas potencialmente tóxicas e permitir a montagem de proteínas que controlam canais iônicos. O LPS também está envolvido na patogênese do *H. influenzae* nas etapas de colonização e evasão do sistema imune do hospedeiro (MOXON, 2009). Apresenta uma característica anfipática, possuindo uma porção hidrofóbica composta por lipídio e uma porção hidrofílica composta por polissacarídeo. Na maioria das espécies o LPS é composto por três regiões distintas (figura 2.5A e B), o lipídio A, o oligossacarídeo central e o polissacarídeo-O (MAGALHÃES *et al.*, 2007).

O lipídio A é uma região conservada altamente hidrofóbica e endotóxica do LPS formada por fosfolípeos. O lipídio A está ligado a uma molécula central que é dividida em região interna e externa.

A região interna é altamente conservada e caracterizada por apresentar açúcares incomuns em sua estrutura como o *3-deoxy-D-manno-octulosonic acid* (Kdo) e o *L-glycero-D-manno heptose* (Hep). Já a região externa, é mais variável que a interna, e se estende além da superfície bacteriana. A região externa consiste de hexoses mais comuns como glicose, galactose, N-acetilgalactosamina e N-acetilglicosamina.

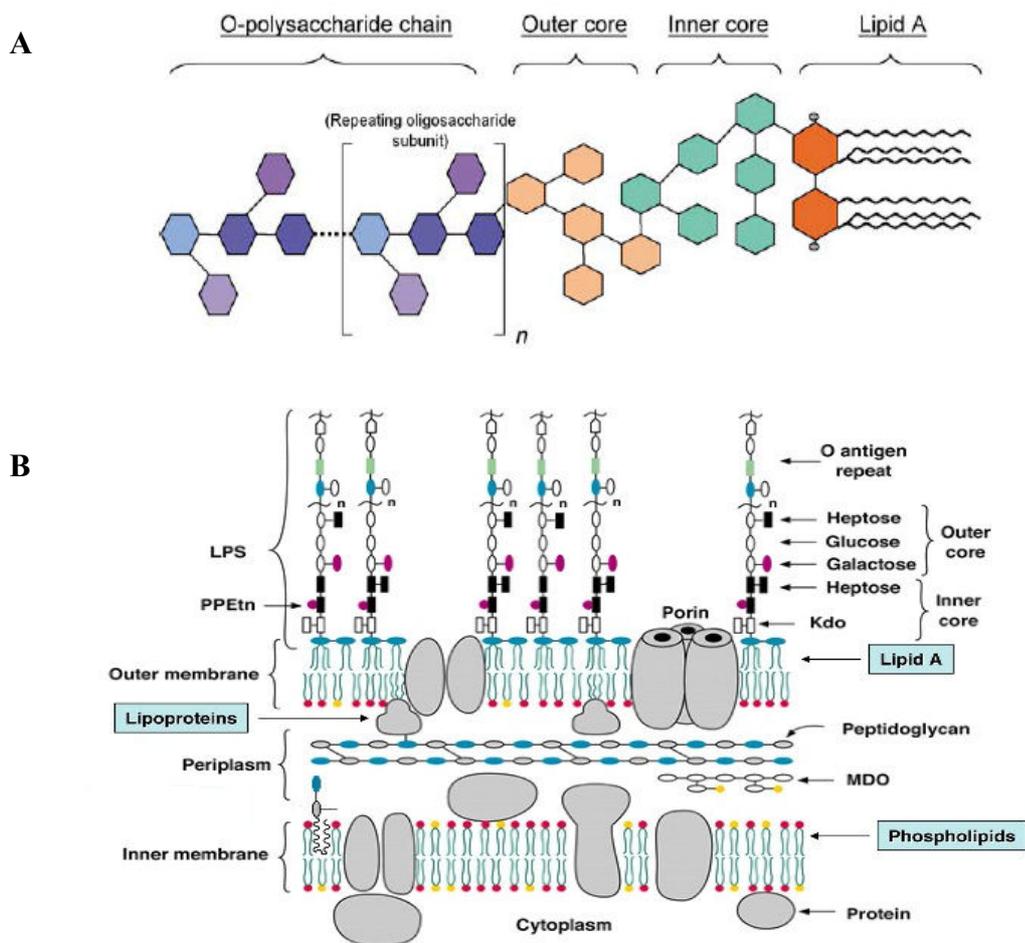
O polissacarídeo-O ou cadeia-O é composta por unidades repetidas de hexoses, sendo uma região extremamente variável, mas apresenta algumas regiões mais conservadas. O polissacarídeo-O difere entre linhagens pela quantidade de açúcares, sequência, ligação química, substituição e a forma dos anéis. Este polissacarídeo se encontra em uma região mais externa do LPS estando em contato com o sistema imune do hospedeiro e, portanto alvo do mesmo. Respostas imunológicas contra o polissacarídeo-O são altamente específicas, sendo este denominado como antígeno-O (ERRIDGE *et al.*, 2002).

No hospedeiro humano, o LPS desempenha um papel importante no surgimento de manifestações clínicas que muitas vezes são mediadas por substâncias que se originam do plasma ou das células, principalmente pelos macrófagos (TRABULSI *et al.*, 1999).

Zwahlen *et al.* observaram que o LPS estava envolvido na patogenicidade de diferentes sorotipos do *H. influenzae* (ZWAHLEN *et al.*, 1983). O LPS do *H. influenzae* apresenta grande diversidade como variação alélica, aquisição de transferases distintas, variação de fases e adição não-estequiométrica de moléculas como fosforilcolina (FC) (WONG e AKERLEY, 2005; SCHWEDA *et al.*, 2007; MOXON, 2009).

A fosforilcolina media aderência e invasão do epitélio hospedeiro de forma a permitir a colonização e persistência do microrganismo no trato respiratório (SCHWEDA *et al.*, 2007). Múltiplos genes controlam a biossíntese do LPS e a modulação da fosforilcolina (WONG e AKERLEY, 2005). O locus *lic1* compreende quatro genes (*lic1A* a *lic1D*) que estão envolvidos na adição da FC no LPS e estão relacionados com a adaptação do microrganismo aos sinais do ambiente durante o processo infeccioso (WONG e AKERLEY, 2005; SCHWEDA *et al.*, 2007).

A adição de ácido siálico (N-acetilneuramínico ou NeuAc) no LPS é um importante mecanismo utilizado pelo *H. influenzae* para se esquivar do sistema imune hospedeiro (SEVERI *et al.*, 2005). O ácido siálico interfere na ligação, ativação do sistema imune de forma a aumentar a sobrevivência da bactéria no hospedeiro humano (SEVERI *et al.*, 2005; SCHWEDA *et al.*, 2007; MOXON, 2009).



ERRIDGE *et al.*, 2002 e MAGALHÃES *et al.*, 2007

Figura 2.5. Representação esquemática da estrutura do lipopolissacarídeo. A) esquema da estrutura do LPS e B) disposição do LPS na membrana externa.
LPS – lipopolissacarídeo

2.2.6 Polissacarídeo Capsular

Os polissacarídeos capsulares são moléculas que contêm mais de 95% de água formando um gel hidratado ao redor da superfície bacteriana de forma a conferir proteção contra dessecação e facilitar sua transmissão de hospedeiro para hospedeiro. A cápsula ainda permite a aderência do microrganismo a superfícies do epitélio e confere proteção do microrganismo contra o sistema imune (ROBERTS, 1996).

Os polissacarídeos da cápsula de *Haemophilus influenzae* são reconhecidos por anticorpos específicos e classificados em seis sorotipos (a-f). A cápsula polissacarídica de *Haemophilus influenzae* b aparece como principal fator de virulência, sendo responsável por doenças invasivas como bacteremia e meningite (SMITH, 1993; KONEMAM *et al.*, 1997).

Crisel *et al.* demonstraram que a estrutura do polissacarídeo capsular do Hib apresentava proporções equimolares de duas pentoses, ribose e ribitol seguida por unidades de fosfato formando o polímero poli-ribosil-ribitol-fosfato - PRP (figura 2.6) (CRISEL *et al.*, 1975).

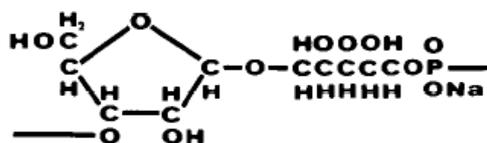


Figura 2.6. Estrutura do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b.

Os genes responsáveis pela síntese da cápsula polissacarídica estão localizados no cromossomo em um locus chamado *cap* (figura 2.7A). Este arranjo de genes apresenta-se duplicado em mais de 98% das linhagens do Hib (KONEMAM *et al.*, 1997). O locus *cap* é constituído de três regiões, sendo as regiões I e III comuns a todos os sorotipos, e a região II específica para cada sorotipo (KROLL *et al.*, 1989). Boulnois *et al.* relataram estrutura semelhante ao locus *cap* para a síntese de cápsula K1 de *Escherichia coli* (BOULNOIS *et al.*, 1987).

A região I contém quatro genes (*bexA*, *bexB*, *bexC* e *bexD*) que codificam para um sistema de transporte que está envolvido na exportação do polissacarídeo capsular para a superfície da bactéria (KROLL *et al.*, 1990). A região II também contém quatro genes (*bcs1*, *bcs2*, *bcs3* e *bcs4*), porém eles estão envolvidos com a biossíntese específica para cada tipo de polissacarídeo capsular (VAN ELDERE *et al.*, 1995). A região III contém dois genes *hcsA* e *hcsB*, que inicialmente foram descritos como envolvidos na etapa de polimerização do

polissacarídeo capsular. No entanto, Sukupolvi-Petty *et al.* demonstraram que os genes *hcsA* e *hcsB* estão envolvidos com a exportação do polissacarídeo capsular. Estes mesmos autores inativaram o gene *hcsA* e observaram acúmulo de polissacarídeo capsular no periplasma e diminuição parcial da associação deste à superfície da célula. Quando inativaram o gene *hcsB* e ambos *hcsA* e *hcsB*, observaram acúmulo de polissacarídeo capsular no periplasma e total ausência da associação deste com a superfície da célula (figura 2.8) (KROLL *et al.*, 1989; SUKUPOLVI-PETTY *et al.*, 2006).

As linhagens *in vivo* podem apresentar múltiplas cópias do locus *cap* e produzir até cinco vezes mais material capsular. Esta duplicação pode conferir estabilidade e aumento da produção de polissacarídeo (KROLL *et al.*, 1988). A duplicação do locus *cap* serve como *template* para amplificar a sequência de genes da cápsula o que resulta em menor suscetibilidade à lise e opsonização mediada pelo complemento e consequente resistência do microrganismo contra o sistema imune hospedeiro (CORN *et al.*, 1993; NOEL *et al.*, 1996).

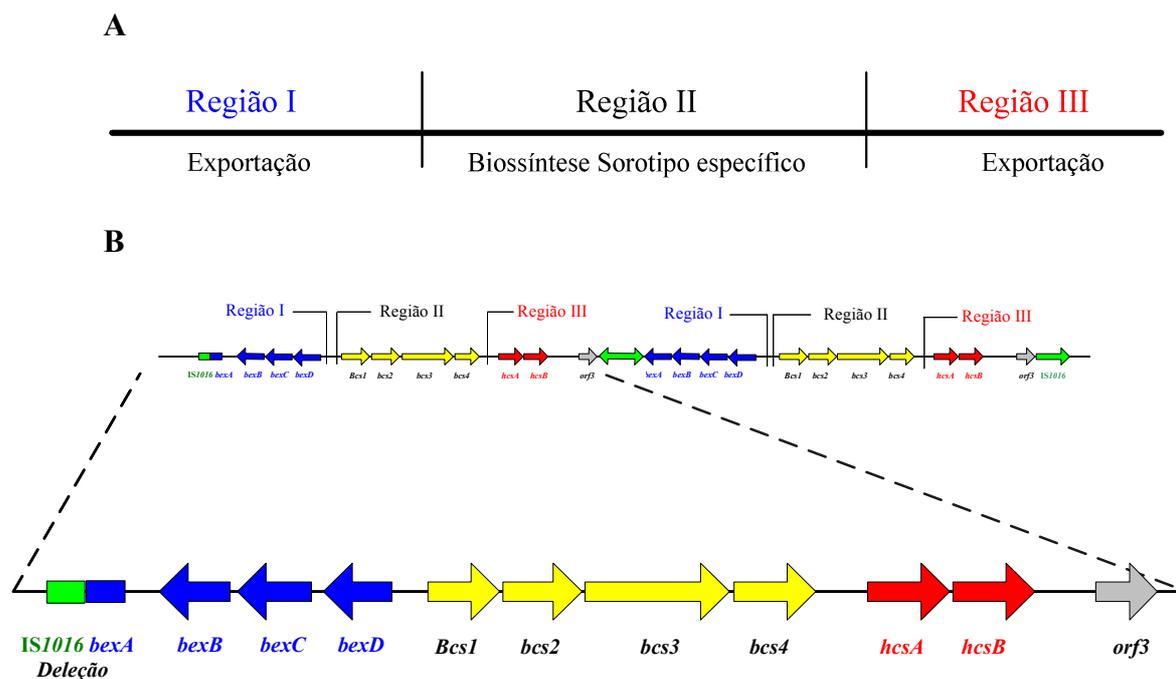
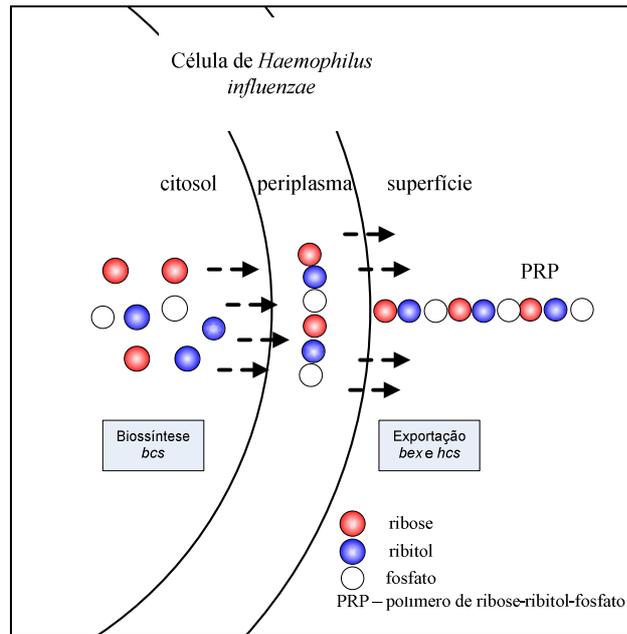


Figura 2.7. A) Estrutura do locus *cap* demonstrando as regiões e suas respectivas funções; B) Esquema do locus *cap* duplicado.



Interpretação de fontes literárias (KROLL *et al.*, 1989; KROLL *et al.*, 1990; VAN ELDERE *et al.*, 1995; SUKUPOLVI-PETTY *et al.*, 2006).

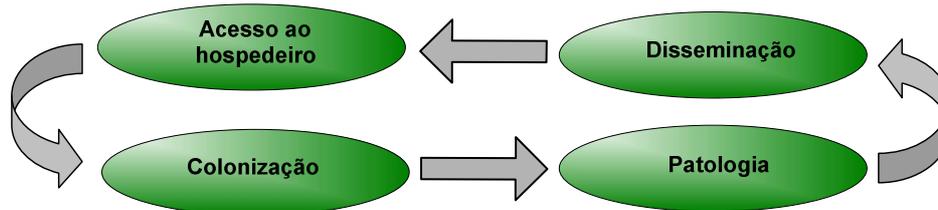
Figura 2.8. Esquema de biossíntese e transporte do polissacarídeo capsular de *H. influenzae*.

A amplificação do locus *cap* é muito comum em linhagens de *H. influenzae* tipo b. Estas linhagens são isoladas com maior frequência em crianças vacinadas do que em crianças não vacinadas, indicando que a amplificação pode conferir vantagem sobre a vacina (CERQUETTI *et al.*, 2005).

As linhagens com menor número de cópias duplicadas do locus *cap* apresentam maior aderência em células epiteliais humanas e maior capacidade de invasão (KROLL e MOXON, 1988). Segundo Hoiseth *et al.* (1985) a ausência de pressão seletiva de forma a manter a expressão da cápsula polissacarídica pode levar à perda da mesma de forma espontânea *in vivo* e/ou *in vitro*. A recombinação no locus *cap* pode levar à perda da duplicação resultando em uma única cópia. Este variante pode não produzir cápsula e, portanto, ser sorologicamente não tipável (SCHOULS *et al.*, 2007).

2.3 PATOGENICIDADE

O processo de patogenicidade está relacionado com a eficiência do microrganismo em ganhar acesso ao hospedeiro, colonizá-lo, causar patologia e se disseminar em outro hospedeiro (figura 2.9) (MIETZNER e MORSE, 1994).

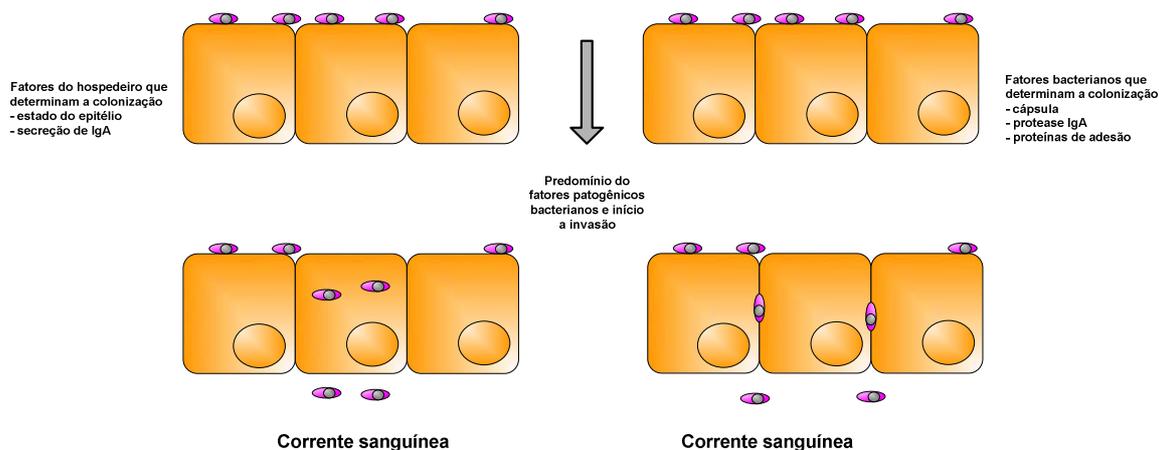


modificado MIETZNER e MORSE, 1994

Figura 2.9. Ciclo patogênico do *Haemophilus influenzae*.

Haemophilus influenzae tipo b faz parte da flora normal do hospedeiro e pode eventualmente causar doença. O desenvolvimento de infecção causada pelo Hib envolve uma série de eventos, iniciando-se pela colonização até resultar em invasão.

O processo de infecção do Hib inicia-se com a colonização do epitélio do trato respiratório superior. Esta etapa é facilitada pela condição do epitélio e por fatores de virulência como cápsula, proteínas de adesão e IgA protease (figura 2.10).



modificado STRUTHERS e WESTRAN, 2003

Figura 2.10. Mecanismo de invasão do *Haemophilus influenzae*.

A bactéria consegue se fixar ao epitélio respiratório através de proteínas de adesão para poder depois se multiplicar e colonizar. O pili e a fimbria são proteínas de adesão reconhecidas por receptores específicos e por tipos celulares distintos. O pili aparece em uma fase inicial do processo de colonização, enquanto a fimbria em uma fase posterior (WARD *et al.*, 1994; ST GEME III *et al.*, 1996; STRUTHERS e WESTRAN, 2003).

A cápsula polissacarídica inibe o reconhecimento de proteínas de adesão como a fimbria na superfície da célula hospedeira mascarando o domínio de ligação da fimbria.

Portanto, a formação da cápsula seria modulada em resposta aos sinais do ambiente. Assim, uma menor espessura da cápsula ocorreria na etapa inicial do processo de infecção e uma maior síntese da cápsula ocorreria durante a bacteremia, conferindo vantagem seletiva ao microrganismo (ST GEME III *et al.*, 1996; STRUTHERS e WESTRAN, 2003).

Dentro da submucosa, as linhagens produtoras de cápsula invadem os fagócitos e entram na corrente sanguínea através da drenagem linfática levando a uma bacteremia (SMITH, 1993). Após a penetração da bactéria na mucosa e disseminação na corrente sanguínea, sua sobrevivência é garantida com o auxílio do polissacarídeo capsular e mudança de fenótipo do LPS que permite sua adaptação e crescimento (TURK, 1984; KONEMAM, 1997).

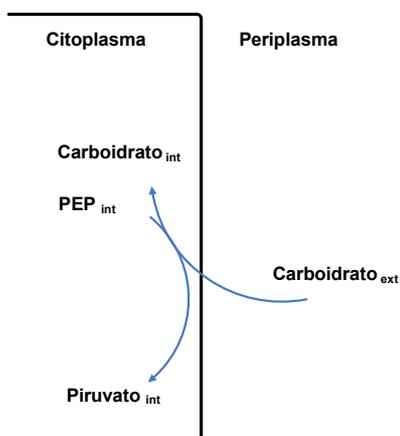
2.4 METABOLISMO

O genoma completo do *H. influenzae* KW20 Rd foi sequenciado em 1995 por Fleischmann *et al.* (FLEISCHMANN *et al.*, 1995). A partir de então, os mecanismos de patogenicidade deste microrganismo começaram a ser elucidados, e outros fatores de virulência, que não o polissacarídeo, passaram a ser evidenciados como candidatos a antígenos vacinais. As informações relacionadas ao metabolismo deste microrganismo são raras. Neste tópico buscou-se fazer uma síntese desde a captação de carboidratos, bem como catabolismo pelas principais vias metabólicas.

2.4.1 Captação de Carboidratos

O *H. influenzae* possui uma maquinaria capaz de utilizar a maioria dos açúcares disponíveis na mucosa do hospedeiro humano como, por exemplo, a glicose, frutose, galactose e o glicerol (MACFADYEN e REDFIELD, 1996). A habilidade em utilizar uma variedade de fontes de carbono pode conferir à bactéria vantagens ao competir com outros microrganismos e na adaptação às mudanças do microambiente. Os sinais percebidos no ambiente externo são convertidos em resposta com mudanças na síntese protéica, na regulação enzimática e mudança de comportamento. Um dos sistemas sensitivos para carboidratos é mediado pelo fosfoenolpiruvato (PEP): *carbohydrate phosphotransferase system* (PTS), envolvido com transporte e fosforilação de carboidratos, movimento bacteriano por quimiotaxia a estas fontes de carbono, e regulação de uma série de outras vias

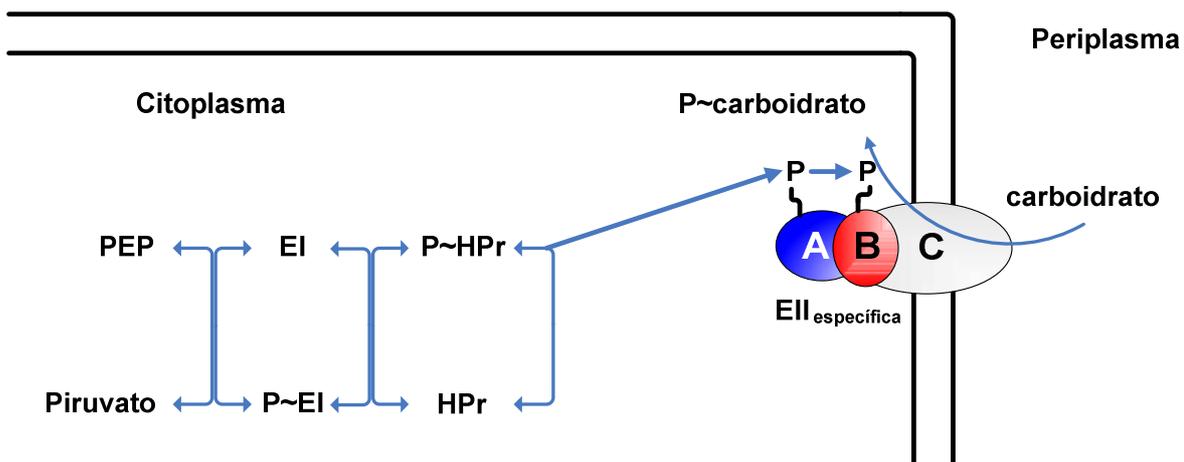
metabólicas. No sistema PTS, cerca de 20 proteínas são conhecidas e outras 10 proteínas mostram interação com proteínas do sistema PTS. Independente do microrganismo ou carboidrato, este sistema catalisa uma reação global, ilustrado na figura 2.11 (POSTMA *et al.*, 1993).



PEP (int) + carboidrato (ext) = piruvato (int) + carboidrato-P (int); PEP (fosfoenolpiruvato); int (intracelular); ext (extracelular).

Figura 2.11. Reação global catalisada pelo sistema PTS.

O fosfoenolpiruvato (PEP), um intermediário da via glicolítica, fornece energia para a fosforilação do carboidrato, reação esta que está acoplada a translocação do carboidrato através da membrana. As reações de translocação e fosforilação de carboidratos ocorrem obrigatoriamente através dos intermediários EI, HPr, EIIA, EIIB e EIIC (figura 2.12).



PEP - fosfoenolpiruvato; EI – enzima I; EII, P~EI – enzima I fosforilada; EII – enzima II domínios A, B e C; Figura 2.12. Reação de fosforilação e translocação de carboidratos pelo sistema PTS.

As enzimas EI e HPr são denominadas proteínas gerais do sistema PTS por participarem da fosforilação de todos os carboidratos deste sistema. Já a enzima II (EII) é

específica para cada carboidrato e pode consistir em uma única proteína, composta de três domínios (A, B e C), ligada à membrana. Os domínios A e B estão envolvidos com a fosforilação dos carboidratos, e o domínio C constitui parte integral da membrana e forma um canal de translocação (POSTMA *et al.*, 1993).

H. influenzae Rd possui um sistema PTS simples. Seu genoma possui genes que codificam as enzimas EI e HPr do sistema PTS, no entanto, não possui o gene que codifica a enzima EII específica para o transporte de glicose através da membrana (FLEISCHMANN *et al.*, 1995). Embora o *H. influenzae* não possua permease para glicose pelo sistema PTS, ele pode fosforilar e captar a glicose via proteína quinase dependente de ATP (MACFADYEN *et al.*, 1996). O sistema de captação de galactose, também permite o transporte de glicose, sendo observada a inibição na captação de galactose quando na presença de glicose (MACFADYEN *et al.*, 1996). Devido sua deficiência, o sistema PTS de *H. influenzae* Rd permite somente a entrada de frutose na célula. O glicerol, parece ter sua difusão facilitada através da membrana por um transportador (glpT) que permite alimentar direto a via glicolítica. O *H. influenzae* possui ainda um sistema de captação e catabolismo de ribose e xilose, assim como para fucose (CHAKRABARTI *et al.*, 1984). Fermenta ácido siálico livre (ácido N-acetilneuraminico) que pode formar piruvato e N-acetilmanosamina. E este último provavelmente é fosforilado e convertido a N-acetilglucosamina-fosfato e então metabolizado para frutose-6-fosfato (WARREN, 1932).

2.4.2 Via Glicolítica

O catabolismo dos carboidratos pelo *H. influenzae* ocorre principalmente pela via glicolítica (RAGHUNATHAN *et al.*, 2004). Esta via apresenta uma sequência de dez reações, com a formação de açúcares intermediários que são catalisados por enzimas específicas como ilustra a figura 2.13 (CHAMPE e HARVEY, 1996; ALBERTS *et al.*; 2002).

Dependendo das condições a que este microrganismo é submetido, o fluxo da via glicolítica se altera, como verificado por Raghunathan *et al.*, que observaram uma atividade da enzima piruvato quinase (E.C 2.7.1.40) em *H. influenzae* seis vezes maior quando submetido às condições de microaerobiose do que em anaerobiose, sugerindo assim que o fluxo de carbono de fosfoenolpiruvato (PEP) para piruvato, seja menor em anaerobiose. Verificou-se também que em anaerobiose, a atividade da piruvato desidrogenase (E.C 1.2.4.1

e 2.3.1.12) aparece três vezes menor, indicando redução do fluxo de piruvato para acetil-CoA (RAGHUNATHAN *et al.*, 2004).

Em *H. influenzae*, ao final desta via, a partir de uma molécula de glicose se tem a degradação do esqueleto carbônico da glicose em duas moléculas de piruvato com um rendimento líquido de duas moléculas de ATP (KEGG, 2010).

2.4.3 Via das Pentoses

A via das pentoses, também denominada hexose-monofosfato, é uma importante via alternativa para a utilização de glicose-6-fosfato que se encontra funcional em *H. influenzae* (figura 2.13) (TATUSOV *et al.*, 1996; RAGHUNATHAN *et al.*, 2004). Nesta via são geradas duas moléculas de NADPH para cada glicose-6-fosfato. O NADPH é um transportador de energia na forma de força redutora, sendo em grande parte fornecido à célula por esta rota. A via das pentoses, também produz ribose-fosfato para biossíntese de nucleotídeos e apresenta mecanismos metabólicos capazes de utilizar açúcares de cinco carbonos (LEHNINGER, 1984; CHAMPE e HARVEY, 1996).

2.4.4 Metabolismo do Piruvato

Pelo mapa metabólico (figura 2,13), a partir do piruvato oriundo da via glicolítica o *H. influenzae* Rd pode formar acetil-CoA, acetato, lactato ou formato (KEGG, 2010).

De modo geral, o piruvato pode ser metabolizado por diferentes vias e formar uma série de produtos finais como acetil-CoA, ácido butírico, ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido succínico, álcool isopropílico, álcool butílico, entre outros, desde que o microrganismo apresente enzimas adequadas. Por isso, o piruvato pode ser considerado como o eixo do metabolismo de carboidratos.

A via de utilização do piruvato reflete em diferenças na fermentação. A fermentação refere-se ao metabolismo anaeróbico de produção de energia e que não envolve a cadeia respiratória ou citocromos. A disposição dos elétrons com a regeneração do NAD permite a continuação da glicólise com o consumo de mais glicose (PELCZAR *et al.*, 1980). Em fermentação, o *H. influenzae* produz D-lactato, acetato, CO₂ e hidrogênio. Estes dois últimos são produzidos através do catabolismo do formato (RAGHUNATHAN *et al.*, 2004). A formação de acetato por *H. influenzae* ocorre tanto em condições de microaerobiose como em anaerobiose, pela ação das enzimas fosfato acetiltransferase (E.C 2.3.1.8) e acetato quinase

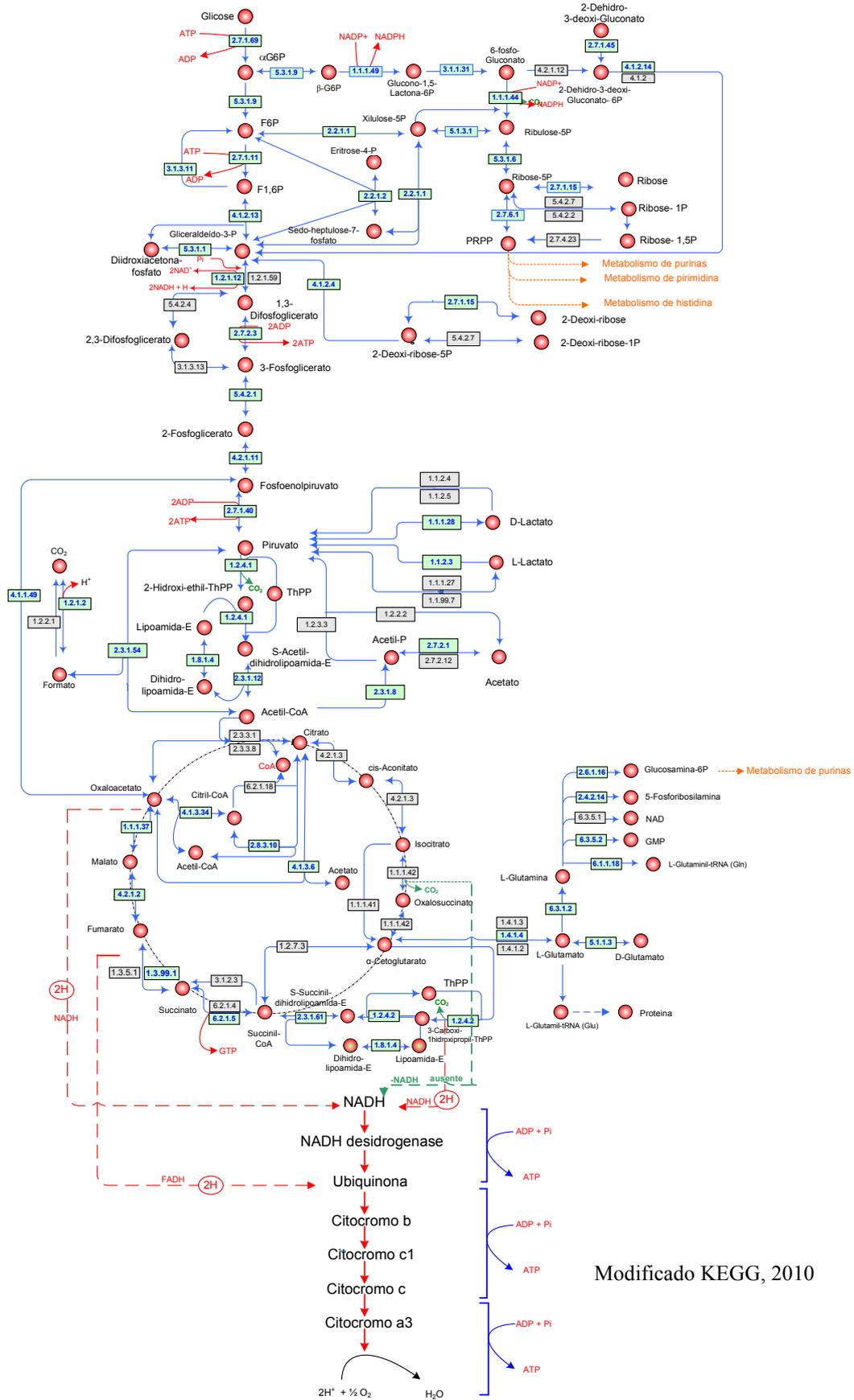
(E.C 2.7.2.1). Esta última mostrou maior atividade em condições de microaerobiose. As enzimas fosfato acetiltransferase e acetato quinase podem funcionar na direção reversa, o que pode facilitar o crescimento em acetato. Portanto, dependendo da via utilizada, o acetato pode ser produto final ou substrato. Já o etanol, produto final do catabolismo do acetil-CoA em *E. coli*, não foi detectado em *H. influenzae*, que não apresenta atividade da enzima álcool desidrogenase (RAGHUNATHAN *et al.*, 2004).

O genoma do *H. influenzae* Rd contém um operon (*napFDAGHB*) para a utilização de nitrato (FLEISCHMANN *et al.*, 1995; RAGHUNATHAN *et al.*, 2004). Em respiração anaeróbica o nitrato é utilizado como acceptor final da cadeia de elétrons, onde a enzima nitrato redutase catalisa a reação de maneira a conjugar a redução do nitrato com a oxidação de um citocromo (PELCZAR *et al.*, 1980).

2.4.5 Ciclo de Krebs

O ciclo de Krebs ou ciclo do ácido tricarboxílico desempenha vários papéis no metabolismo tendo como função central a oxidação do acetil-CoA, derivado de moléculas combustíveis como aminoácidos, ácidos graxos e carboidratos a CO₂ e H₂O. No ciclo de Krebs, o oxaloacetato se condensa ao acetil-CoA, sendo regenerado no decorrer do ciclo. Entretanto, as reações não são como um círculo fechado, mas sim como um círculo em trânsito, em que compostos intermediários entram e saem conforme necessidade (CHAMPE e HARVEY, 1996; ALBERTS *et al.*; 2002). No genoma do *H. influenzae* Rd o ciclo de Krebs aparece incompleto (figura 2.13) com ausência de três genes responsáveis pela síntese das enzimas citrato sintase (E.C 2.3.3.1), aconitase (E.C 4.2.1.3) e isocitrato desidrogenase (E.C 1.1.1.41 e 1.1.1.42). A ausência destas enzimas exige que este microrganismo busque caminhos alternativos para gerar energia o que pode explicar o requerimento de grande quantidade de glutamato para o seu crescimento em meio de cultura. O glutamato pode entrar direto no ciclo de Krebs pela conversão de glutamato em α -cetoglutarato pela ação da enzima glutamato desidrogenase (E.C 1.4.1.4) (FLEISCHMANN *et al.*, 1995; TATUSOV *et al.*, 1996; TANG *et al.*, 1997).

A porção do ciclo de Krebs, do succinil-CoA à oxaloacetato, através do malato e fumarato, aparece ativo tanto em condições de microaerobiose como em anaerobiose. O oxaloacetato também pode ser formado através da atividade da citrato liase (E.C 4.1.3.6) (RAGHUNATHAN *et al.*, 2004).



Quadrado cinza – código das enzimas ausentes; Quadrado verde – código das enzimas presentes
 Figura 2.13. Mapa com as principais vias do metabolismo do *H. influenzae* KW20 Rd

2.4.6 Outras Fontes Energéticas

Muitas bactérias podem degradar proteínas exógenas e utilizar seus produtos como fontes energéticas. No caso específico do *H. influenzae*, pode secretar proteases e digerir proteínas de forma a facilitar o transporte destas através da membrana. Para tanto, apresenta transportadores e permeases para aminoácidos, assim como para peptídeos, dipeptídeos e oligopeptídeos. A degradação destes compostos pode suprir peptídeos, aminoácidos e fontes de carbono e nitrogênio. Os esqueletos carbônicos dos aminoácidos sofrem degradação oxidativa levando a compostos como acetil-CoA, α -cetoglutarato, succinato, fumarato ou oxaloacetato que podem ingressar no ciclo de Krebs (PELCZAR *et al.*, 1980; MACFADYEN e REDFIELD, 1996).

É importante destacar que o genoma do *H. influenzae* Rd KW20, refere-se a uma linhagem acapsular e não patogênica que possui genes que podem não representar a variedade das linhagens de *H. influenzae*, devendo-se ter cuidado ao generalizar a reconstrução de outras linhagens baseando-se apenas nesse banco de dados (TATUSOV *et al.*, 1996).

2.4 IMUNOGENICIDADE

A exposição natural ao *H. influenzae* tipo b pode induzir a formação de anticorpos contra lipopolissacarídeos, proteínas de membrana externa, antígenos de superfície e a cápsula polissacarídica (PRP). Anticorpos contra estes diferentes antígenos têm uma importância ao conferir imunidade, sendo que anticorpos contra a cápsula aparecem como o fator de maior importância. Os anticorpos contra o PRP protegem contra doença invasiva ativando o sistema complemento e têm características bactericida e opsonofagocítica. Um indivíduo pode produzir anticorpos contra o PRP quando exposto à outra bactéria que imunologicamente possibilite reação cruzada dos antígenos. A indução de anticorpos depende do tipo, tempo, gravidade da exposição e a idade do indivíduo (WARD *et al.*, 1994).

Os polissacarídeos são antígenos primitivos que conferem uma resposta imune fraca e com uma influência mínima de células T. Estes antígenos, denominados T–independentes, produzem uma resposta que estimula direto as células B. Em geral, as vacinas polissacarídicas induzem resposta T–independente com resposta imune limitada. Já as proteínas, são antígenos complexos que induzem uma resposta imune com participação de células T. Estes antígenos, denominados T-dependentes, são captados e processados pelos macrófagos e células dendríticas e apresentados para as células B e células T. A atividade das células T, de reação

antígeno-específica, induz a proliferação e diferenciação das subpopulações de células B que retêm memória imunológica (WARD *et al.*, 1994).

O complemento aparece como importante componente de defesa contra o Hib. Pacientes que apresentam deficiência congênita específica dos componentes C2, C3, C4 e C9, tem maior suscetibilidade em adquirir doença causada pelo Hib. *H. Influenzae* ativa as vias clássica e alternativa do sistema complemento o que leva a opsonofagocitose e morte celular. Outro mecanismo importante de defesa do hospedeiro é a fagocitose. Esta é induzida pela opsonização que leva a bactéria à morte. Uma falha na função fagocítica ou redução do número de fagocitoses resulta em maior suscetibilidade à doença causada pelo Hib. A opsonização e fagocitose do Hib parece ser dependentes da ligação do IgG, ativação da via clássica do complemento pelo anticorpo com deposição do componente C3b do sistema complemento na superfície bacteriana e ativação da via alternativa do complemento diretamente pela bactéria (WARD *et al.*, 1994).

2.5 FATORES DE CRESCIMENTO

H. influenzae é considerado um microrganismo fastidioso que possui um sistema enzimático deficiente necessitando de aminoácidos, vitaminas e fatores de crescimento como fator X (Hemina) e fator V (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - NAD) para o seu crescimento (FILDES, 1921).

Alguns membros da família Pasteurellaceae como o *Haemophilus influenzae* tem o NAD como componente essencial para o seu crescimento. O NAD e o NADP aparecem como coenzimas importantes em reações de oxi-redução.

Para o *H. influenzae*, tanto a nicotinamida riboside (NR) e a nicotinamida mononucleotídeo (NMN) podem servir como fontes de fator V, podendo compensar uma baixa concentração de NAD.

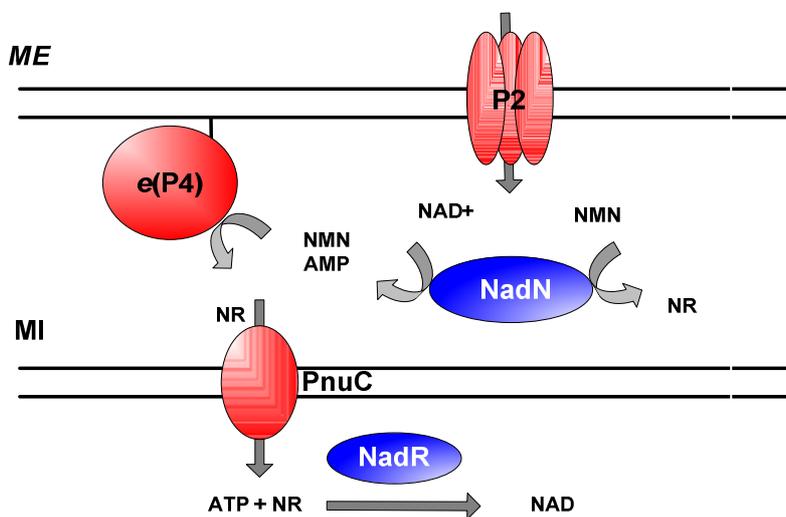
A aquisição de NAD e NMN é realizada pela proteína de membrana externa OMP P2. A OMP P2 é uma porina que através de difusão facilitada permite a entrada de NAD e NMN através da membrana externa da bactéria. Já no espaço periplasmático, o NMN e o NAD são substratos, sendo processados pela lipoproteína P4 e pela NAD pirofosfatase codificadas pelos genes *hel* e *nadN*, respectivamente (GERLACH e REIDL, 2006).

O NAD é hidrolisado pela NadN (figura 2.14) resultando em NMN e AMP (adenosina monofosfato). O NMN resultante é desfosforilado em NR pela atividade fosfatase da NadN. A

lipoproteína P4 atua liberando NR derivado do NMN. O NR assim gerado é reconhecido pela PnuC, uma permease citosólica específica a qual facilita a entrada de NR através da membrana interna. Em seguida, o NR participa de um processo de ressíntese do NAD pela proteína NadR. O transporte de NR depende da atividade do domínio NRK (*nicotinamide riboside kinase*) da proteína NadR para fosforilar NR em NMN e posteriormente em NAD (GERLACH e REIDL, 2006).

Singh *et al.* (2002) identificaram a estrutura da NadR de *H. influenzae*. Esta proteína apresenta dois domínios (figura 2.15), um domínio denominado NRK, que se encontra na região C-terminal e outro domínio denominado NMNAT (*nicotinamide mononucleotideo activity*) localizada na região N-terminal.

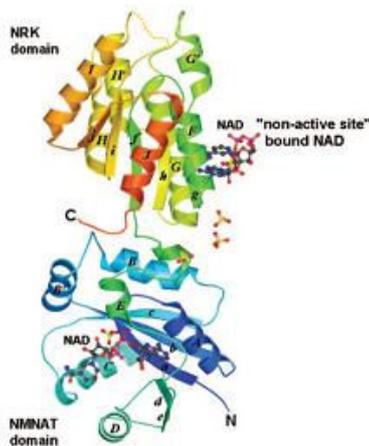
A NRK controla a síntese de NAD e aquisição de NR. Quando há acúmulo de NR, este é detectado pelo *nadR* indicando que a fosforização do NR é necessária. Através de controle *feedback* a NRK é inibida pelo produto final, o NAD. A captação de NR e a síntese de NAD são controlados pela PnuC, um mecanismo de canal aberto/fechado que responde e interage com a proteína NadR (figura 2.16) (GERLACH e REIDL, 2006).



modificado GERLACH e REIDL, 2006

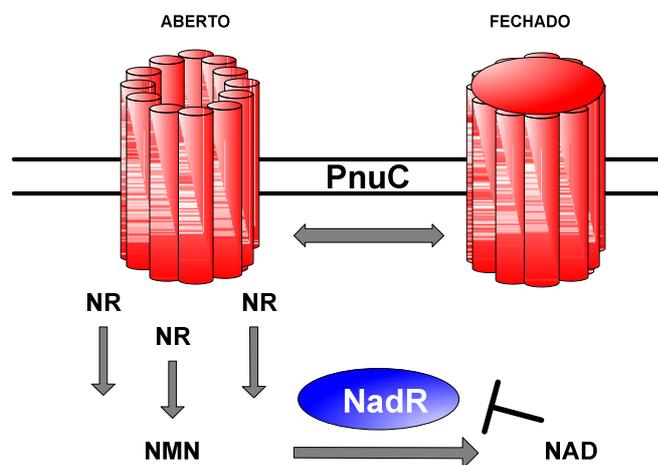
ME – membrana externa; MI – membrana interna.

Figura 2.14. Mecanismo de aquisição de NAD e NMN pelo *H. influenzae*.



modificado GERLACH e REIDL, 2006

Figura 2.15. Estrutura secundária do monômero NadR.



modificado GERLACH e REIDL, 2006

Figura 2.16. Mecanismo de controle de abertura e fechamento do canal PnuC. *Feedback* pelo produto final NAD, mediado por NadR.

2.6 AQUISIÇÃO DE FERRO

O ferro é necessário em pequenas quantidades por fazer parte de muitos processos metabólicos. No entanto, o *H. influenzae* é incapaz de converter ácido aminolevulínico (ALA) em protoporfirina necessitando de heme para aquisição de ferro (WHITE e GRANICK, 1963; MIETZNER e MORSE, 1994).

O heme extracelular pode ser disponibilizado ao *H. influenzae* através de diferentes fontes como, por exemplo, os complexos hemoglobina/haptoglobina e mioglobina/haptoglobina.

As proteínas HgpA, HgpB, e HgpC (*haemoglobin-binding protein*), identificadas em *H. influenzae* HI689, são capazes de se ligar aos complexos hemoglobina e

hemoglobina/haptoglobina e utilizar estes como fonte de heme. A expressão de uma dessas três proteínas mostrou-se suficiente para permitir a utilização de heme do complexo hemoglobina/haptoglobina. No entanto, estas proteínas não se mostraram essenciais para a utilização de heme de hemoglobina (MORTON *et al.*, 1999).

Já os genes *hxuA*, *hxuB* e *hxuC*, (*hemopexin-binding protein*) codificam proteínas de membrana externa que também se mostraram importantes na utilização de heme (COPE, 1995). Os produtos do cluster *hxuCBA* mediam a utilização de heme a partir de hemopexina. As proteínas HxuA e HxuB aparecem envolvidas na utilização de heme de hemopexina, enquanto a proteína HxuC também se mostra importante para a utilização de heme a partir do complexo heme-albumina *in vitro* (MORTON *et al.*, 2007).

Outra potencial fonte de heme *in vivo* é a proteína mioglobina. Esta proteína se encontra em baixos níveis no soro humano o que não descarta seu potencial como fonte de heme. Linhagens de *H. influenzae* mostraram-se capazes de utilizar heme a partir de mioglobina quando complexada com haptoglobina. A utilização de heme a partir do complexo mioglobina/haptoglobina é mediada pelas proteínas Hgps (MORTON *et al.*, 2006).

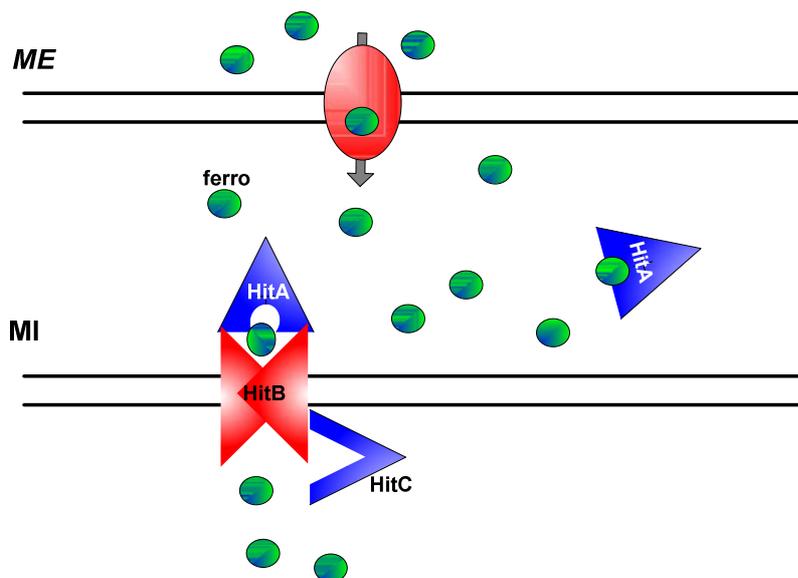
Morton *et al.* (2004) identificaram outras proteínas envolvidas na utilização de heme denominando-as Hup (*haem-utilization protein*). Estas proteínas podem funcionar como cofator na mediação da aquisição de heme de múltiplas fontes de heme (MORTON *et al.* 2004).

Como visto, o *H. influenzae* pode utilizar o heme associado a albumina ou de fontes como hemopexina ou associado ao complexo hemoglobina/haptoglobina, distintamente do que acontece com *N. gonorrhoeae* que não consegue utilizar o heme da hemopexina ou albumina, ou da *E. coli* que não consegue utilizar o heme do complexo hemoglobina/haptoglobina. Tais habilidades conferem ao *H. influenzae* grande vantagem (MIETZNER e MORSE, 1994).

No hospedeiro, os níveis de ferro extracelular são controlados pelas proteínas transferrina e lactoferrina, uma família de proteínas que se ligam ao ferro como quelante e para o transporte do mesmo. O *Haemophilus influenzae* consegue remover o ferro destas proteínas e o transporta através da membrana externa por um mecanismo dependente de energia, resultando em deposição de ferro livre no periplasma (ADHIKARI *et al.*, 1995).

O ferro livre depositado no periplasma é transportado para o interior da célula. Na literatura é descrito um sistema de transporte de ferro entre os membros das famílias de microrganismos Enterobacteriaceae (*sfu* operon), Pasteurellaceae (*hit* operon) e Neisseriaceae (*fbp* operon).

O sistema de transporte de ferro *hitABC* (*Haemophilus Iron Transport*) funciona como um sistema de alta afinidade. Os genes *hitA*, *hitB* e *hitC* codificam as proteínas ligantes de ferro no periplasma, permease citoplasmática e ligante de nucleotídeo, respectivamente (figura 2.17) que varrem o ferro livre do espaço periplasma e o transportam para o citosol, disponibilizando ao *H. influenzae* o ferro necessário para seus processos metabólicos (SANDERS *et al.*, 1994; ADHIKARI *et al.*, 1995).



modificado ADHIKARI *et al.*, 1995; SANDERS *et al.*, 1994

ME – membrana externa; MI – membrana interna.

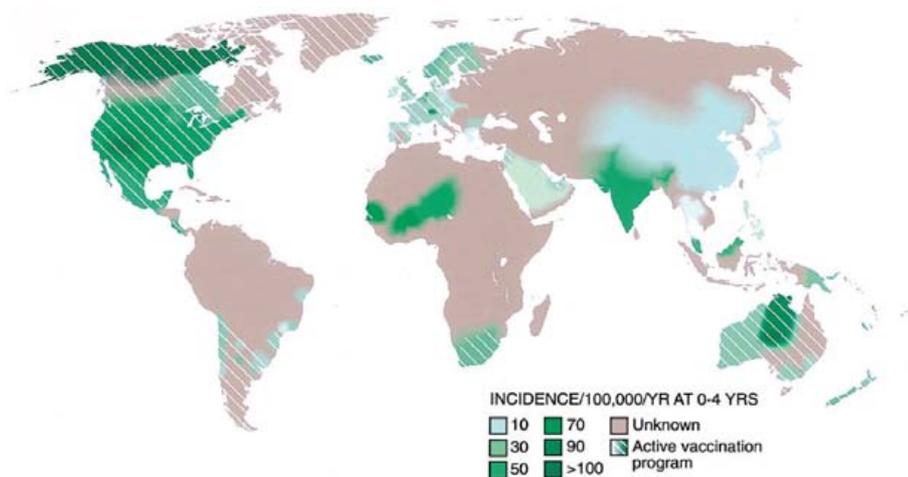
Figura 2.17. Mecanismos de aquisição de ferro pelo *Haemophilus influenzae*.

2.7 INCIDÊNCIA

A informação referente ao número de casos de doenças causadas pelo *H. influenzae* tipo b é ainda imprecisa pelo fato de muitas crianças desenvolverem a doença pelo Hib e não serem notificados. Somente aquelas crianças que são atendidas pelo sistema de saúde são contabilizadas, quando diagnosticado o agente responsável (MÄKELÄ *et al.*, 1992; PELTOLA *et al.*, 2000).

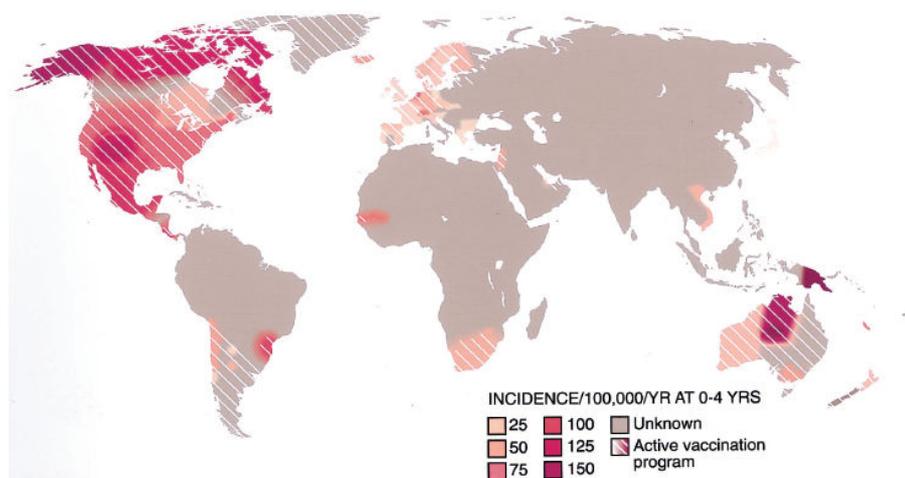
A disseminação do *H. influenzae* nas creches parece ser um importante fator de risco por promover a exposição prolongada e intensa entre crianças, assim como a disseminação da infecção em grandes famílias e entre crianças de contato próximo. As infecções respiratórias também constituem fator de risco, assim como os fatores socioeconômicos que podem ser responsáveis pelo aumento na transmissão de infecção (MÄKELÄ *et al.*, 1992; MARIN e SILVA, 2005). A OMS estima que o Hib atinja por ano, em torno de 3 milhões de crianças e

cause aproximadamente 386.000 mortes de crianças em todo o mundo (figuras 2.18 e 2.19) (PELTOLA *et al.*, 2000; WATT *et al.*, 2009).



PELTOLA *et al.*, 2000

Figura 2.18. Incidência de meningite, causada pelo Hib em crianças de 0-4 anos antes da era da vacina conjugada, em 100.000 habitantes por ano. Áreas tracejadas tiveram vacinação intensa em 1999.



PELTOLA *et al.*, 2000

Figura 2.19. Incidência de doenças (epiglotite, faringite, otite, pneumoniae e sinusite), em 100.000 habitantes por ano, causada pelo Hib em crianças entre 0-4 anos antes da era da vacina conjugada. Áreas tracejadas tiveram vacinação intensa em 1999.

Em estudo realizado por Watt *et al.*, só em 2000, o Hib teria sido responsável por 8-13 milhões de infecções, e causado 371.000 mortes em crianças menores de 5 anos. A maior incidência de morte aparece relacionada a países subdesenvolvidos da África e Ásia (figura 2.20), sendo 10 países os responsáveis por 61% das mortes estimadas causadas por Hib em crianças (figura 2.21) (WATT *et al.*, 2009).

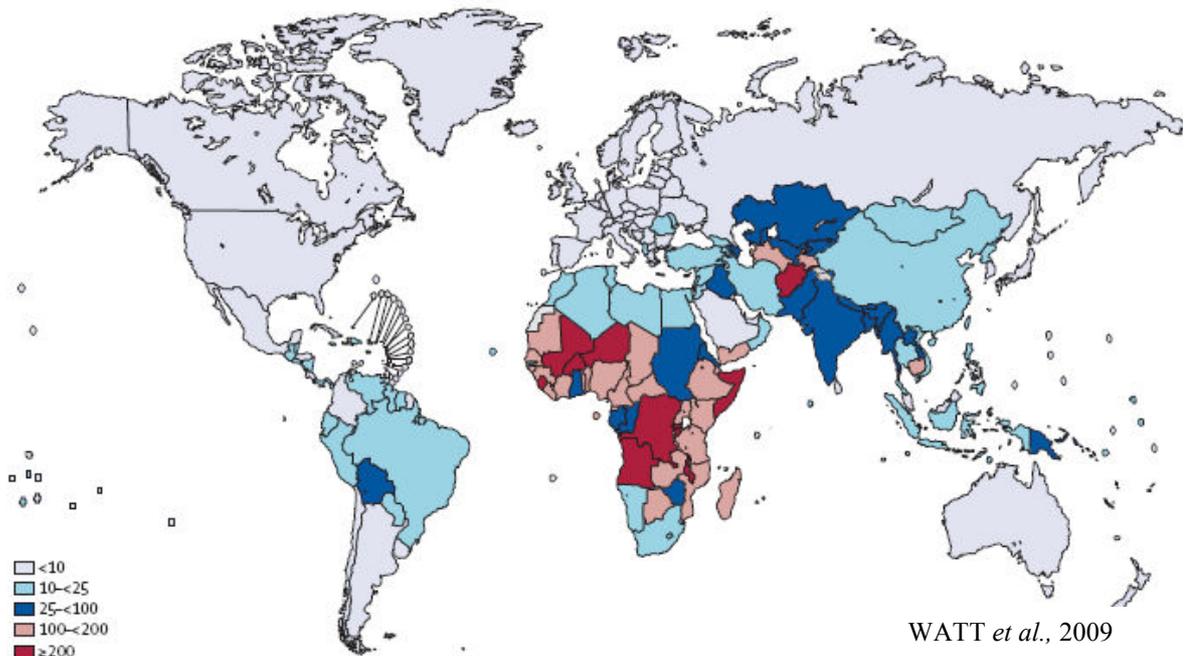


Figura 2.20. Mortalidade de crianças menores de cinco anos por 100.000 crianças.

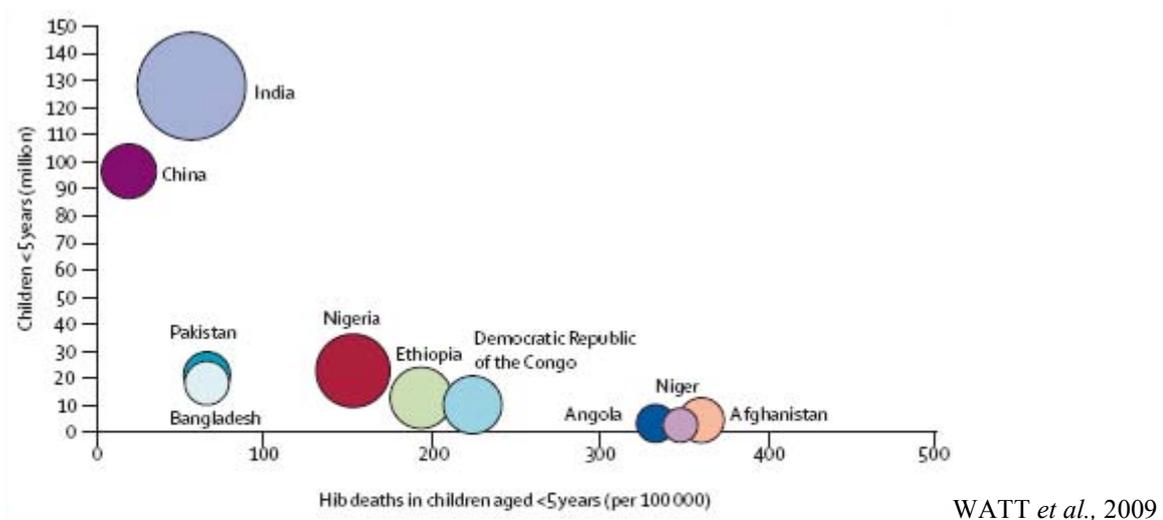


Figura 2.21. Incidência de mortes causadas por *H. influenzae* b. Os dez países com maior incidência: o tamanho da bolha indica o número de mortes por Hib.

País (número de mortes): Índia (72.000), Nigéria (34.000), Etiópia (24.000), República Democrática do Congo (22.000), China (19.000), Afeganistão (14. 000), Paquistão (13.000), Bangladesh (12.000), Angola (9.000) e Níger (8.000).

O Hib é um dos principais agentes causadores de pneumonia em pacientes com doenças sistêmicas. O quadro de pneumonia chega a ser fatal em 2 a 25% dos casos. Esta bactéria também está entre um dos principais causadores de meningite bacteriana em crianças, sendo o pico de incidência entre seis e doze meses de idade. O contágio em recém nascidos é

mais difícil devido a proteção de anticorpos maternos, o que responde a baixa incidência de casos nesta fase. Já as crianças entre três e 24 meses apresentam baixos níveis de anticorpos estando mais susceptíveis. Após os dois anos de idade, a presença de anticorpos aumenta gradativamente e a incidência diminui. Entre as crianças que desenvolvem meningite pelo Hib, de 10 a 30% morrem e dos sobreviventes, 10 a 35% apresentam como sequelas neurológicas a surdez, paralisia e deficiência no aprendizado (SMITH, 1993; KONEMAM *et al.*, 1997; FEIKIN *et al.*, 2001).

Nos Estados Unidos, antes da introdução da vacina conjugada contra Hib mais de 10.000 casos de doença eram registrados por ano. Após a introdução da vacina, a incidência diminuiu para menos de 100 casos a cada ano (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Com a introdução da vacina e manutenção da rotina de vacinação nos Estados Unidos, a incidência de doença invasiva causada pelo Hib caiu mais de 99%, tendo uma redução de 55% em todas as meningites bacterianas. Em alguns países da África, a rotina de vacinação diminuiu drasticamente a doença invasiva pelo Hib mesmo em ambientes com alta prevalência de infecção por HIV (*Human immunodeficiency virus*) (SHUCHAT e MESSONNIER, 2007).

A introdução da vacina conjugada contra Hib (figura 2.22) reduziu a doença causada pelo Hib em muitos países desenvolvidos e subdesenvolvidos. Em 2007, 119 países haviam incluído a vacina contra Hib na rotina de vacinação. A Organização Mundial da Saúde- OMS estima que 92% da população que se encontra na faixa etária de vacinação, foi vacinada nos países desenvolvidos, 44% nos países subdesenvolvidos e apenas 8% nos países pobres. A África e o sudeste da Ásia possuem a menor adesão à vacina contra o Hib (MORRIS *et al.*, 2008).

No final de 2007, 31 dos 32 países da América do Sul e Central haviam introduzido a vacina conjugada na rotina de vacinação. Após a introdução da vacina a incidência caiu drasticamente, comprovando a sua eficiência. A doença invasiva contra Hib passou da maior causa de doença em crianças para um raro evento em países que adotaram a vacina. No entanto, menos de dois terços dos países tem incorporado a vacina conjugada contra o Hib (MORRIS *et al.*, 2008).

O alto custo da vacina conjugada contra Hib continua sendo um grande obstáculo que dificulta a introdução desta em países subdesenvolvidos. O desconhecimento do número real de incidência da doença nestes países impede pequenos incentivos, financiamentos e recursos que seriam destinados à introdução da vacina (FEIKIN *et al.*, 2001; MORRIS *et al.*, 2008.).

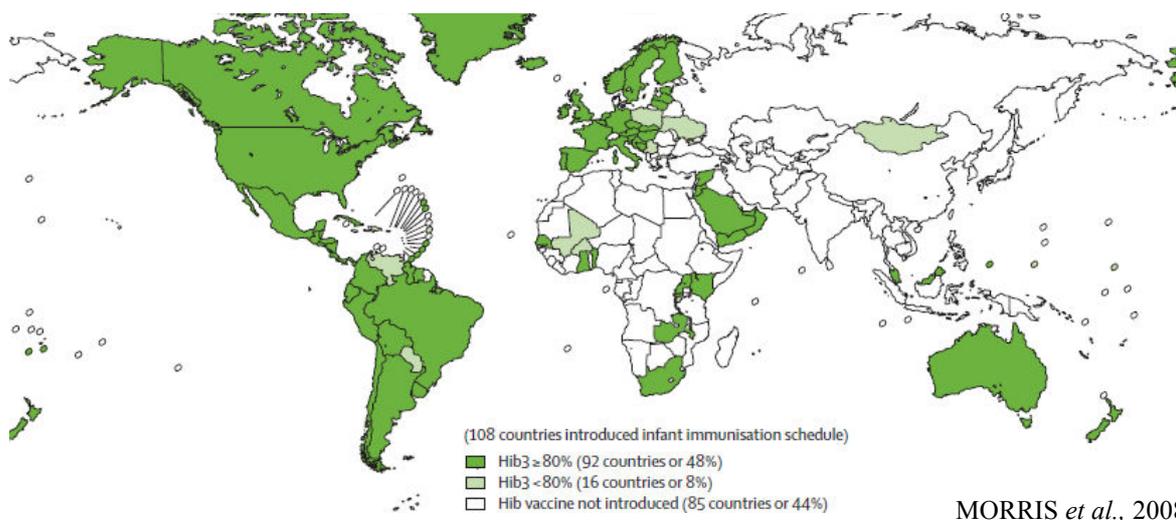
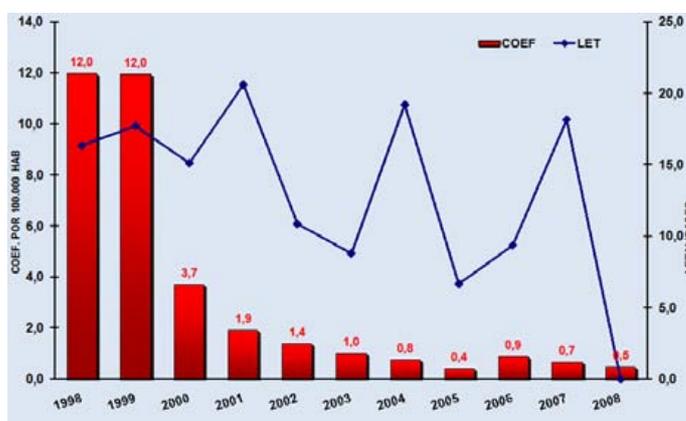


Figura 2.22. Países que introduziram a vacina contra o Hib em 2006

Em 1999 no Brasil, a vacina conjugada contra *H. influenzae* tipo b foi introduzida pelo Ministério da Saúde no Programa Nacional de Imunização. Até a introdução da vacina havia tendência de ascensão na incidência, mas logo após o primeiro ano de vacinação houve queda abrupta da mesma, como ilustra a figura 2.23 mostrando a incidência e letalidade no Estado de São Paulo (SIMÕES *et al.*, 2004; MIRANZI *et al.*, 2006; CVE, 2009).



Fonte: SINAN / D.D.T.R / CVE (dados em 02/10/2009)

Figura 2.23. Incidência e letalidade por meningite causada por *H. influenzae* tipo b em menores de cinco anos de idade no estado de São Paulo no período de 1998 a 2008.

No Brasil, mais especificamente Salvador, o programa de imunização permitiu depois de um ano do início da imunização uma redução de 69% nos casos de meningite causada pelo Hib. Após cinco anos da introdução da campanha de vacinação, a incidência de meningite diminuiu 98% entre crianças menores de cinco anos (RIBEIRO *et al.*, 2007). No entanto, a incidência de meningite pelo *Haemophilus influenzae* tipo a (Hia) aumentou oito vezes,

embora o risco atribuído pela troca de sorotipo (de b para a) é baixo quando comparado com a grande redução de meningite causada pelo Hib (RIBEIRO *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2007). A eliminação do Hib da nasofaringe devido à introdução da vacina poderia resultar na substituição de cepas de outro sorotipo capsular ou ainda pela colonização por linhagens acapsulares (MARIN e SILVA, 2005).

Além da Bahia, o aumento no número de casos de infecções causadas por *H. influenzae* não b após a introdução da vacina contra Hib nas campanhas de imunização foi observado em outros estados brasileiros (Santa Catarina, Pernambuco e Rio de Janeiro) (ALMEIDA *et al.*, 2005), assim como em outros países (Estados Unidos, Holanda, Dinamarca) (RIJKERS *et al.*, 2003; BRUUN *et al.*, 2004; DWORKIN *et al.*, 2007; BRUCE *et al.*, 2008; SCHOULS *et al.*, 2007).

Na Europa, apesar de não existir evidências consistentes de que a vacinação em massa das crianças contra o Hib leve a um aumento na incidência por outros sorotipos de *H. influenzae*, vários autores enfatizam a necessidade de manter a vigilância e monitoramento da incidência do Hib e a eventual substituição por outros sorotipos (RIBEIRO *et al.*, 2003; BRUUN *et al.*, 2004; MARIN e SILVA, 2005; BRUCE *et al.*, 2008; LADHANI *et al.*, 2008 e LADHANI *et al.*, 2009).

O diagnóstico laboratorial tem se mostrado de extrema importância para a identificação dos sorotipos, entretanto o diagnóstico por sorotipagem convencional pode resultar na identificação errônea de isolados do Hib. A introdução da técnica de PCR seria a melhor ferramenta para este diagnóstico, no entanto ela requer uma infraestrutura mais sofisticada e disponibilidade de *kits* diagnósticos (SATOLA *et al.*, 2007). Portanto, para um efetivo controle epidemiológico, se faz necessário o desenvolvimento de métodos bacteriológicos mais sensíveis e de fácil acesso e implantação (ALMEIDA *et al.*, 2005).

2.8 VACINAS

A adoção de campanhas de vacinação em massa como política de saúde pública proporcionou o controle das nove principais doenças infecciosas que mais afetavam a população na maior parte do mundo. São elas: varíola, difteria, tétano, febre amarela, coqueluche, poliomielite, sarampo, caxumba e rubéola, e segundo a OMS a varíola foi considerada completamente erradicada em 1979. Nem mesmo os antibióticos tiveram efeito tão notável na redução da mortalidade como observado pelas vacinas. A introdução das vacinas contra influenza, hepatite B, pneumococcus e *Haemophilus influenzae* tipo b tem

produzido bons resultados contra estas doenças. No entanto, muito ainda precisa ser feito como conhecer a real incidência destas doenças, principalmente em países subdesenvolvidos, e desenvolver processos de produção que reduzam o custo destas vacinas permitindo a disponibilização a toda população (LIMA *et al.*, 2001; MORRIS *et al.*, 2008).

A primeira vacina produzida contra o *H. influenzae* tipo b foi elaborada somente com polissacarídeo capsular purificado (PRP) e licenciada nos Estados Unidos em 1985. Esta vacina tem propriedades similares às vacinas polissacarídicas contra pneumococos e meningococos gerando respostas do tipo T-independente. Mostrou-se ineficiente em crianças menores de dois anos de idade, faixa etária em que 75% das infecções são acometidas por Hib. Deste modo, esta vacina foi logo substituída por uma vacina de polissacarídeo conjugada a uma proteína e licenciada nos Estados Unidos em 1987 (WARD *et al.*, 1994) e as vacinas disponíveis atualmente são baseadas no PRP conjugado a diferentes proteínas como ilustrado na tabela 2.1.

O *Advisory Committee on Immunization Practices* (ACIP) recomenda três doses da vacina conjugada contra o Hib, sendo que algumas vacinas já são efetivas depois da segunda dose. Diferentes alternativas de vacinas conjugadas estão disponíveis comercialmente (tabela 2.1), tendo em sua maioria como elemento comum o PRP e variando quanto ao antígeno conjugado como por exemplo as vacinas PRP conjugado ao toxóide diftérico (PRP-D), PRP conjugado a *Outer Membrane Protein* de Meningococo (PRP-OMP) e PRP conjugado a toxóide tetânico (PRP-T). A administração da vacina conjugada contra Hib pode ser realizada de forma monovalente, ou combinada com outros antígenos. A combinação mais comum disponível é a DTP com Hib em uma única dose, constituindo uma vacina tetravalente. São ainda encontradas combinações com antígenos contra Hepatite b e Hib (HepB Hib) e DTP+HepB+Hib. As vacinas co-administradas permitem a redução do número de injeções durante o período de imunização (WHO, 2000; FEIKIN *et al.*, 2001; PARTRIDGE *et al.*, 2007; MORRIS *et al.*, 2008).

Tabela 2.1. Vacinas contra *Haemophilus influenzae* tipo b

Vacina	Empresa	Nome Comercial	Data Licenciamento	Idade (mês)
PRP	Praxis	b-CAPSA 1*	Abril 1985	24-59
	Connaught	Hib-VAX*		18-24
	Lederle	Hib-IMUNE*		
PRP-D	Connaught	ProHIBiT	Dezembro 1987	18-59
			Dezembro 1989	15-59
HbOC	Lederle / Praxis	HibTITER	Dezembro 1988	18-59
			Dezembro 1999	15-59
			Outubro 1990	2,4,6 e 12-15
			Março 1993	2,4,6 e 15-18
HbOC-DTP	Lederle / Praxis	TETRAMUNE	Março 1993	2,4,6 e 15-18
PRP-OMP	Merck Sharp & Dohme	PedvaxHIB	Dezembro 1989	15-59
			Dezembro 1990	2,4 e 12-15
PRP-T	Connaught / Mérioux	ActHIB	Março 1993	2,4,6 e 12-15
	SmithKline Beecham	Omnihib	Março 1993	2,4,6 e 12-15

* Disponível por tempo limitado
WARD *et al.*, 1994.

A vacina 7-valente *pneumococcal conjugate vaccine* (PCV), licenciada em 2000 nos Estados Unidos, contém polissacarídeos capsulares dos sete sorotipos de *S pneumoniae* mais prevalentes, conjugado individualmente a CRM₁₉₇ (variante não tóxico da toxina Diftérica). Esta vacina co-administrada com a vacina DTP-HepB-IPV (inativada poliovírus) e Hib mostrou ser imunogênica e segura (PARTRIDGE *et al.*, 2007). A vacina pentavalente, DTP-IPV e Hib, licenciada nos EUA, mostrou ser também imunogênica e está disponível para substituir as mesmas vacinas administradas separadamente (GUERRA *et al.*, 2009).

Um dos sucessos da história da vacinologia moderna foi o desenvolvimento da vacina conjugada contra *H. influenzae* tipo b (MOXON, 2009). A vacina conjugada contra o Hib é altamente efetiva, com 90% de eficácia em prevenir infecções pelo Hib. Muitos países têm introduzido a vacina conjugada em seus programas de imunização (WHO, 2000). No entanto, o elevado custo da vacina conjugada dificulta sua introdução em países subdesenvolvidos (FEIKIN *et al.*, 2001; MORRIS *et al.*, 2008). Na Europa, vários países adotaram duas doses com um reforço posterior ou três doses consecutivas, ao invés de quatro. A combinação da vacina Hib com outras vacinas como DTP (Difteria-Tétano-Pertussis) também é um recurso para redução de custo. O Brasil assinou em 1998 uma aliança estratégica com a *European manufacturer* para a produção nacional da vacina contra o Hib com custo menor (PELTOLA *et al.*, 2000). Estas e outras estratégias somadas ao investimento em inovação tecnológica podem contribuir para a redução do custo da vacina conjugada Hib, consequentemente permitir maior disponibilidade desta vacina a população.

No entanto, atenção ainda deve ser dada as linhagens acapsulares do *H. influenzae*. Estas linhagens fazem parte da flora normal do trato respiratório superior de humanos e podem causar um amplo espectro de doenças em adultos e crianças, incluindo otite média, sinusite, bronquite crônica e pneumonia, sendo a otite média um dos principais motivos para a prescrição de antibióticos. Identificar os fatores antigênicos que conferem proteção imune para o hospedeiro e desenhar um sistema de entrega que possa induzir resposta imune em humanos, prevenindo infecções causadas por linhagens acapsulares, é um desafio. O conhecimento da patogênese, do comportamento comensal e virulento do *H. influenzae* pode auxiliar no desenvolvimento de uma nova vacina efetiva que possibilite a redução na incidência de doenças causadas por este microrganismo e diminuir a dependência de tratamentos com antibióticos (KYD e CRIPPS, 1999; MOXON, 2009).

O foco principal para o desenvolvimento de uma vacina com cobertura mais ampla está voltado aos componentes da bactéria que são bactericidas, opsonofagocíticos e que conferem proteção e imunidade contra diferentes linhagens, como as proteínas de membrana externa OMP P1, P2, P4 e P6 e antígenos de fimbria e as proteínas de adesão HMW1, HMW2, Hia e Hfs como potenciais antígenos vacinais (WARD *et al.*, 1994; WINTER e BARENKAMP, 2003; HALLSTRÖM, *et al.* 2006; GALDIERO *et al.*, 2006; FELTS *et al.*; 2007; MES, 2007; NOMURA *et al.*, 2008).

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, P.; KIRBY, S. D.; NOWALK, A. J.; VERALDI, K. L.; SCHRYVERS A. B.; MIETZNER, T. A. Biochemical characterization of a *Haemophilus influenzae* periplasmic iron transport peron. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 42, p. 25142–25149, 1995.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Fundamentos da biologia celular uma introdução a biologia molecular da célula., Artmed. – Porto Alegre. cap. 4, p. 113-120 e cap. 11-12, p. 364-395, 2002.
- ALMEIDA, A. E. C. C.; FILIPPIS, I.; ABREU, A. O.; FERREIRA, D. G.; GEMAL, A. L.; MARZOCHI, K. B. F. Occurrence of *Haemophilus influenzae* strains in three Brazilian states since the introduction of a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**., v. 38. n.5, p. 777-781, 2005.
- BARENKAMP, S. J.; ST GEME III, J. W. Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by nontypeable *Haemophilus influenzae*. **Molecular Microbiology**, v. 19, p. 1215-1223, 1996.
- BERENSON, C. S.; MURPHY, T. F.; WRONA, C. T.; SETHI, S. Outer membrane protein P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a potent and selective inducer of human macrophage proinflammatory cytokines. **Infection and Immunity**., p. 2728-2735, 2005.
- BOULNOIS, G. J.; ROBERTS, I. S.; HODGE, R.; HARDY, K. R.; JANN, K. B.; TIMMIS, K. N. Analysis of the K1 capsule biosynthesis genes of *Escherichia coli*: Definition of three functional regions for capsule production *offprint requests to Molecular and General Genetic*., v. 208, p. 242-246, 1987.
- BRUCE, M. G.; DEEKS, S. L.; ZULZ, T.; NAVARRO, C.; PALACIOS, C.; CASE, C.; HEMSLEY, C.; HENNESSY, T.; CORRIVEAU, A.; LARKE, B.; SOBEL, I.; LOVGREN, M.; DEBYLE, C.; TSANG, R.; PARKINSON, A.J.; International circumpolar surveillance Hia working group epidemiology of *Haemophilus influenzae* serotype a. North American Arctic, 2000-2005. www.cdc.gov/eid: **Emerging Infection Diseases**. v. 14, n. 1, p. 48-55, 2008.
- BRUUN, B.; GAHRN-HANSEN, B.; WESTH, H.; KILIAN, M. Clonal relationship of recent invasive *Haemophilus influenzae* serotype f isolates from Denmark and the United States. **Journal Medical and Microbiology**, v. 53, p. 1161-1165, 2004.
- CERQUETTI, M.; CARDINES, R.; ATTI, M. L. C.; GIUFRE, M.; BELLA, A.; SOFIA, T.; MASTRANTONIO, P.; SLACK, M. Presence of multiple copies of the capsulation b locus in invasive *Haemophilus influenzae* type b (Hib) strains isolated from children with Hib conjugate vaccine failure. **Journal and Infection Diseases**. v. 192, p. 819-23, 2005.
- CHAKRABARTI, T.; CHEN, Y. M.; LIN, E. C. C. Clustering of genes for L-fucose dissimilation by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**., v.157, p. 984-986, 1984.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. Bioquímica Ilustrada. 2ªed. **Artmed**. - Porto Alegre, 1996.
- CORN, P. G.; ANDERS, J.; TAKALA, A. K.; KÄYHTY, H.; HOISETH, S. K. Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are frequently amplified. **Journal and Infection Diseases**., v. 167, p. 356-64, 1993.
- CRISEL, R. M. O.; BAKER, R. S.; DORRMAN, D. E. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae* type b . I – structural characterization of the polymer of strain Eagan. **Journal of Biochemical and Chemistry**., v. 250, p. 4926-4930, 1975.
- CVE - CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/>. Acessado em outubro de 2009.

DE'MARIA, T. F.; MURWIN, D. M.; LEAKE, E. R. Immunization with outer membrane protein P6 from nontypeable *Haemophilus influenzae* induces bactericidal antibody and affords protection in the chinchilla model of otitis media. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 12, p. 5187-5192, 1996.

DWORKIN, M. S.; PARK, L.; BORCHARDT, S. M. The changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease, especially in persons 65 years old. **Clinical Infection Diseases**, v. 44, p.810-816, 2007.

ERRIDGE, C.; BENNETT-GUERRERO, E.; POXTON, I. R. Structure and function of lipopolysaccharides **Microbiol Infection Review**, v. 4, p. 837-851, 2002.

FEIKIN, D.; LEVINE, O.; NELSON, C.; MOHSNIE, E.; WATT, J.; WENGER, J.; KOU, U. Estimatin the local burden of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease preventable by vaccination. Dep. Vaccines Biologicals, **World Health Organization**, 2001.

FELTS, R. L.; OU, Z.; REILLY, T. J.; TANNER, J. J. Structure of recombinant *Haemophilus influenzae* e (P4) acid phosphatase reveals a new member of the haloacid dehalogenase superfamily. **Biochemistry**, v. 46, p. 11110-11119, 2007.

FILDES, P. The nature of the effect of blood-pigment upon growth of *H. influenzae*. **Brazilian Journal Experimental Pathology**, v. 2, p. 16, 1921.

FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v. 269, p. 496-512, 1995.

GALDIERO, S.; VITIELLO, M.; AMODEO, P.; D'ISANTO, M.; CANTISANI, M.; PEDONE, C.; GALDIERO, M. Structural requirements for proinflammatory activity of porin P2 loop 7 from *Haemophilus influenzae*. **Biochemistry**, v. 45, p. 4491-4501, 2006.

GERLACH, G.; REIDL, J. NAD Utilization in *Pasteurellaceae*: Simplification of a complex pathway. **Jornal of Bacteriology**, v. 188, n. 19, p. 6719-6727, 2006.

GILSDORF, J. R.; MCCREA, K. W.; MARRS, C. F. Role of pili in *Haemophilus influenzae* adherence and colonization. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 8, p. 2997-3002, 1997.

GUERRA, F. A.; BLATTER, M. M.; GREENBERG, D. P.; PICHICHERO, M.; NORIEGA, F. R. On behalf of the pentacel study group safety and immunogenicity of a pentavalent vaccine compared with separate administration of licensed equivalent vaccines in US infants and toddlers and persistence of antibodies before a preschool booster dose: A Randomized, **Clinical Trial Pediatric**, v. 123, n.1, 2009.

HALLSTRÖM, T.; TRAJKOVSKA, E.; FORSGREN, A.; RIESBECK, K. *Haemophilus influenzae* surface fibrils contribute to serum resistance by interacting with vitronectin1. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 430-436, 2006.

HANSON, M. S.; COPE, L. D.; HANSEN, E. J. Expression of the heat-modifiable major outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b is unrelated to virulence, **Infection and Immunity**, v. 57, p. 1639-1646, 1989.

HENDERSON, P. J. F. Proton-linked sugar transport systems in bacteria. **Journal of Bioenergetic Biomembranes**, v. 22, n. 4, p. 525-569, 1990.

HETHERINGTON, S. V.; PATRICK, C. C.; HANSEN, E. J. Outer membrane protein binding sites of complement component 3 during opsonization of *Haemophilus influenzae*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 12, p. 5157-5163, 1993.

HOISETH, S. K.; CONNELLY, C. J.; MOXON, E. R. Genetics of spontaneous, high-frequency loss of b capsule expression in *Haemophilus influenzae*. **Infection and Immunity**, v. 49, p. 389-395, 1985.

HOTOMI, M.; YAMANAKA, N.; SHIMADA, J.; SUZUMOTO, M.; IKEDA, Y.; SAKAI, A.; ARAI, J.; GREEN, B. Intranasal immunization with recombinant outer membrane protein P6 induces specific immune

responses against nontypeable *Haemophilus influenzae*. **International Journal of Pediatric and Orthohinology**, v. 65, p. 109-116, 2002.

HOTOMI, M.; IKEDA, Y.; SUZUMOTO, M.; YAMAUCHI, K.; GREEN, B. A.; ZLOTNICK, G.; BILLAL, D. S.; SHIMADA, J.; FUJIHARA, K.; YAMANAKA, N. A recombinant P4 protein of *Haemophilus influenzae* induces specific immune responses biologically active against nasopharyngeal colonization in mice after intranasal immunization. **Vaccine**, v. 23 p. 1294-1300, 2005.

KEGG PATHWAY Database. Disponível em <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>. Acessado em jun, 2010.

KONEMAM, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. J. **Diag.Microbiol.. Color Atlas and Textbook**, 5th ed **Lippincott**, v. 7, p. 363-384, 1997.

KROLL J. S.; MOXON, E. R. Capsulation and gene copy number at the cap Locus of *Haemophilus influenzae* type b. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 2, p. 859-864, 1988.

KROLL, J. S., ZAMZE, S., LOYND, B: MOXON, E. R. Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysaccharides in *Haemophilus influenzae*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 3343-3347, 1989.

KROLL, J. S.; LOYND, B.; BROPHY, L. N.; MOXON, E. R. The *bex* locus in encapsulated *Haemophilus influenzae*: a chromosomal region involved in capsule polysaccharide export. **Molecular and Microbiology**, v. 4, p. 1853-1862, 1990.

KYD, J.; CRIPPS, A. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: challenges in developing a vaccine. **Journal of Biotechnology**, v. 73 p. 103-108, 1999.

LADHANI, S.; RAMSAY, M. E.; CHANDRA, M.; SLACK, M. P. No evidence for *Haemophilus influenzae* serotype replacement in Europe after introduction of the Hib conjugate vaccine. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 275-276, 2008.

LADHANI, S.; NEELY, F.; HEATH, P. T.; NAZARETH, B.; ROBERTS, R.; SLACK, M. P. E.; MCVERNON, J.; RAMSAY, M. E. Recommendations for the prevention of secondary *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease. **Journal of Infection**, v. 58, p. 3-14, 2009.

LEE, C. J. Bacterial capsular polysaccharides biochemistry, immunity and vaccine. **Molecular and Immunology**, v. 24, n. 10, p. 1005-1019, 1987.

LEHNINGER, A. L. **Princípios da Bioquímica**. São Paulo, Editora **Sarvier**, cap13-17, p. 245-361, 1984.

LIGON, B. L. Margaret Pittman: Pioneer Researcher on *Haemophilus influenzae* (1901-1995). **Seminaries in Pediatric Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 77-79, 1998.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotechnology Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. Editora Edgard Blücher, v. 3, cap.1-3 p. 307-346, 2001.

LIPUMA, J. J.; RICHMAN, H.; STULL, T. L. Haemocin, the bacteriocin produced by *Haemophilus influenzae*: Species distribution and role in colonization. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 6, p. 1600-1605, 1990.

LOEB, M. R. Protection of infant rats from *Haemophilus influenzae* type b infection by antiserum to purified outer membrane protein a. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 11, p. 2612-2618 1987.

LUNDSTRÖM, S. L.; LI, J.; DEADMAN, M. E.; HOOD, D. W.; MOXON, E. R.; SCHWEDA, E. K. H. Structural analysis of the lipopolysaccharide from nontypeable *Haemophilus influenzae* strain R2846. **Biochemistry**, v. 47, p. 6025-6038, 2008.

MACFADYEN, L. P.; REDFIELD, R. J. Life in mucus: sugar metabolism in *Haemophilus influenzae*. 14th Forum in Microbiology, p. 541-551, 1996.

- MACFADYEN, L. P.; DOROCICZ, I. R.; REIZER, J.; SAIER, M. H., JR.; REDFIELD, R. J. Regulation of competence development and sugar utilisation in *Haemophilus influenzae* Rd by a phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase system. **Molecular and Microbiology**, 1996.
- MAGALHÃES, P. O.; LOPES, A. M.; MAZZOLA, P. G.; RANGEL-YAGUI, C.; PENNA, T. C. V.; Jr PESSOA, A. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a Review. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 10, n. 3, p. 388-404, 2007.
- MÄKELÄ, P. H.; TAKALA, A. K.; PELTOLA, H.; ESKOLA, J. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. **Journal of Infection and Diseases**, v. 165, p. 2-5, 1992.
- MARIN, J. M.; SILVA, M. E. N. B. Ocorrência de *Haemophilus influenzae* em crianças atendidas em creches **Revista da Ciência e Farmaceuticas Básica Aplicada**, v. 26, n. 3, p. 167-174, 2005.
- MES, T. H. M.; VAN PUTTEN, J. P. M. Positively selected codons in immune-exposed loops of the vaccine candidate OMP-P1 of *Haemophilus influenzae*. **Journal of Molecular and Evolution**, v. 64, p. 411-422, 2007.
- MIETZNER, T. A.; MORSE, S. A. The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria. **Annual Review of Nutrition**, v. 14, p. 471-493, 1994.
- MIRANZI, S. S. C.; MORAES, S. A.; FREITAS, I. C. M. Tendência das meningites por *Haemophilus influenzae* tipo b no Brasil, em menores de 5 anos, no período de 1983 a 2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 473-477, 2006.
- MORRIS, S. K.; MOSS, W. J.; HALSEY, N. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine use and effectiveness. **Lancet Infectious and Diseases**, v. 8, p. 435-443, 2008.
- MORTON, D. J.; WHITBY, P. W.; JIN, H.; REN, Z.; STULL, T. Effect of multiple mutations in the hemoglobin and hemoglobin-haptoglobin-binding proteins, HgpA, HgpB, and HgpC, of *Haemophilus influenzae* type b. **Infection and Immunity**, p. 2729-2739, 1999.
- MORTON, D. J.; SMITH, A.; REN, Z.; MADORE, L. L.; WAGONER, T. M. V.; SEALE, T. W.; WHITBY, P. W.; STULL, T. L. Identification of a haem-utilization protein (Hup) in *Haemophilus influenzae*. **Microbiology**, v. 150, p. 3923-3933, 2004.
- MORTON, D. J.; WAGONER, T. M. V.; SEALE, T. W.; WHITBY, P. W.; STULL, T. L. Utilization of myoglobins as a heme source by *Haemophilus influenzae* requires binding of myoglobin to haptoglobin. **Microbiology Letters**, v. 258, p. 235-240, 2006.
- MORTON, D. J.; SEALE, T. W.; MADORE, L. L.; VANWAGONER, T. M.; WHITBY, P. W.; STULL, T. L. The haem-haemopexin utilization gene cluster (hxCBA) as a virulence factor of *Haemophilus Influenzae*. **Microbiology**, v. 153, p. 215-224, 2007.
- MOXON, E. R. Bacterial variation, virulence and vaccines. **Microbiology**, v. 155, p. 997-1003, 2009.
- MURPHY, T. F.; BARTOS, L. C.; RICE, P. A.; NELSON, M. B.; DUDAS, K. C.; APICELLA, M. A. Identification of a 16,600-dalton outer membrane protein on nontypeable *Haemophilus influenzae* as a target for human serum bactericidal antibody. **Journal and Clinical Investigation**, v. 78, p. 1020-1027, 1986.
- MUSSER, J. M.; KROLL, J. S.; MOXON, E. R.; SELANDER, R. K. Evolutionary genetics of the encapsulated strains of *Haemophilus influenzae*. **Medical Sciences**, v. 85, p. 7758-7762, 1988.
- NOEL, G. J.; BRITTINGHAM, A.; GRANADO, A. A.; MOSSER, D. M.; Effect of amplification of the cap b locus on complement-mediated bacteriolysis and opsonization of type b *Haemophilus influenzae*. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 4769-4775, 1996.
- NOMURA, Y.; ABE, Y.; ISHIDA, Y.; KOBAYASHI, H.; HARABUCHI, Y. Promiscuous peptides on the nontypeable *Haemophilus Influenzae* P6 outer membrane protein. **Journal of Clinical Immunology**, v. 28, p. 361-369, 2008.

OGILVIE, C.; OMIKUNLE, A.; WANG, Y.; ST GEME III, J. W.; RODRIGUEZ, C. A.; ADDERSON, E. E. Capsulation loci of non-serotype b encapsulated *Haemophilus influenzae* **Journal and Infectious Diseases.**, v. 184, p. 144-149, 2001.

OSTBERG, K. L.; RUSSELL, M. W.; MURPHY, T. F. Mucosal immunization of mice with recombinant OMP P2 induces antibodies that bind to surface epitopes of multiple strains of nontypeable *Haemophilus influenzae* Mucosal. **Immunology.**, v. 2, n. 1, p. 63-73, 2009.

PARTRIDGE, S.; ALVEY, J.; BERNSTEIN, H.; BLATTER, M.; BOTTENFIELD, G.; GUERRERO, J.; SENDERS, S. D.; SCHUERMAN, L.; CHEUVART, B.; HOLMES, S. J. Safety of a combination diphtheria, tetanus toxoid, acellular pertussis, hepatitis B, and inactivated polio vaccine coadministered with a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. **Vaccine.**, v. 25, p. 1806-1813, 2007.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. Microbiologia - Metabolismo Bacteriano: Produção de energia. Editora McGraw-Hill. v. 1, p.187-208, 1980.

PELTOLA, H.; KAYHTY, M.; SIVONEN, A.; MAKELA, P. H.; *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccine in children: a double-blind field study of 100 000 vaccines 3 Month to 5 years of age in Finland. **Pediatrics.**, v. 60, p. 730-737, 1977.

PELTOLA, H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. **Clinical Microbiology Reviews.**, p. 302-317, 2000.

PLAUT, A. G. The IgAl proteases of pathogenic bacteria. **Microbiology.** v. 37, p. 603-22, 1983.

POSTMA, P. W.; LENGELER, J. W.; JACOBSON, G. R. Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria. **Microbiological Reviews.**, p. 543-594, 1993.

RAGHUNATHAN, A.; PRICE, N. D.; GALPERIN, M. Y.; MAKAROVA, K. S.; PURVINE, S.; PICONE, A. F.; CHERNY, T.; XIE, T.; REILLY, T. J.; MUNSON-JR, R.; TYLER, R. E.; AKERLEY, B. J.; SMITH, A. L.; PALSSON, B. O.; KOLKER, E. *In silico* metabolic model and protein expression of *Haemophilus influenzae* strain Rd KW20 in rich medium. **OMICS A Journal Integrative Biology.**, v. 8, n. 1, p. 25-41, 2004.

RIBEIRO, G. S.; REIS, J. N.; CORDEIRO, S. M.; LIMA, J. B. T.; GOUVEIA, E. L.; PETERSEN, M.; SALGADO, K.; SILVA, H. R.; ZANELLA, R. C.; ALMEIDA, S. C. G.; BRANDILEONE, M. C.; REIS, M. G.; KO, A. I. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement with type a strains after introduction of Hib immunization in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases.**, v. 187, p. 109-16, 2003

RIBEIRO, G. S.; LIMA, J. B. T.; REIS, J. N.; GOUVEIA, E. L.; CORDEIRO, S. M.; LOBO, T. S.; PINHEIRO, R. M.; RIBEIRO, C. T.; NEVES, A. B.; SALGADO, K.; SILVA, H. R.; REIS, M. G.; KO, A. I. *Haemophilus influenzae* meningitis 5 years after introduction of the *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Brazil. **Vaccine.**, p. 4420-4428, 2007.

RIJKERS, G. T.; BONDT, P. E. V.; SPANJAARD, L.; BREUKELS, M. A.; SANDERS, E. A. M. Return of *Haemophilus influenzae* type b infections. **The Lancet.**, v. 361, p. 1563-1564, 2003.

RILEY, M. A. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. **Annual Review of Genetic.** v. 32, p.255-78, 1998.

ROBBINS, J. B.; SCHNEERSON, R. Evaluating the *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine PRP-D. **J The New England Journal of Medicine.**, v. 323, p. 1415-1416, 1990.

ROBERTS, I. S. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. **Microbiology.**, v. 50, p. 285-315, 1996.

SANDERS, J. D.; COPE, L. D.; HANSEN, E. J. Identification of a Locus Involved in the Utilization of Iron by *Haemophilus influenzae*. **Infection and Immunity.**, v. 62, n. 10, p. 4515-4525, 1994.

SATOLA, S. W.; SCHIRMER, P. L.; FARLEY, M. M. Complete sequence of the *cap* locus of *Haemophilus influenzae* serotype b and nonencapsulated b capsule-negative variants. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 3639–3644, 2003.

SATOLA, S. W.; COLLINS, J. T.; NAPIER, R.; FARLEY, M. M. Capsule gene analysis of invasive *Haemophilus influenzae*: Accuracy of serotyping and prevalence of IS1016 among nontypeable isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3230-3238, 2007.

SCHWEDA, E. K. H.; RICHARDS, J. C.; HOOD, D. W.; MOXON, E. R. Expression and structural diversity of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: Implication in virulence International. **Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 297-306, 2007.

SCHOOLS, L.; HEIDE, H.; WITTEVEEN, S.; ZOMER, B.; ENDE, A.; BURGER, M.; SCHOT, C. Two variants among *Haemophilus influenzae* serotype b strains with distinct *bcs4*, *hcsA* and *hcsB* genes display differences in expression of the polysaccharide capsule. **BMC Microbiol.**, p. 1-11, 2008.

SHUCHAT, A.; MESSONNIER, N. R. From pandemic suspect to the postvaccine era: The *Haemophilus influenzae* story. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 44, p. 817-819, 2007.

SEVERI, E.; RANDLE, G.; KIVLIN, P.; WHITFIELD, K.; YOUNG, R.; MOXON, R.; KELLY, D.; HOOD, D.; THOMAS, G. H. Sialic acid transport in *Haemophilus influenzae* is essential for lipopolysaccharide sialylation and serum resistance and is dependent on a novel tripartite ATP-independent periplasmic transporter molecular. **Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1173-1185, 2005.

SMITH, A. L. *Haemophilus Influenzae*: An important cause of meningitis. 2^o ed. Mechanisms of microbial Disease, v. 15, p. 235-243, 1993.

SIMÕES, L. L. P.; ANDRADE, A. L. S. S.; LAVAL, C. A.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, S. A.; MARTELLI, C. M. T.; ALVES, S. L. A. ALMEIDA, R. M.; ANDRADE, J. G. Impacto da vacinação contra o *Haemophilus influenzae* b na redução de meningites, Goiás Impacto da vacinação contra o *Haemophilus influenzae* b na redução de meningites, Goiás. **Revista da saúde pública**, v. 38, n.5, p. 664-670, 2004.

SINGH, S. K.; KURNASOV, O. CHEN, V.; ROBINSON, B. H.; GRISHIN, N. V.; OSTERMAN, A. L.; ZHANG, H. Crystal structure of *Haemophilus influenzae* NadR protein: a bifunctional enzyme endowed with NMN adenylyltransferase and ribosylnicotinamide kinase activities. **Journal Biological Chemistry**, v. 277, p. 33291–33299, 2002.

ST GEME III, J. W.; CUTTER, D. Influence of pili, fibrils, and capsule on in vitro adherence by *Haemophilus influenzae* type b. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 21-31, 1996.

ST GEME III, J. W.; CUTTER, D.; BARENKAMP, S. J. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. **Journal of Bacteriology**, v. 69, p. 695-705, 1996.

STRUTHERS, J. K.; WESTRAN, R. P. Bacteriologia Clínica. III Masson, cap. 9, p. 119-120, 2003.

SUKUPOLVI-PETTY, S.; GRASS, S.; ST GEME III, J. W. The *Haemophilus influenzae* type b *hcsA* and *hcsB* gene products facilitate transport of capsular polysaccharide across the outer membrane and are essential for virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 3870-3877, 2006.

TANG, C. M.; HOOD, D. W.; MOXON, E. R. *Haemophilus influenzae* the impact of whole genome sequencing on microbiology. **Trends in Genetics** v. 13, n. 10, p. 399-404, 1997.

TATUSOV, R. L.; MUSHEGIAN, A. R.; BORK, P.; BROWN, N. P.; HAYES, W. S.; BORODOVSKY, M.; RUDD, K. E.; KOONIN, E. V. Metabolism and evolution of *Haemophilus influenzae* deduced from a whole-genome comparison with *Escherichia coli*. **Current Biology**, v. 6, n. 3, p. 279-291, 1996.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; COMPERTZ O. F.; CANDEIAS, J. G. N. Microbiologia. 3. ed. São Paulo, Editora Atheneu, 1999.

TURK, D. C. The Pathogenicity of *Haemophilus influenzae*. **Journal of Medical Microbiol**, v. 18, p. 1-16, 1984.

VAN ELDERE, J.; BROPHY, L.; LOYNDS, B.; CELIS, P.; HANCOCK, I.; CARMAN, S.; KROLL, J. S.; MOXON, E. R. Region II of the *Haemophilus influenzae* type b capsulation locus is involved in serotype-specific polysaccharide synthesis. **Molecular Microbiology**, v. 15, p. 107-118, 1995.

WARREN, L. The biosynthesis and metabolism of amino sugars and amino sugar-containing heterosaccharides, in Glycoproteins: their composition, structure and function. Amsterdam-London-New York, Editora Elsevier., p. 1097-1126, 1932.

WARD, J.; LIEBERMAN, J. M.; COCH, S. L. Vaccines Plotkin Stanley. 2. ed. Editora W.B. Saunders Company, cap. 12, p. 337-381, 1994.

WATT, J. P.; WOLFSON, L. J.; O'BRIEN, K. L.; HENKLE, E.; DELORIA-KNOLL, M.; MCCALL, N.; LEE, E.; LEVINE, O. S.; HAJJEH, R.; MULHOLLAND, K.; CHERIAN, T.; for the Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team: Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet**, v. 374, p. 903-911, 2009.

WHITE, D. C.; GRANICK, S. Hemin biosynthesis in *Haemophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 85, p. 842-850, 1963.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION: Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **WHO Technical Report Series.**, n. 897, p. 27-60. 2000.

WINTER, L. E.; BARENKAMP, S. J. Human antibodies specific for the high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate opsonophagocytic activity. **Infection and Immunity.**, v. 71, p. 6884-6891, 2003.

WONG, S. M.; AKERLEY, B. J. Environmental and genetic regulation of the phosphorylcholine epitope of *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide. **Molecular Microbiology.**, v. 3, p. 724-738, 2005.

ZWAHLEN, A.; WINKELSTEIN, J. A.; MOXON, E. R. Surface determinants of *Haemophilus influenzae* pathogenicity: comparative virulence of capsular transformants in normal and complement-depleted rats. **Journal Infectious Diseases.**, v. 148, n. 3, 1983.

YANG, Y.; MUNSON-JR, R. S.; GRASS, S.; CHONG, P. HARKNESS, R. E.; GISONNI L.; JAMES, O.; KWOK, Y.; KLEIN, M. H. Effect of lipid modification on the physicochemical, structural, antigenic and immunoprotective properties of *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6. **Vaccine.**, v. 15, n. 9, p. 976-997, 1997.

Capítulo 3

Cultivos de Haemophilus influenzae b

3.1 PROCESSOS FERMENTATIVOS

A partir da década de 1950 ocorreu grande desenvolvimento na área de reatores o que culminou no sucesso de muitos processos fermentativos. Atualmente, dentro dos processos fermentativos existem diferentes tipos de cultivos e seu uso irá depender das características do microrganismo, meio de cultivo e dos objetivos do processo. De forma geral, um biorreator pode ser operado como cultivo descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

3.1.1 Cultivo Descontínuo

Em cultivo descontínuo ou batelada (figura 3.1), o meio de cultura é inoculado com o microrganismo e incubado em condições pré-estabelecidas de pH, oxigênio dissolvido, agitação e temperatura. No decorrer do processo nada é adicionado ao biorreator, com exceção de ar (ou outros gases como nitrogênio e oxigênio), anti-espumante e ácido ou base para controle do pH (LEVENSPIEL, 1974; BU'LOCK e KRISTIANSEN, 1987; WARD, 1989; FLICKINGER e DREW, 1999; SCHMIDELL *et al.*, 2001; SHULER e KARGI, 2001).

O cultivo descontínuo pode resultar em baixos rendimentos ou produtividades quando o substrato adicionado exerce efeito inibitório ou quando o metabolismo celular resulta na formação de produtos indesejáveis como, por exemplo, a formação de ácidos. Este processo também apresenta como desvantagem tempos mortos, onde não se tem atividade produtiva nos períodos de carga, descarga, lavagem e esterilização do fermentador (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

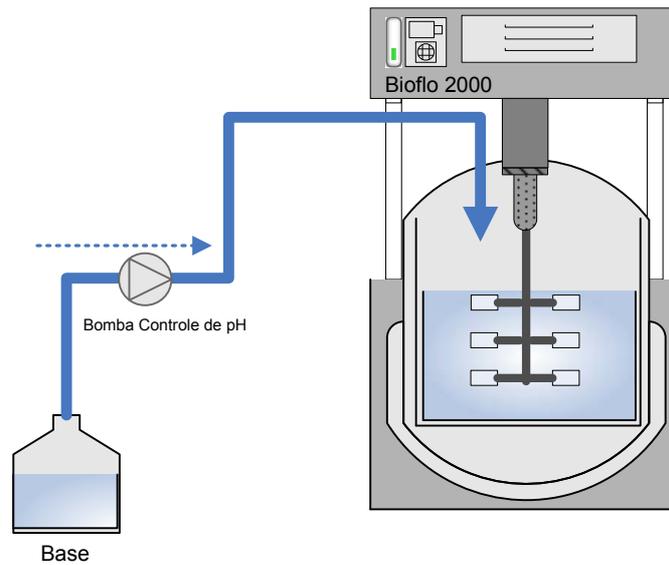


Figura 3.1. Processo descontínuo.

3.1.2 Cultivo Descontínuo Alimentado

Em um cultivo descontínuo alimentado, também denominado batelada alimentada (figura 3.2), com o decorrer do processo, além da adição de ar ou outros gases, anti-espumante e ácido ou base para controle do pH, é realizada alimentação com um ou mais nutrientes. A adição de meio de alimentação pode ser de forma contínua ou intermitente, e a vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo de cultivo (WARD, 1989; FLICKINGER e DREW, 1999; SCHMIDELL *et al.*, 2001; SHULER e KARGI, 2001).

O modo de operação descontínuo alimentado tem sido utilizado visando prevenir inibição por substrato, reduzir a formação de metabólitos tóxicos e estender a fase de formação de produto (STRANDBERG e ENFORS, 1991; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

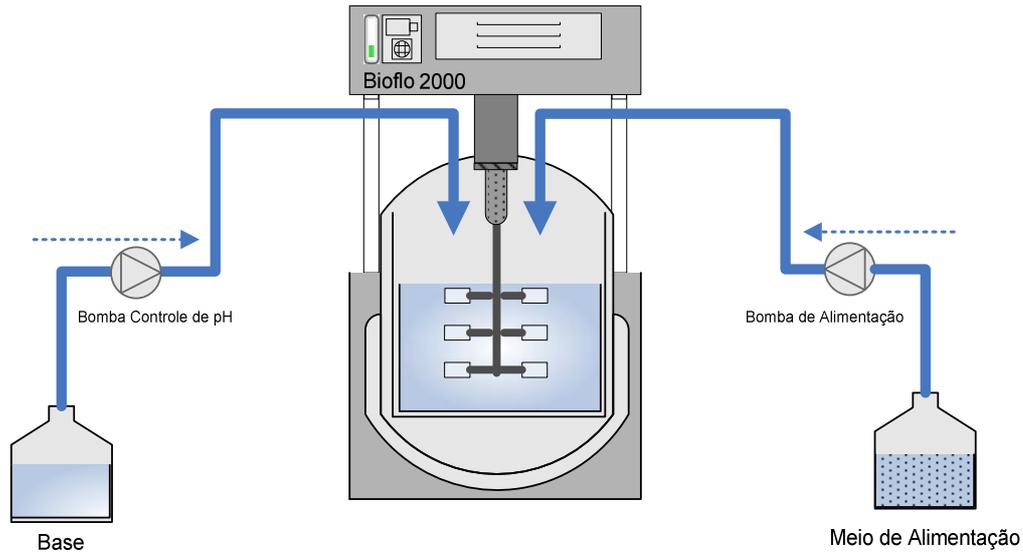


Figura 3.2. Processo descontínuo alimentado.

3.1.3 Cultivo Contínuo

O cultivo contínuo caracteriza-se por possuir a mesma vazão de alimentação e de retirada do caldo fermentado, mantendo o volume dentro do biorreator constante (SHULER e KARGI, 2001).

O cultivo contínuo tem como vantagens aumentar a produtividade devido redução dos tempos mortos, fornecer caldo fermentado uniforme, o que facilita as etapas posteriores de *downstream*, manter as células em um mesmo estado fisiológico, possibilitar a associação de outras operações contínuas na linha de produção e menor necessidade de mão de obra. No entanto, há a necessidade de maior investimento na automação e controle da planta, possibilidade de ocorrência de mutações genéticas espontâneas resultando em mutantes menos produtivos, e maior ocorrência de contaminações (WARD, 1989; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Uma variação do cultivo contínuo é o contínuo com reciclo (figura 3.3), onde, o caldo fermentado é removido e processado em uma unidade de microfiltração, gerando duas correntes: a) corrente efluente, isenta de células, podendo conter o produto desejado e subprodutos tóxicos, enviada posteriormente para recuperação do produto; b) corrente de retentato, consistindo na suspensão celular concentrada, a qual é retornada ao biorreator com o objetivo de manter alta densidade celular no mesmo. A corrente de alimentação adicionada continuamente ao reator, à mesma vazão da corrente de retirada de meio cultivado, fornece os nutrientes necessários ao crescimento e, ao mesmo tempo, dilui os subprodutos metabólicos, minimizando os efeitos de inibição. A operação com reciclo de células assim como a

alimentação do reator pode ser realizada de maneira intermitente ou ainda, com vazões diferentes para as correntes de alimentação e de retirada de meio cultivado. Neste caso, o volume não permanece constante e o modo de operação se torna uma variação do cultivo descontínuo alimentado descrito em 3.1.3 (SHULER e KARGI, 2001).

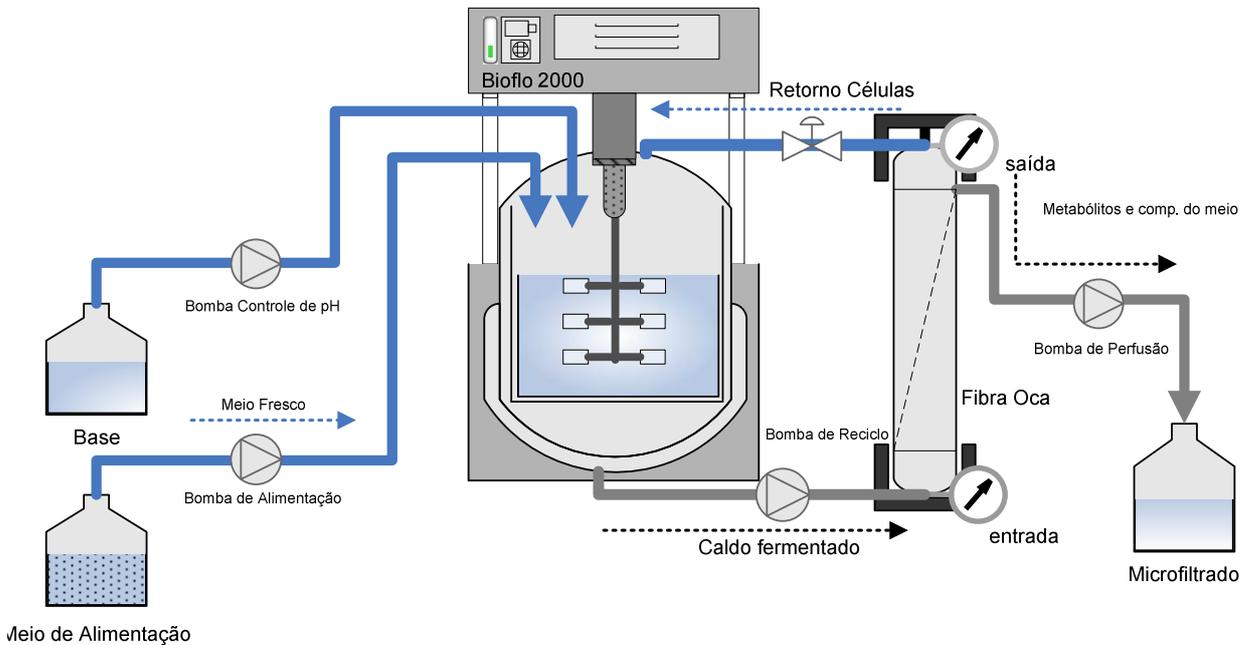


Figura 3.3. Processo contínuo com reciclo de células.

3.1.4 Cultivos de *Haemophilus influenzae*

Os primeiros relatos de cultivos de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) datam de 1984 quando da publicação de patente e dos estudos de Carty *et al.*. Neste último, foram testados quatro diferentes meios de cultura e dois tipos de cultivo em biorreatores. Dentre os diferentes meios de cultura, o meio designado como MP (composto de peptona de soja e extrato de levedura) resultou em melhor desenvolvimento celular e produção de polissacarídeo. Quanto aos tipos de cultivo, foi realizado cultivo descontínuo com aeração superficial, agitação constante em 750 rpm e cultivo descontínuo com aeração submersa, agitação constante em 200 rpm, ambos sem controle de pH, temperatura 36°C e vazão específica de ar em 0,25 VVM. O cultivo com aeração superficial apresentou menor crescimento celular, mas maior produção de polissacarídeo (258 mg PRP/L) quando comparado com cultivo com aeração submersa (91 mg PRP/L) (CARTY *et al.*, 1985; HILLEMANN *et al.*, 1984).

Anos mais tarde, Merrit *et al.* (2000) realizaram cultivo descontínuo alimentado de *H. influenzae*, conduzido com agitação variando entre 400 e 900 rpm, pH controlado em 7,3, temperatura mantida em 36,5°C e vazão específica de ar entre 0,6 e 0,8 VVM. A vazão de alimentação foi realizada de forma manter a velocidade específica de crescimento em torno de 0,50 h⁻¹. O meio de alimentação era composto por extrato de levedura 10 % (p/v) e glicose 20 % (p/v). Nessas condições, o crescimento celular e a produção de polissacarídeo capsular em reator de 1,5L foram 5,3 g MS/L e 1190 mg PRP/L, respectivamente. Ao escalonar o processo a partir de um biorreator de 1,5 L para um biorreator de 500 L, os autores obtiveram 6 g MS/L e 1300 mg PRP/L (MERRIT *et al.*, 2000).

Takagi *et al.* inicialmente estudaram a produção de polissacarídeo capsular em três condições de cultivo: descontínuo, descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose e descontínuo repetido. Neste último, uma parte do caldo fermentado permanece na dorna ao final da batelada, e este serve como inóculo para um novo cultivo. Nas três condições, atingiram aproximadamente 132 mg PRP/L (TAKAGI *et al.*, 2003). Com o propósito de estabelecer a condição de cultivo que resultasse em maior produção de polissacarídeo capsular, os autores realizaram cultivos descontínuos com adição intermitente de glicose em diferentes condições: aeração superficial e sem controle de pH; aeração submersa e concentração de oxigênio dissolvido (COD) em 10 % da saturação, sem e com controle de pH em 7,5; e aeração submersa e COD em 30 % da saturação, sem e com controle de pH em 7,5. Os cultivos foram realizados com meio de cultura MP original (CARTY *et al.*, 1985) e meio MP modificado quanto a concentração de hemina e NAD em 30 e 15 mg/L, respectivamente. A melhor produção de polissacarídeo capsular foi obtida com meio MP modificado, em aeração submersa com COD tanto em 10 %, quanto em 30 % da saturação. Entretanto, o controle de pH em 7,5 foi imprescindível para atingir 980 mg PRP/L (TAKAGI *et al.*, 2006). Definido o meio de cultura (MP modificado) e as condições de cultivo, os autores realizaram cultivo descontínuo com alimentação gradual, onde atingiram em torno de 2000 mg PRP/L (TAKAGI, 2003).

Na tabela 3.1 estão listadas as principais condições descritas na literatura para cultivo de *H. influenzae* tipo b em biorreator.

Neste capítulo foram abordadas diferentes estratégias de cultivo descontínuo alimentado com objetivo de estabelecer a melhor condição de cultivo que resulte em maior crescimento celular e produção de polissacarídeo capsular.

Tabela 3.1. Condições de cultivo de *Haemophilus influenzae* tipo b realizados em biorreator descritos na literatura.

Cultivo	Alimentação	Meio de Alimentação	Aeração	Agitação	Vazão de ar	pH	COD	Temp	Produção	Produtividade	Referência
				rpm	VVM		(%)	°C	mg PRP/L	mg PRP/(L.h)	
descontínuo	-	-	submersa	200	0,25	-		36	91		CARTY <i>et al.</i> , 1985
descontínuo	-	-	superficial	750	0,25	-		36	258		CARTY <i>et al.</i> , 1985
descontínuo alimentado		EL 10% (p/v); G 20% (p/v)	submersa	400-900	0,6-0,8	7,3	50	36,5	1190	~85	MERRIT <i>et al.</i> , 2000
descontínuo alimentado	intermitente	G 50% (p/v)	submersa	100-700	0,25	7,5	10	37	1058	48,1	TAKAGI <i>et al.</i> , 2006
descontínuo alimentado	intermitente	G 50% (p/v)	submersa	100-700	0,25	7,5	30	37	904	39,3	TAKAGI <i>et al.</i> , 2006
descontínuo alimentado	gradual	G 20% (p/v)	submersa	100-700	0,25	7,5	10	37	2340	87,4	TAKAGI, 2003
descontínuo alimentado	gradual	EL 10% (p/v); G 20% (p/v)	submersa	100-700	0,25	7,5	10	37	2433	90,8	TAKAGI, 2003

COD – Concentração de Oxigênio Dissolvido; EL – Extrato de Levedura; G – Glicose.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Microrganismo

Haemophilus influenzae tipo b linhagem GB3291 foi cedido pelo Departamento de Bacteriologia do Instituto Adolf Lutz (São Paulo) na forma liofilizada e o lote de trabalho foi preparado no laboratório de Bioprocessos do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan - SP e mantido em *freezer* -70°C.

3.2.2 Preparo do lote trabalho

A partir do lote armazenado em *freezer* -70°C, um criotubo foi descongelado a temperatura ambiente, a suspensão bacteriana foi homogeneizada levemente com uma micropipeta e 200 µL foram transferidos para cada um dos quatro tubos inclinados contendo ágar chocolate (item 3.2.3.1). Em seguida, foi adicionado 200 µL de solução salina (NaCl 150 mM) estéril em cada tubo para cobrir toda a superfície do ágar. Os tubos foram incubados em uma atmosfera de aproximadamente 5-6 % de CO₂, e deixados em estufa (Estufa BOD – TE 391 Tecnal) a 37°C por 6 horas. Após incubação, as células de *Haemophilus influenzae* b presentes na superfície do ágar chocolate foram ressuspensas com 1 mL de salina estéril com o auxílio de uma pipeta de vidro de 2 mL, e em seguida, a suspensão foi distribuída em outros dois novos tubos de ágar chocolate. Movimentos no tubo foram feitos de forma que a salina cobrisse toda superfície do ágar. Estes foram incubados em atmosfera de CO₂ a 37°C por aproximadamente 16 horas. Após o período de incubação foi realizado o teste de pureza da cultura através de coloração de Gram (item 3.2.8.1). Verificada a pureza das culturas, as células de cada tubo foram ressuspensas da superfície do ágar com auxílio de uma pipeta de vidro de 2 mL com 1 mL de meio Greaves (item 3.2.3.2) e transferidas para um mesmo frasco. O *pool* assim formado foi homogeneizado e 500 µL da suspensão bacteriana foram aliqüotados em cada criotubo devidamente identificado. Os criotubos foram colocados em *freezer* -20°C onde permaneceram por cerca de 3 horas. Em seguida, estes foram transferidos para *freezer* -70°C por 72 horas, para então serem estocados em nitrogênio líquido até o momento do uso. Uma amostra do *pool* foi utilizada para realizar o teste de viabilidade celular (item 3.2.8.3).

3.2.3 Meios de Cultura

3.2.3.1 Ágar chocolate

O ágar chocolate foi preparado utilizando como base *Brain Heart Infusion* (BHI) 37 % (p/v). Foi adicionado 2 % (p/v) de Bacto Ágar e esterilizado a 121°C por 25 minutos. Após o resfriamento, quando a temperatura estava em torno de 80°C, foi adicionado sangue de cavalo a 10 % (v/v) e homogeneizado. Em seguida, foram distribuídos 20 mL em placas de petri e 15 mL em tubos com rosca. Os tubos foram mantidos inclinados em estante apropriada até o ágar solidificar.

Teste de esterilidade do meio foi realizado a 37°C por aproximadamente 72 horas, em seguida, armazenados a 4°C até o momento do uso.

3.2.3.2 Meio Greaves

O meio Greaves foi utilizado para preservar as células durante o armazenamento do lote de trabalho em nitrogênio líquido. Este foi preparado adicionando ácido glutâmico sal monossódico 5 % (p/v), glicerol 10 % (p/v) e soro de albumina bovina 5 % (p/v). Todos os componentes foram solubilizados com água destilada. Em seguida, o meio foi esterilizado através de filtração em membrana 0,22 µm e armazenado em temperatura ambiente protegido da luz até a hora do uso (GREAVES, 1960).

3.2.3.3 Meio de cultivo

A composição dos meios descontínuo e de alimentação está descrita nas tabelas 3.1A e 3.1B, respectivamente.

Os cultivos descontínuos alimentados com adição intermitente de glicose tiveram a alimentação feita por pulsos de glicose 50% (p/v) de forma a restaurar a concentração de glicose do início do cultivo.

Tabela 3.1A. Composição do meio de cultura descontínuo.

Componentes	Marca	Concentração
Peptona de Soja	BD	10 g/L
Extrato de Levedura	Merck	5 g/L
Glicose	Merck	5,0 g/L
Cloreto de Sódio	Fisher	5 g/L
K ₂ HPO ₄	Merck	2,5 g/L
Na ₂ HPO ₄	Synth	13,1 g/L
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	Nuclear	3,3 g/L
NAD	Sigma	15 mg/L
Hemina	Sigma	30 mg/L

(TAKAGI *et al.*, 2006)

Tabela 3.1B. Composição do meio de alimentação .

Componentes	Marca	Concentração
Peptona de Soja	BD	10 g/L
Extrato de Levedura	Merck	200 g/L
Glicose	Merck	200 g/L
Cloreto de Sódio	Fisher	5 g/L
K ₂ HPO ₄	Merck	2,5 g/L
Na ₂ HPO ₄	Synth	13,1 g/L
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	Nuclear	3,3 g/L
NAD	Sigma	15 mg/L
Hemina	Sigma	30 mg/L

3.2.3.4 Preparo dos Meios de Cultura

3.2.3.4.1 Ultrafiltração de Extrato de Levedura e Peptona de Soja

O extrato de Levedura (EL) e a Peptona de Soja (*Soytone*) foram submetidos à ultrafiltração tangencial (*LabScale e/ou PrepScale - Millipore™*) em membrana com corte molecular de 10 kDa. Este procedimento foi adotado para remover possíveis polissacarídeos de massa molecular superior a 10 kDa que poderiam estar presente no extrato de levedura, e por ventura, interferir nos passos de purificação e na determinação do polissacarídeo de interesse.

3.2.3.4.1.a Preparo do Extrato de Levedura e Peptona de Soja ultrafiltrado para o meio de cultura utilizado na etapa de cultivo descontínuo

Uma quantidade de EL e *Soytone* referente a 5 g/L e 10 g/L, respectivamente foram solubilizados com 200 mL e 400 mL de água destilada aquecida previamente. Em seguida, os

dois componentes foram transferidos para o mesmo reservatório. A solução de EL e *Soytone* (600 mL) foi concentrada até o ultrafiltrado (UF) atingir 500 mL. Em seguida, adicionou-se 200 mL de água destilada no reservatório que continha o concentrado de 100 mL restante, e este foi concentrado novamente até 100 mL. Este procedimento foi repetido até o UF atingir um volume final de 900 mL. O UF final foi identificado como UF EL-*Soytone* 10 kDa descontínuo.

3.2.3.4.1.b Preparo do Extrato de Levedura e Peptona de Soja ultrafiltrado utilizado para o meio de alimentação

Quantidades de EL e *Soytone* correspondente a 200 g/L e 10 g/L, foram solubilizados respectivamente com 500 mL e 100 mL de água destilada aquecida previamente. Em seguida, os dois componentes foram transferidos para o mesmo reservatório. A solução de EL e *Soytone* (600 mL) foram concentradas até o ultrafiltrado (UF) atingir 400 mL e identificado como 1° UF EL-*Soytone* 10 kDa alimentação. Em seguida, foi adicionado 200 mL de água destilada no reservatório que continha o concentrado de 200 mL restante, o qual foi concentrado novamente até 200 mL. Este procedimento foi repetido até o UF atingir um volume final de 400 mL. O UF foi identificado como 2° UF EL-*Soytone* 10 kDa alimentação.

3.2.3.5 Preparo da solução de Hemina

A quantidade de Hemina necessária para compor o meio foi transferida para um béquer e solubilizada com 5 mL de NaOH 0,1 M com auxílio de micropipeta (1000 µl). Em seguida, adicionou-se 95 mL da solução de NaOH 0,1 M ao béquer e a solução foi mantida sob agitação até o momento da composição final do meio de cultura.

3.2.3.6 Preparo do meio de cultura para os cultivos descontínuos

Os sais e a glicose foram solubilizados individualmente com água destilada previamente aquecida. Em seguida, os componentes solubilizados foram transferidos para um recipiente graduado, assim como a solução UF EL-*Soytone* 10 kDa descontínuo (item 3.2.3.4.1.a).

O NAD foi solubilizado com água destilada com auxílio de micropipeta (1000 µL), homogeneizado e transferido para o recipiente que continha os demais componentes.

Finalmente, adicionou-se a solução de Hemina previamente deixada sob agitação. O pH do meio foi checado e ajustado a 7,5 com NaOH 5 M e o volume final do meio foi ajustado

com água destilada. O meio foi filtrado em membrana Opticap (*Millipore*TM) de 0,22 µm para uma garrafa *Schot* ou diretamente para o biorreator, previamente esterilizado.

3.2.3.7 Preparo do meio de alimentação

Os sais foram solubilizados individualmente nos 400 mL da solução 1º UF EL-*Soytone* 10 kDa alimentação (item 3.2.3.4.1.b). Em paralelo, 200 g de glicose foram solubilizados com os outros 400 mL da solução 2º UF EL *Soytone* 10 kDa alimentação (item 3.2.3.4.1.b) previamente aquecida. Em seguida transferida para um mesmo recipiente.

O NAD e a Hemina (item 3.2.3.5) foram solubilizados e transferidos para o recipiente com os demais componentes do meio já solubilizados. O pH do meio foi ajustado para 7,5 e o volume final ajustado. O meio foi filtrado e transferido para uma garrafa *Schot* apropriada para alimentação.

3.2.4 Inóculo

O pré inóculo foi preparado transferindo 100 µL da suspensão bacteriana armazenada em *freezer* -70°C e/ou nitrogênio líquido, contendo aproximadamente $1,0 \times 10^{10}$ UFC/mL para frasco *erlenmeyer* de 500 mL contendo 50 mL de meio de cultura estéril. Este foi incubado em atmosfera de 5-6 % de CO₂ a 37°C por 6 horas (Estufa BOD – TE 391 *Tecnal*). Um volume da suspensão bacteriana que resultasse em DO_{540nm} final de 0,03 foi transferido para frasco *erlenmeyer* de 1L contendo 200 mL de meio e incubado a 37°C, sob agitação de 200 rpm (*Shaker* séries 25 - *New Brunswick Scientific*) por aproximadamente 14 horas. A quantidade de inóculo que resultasse em DO_{540nm} de 0,1 foi transferida para o reator.

3.2.5 Biorreator

Os biorreatores utilizados nos ensaios foram Bioflo 2000 e Bioflo 3000 (*New Brunswick Scientific*) (figura 3.4) com dorna de vidro com capacidade nominal de 7 a 13 litros, conectados a uma unidade central com controle de pH, oxigênio dissolvido e temperatura.



Figura 3.4. Biorreatores Bioflo 2000 e Bioflo 3000 (*New Brunswick Scientific*).

A dorna possui uma tampa de aço inoxidável (figura 3.5) com orifícios onde são acoplados eletrodo de pH, sonda de oxigênio dissolvido, sensor de temperatura, condensador, entradas de ar superficial e submerso, manômetro para controle da pressão interna, tubo para entrada de meio, tubo para entrada de inóculo, sistema de coleta de amostra, adição de anti-espumante e *triplet* com entrada para hidróxido de sódio (NaOH) e as duas outras entradas para, por exemplo, meio de alimentação. A agitação foi realizada com auxílio de impelidores tipo *Rushton* com seis pás planas. O controle de temperatura foi realizado por meio de uma serpentina com circulação de água para a refrigeração e de uma manta térmica para o aquecimento.

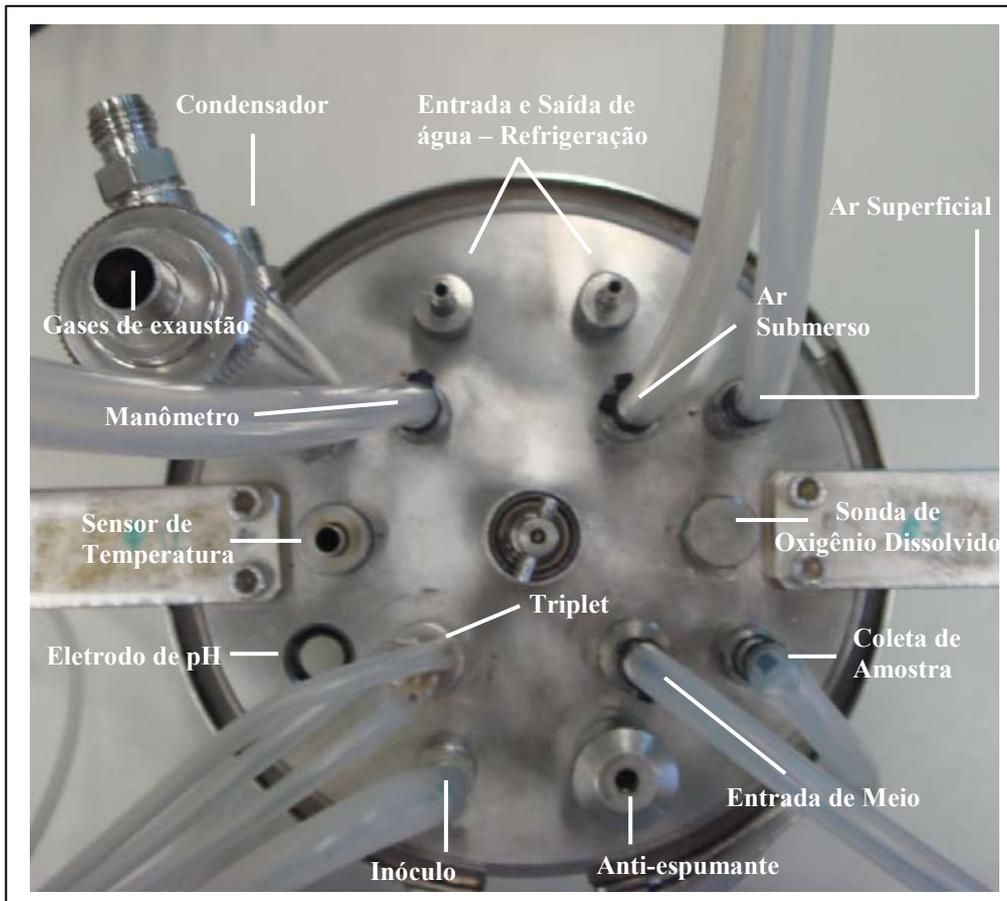


Figura 3.5. Tampa de aço inoxidável do biorreator com as principais tubulações.

3.2.6 Condições de cultivo

Em todos os experimentos realizados a temperatura foi mantida em 37°C, o pH controlado em 7,5 através da adição de NaOH 5 M, a concentração de oxigênio dissolvido (%COD) mantida em 30 % de saturação de ar e a vazão específica de ar variando de 0,2 a 1,0 VVM, dependendo do ensaio. Os parâmetros pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, vazão de ar e velocidade de agitação foram medidos em tempo real e a aquisição foi realizada pelos programas *LabView* (Bioflo 2000) ou *Biocomand* (Bioflo 3000). As frações molares de CO₂ e O₂ no gás de exaustão foram mensuradas também em tempo real pelo analisador de gases (*Sick Maihak S710*). A manutenção da concentração de oxigênio dissolvido no *set point* desejado foi realizada pela variação automática da velocidade de agitação.

Amostras foram coletadas em intervalos regulares para o acompanhamento do crescimento celular através da leitura da densidade óptica, determinação da massa seca, ácidos orgânicos, glicose, polissacarídeo capsular e eventualmente ensaios complementares.

3.2.7 Descrições dos Cultivos

As diferentes estratégias de cultivo utilizadas, resumidas na tabela 3.2, são continuidade ao estudo desenvolvido durante a tese de doutorado de Takagi (2003), tendo como propósito minimizar a formação de ácido acético e melhorar a produção de polissacarídeo capsular de *H. influenzae*.

Tabela 3.2. Ensaios realizados

Ensaio	Peptona de soja	VVM	Descrição:
1	Sigma	0,2	adição intermitente de glicose
2	BD	0,2	adição intermitente de glicose
3	Sigma	0,5	adição intermitente de glicose
4	BD	0,5	adição intermitente de glicose
5	BD	0,3 - 1,0	vazão constante 77 mL/h
6	BD	1,0	vazão constante 131 mL/h
7	BD	1,0	vazão exponencial; $\mu=0,07 \text{ h}^{-1}$
8	BD	1,0	vazão exp.; $\mu=0,2 \text{ h}^{-1}$ seguido de reciclo de células e perfusão

3.2.7.1 Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose

Os cultivos descontínuos alimentados com adição intermitente de glicose (CDAIG) (figura 3.6) foram realizados em reatores com 4,5 e 8,5 litros de meio de cultura. A adição de glicose 50% (p/v) para restaurar a mesma concentração de substrato do início do cultivo foi realizada no momento em que a glicose presente no meio foi totalmente consumida, sendo indicada pelo aumento da concentração de oxigênio dissolvido (COD).

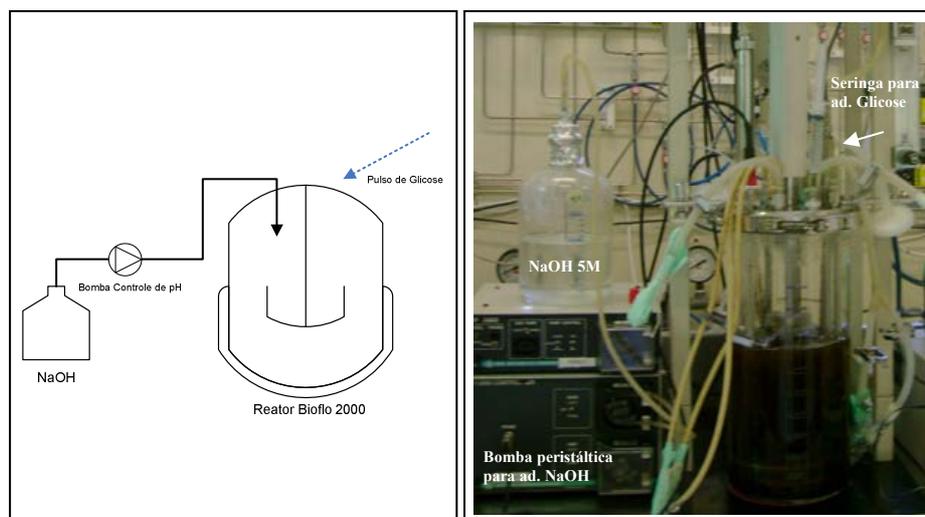


Figura 3.6. Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose.

3.2.7.2 Cultivo descontínuo alimentado com vazão constante

Os cultivos descontínuos alimentados com vazão de alimentação constante (figura 3.7) foram realizados em reatores com 3,5 e 6,5 litros de meio de cultura. O início da alimentação ocorreu no momento em que a glicose presente no meio descontínuo foi totalmente consumida. A alimentação foi realizada com o auxílio de uma bomba peristáltica (*Watson Marlow 323*), utilizando mangueira 14 (*PharMed 06508-14 Masterflex*) e vazão constante. A bomba utilizada foi previamente calibrada na faixa de vazão de trabalho com o mesmo tipo de mangueira utilizada na alimentação.

3.2.7.3 Cultivo descontínuo alimentado com vazão exponencial

O cultivo descontínuo alimentado com vazão exponencial (figura 3.7) foi realizado em reator com 6,5 litros de meio de cultura. O início da alimentação ocorreu no momento em que a glicose do meio descontínuo foi totalmente consumida. A alimentação foi realizada com auxílio de uma bomba peristáltica (*Watson Marlow 323*), utilizando mangueira 14 (*PharMed 06508-14 Masterflex*) e vazão exponencial de forma manter a velocidade específica de crescimento (μ) constante em $0,07 \text{ h}^{-1}$. A vazão de alimentação exponencial foi calculada de acordo com a equação 3.1.

$$M_S = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m \right) \cdot C_x(t_0) \cdot V(t_0) \cdot \exp^{\mu(t-t_0)} \quad (3.1)$$

(LEE, 1996)

ou

$$M_S = C_{S_e} \cdot F$$

M_S = velocidade de fluxo de massa da fonte de carbono (g/h^{-1});

μ = velocidade específica de crescimento (h^{-1});

m = coeficiente específico de manutenção (h^{-1}),

V = volume da cultura (L);

C_x = concentração de biomassa (g MS/L);

$Y_{X/S}$ = coeficiente de rendimento de substrato em biomassa (g MS /g S);

t_0 = tempo do início da alimentação (h);

F = vazão volumétrica de alimentação (L/h);

C_{S_e} = concentração de substrato no meio de alimentação (g/L).

O valor da velocidade específica de crescimento (μ) utilizado neste ensaio foi definido com base no perfil de velocidade específica de crescimento do ensaio 6 (tabela 3.2), gerado com o auxílio do *software* AnaBio 1.0 (SILVA *et al.*, 2004). Para análise no programa AnaBio, inicialmente foram utilizados parâmetros cinéticos reais do ensaio 6, no entanto, alguns parâmetros foram sendo modificados de forma que o modelo ajustasse aos dados experimentais (tabela 3.3).

Tabela 3.3. Parâmetros e condições de cultivo usado na simulação.

Parâmetros	Valor	Unidade
Condições iniciais:		
C_X	0,1	(g MS/L)
C_S	5	(g G/L)
C_P	0	(g HA/L)
V	6,75	(L)
Dados da alimentação:		
C_{SF}	200	(g G/L)
F	131	(mL.h)
Outros parâmetros:		
A	1,8	(g HA/ g MS)
$\mu_{m\acute{a}x}$	0,6	(h^{-1})
C_{S1}	0	(g/L^{-1})
C_P^*	29	(g HA/ L^{-1})
K_S	0,6	(g/L^{-1})
N	1,2	
$Y_{X/S}$	0,35	(g MS/ g S)
$Y_{P/S}$	0,63	(g HA / g S)

Um modelo matemático simples consistindo em 3 equações diferenciais ordinárias descrevendo o balanço material para a formação de biomassa (Eq. 3.2), o consumo de substrato (Eq. 3.3) e a formação de ácido acético (Eq. 3.4). Em termos de expressões cinéticas, considerou-se a formação de produto (ácido acético) associada ao crescimento (Eq. 3.4) e adotou-se o modelo de Levenspiel, com inibição pelo produto, para descrever a cinética de crescimento celular. Os símbolos usados nas equações (3.2) a (3.5) são descritos abaixo.

C_X = concentração de biomassa (g MS/L);
 C_S = concentração de substrato (g G/L);
 C_P = concentração de produto (g/L);
 V = volume no biorreator no início da alimentação (L).
 C_{SF} = concentração de substrato no meio de alimentação (g G/L);
 F = vazão de alimentação (L/h).

$$\frac{dC_X}{dt} = \left(\mu - \frac{F}{V} \right) \cdot C_X \quad (3.2)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = \left(\frac{F}{V} \right) \cdot (C_{SF} - C_S) - \left(\frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{\alpha}{Y_{P/S}} \right) \cdot \mu \cdot C_X \quad (3.3)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = (\alpha \cdot \mu) \cdot C_X - \frac{F}{V} C_P \quad (3.4)$$

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*} \right)^n \quad (3.5)$$

Outros parâmetros e símbolos utilizados nas equações 3.2 a 3.5:

α = coeficiente pseudo-estequiométrico para formação de ácido acético associado ao crescimento (g HA/ g MS);
 μ = velocidade específica de crescimento (h^{-1});
 $\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1});
 C_{S1} = concentração de substrato a partir da qual se inicia morte celular (g/L^{-1});
 C_P^* = valor crítico da concentração de produto para inibição de produto ($g HA/L^{-1}$);
 K_S = constante de saturação (g/L^{-1});
 n = parâmetro para o modelo de Levenspiel;
 $Y_{X/S}$ = coeficiente de rendimento de substrato em biomassa (g MS/ g S);
 $Y_{P/S}$ = coeficiente de rendimento de substrato em produto (g HA / g S).

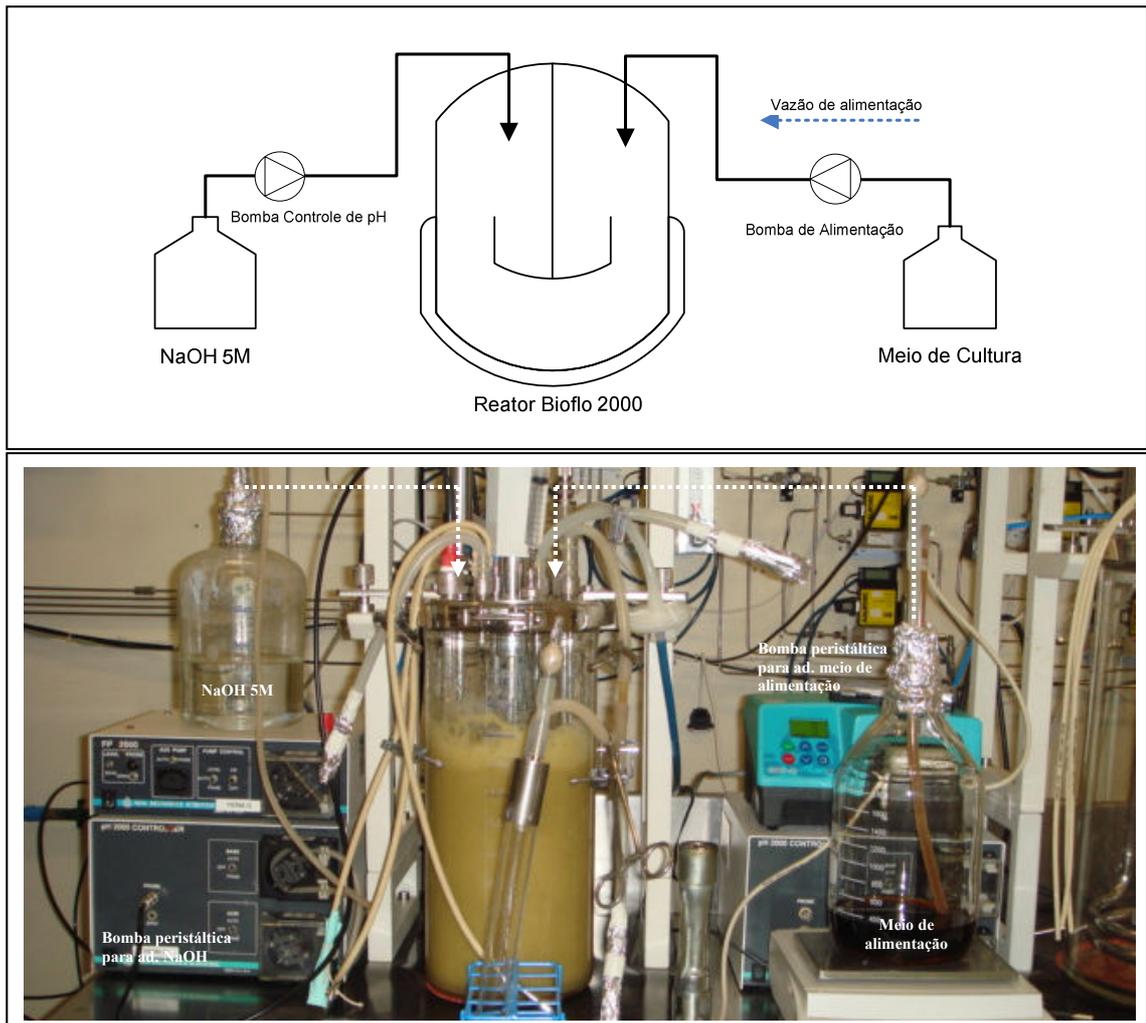


Figura 3.7. Cultivo descontínuo alimentado com vazão de alimentação constante ou exponencial.

3.2.7.4 Cultivo descontínuo alimentado com vazão exponencial seguido de reciclo de células e perfusão

O cultivo descontínuo alimentado com vazão exponencial seguido de reciclo de células e perfusão foi realizado em reator com 6,5 litros de meio de cultura.

Neste cultivo foi acoplado ao reator um sistema para o reciclo de células (figura 3.8) constituído por uma membrana de microfiltração tangencial - fibra oca, com corte de 0,1 μm (*hollow fiber cartridge*, Model # CFP-2-E-5A, com 1200 cm^2 - GE HeathCare), uma bomba peristáltica (*easy load* - Masterflex) para reciclo de células e outras duas bombas peristálticas (*Watson Marlow 323*) para alimentação (adição de meio fresco) e remoção de metabólitos (acoplada a membrana de fibra oca).

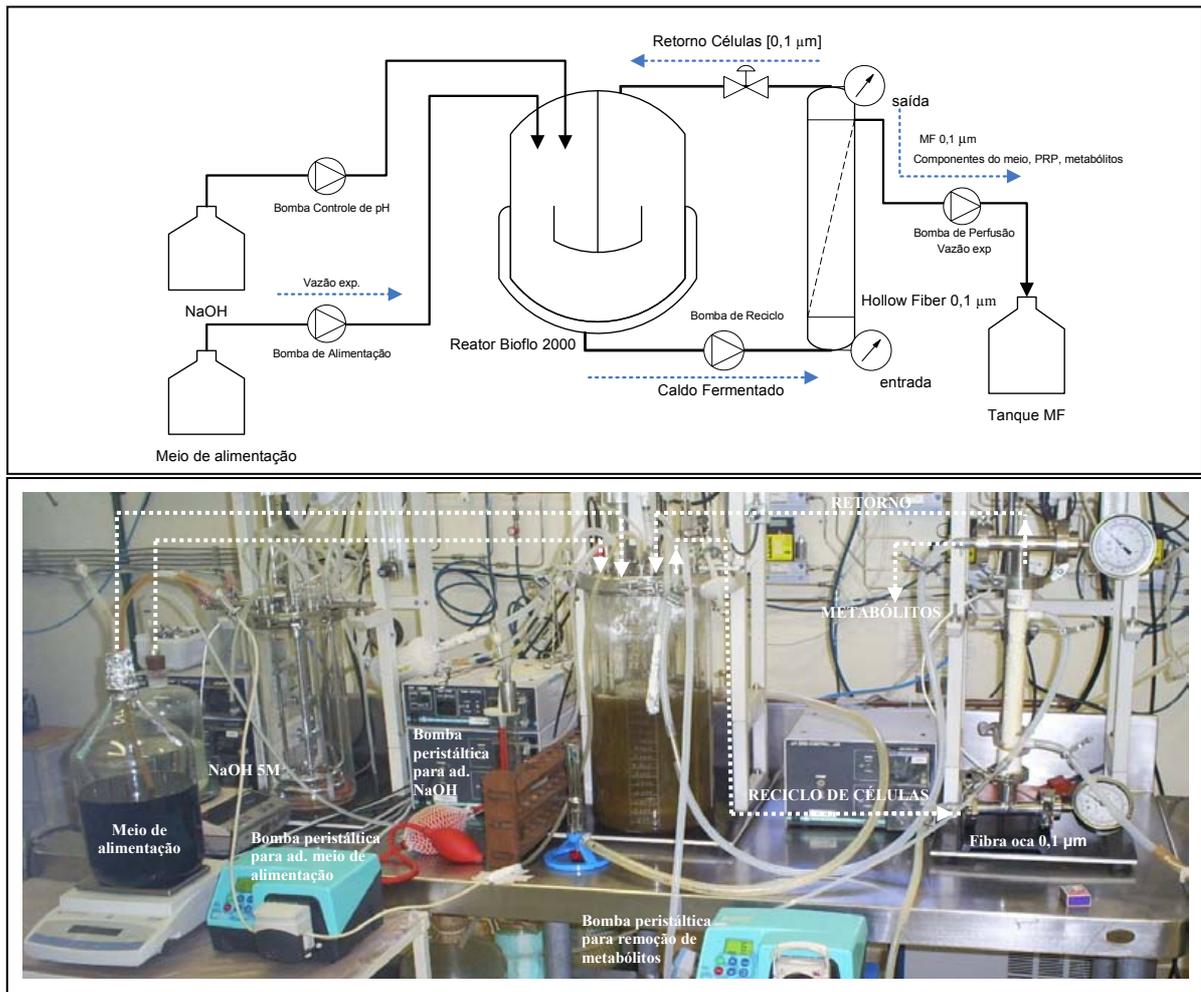


Figura 3.8. Cultivo descontínuo alimentado com vazão de alimentação exponencial seguido de reciclo de células e perfusão

O início da alimentação ocorreu no momento em que a glicose do meio descontínuo foi totalmente consumida. A alimentação foi realizada com auxílio de uma bomba peristáltica (*Watson Marlow 323*), utilizando mangueira 14 (*PharMed 06508-14 Masterflex*) e vazão exponencial de forma manter a velocidade específica de crescimento (μ) constante em $0,2 \text{ h}^{-1}$.

Quando a concentração de ácido acético no reator atingiu aproximadamente 15 g/L , removeu-se do reator um volume microfiltrado de $1,5 \text{ L}$. Este procedimento levou em torno de trinta minutos, em seguida, iniciou-se a perfusão. Na etapa de perfusão as bombas peristálticas de alimentação e remoção foram ajustadas com a mesma vazão (exponencial).

Ao observar queda de CO_2 (12ª hora de cultivo), a vazão exponencial das bombas de alimentação e remoção foi alterada para vazão constante (390 mL/h) até o final do cultivo e adicionou-se $1,3 \text{ L}$ de meio fresco de uma vez.

3.2.8 Metodologia Analítica

3.2.8.1 Coloração de Gram

A metodologia de coloração de Gram é uma técnica de coloração diferencial que permite distinguir os dois principais grupos de bactérias (Gram positiva e Gram negativa) por microscopia óptica. A coloração de Gram foi realizada com o propósito de observar a pureza da cultura, e sua morfologia em diferentes condições de cultivo e também durante o cultivo quando houve a necessidade.

Com o auxílio de alça de alumínio, uma alçada da cultura foi distribuída em movimentos elípticos de modo a formar um filme homogêneo na lâmina de vidro (esfregaço). Em seguida, deixou-se secar o esfregaço a temperatura ambiente e então a lâmina foi fixada passando 3 vezes sobre a chama do Bico de *Bunsen*.

O passo seguinte foi cobrir o esfregaço com solução de Cristal Violeta por 1 minuto. Após este período, o corante foi desprezado, e a lâmina foi lavada e coberta com solução de Lugol (iodo + iodeto de potássio) por 1 minuto. A solução de Lugol foi desprezada e a lâmina lavada com etanol 95% para remover o excesso do corante. Finalmente, o esfregaço foi coberto com a solução de Fucsina por 30 segundos. O excesso do corante foi removido com água destilada. Secou-se a lâmina e esta foi levada ao microscópio óptico com objetiva de imersão (PELCZAR, 1980).

3.2.8.2 Crescimento celular

O crescimento celular foi acompanhado de duas maneiras descritas a seguir:

3.2.8.2.1 Densidade óptica

Para acompanhar o crescimento celular, amostras foram coletadas durante o cultivo em tempo regular para medida de Densidade Óptica em 540 nm (DO_{540nm}) utilizando Espectrofotômetro (*Hitachi U-1800*). As amostras foram diluídas com solução de NaCl 150 mM quando necessário.

3.2.8.2.2 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada pelo método da massa seca. Amostras de 10 mL coletadas durante o cultivo foram distribuídas em dois tubos de centrífugas de 15 mL

previamente pesados. As amostras foram centrifugadas (*Centrifuge 5810 R Eppendorf*) a 12800 g por 10 minutos, o sobrenadante foi separado e congelado para posterior análise de ácido, glicose e polissacarídeo. O precipitado celular foi ressuspenso com 10 mL de solução de NaCl 150 mM e foram novamente centrifugados a 12800 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular deixado em estufa (*Fanem - Orion 515*) a 60°C por aproximadamente 48 horas. Após este período, os tubos foram colocados em um dessecador para resfriar sem adsorver umidade e posteriormente foram pesados. A concentração celular em g de massa seca/L foi determinada pela diferença de pesos dos tubos com e sem as células e dividido pelo volume de cultivo utilizado (10 ml) (Eq. 3.6).

$$MS = \frac{Mtc - Mtv}{V} \quad (3.6)$$

MS = massa celular seca (g/L)
Mtc = massa do tubo contendo *pellet* (g)
Mtv = massa do tubo vazio (g)
V = volume da amostra (L)

3.2.8.3 Viabilidade celular

O teste de viabilidade celular foi realizado com as amostras da suspensão bacteriana contida nos criotubos de lote de trabalho e/ou amostras coletadas durante o cultivo. A suspensão bacteriana foi inicialmente diluída de maneira seriada na ordem de 10^{-1} a 10^{-10} com solução salina (150 mM NaCl). Em seguida, 20 μ L de cada diluição foi alíquotada em placa de ágar chocolate (item 3.2.3.1) e incubada em atmosfera de 5-6 % de CO₂ a 37°C por aproximadamente 36 horas. Após incubação fez-se a contagem das colônias para determinar a viabilidade da célula que foi expressa em unidade formadora de colônia por mL (UFC/mL).

3.2.8.4 Determinação da concentração de polissacarídeo capsular

A concentração de polissacarídeo capsular foi determinada pelo método modificado de Bial (ASHWELL, 1957) que tem sido amplamente empregado para quantificar o polissacarídeo capsular tipo b de *Haemophilus influenzae* (MAWAS *et al.*, 2007). Amostras coletadas durante o cultivo foram centrifugadas a 12800 g por 10 minutos. O sobrenadante foi dialisado contra água a 4°C por 24 horas com trocas de água de 2 em 2 horas. As amostras dialisadas foram novamente centrifugadas a 12800 g por 5 minutos. O sobrenadante foi distribuído em tubos de ensaios, sendo diluídas com água destilada quando necessário de

forma a resultar em volume final de 750 µL. Em seguida, 1,5 mL do reagente cloreto férrico foram adicionados aos tubos de ensaio, seguido de 100 µL de solução de orcinol 0,6 %. As amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho maria a 100°C por 25 minutos, resfriados e as respectivas leituras de absorbância foram realizadas nos comprimentos de onda de 668 nm e 540 nm.

Segundo o protocolo do método modificado de Bial, ocorre a hidrólise ácida do polissacarídeo presente nas amostras tornando-os monômeros de carboidratos ribose e ribitol. A ribose oriunda do polissacarídeo é convertida em furfural em meio ácido. Na presença do orcinol ocorre uma reação de condensação com o composto furfural, formando um complexo de cor esverdeada que tem absorção em 668 nm. A equação 3.7 foi utilizada para determinar a concentração de ribose na presença de outros carboidratos, principalmente hexoses, que apresentam reação na presença de cloreto férrico e na presença de orcinol em meio ácido, o que acaba mascarando a concentração real da pentose (ribose), e portanto, precisa ser corrigido (DRURY 1948). Para obter a concentração de polissacarídeo na amostra, a concentração de ribose foi multiplicada pelo fator 2,5.

$$[\text{ribose}] = \frac{\alpha \theta (\beta \text{ Abs } 668 \text{ nm} - \Omega \text{ Abs } 540 \text{ nm})}{(\theta \cdot \beta - \alpha \cdot \Omega)} \quad (3.7)$$

α = coeficiente angular de pentose medido a 668 nm

β = coeficiente angular de glicose medido a 668 nm

θ = coeficiente angular de pentose medido a 540 nm

Ω = coeficiente angular de glicose medido a 540 nm

3.2.8.5 Determinação da concentração de glicose e ácido acético

As concentrações de glicose e de ácido acético no meio cultivado foram determinadas por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) – (*Shimadzu*). O sobrenadante das amostras obtidas durante o cultivo foi diluído cinco vezes com ácido sulfúrico (50 mM) e filtrado em membrana de 0,22 µm antes de injetar na coluna HPX-87H (*Bio Rad*). Foi utilizado como fase móvel ácido sulfúrico 5 mM com fluxo de 0,6 mL/min a 60°C. As concentrações de glicose assim como de ácido acético foram calculadas através do *software Class VP – Version 6.2* utilizando padrão de carboidratos e de ácidos orgânicos.

3.2.8.6 Estimativa da taxa de aplicação, produtividade máxima, velocidade de produção de CO₂ e velocidade específica de crescimento

A taxa de aplicação (TA) foi determinada pela equação 3.8.

$$TA = \frac{F \cdot C_{SF}}{V} \quad (3.8)$$

A produtividade foi determinada pela equação 3.9.

$$Prod = \frac{PRP_{m\acute{a}x}}{t} \quad (3.9)$$

Prod = produtividade (mg PRP/(L.h));
 PRP_{máx} = concentração máxima de polissacarídeo (mg PRP/L);
 t = tempo total de cultivo (h).

A velocidade de produção de CO₂ foi determinada pela equação 3.10.

$$VPC = P (Y_{CO_2} - Y_{CO_2AR}) Q_{ar} \frac{600}{R \cdot T} \quad (3.10)$$

VPC = velocidade de produção de CO₂ (mmol CO₂/h);
 y_{CO₂} = fração molar de CO₂ no gás de exaustão (%);
 P = pressão atmosférica nas CNTP (atm);
 T = temperatura nas CNTP (K);
 Q_{AR} = vazão volumétrica da corrente de ar (L/min)
 R = constante (0,0082 atm. (L/mol.K)).

A velocidade específica de crescimento nos cultivos descontínuos alimentados foi estimada pela equação 3.2. A derivada dCx/dt foi estimada por ajuste de polinômio aos dados da concentração celular em função do tempo e diferenciação do mesmo.

3.2.8.7 Determinação dos fatores de conversão e da velocidade específica máxima de crescimento

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi determinada pela equação 3.11.

$$\ln \frac{Cx}{Cx_0} = \mu_{m\acute{a}x} \cdot (t - t_i) \quad (3.11)$$

A determinação dos fatores de conversão global foi calculada a partir da regressão linear dos resultados experimentais:

$Y_{X/S}^G$ = coeficiente de rendimento de substrato em biomassa; $Y_{P/X}^G$ = coeficiente de rendimento em produto por biomassa formada; $Y_{P/S}^G$ = coeficiente de rendimento de substrato em produto.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo realizado por Takagi *et al.* foi estabelecido que a melhor condição para o cultivo de *Haemophilus influenzae* tipo b era com aeração submersa e controle de pH em 7,5, condição que levou à produção de aproximadamente 980 mg/L de polissacarídeo quando conduzido em cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose (TAKAGI *et al.*, 2006).

Este trabalho é continuidade dos estudos realizados por Takagi *et al.*, nos quais foram utilizadas diferentes estratégias de cultivo descontínuo alimentado com o propósito de aumentar a produção do polissacarídeo capsular.

Para este estudo foram disponibilizadas duas marcas de peptona de soja, uma da BD, denominado *Bacto Soytone (Enzymatic digest of soybean meal)* e outra da Sigma (P6713 - *Peptone N-Z-Soy BL7*), ambas diferentes daquela utilizada nos estudos de Takagi. A formulação de meios de cultura complexos requer atenção especial quanto a alterações da marca, fornecedor ou mesmo do lote de nutrientes, pois pode haver diferença nos componentes nutricionais e desta maneira influenciar no crescimento celular e porventura na formação de produto. Portanto, houve a necessidade de realizar alguns ensaios com estes componentes a fim de verificar se houve alguma alteração nos fatores de conversão ou na cinética de crescimento e formação de produto.

Os ensaios de verificação foram realizados em frascos agitados (*shaker*) e em biorreator respeitando as condições inicialmente estabelecidas por Takagi *et al.* com a finalidade de permitir a comparação dos cultivos.

No ensaio conduzido em *shaker*, o crescimento celular em meio de cultura com peptona de soja BD foi superior aquele com peptona de soja Sigma, com valores máximos de DO_{540nm} de 11,7 e 9,4, respectivamente, após 12 horas de cultivo. Como não se observou diferença significativa no crescimento celular, outros ensaios foram realizados em biorreator, um sistema com melhor monitoramento e controle de variáveis, e assim poder determinar a influência da peptona de soja de diferentes procedências sobre o crescimento celular e a produção de polissacarídeo capsular (itens 3.3.1.1 e 3.3.1.2). Dando continuidade aos estudos em biorreator, a influência de diferentes estratégias de alimentação na produção de polissacarídeo capsular e na formação de biomassa foi investigada (itens 3.3.2.1, 3.3.2.2 e 3.3.2.3). Os resultados obtidos são discutidos em detalhes a seguir.

3.3.1 Cultivos descontínuos alimentados - adição intermitente de glicose

3.3.1.1 Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose e suprimento de ar em 0,2 VVM

Cultivos descontínuos alimentado com adição intermitente de glicose (CDAIG) e suprimento de ar em 0,2 VVM foram realizados com ambas as marcas de peptona de soja.

A adição de glicose foi realizada no momento em que a glicose presente no meio foi completamente consumida, sinalizada pelo aparecimento de um pico na concentração de oxigênio dissolvido (COD) (dados não mostrados). O montante de glicose adicionado foi de maneira a restaurar a concentração inicial de glicose do meio (5 g/L).

No cultivo com peptona de soja da Sigma (figura 3.9) foi possível observar que após a quarta hora de cultivo a glicose começou a ser consumida com maior velocidade. A agitação chegou a 580 rpm na quinta hora e a partir da oitava hora começou a cair até atingir 457 rpm (12^a hora). A velocidade de produção de CO₂ alcançou 31,4 mmol CO₂/h na quinta hora, permanecendo constante neste patamar até a oitava hora e então começou a cair lentamente até atingir 13 mmol CO₂/h na 12^a hora. No momento em que o CO₂ começou a cair (8^a hora), a concentração de ácido acético estava em torno de 5 g HA/L. Ao final do cultivo a concentração de biomassa foi de 3,6 g MS/L, enquanto que a produção de ácido acético e polissacarídeo capsular foram 9 g HA/L e 400 mg PRP/L, respectivamente.

No cultivo com peptona de soja da BD (figura 3.10), após a quarta hora de cultivo a glicose começou a ser consumida em maior velocidade. A agitação chegou a 600 rpm na quarta hora de cultivo, e a partir da nona hora começou a cair lentamente chegando a 530 rpm (12^a hora). A velocidade de produção de CO₂ alcançou 93,5 mmol CO₂/h na quinta hora, permanecendo constante até a sétima hora e então começou a cair até 10,2 mmol CO₂/h na 12^a hora. No momento no qual a produção de CO₂ começou a cair (7^a hora), a concentração de ácido acético estava em 4,8 g HA/L. Ao final do cultivo a concentração de biomassa foi de 4,7 g MS/L, enquanto a produção de ácido acético e polissacarídeo capsular foram 9 g HA/L e aproximadamente 600 mg PRP/L, respectivamente.

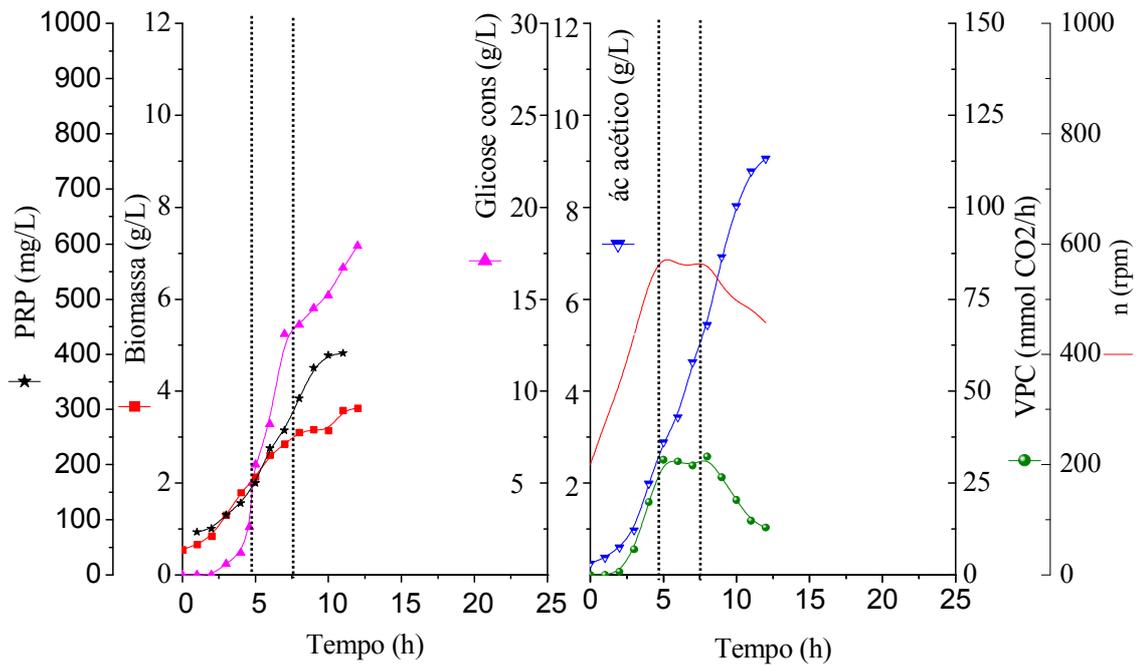


Figura 3.9. Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose, peptona de soja da Sigma com suprimento de ar em 0,2 VVM (Ensaio 1).
 Linha pontilhada indica o momento do pulso de glicose.
 n = agitação; VPC = velocidade de produção de CO₂.

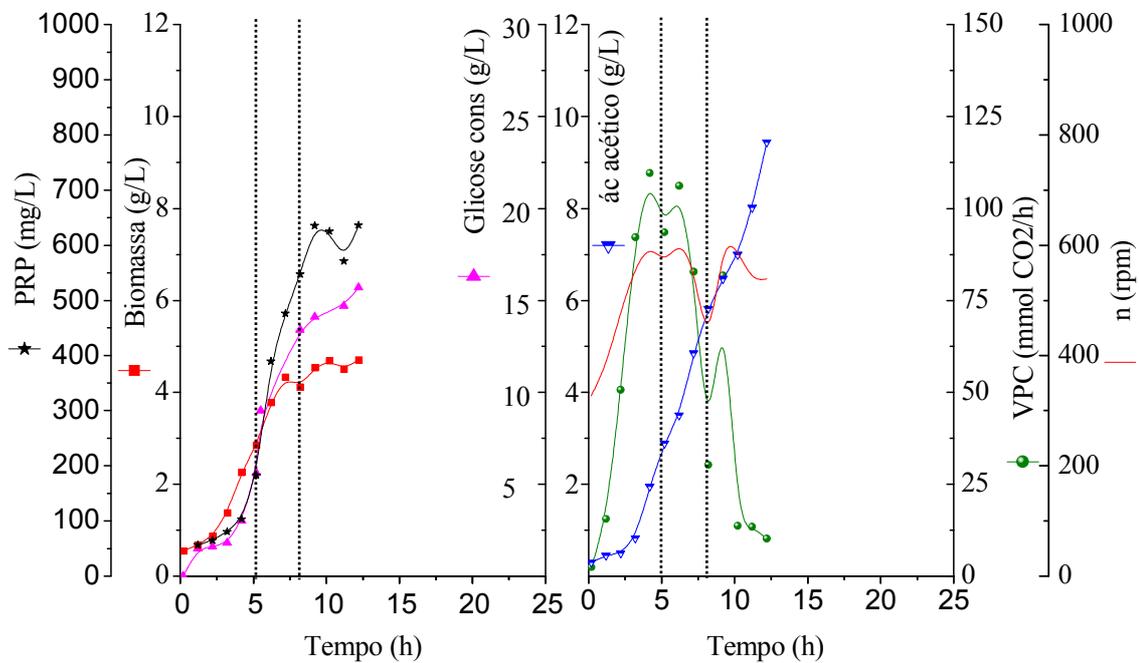


Figura 3.10. Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose, peptona de soja da BD com suprimento de ar em 0,2 VVM (Ensaio 2).
 Linha pontilhada indica o momento do pulso de glicose.
 n = agitação; VPC = velocidade de produção de CO₂.

Constata-se assim que o cultivo utilizando peptona de soja da BD apresentou crescimento celular e produção volumétrica de PRP superiores ao cultivo com peptona de soja da Sigma, com um acréscimo de 23% e 33%, respectivamente (tabela 3.4). A produção de CO₂ acompanhou o crescimento, sendo significativamente superior para o CDAIG com peptona de soja da BD. O valor de PRP obtido por Takagi *et al.* (2006) utilizando peptona de soja da Difco em cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose, aeração submersa, pH controlado em 7,5 e suprimento de ar em 0,25 VVM, foi em torno de 980 mg PRP/L ao final do cultivo (24 horas), e 600 mg PRP/L em doze horas de cultivo, produção similar ao obtido com a peptona de soja da BD (600 mg PRP/L em 12 horas).

Em processos fermentativos, o oxigênio é considerado substrato chave e sua escassez pode limitar o crescimento celular e a formação de produto (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009). Por ser pouco solúvel em água, o oxigênio precisa ser fornecido ao longo do processo de maneira eficiente. Para tanto, reatores aerados e agitados, normalmente trabalham com vazão específica de ar próximo de 0,5 VVM (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Além disso, uma maior vazão de ar exige menos do sistema de agitação do equipamento, economizando energia e diminuindo o cisalhamento. Sendo assim, visando a melhor transferência de oxigênio e mistura do meio, foram realizados cultivos com vazão específica de ar em 0,5 VVM

3.3.1.2 Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose e suprimento de ar em 0,5 VVM

Cultivos descontínuos alimentado com adição intermitente de glicose (CDAIG) e suprimento de ar em 0,5 VVM foram realizados com ambas as marcas de peptona de soja. Assim como nos ensaios anteriores, a adição de glicose foi realizada no momento em que toda a glicose presente no meio descontínuo foi completamente consumida, sinalizada pelo aparecimento de um pico na COD (dados não mostrados).

No cultivo com peptona de soja da Sigma (figura 3.11) foi possível observar que após quatro horas de cultivo a glicose começou a ser consumida com maior velocidade. A agitação chegou a 555 rpm na oitava hora e a partir deste momento começou a cair lentamente até 420 rpm (12^a hora). A velocidade de produção de CO₂ alcançou 60 mmol CO₂/h na quarta hora de cultivo. Com o consumo total da glicose presente no reator, a velocidade de produção de CO₂ caiu, chegando a 31 mmol CO₂/h (6^a hora). Diferentemente dos outros cultivos, foi dado pulso

de glicose de forma resultar no dobro da concentração de glicose inicial (10 g/L). Com o pulso, a velocidade de produção de CO₂ voltou a subir até atingir 72 mmol CO₂/h na oitava hora, e então caiu lentamente até 29,5 mmol CO₂/h na 12^a hora. No momento em que a produção de CO₂ começou a cair (8^a hora), a concentração de ácido acético estava em torno de 5 g HA/L. Ao final do cultivo a concentração de biomassa foi 4,5 g MS/L, a produção de ácido acético e polissacarídeo capsular foram 7,8 g HA/L e aproximadamente 550 mg PRP/L, respectivamente.

No cultivo com peptona de soja da BD (figura 3.12), após quatro horas a glicose começou a ser consumida com maior velocidade. A quantidade de glicose adicionada foi calculada de maneira a restaurar a concentração inicial de glicose no meio (5 g/L). A agitação chegou a 597 rpm na sexta hora e a partir deste momento começou a cair lentamente até 450 rpm (11^a hora). A velocidade de produção de CO₂ alcançou 133 mmol CO₂/h na sexta hora de cultivo, então, começou a cair lentamente até 44 mmol CO₂/h na 11^a hora. No momento em que a produção de CO₂ começou a cair (6^a hora), a concentração de ácido acético estava em 4,8 g HA/L. Ao final do cultivo a concentração de biomassa foi de 6 g MS/L, a produção de ácido acético e polissacarídeo capsular foram 10 g HA/L e aproximadamente 750 mg PRP/L, respectivamente.

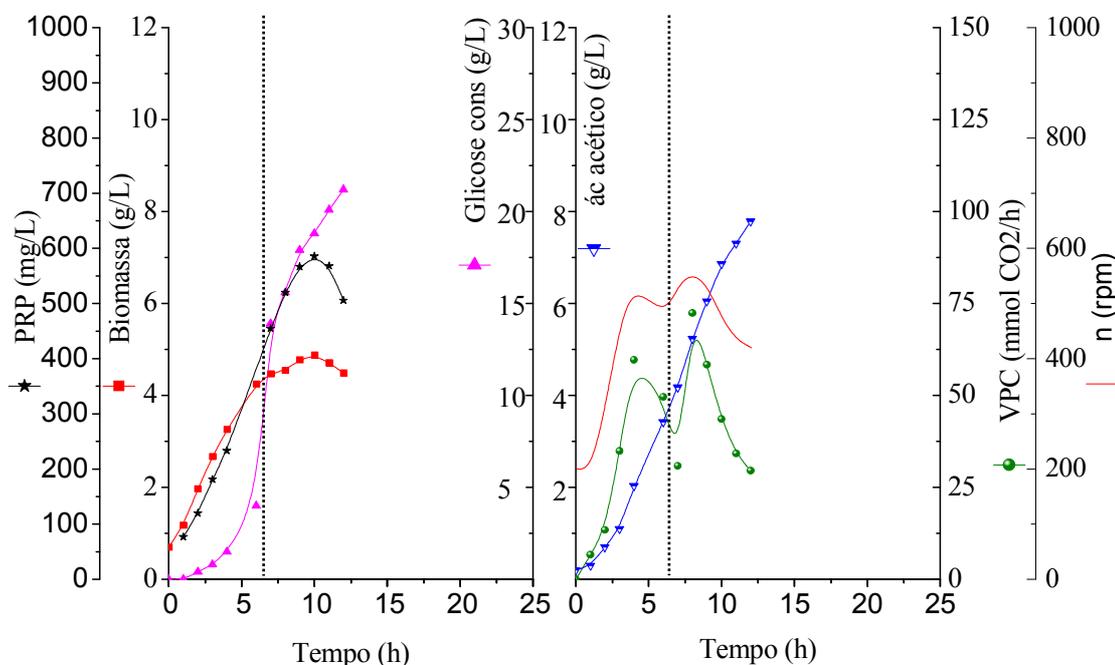


Figura 3.11. Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose, peptona de soja da Sigma, com suprimento de ar em 0,5 VVM (Ensaio 3).

Linha pontilhada indica o momento do pulso de glicose.
n = agitação; VPC = velocidade de produção de CO₂.

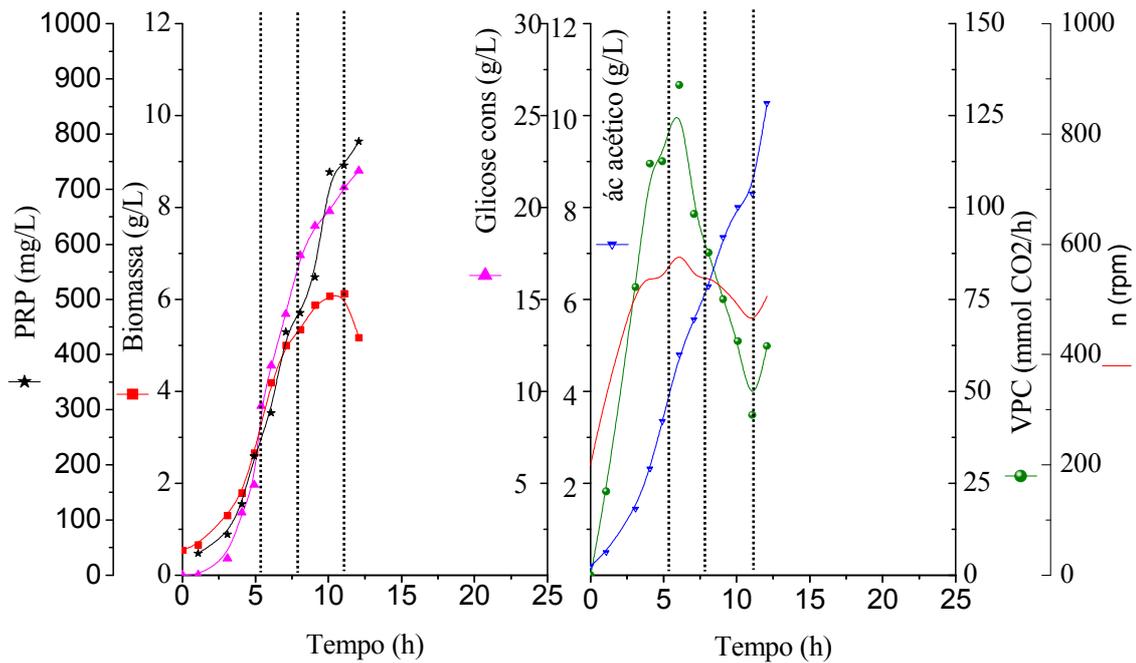


Figura 3.12. Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose, peptona de soja da BD com suprimento de ar em 0,5 VVM (Ensaio 4).

Linha pontilhada indica o momento do pulso de glicose.

n = agitação; VPC = velocidade de produção de CO₂.

Comparando ambas as marcas de peptona de soja em CDAIG realizados com vazão específica de ar em 0,5 VVM, observa-se que o cultivo realizado com peptona de soja da BD apresentou crescimento celular e produção volumétrica de PRP maiores que o cultivo com peptona de soja da Sigma, com aumentos de 20% e 27%, respectivamente.

Os microrganismos podem utilizar muitos carboidratos em preferência a outros (POSTMA *et al.*, 1993) e, embora não tenha sido possível dispor de dados do certificado de análise das peptonas de soja da Sigma, a peptona da BD aparentemente contém nutrientes que poderiam ser mais facilmente assimiladas, resultando no maior crescimento celular e na produção de polissacarídeo. Os altos valores de produção de CO₂ alcançados nos cultivos com peptona de soja da BD também reforçam essa hipótese.

Quando comparado os CDAIG realizados com peptona de soja da Sigma em diferentes vazões específicas de ar (tabela 3.4), observa-se que o aumento da vazão de ar de 0,2 VVM para 0,5 VVM, resultou em aumento no crescimento celular e na produção volumétrica de PRP, de 25% e 27%, respectivamente. Da mesma forma, nos cultivos com peptona de soja da BD, o aumento da vazão de ar de 0,2 VVM para 0,5 VVM resultou em aumento no crescimento celular e na produção volumétrica de PRP, da ordem de 22% e 20%,

respectivamente. O aumento da aeração pode ter melhorado a mistura do meio, além de promover melhor transferência de oxigênio e consequentemente, permitir maior crescimento celular e produção de polissacarídeo.

Com base nesses resultados, a peptona de soja da BD foi selecionada para conduzir os próximos experimentos.

Tabela 3.4. Formação de biomassa e produção de polissacarídeo em cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose.

Descrição	Biomassa (g/L)	PRP (mg/L)
Sigma 0,2 VVM	3,6	400
BD 0,2 VVM	4,7	600
Sigma 0,5 VVM	4,5	550
BD 0,5 VVM	6,0	750

Segundo Takagi *et al.* (2003) a síntese de polissacarídeo capsular de *H. influenzae* tipo b está associada ao crescimento celular. Neste panorama, para obter maior formação de produto é necessário atingir alta densidade celular (KORZ *et al.*, 1995). Os processos fermentativos mais utilizados para se obter alta densidade celular são os descontínuos alimentados (LEE 1996). Sendo assim, cultivos descontínuos alimentados com vazão constante foram realizados visando melhorar a produção de polissacarídeo capsular.

3.3.2 Cultivos descontínuos alimentados

3.3.2.1 Cultivo descontínuo alimentado com vazão constante

Takagi *et al.*, ao realizarem cultivo descontínuo alimentado com variação gradual de vazão, atingiram produção de polissacarídeo em torno de 2000 mg PRP/L (tabela 3.1). No entanto, estes ensaios resultaram em acúmulo de substrato no reator durante o cultivo (TAKAGI, 2003).

Dando continuidade aos estudos sobre cultivos descontínuos alimentados, foi realizado cultivo com vazão de alimentação constante de 77 mL/h (ensaio 5), conduzido em biorreator de 7 litros de capacidade nominal. A vazão de alimentação utilizada no ensaio 5 foi escolhida como o valor intermediário utilizado nos ensaios realizados com variação de vazão gradual (TAKAGI, 2003).

No cultivo descontínuo alimentado com vazão constante (CDAVC) em 77 mL/h (figura 3.13), a vazão volumétrica de ar foi aumentada no decorrer do cultivo desde 1 até 3,5 L/min, variando a vazão específica de ar de 0,3 até 1 VVM. No decorrer do cultivo houve aumento da densidade celular e maior requerimento por oxigênio, conseqüentemente, maiores velocidades de agitação foram necessárias para manter a COD em 30% de saturação. A velocidade de agitação atingiu próximo de 500 rpm na sexta hora de cultivo. Neste momento, aumentou-se o suprimento de ar de 1 para 2 L/min. Na décima hora de cultivo, a velocidade de agitação estava em torno de 700 rpm e então o suprimento de ar foi aumentado, novamente, de 2 para 3,5 L/min. A partir da 10^a hora de cultivo, a velocidade de crescimento diminuiu e a agitação estabilizou-se em torno de 650 rpm.

Após a quarta hora de cultivo a glicose começou a ser consumida com maior velocidade. Quando a glicose foi completamente consumida, sinalizada pelo aparecimento de um pico na COD (dados não mostrados), deu-se início à alimentação (6,58 h de cultivo) a uma vazão constante de 77 mL/h. A velocidade de produção de CO₂ alcançou 195 mmol CO₂/h na décima hora e então começou a cair até 127 mmol CO₂/h na 17^a hora. No momento em que o CO₂ começou a cair (10^a hora), a concentração de ácido acético estava em torno de 10,8 g HA/L. Ao final do cultivo, a concentração de biomassa foi de 13 g MS/L, a produção de ácido acético e polissacarídeo capsular foram 26 g HA/L e aproximadamente 1200 mg PRP/L, respectivamente (figura 3.13).

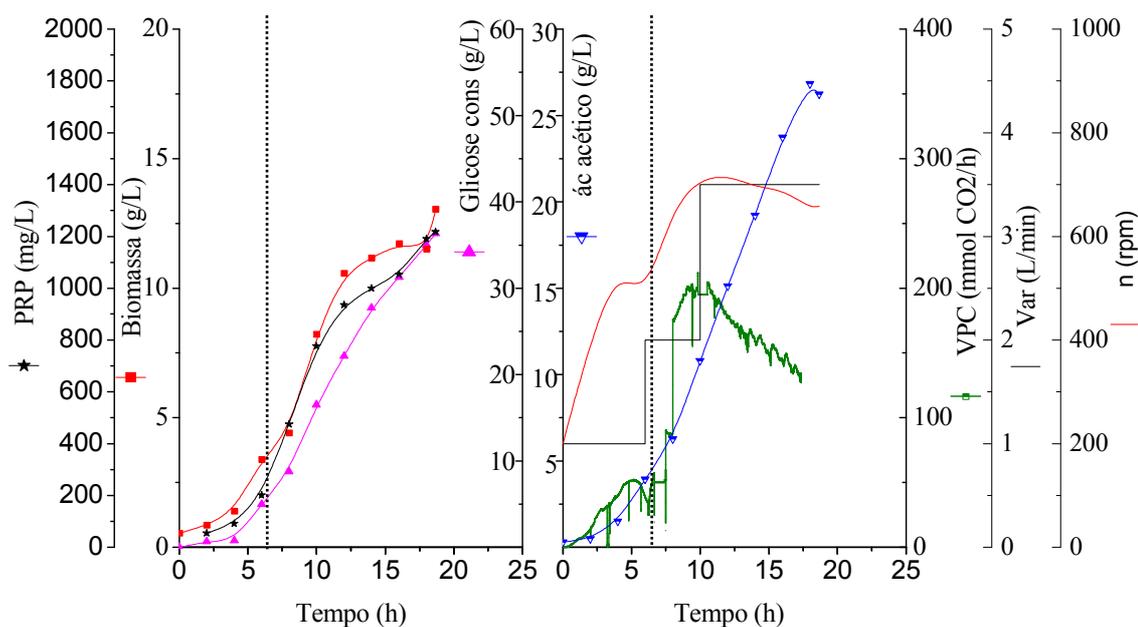


Figura 3.13. Cultivo descontínuo alimentado com vazão constante de 77 mL/h e 0,3 a 1 VVM (Ensaio 5).

Linha pontilhada indica o início da alimentação; n = agitação; VPC = velocidade de produção de CO₂; Var = vazão volumétrica de ar

Ao comparar a produção de polissacarídeo capsular da melhor condição de cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose (CDAIG: BD – 0,5 VVM, tabela 3.4) que resultou em 750 mg/L de PRP, com o cultivo descontínuo alimentado com vazão constante de 77 mL/h que chegou a produzir 1200 mg/L de PRP, nota-se que este último resultou em um incremento de 38% na produção de polissacarídeo. Além disso, conforme o objetivo inicial da realização da alimentação a vazão constante, a concentração de biomassa mais que dobrou (tabelas 3.4 e 3.5).

No ensaio seguinte, foi realizado CDAVC e vazão específica de ar em 1 VVM (ensaio 6) a fim de verificar a influência de uma maior aeração desde o início do cultivo sobre o crescimento celular e a produção de polissacarídeo. Este ensaio foi conduzido em biorreator de 13 litros de capacidade nominal, volume 1,8 vezes maior que o utilizado no cultivo anterior (ensaio 5). Portanto, a vazão de alimentação foi escalonada, passando para 131 mL/h. Para definição da vazão de alimentação utilizada neste ensaio, as equações 3.12 e 3.13 foram utilizadas.

$$F = \frac{V_{F13L} - V_{i13L}}{t_{alim}} \quad (3.12)$$

onde,

$$V_{i13L} = \frac{V_{F13L}}{\frac{V_{F7L}}{V_{i7L}}} \quad (3.13)$$

F = vazão de alimentação (mL/h);

V_{i13L} = volume de cultura inicial no reator de 13L de capacidade nominal(L);

V_{F13L} = volume de cultura final do reator de 13L de capacidade nominal (L);

V_{i7L} = volume de cultura inicial no reator de 7L de capacidade nominal (L);

V_{F7L} = volume de cultura final do reator de 7L de capacidade nominal (L);

t_{alim} = tempo de alimentação (h).

Em cultivo descontínuo alimentado com vazão constante de 131 mL/h (figura 3.14), a vazão volumétrica de ar foi mantida constante em 6,5 L/min, e a vazão específica de ar variou entre 1 VVM e 0,8 VVM de acordo com o volume de meio no reator durante a alimentação. A agitação chegou a 620 rpm na décima hora e então começou a cair lentamente até atingir 574 rpm (19ª hora). Após a terceira hora de cultivo a glicose começou a ser consumida com maior velocidade. Quando a glicose presente no reator foi completamente consumida, sinalizada por uma queda brusca na produção de CO₂, deu-se início à alimentação (5,67h de cultivo). A velocidade de produção de CO₂ alcançou 150 mmol CO₂/h na quarta hora de cultivo. Com o consumo total da glicose presente no reator a velocidade de produção de CO₂ caiu, chegando a 45,5 mmol CO₂/h (5,5ª hora). Com o início da alimentação o CO₂ voltou a subir até atingir 353 mmol CO₂/h na nona hora e então caiu lentamente até 248 mmol CO₂/h na 19ª hora. No momento em que a produção de CO₂ começou a cair (9ª hora), a concentração de ácido acético estava em torno de 10 g HA/L. Ao final do cultivo a concentração de biomassa foi de 12 g MS/L, a produção de ácido acético e polissacarídeo capsular foram 25 g HA/L e aproximadamente 1600 mg PRP/L, respectivamente.

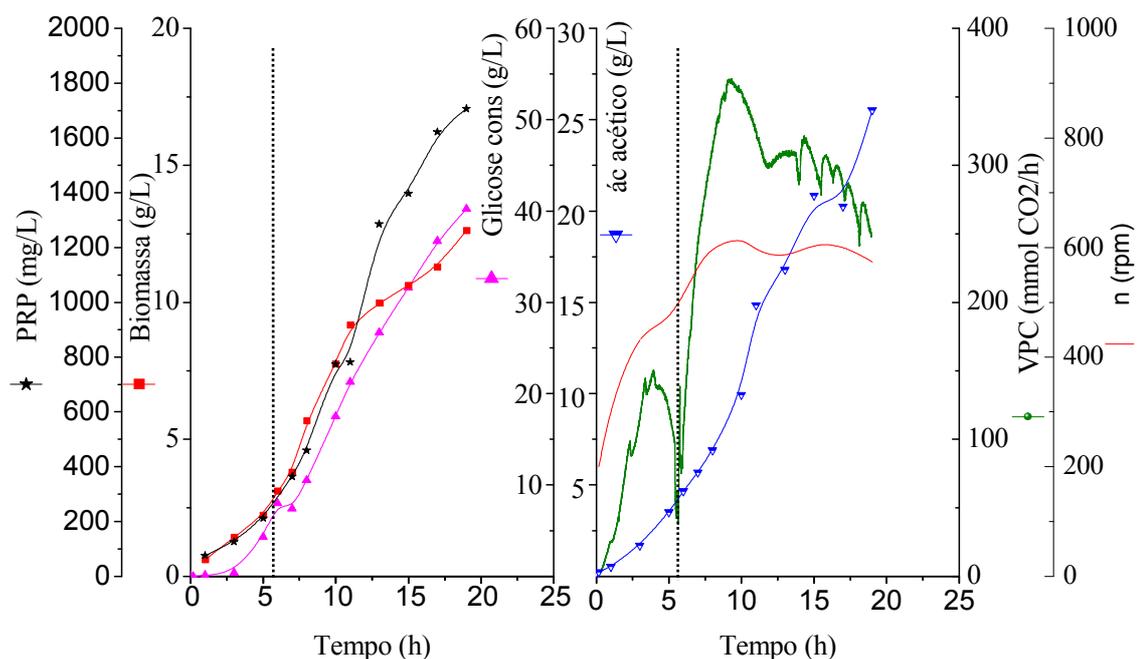


Figura 3.14. Cultivo descontínuo alimentado com vazão constante 131 mL/h e 1 VVM (Ensaio 6).

Linha pontilhada indica o início da alimentação. n = agitação
VPC = velocidade de produção de CO₂.

Ao comparar os CDAVC, observa-se que a taxa de aplicação, ou seja, a quantidade em grama de glicose adicionada por litro de cultura no reator por hora foi praticamente idêntica em ambos os cultivos (figura 3.15), assim como a biomassa acumulada. No entanto, houve um aumento na produção volumétrica de polissacarídeo, de 25% no CDAVC e vazão específica de ar de 1 VVM (tabela 3.5). Esse aumento pode ser resultado de uma melhor transferência de oxigênio e mistura do meio proporcionadas pelo maior suprimento de ar (1 VVM).

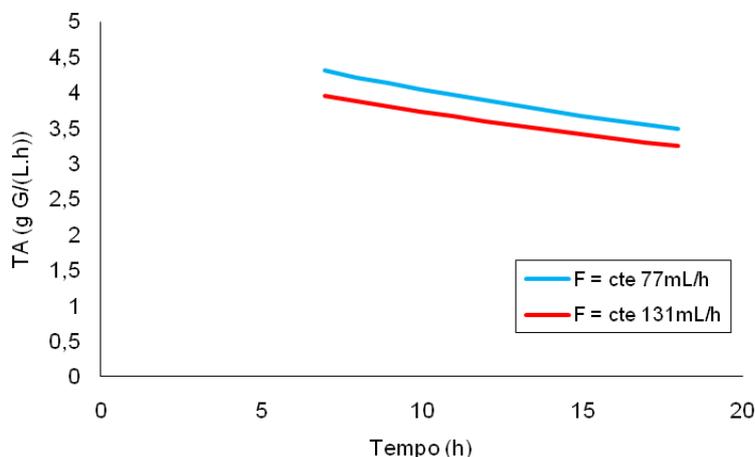


Figura 3.15. Taxa de aplicação em cultivos descontínuos alimentados com vazão constante.

Tabela 3.5. Formação de biomassa e produção de polissacarídeo em cultivo descontínuo alimentado com vazão constante.

Descrição	Biomassa (g/L)	PRP (mg/L)
vazão de alimentação cte. 0,3-1,0 VVM	13	1200
vazão de alimentação cte. 1,0 VVM	12	1600

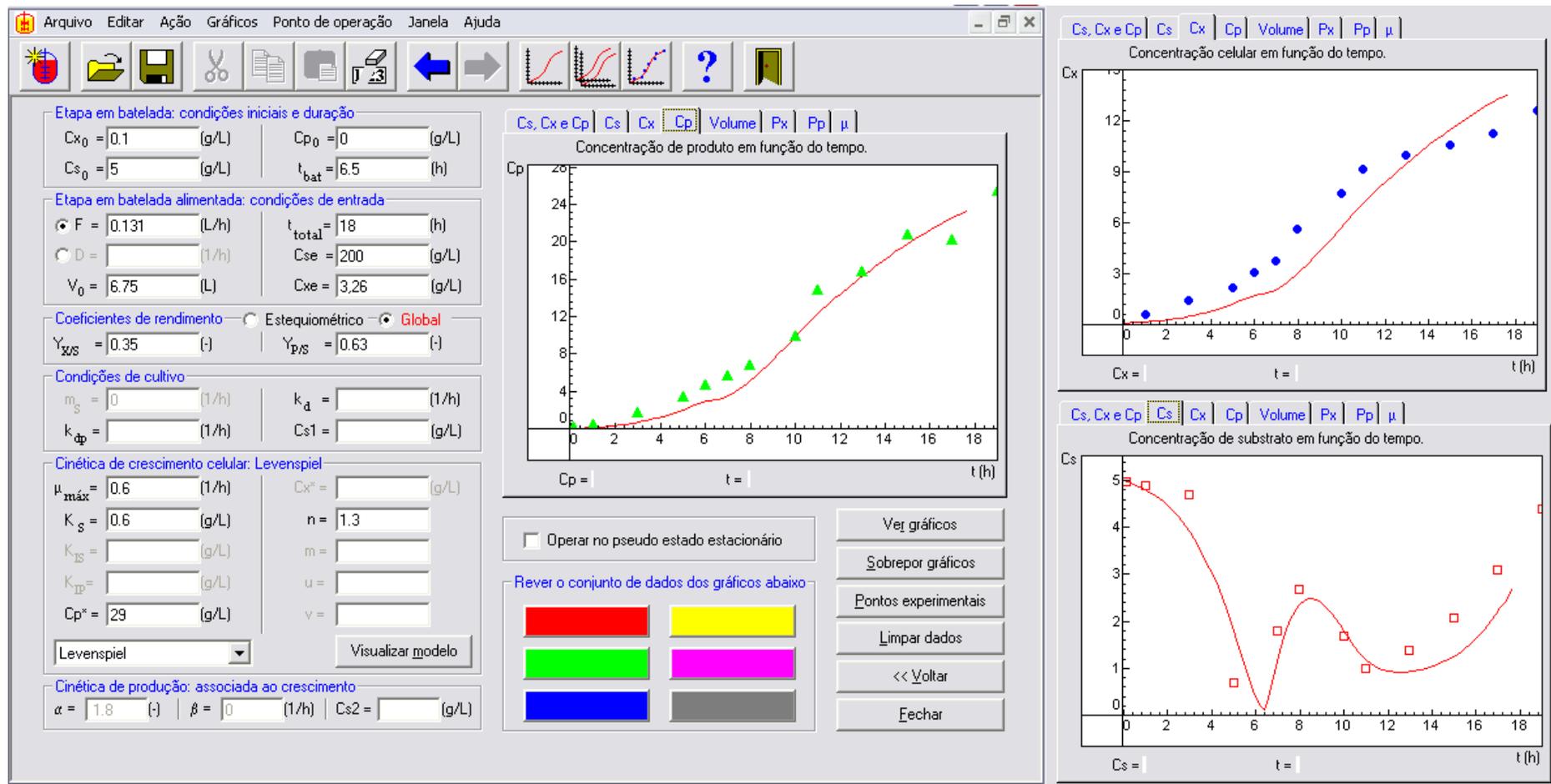
Os CDAVC resultaram em aumento na produção de biomassa e PRP quando comparado com CDAIG. No entanto, os CDAVC apresentaram acúmulo de glicose no biorreator (dados não mostrados), conseqüentemente, aumento da concentração de ácido acético que pode vir a inibir o crescimento celular e a formação de produto.

A concentração de ácido acético passou de 10 g/L em CDAIG, para 25 g/L em CDAVC. Na tentativa de diminuir a formação de ácido e evitar uma possível inibição do crescimento celular devido a presença de metabólitos ácidos, foi realizado cultivo descontínuo alimentado com limitação no fornecimento de glicose, ou seja, a quantidade de substrato fornecida foi controlada de forma não acumular no meio e evitar formação de metabólitos ácidos (LEE *et al.*, 1997).

3.3.2.2 Cultivo descontínuo alimentado com limitação no fornecimento de glicose

No cultivo descontínuo alimentado com limitação no fornecimento de glicose, a vazão de alimentação foi exponencial de forma manter constante a velocidade específica de crescimento (μ) (Eq. 3.1). O valor de μ foi definido com o auxílio do *software* AnaBio 1.0 (SILVA *et al.*, 2004). Os valores dos parâmetros cinéticos utilizados na simulação foram obtidos inicialmente a partir de dados experimentais do cultivo descontínuo alimentado com vazão constante - 1 VVM (ensaio 6). No entanto, estes foram alterados de forma que o modelo se ajustasse aos dados experimentais (figura 3.16). Ao analisar o perfil da velocidade específica de crescimento celular em função do tempo (figura 3.17) gerado pelo AnaBio, nota-se que o menor valor de μ observado no ensaio 6 foi $0,07 \text{ h}^{-1}$. Este valor de μ , foi escolhido para o incremento exponencial da vazão de alimentação no ensaio 7. Deste modo a vazão mássica da fonte de carbono (M_s , em g/h) para este ensaio foi:

$$M_s = 9,66 \cdot \exp^{[0,07(t-t_0)]}$$



SILVA *et al.*, 2004

Figura 3.16: Parâmetros cinéticos do CDAVC - 1VVM utilizados no software AnaBio 1.0 e resultados das simulações.

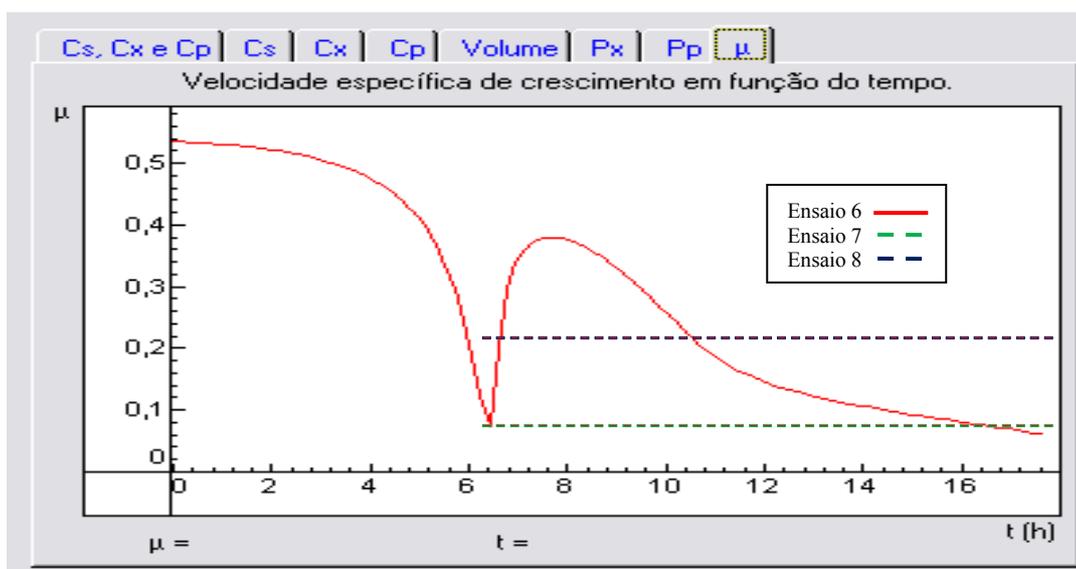


Figura 3.17. Perfil da velocidade específica de crescimento (μ) em cultivo descontínuo alimentado com vazão constante - 1 VVM (ensaio 6) e definição dos valores de μ para os ensaios 7 e 8.

Em CDAVE, a vazão volumétrica de ar foi mantida em 6,7 L/min, e a vazão específica de ar variou entre 1 VVM e 0,85 VVM devido a variação do volume de meio no reator durante a alimentação. A agitação chegou a 478 rpm na quarta hora e então começou a subir lentamente até atingir 576 rpm na décima oitava hora, para então começar a cair até atingir 524 rpm no final do cultivo (23^a hora). A figura 3.18 mostra que a velocidade específica de crescimento (μ) permaneceu no valor máximo nas primeiras 4 horas de cultivo, justamente o período no qual o crescimento foi sustentado pelos nutrientes presentes na peptona de soja e/ou extrato de levedura, sem consumo aparente de glicose (figura 3.20). A medida que a glicose passou a ser o substrato limitante, a velocidade de crescimento diminuiu gradativamente em função da concentração de glicose disponível. Com o início da alimentação em 5,8 h de cultivo, o μ continuou a diminuir gradativamente e só atingiu o valor desejado de $0,07 \text{ h}^{-1}$ a partir da 14^a h de cultivo. Analisando os resultados apresentados nas figuras 3.19 e 3.20, observa-se que após três horas de cultivo, a glicose começou a ser consumida com maior velocidade. A velocidade de produção de CO_2 alcançou $122 \text{ mmol CO}_2/\text{h}$ na sexta hora. Com o início da alimentação a velocidade de produção de CO_2 foi aumentando gradativamente até chegar a $202 \text{ mmol CO}_2/\text{h}$ na décima sétima hora, e então, começou a cair lentamente até $182 \text{ mmol CO}_2/\text{h}$ na 23^a hora. No momento em que o CO_2 começou a cair (17^a hora), a concentração de ácido acético estava em torno de 15 g HA/L e a glicose residual começou a acumular no reator chegando $7,14 \text{ g/L}$ na vigésima terceira hora (figura 3.20).

Neste ensaio verificou-se a formação de ácido acético mesmo durante o período da alimentação, quando o fornecimento de glicose se manteve limitado. O ácido acético foi acumulando no reator e quando a concentração chegou próximo de 15 g HA/L, possivelmente houve inibição no crescimento celular, o que explica a redução na liberação de CO₂ e o acúmulo de glicose no reator (figura 3.20). A figura 3.18 também mostra o perfil crescente da taxa de aplicação: enquanto o volume varia de 6,6 para 7,8 L, a taxa de aplicação vai de 1,3 para 3,8 devido à alta concentração de glicose presente no meio de alimentação. Ao final do cultivo a concentração de biomassa foi de 10 g MS/L, a produção de ácido acético e polissacarídeo capsular foram 23 g HA/L e aproximadamente 1500 mg PRP/L respectivamente (figura 3.19).

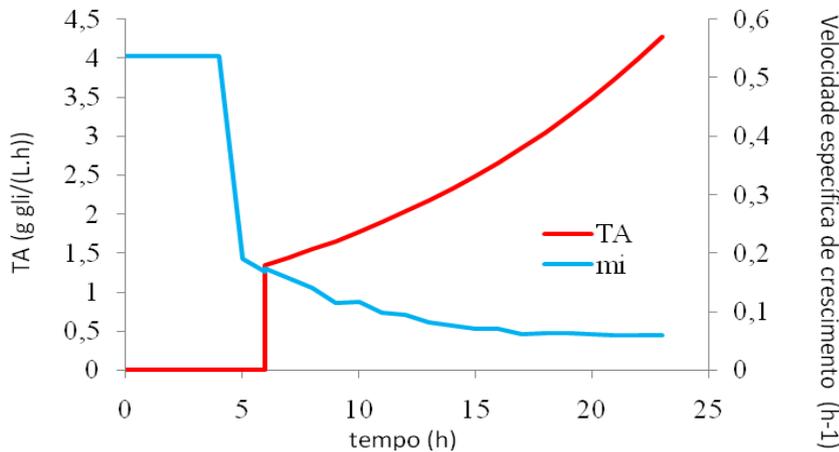


Figura 3.18. Taxa de aplicação e perfil da velocidade específica de crescimento celular em cultivo com limitação no fornecimento de glicose (Ensaio 7).

TA –Taxa de Aplicação.

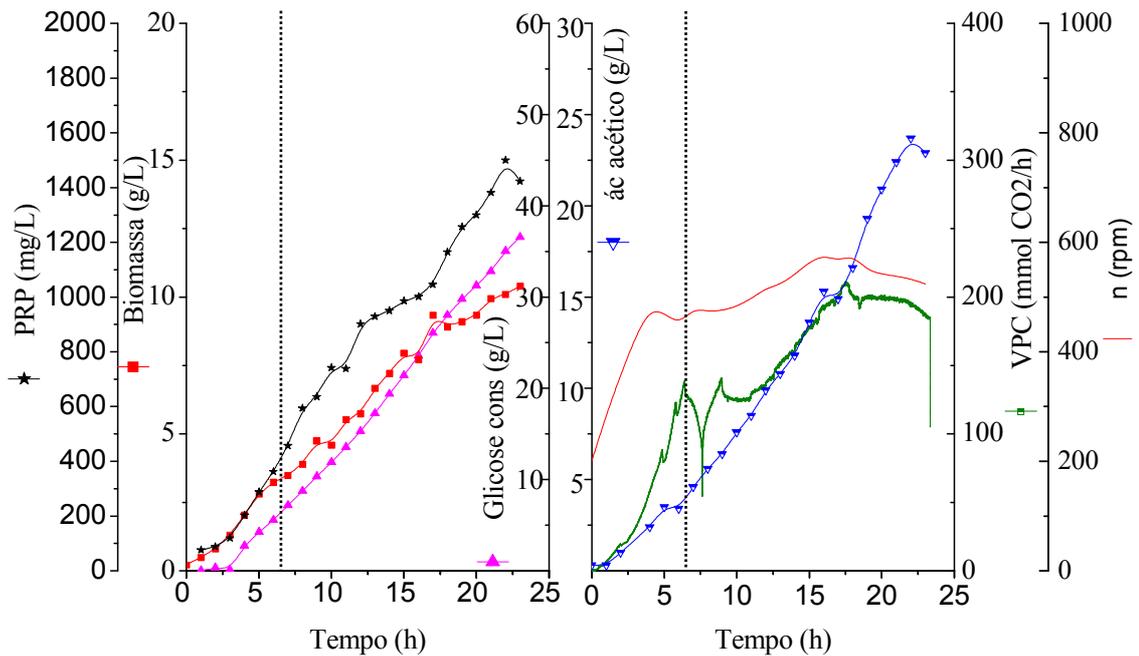


Figura 3.19. Cultivo descontínuo alimentado com vazão exponencial e μ constante em $0,07 \text{ h}^{-1}$ (Ensaio 7). $M_S = 9,66 \cdot \exp^{[0,07(t-t_0)]}$
 Linha pontilhada indica o início da alimentação.
 n = agitação; VPC = velocidade de produção de CO_2 .

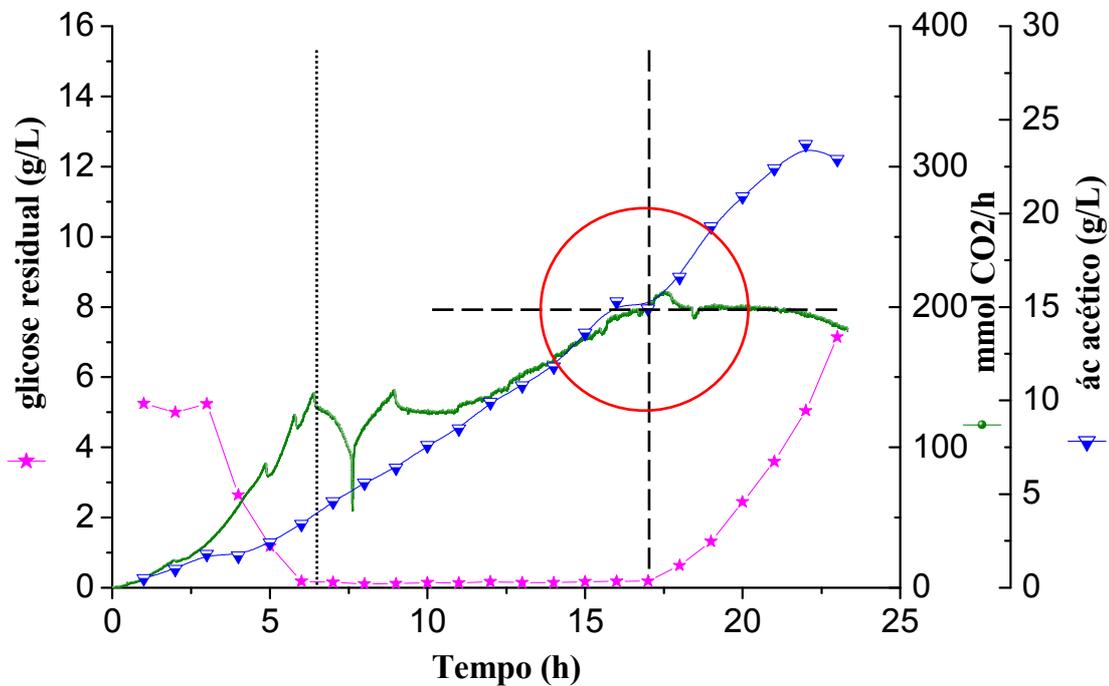


Figura 3.20. Glicose residual, produção de CO_2 e de ácido acético no cultivo com alimentação exponencial e limitação no fornecimento de glicose (Ensaio 7).
 Linha pontilhada indica o início da alimentação; Linha traceja indica a concentração de ácido acético no momento em que ocorreu inibição do crescimento celular.

A produção de ácido acético ocorreu independente da limitação no fornecimento de glicose, diferentemente do observado nos cultivos com *E. coli* recombinante, em que a formação de ácido pode ser controlada ao limitar no fornecimento de glicose (LEE *et al.*, 1997). O mesmo tipo de problema, ou seja, o metabolismo da glicose pelas vias fermentativas mesmo em condições limitadas de fornecimento de glicose, também foi observado em cultivo descontínuo alimentado de *E. rhusiopathiae* (SILVA *et al.*, 2008). Esse fato, juntamente com a baixa produção de CO₂ em cultivos conduzidos em condições aeróbias, foi atribuído pelos autores a possíveis deficiências no metabolismo respiratório dessa bactéria patogênica.

Como o cultivo com limitação no fornecimento de glicose não levou à minimização esperada na formação de ácido acético, foi adotada outra estratégia, a remoção do ácido acético presente no meio de cultivo por meio de um sistema de reciclo de células e perfusão acoplado ao biorreator juntamente com o fornecimento de meio de alimentação fresco.

3.3.2.3 Cultivo descontínuo alimentado com reciclo de células e perfusão

No cultivo descontínuo alimentado com reciclo de células e perfusão (CDAVE+P) foi utilizada vazão exponencial de forma a manter constante a velocidade específica de crescimento (μ) em 0,2 h⁻¹ (Eq. 3.1). O valor de μ para este cultivo foi definido como intermediário ao μ utilizado no ensaio 7, cultivo com limitação em glicose ($\mu=0,07$ h⁻¹) e o valor máximo encontrado na etapa de alimentação do ensaio 6, cultivo com vazão constante - 1VVM ($\mu=0,35$ h⁻¹) (figura 3.17). Deste modo a vazão de alimentação da fonte de carbono (M_s) para este ensaio foi: $M_s = 26,59 \cdot \exp^{[0,2(t-t_0)]}$.

Em CDAVE+P a vazão volumétrica de ar foi também mantida em 6,7 L/min. A agitação chegou a 477 rpm na quarta hora e se estabilizou por um curto período, para, em seguida, voltar a aumentar até atingir 760 rpm na décima primeira hora. A partir deste momento, começou a cair até chegar a 638 rpm no final do cultivo (14^a hora). Com o início da alimentação na 5,5^a h de cultivo, observou-se que o μ foi diferente do desejado (0,2 h⁻¹), variando de 0,4 até 0,3 h⁻¹ até o início da operação em perfusão (9,2^a h), quando μ voltou a diminuir até atingir 0,2 h⁻¹ na 10^a h de cultivo e permanecer aproximadamente nesse valor até a 12^a de cultivo (figura 3.21).

A formação de ácido acético foi acompanhada através do consumo da solução de NaOH, utilizando uma curva de calibração obtida a partir dos dados do ensaio anterior (ensaio 7) para estimar o ácido acético produzido (figura 3.22). Para tanto, a quantidade de NaOH 5M

adicionada ao reator para controle do pH durante o ensaio 7, foi registrada utilizando-se uma balança. A partir dos valores da concentração de ácido acético determinados por HPLC, foi possível estabelecer uma correlação entre a massa de NaOH consumida e a concentração de ácido acético formado (Eq. 3.14). Essa equação foi, portanto, empregada para estimar a produção de ácido acético no ensaio 8 a partir dos dados de consumo de base obtidos em tempo real.

$$HA_F = 0,0469 \cdot NaOH\ cons + 1,263 \quad (3.14)$$

HA_F = ácido acético formado (g/L);
 $NaOH\ cons$ = NaOH consumido (g).

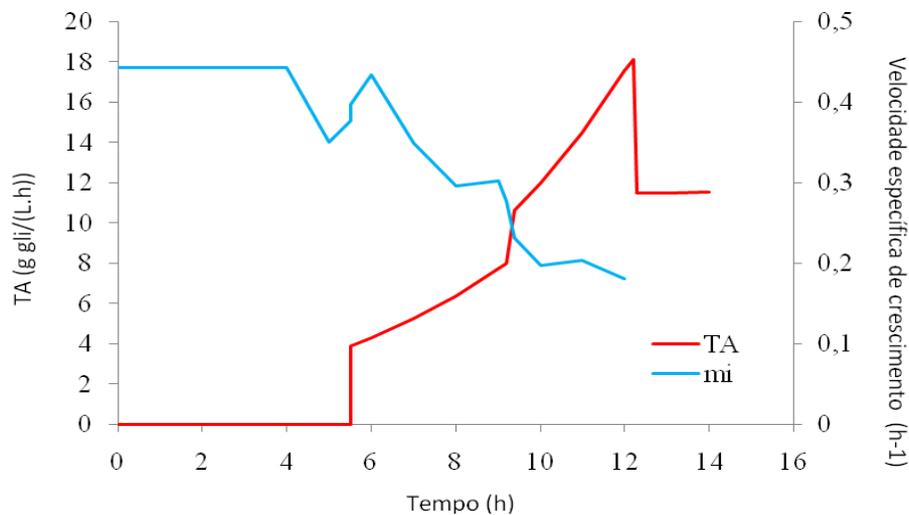


Figura 3.21. Taxa de aplicação e perfil da velocidade específica de crescimento celular do cultivo com vazão exponencial $\mu=0,2\ h^{-1}$ com sistema de reciclo de células e perfusão (Ensaio 8).

TA – Taxa de Aplicação.

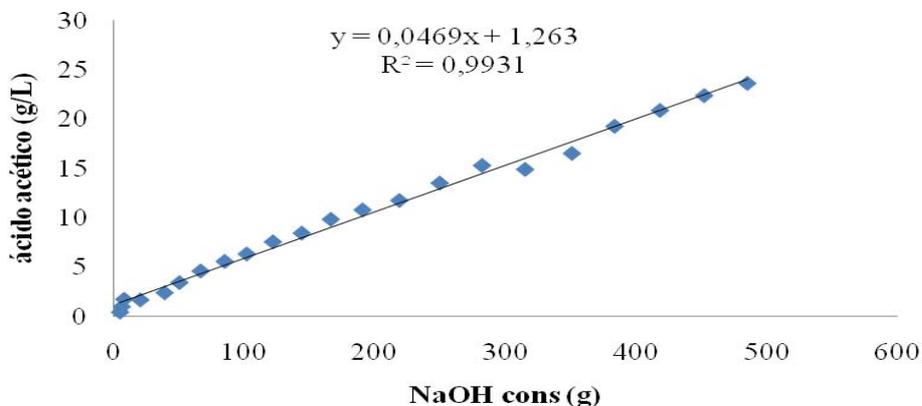


Figura 3.22. Curva de calibração para estimar a formação de ácido acético através do consumo de hidróxido de sódio (Ensaio 7).

Quando a formação de ácido acético estimado em função do consumo de base atingiu valor próximo a 15g/L, concentração esta que resultou em inibição do crescimento celular no ensaio anterior, neste momento um volume de 1,5L da cultura foi removido de uma só vez, utilizando-se o sistema de reciclo de células. Imediatamente após a operação de redução do volume, iniciou-se o sistema de perfusão em operação simultânea com a alimentação. A perfusão foi realizada com vazão exponencial igual àquela utilizada na alimentação, de forma manter o μ constante em $0,2 \text{ h}^{-1}$. A velocidade de produção de CO_2 alcançou $142 \text{ mmol CO}_2/\text{h}$ na quarta hora. Com o consumo total da glicose no reator, o CO_2 caiu a $107 \text{ mmol CO}_2/\text{h}$ (5ª hora de cultivo). Após o início da alimentação, a produção de CO_2 foi subindo gradativamente até atingir $554 \text{ mmol CO}_2/\text{h}$ na 10ª hora, e então, cair até $320 \text{ mmol CO}_2/\text{h}$ na 14ª hora. No momento em que a velocidade de produção de CO_2 começou a cair (10ª hora), a concentração de ácido acético estava em torno de 15 g HA/L . A glicose acumulou no reator, apesar da remoção de $1,5 \text{ L}$ de cultura e da operação em perfusão simultânea à alimentação, chegando a $3,6 \text{ g/L}$ de glicose na 12ª hora. Ao observar a queda do CO_2 , as vazões de alimentação e perfusão foram alteradas para uma vazão constante em 390 mL/h até o final do cultivo. Em seguida, foram adicionados $1,3\text{L}$ de meio fresco ao reator na tentativa de diluir os metabólitos e prolongar o cultivo.

Ao final do cultivo, a concentração de biomassa foi de 18 g MS/L , a produção de ácido acético e polissacarídeo capsular no reator foram 23 g HA/L e aproximadamente 1800 mg PRP/L , respectivamente (figura 3.23).

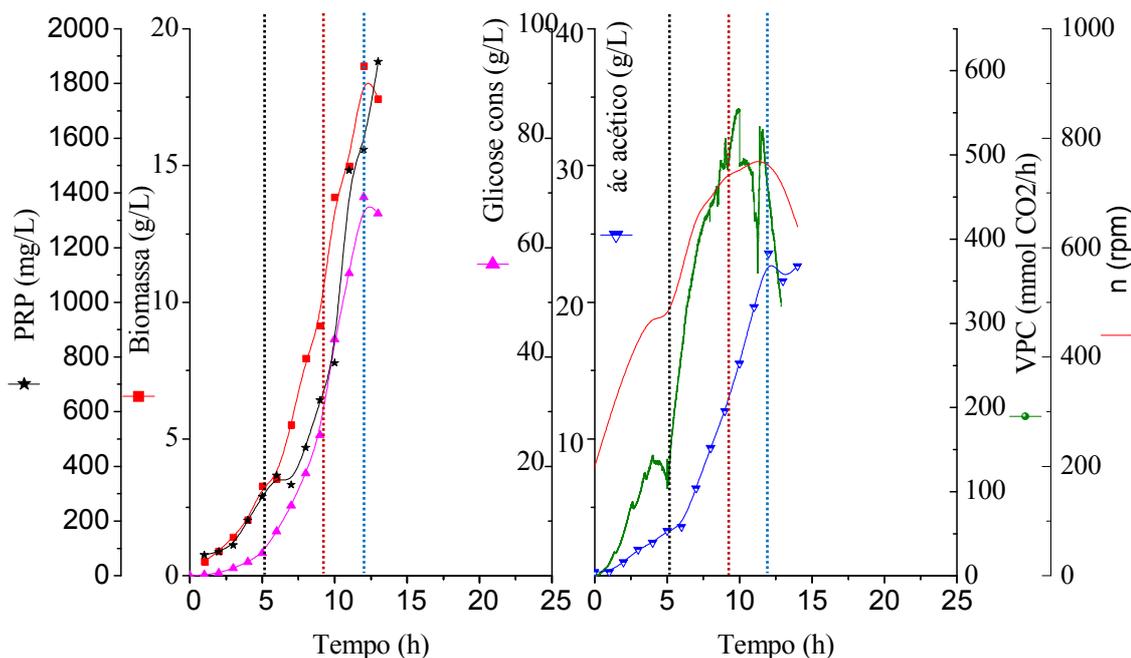


Figura 3.23. Cultivo descontínuo alimentado com vazão exponencial e μ constante em $0,2 \text{ h}^{-1}$ com sistema de reciclo de células e perfusão (Ensaio 8).

$$M_S = 26,59 \cdot \exp^{[0,2(t-t_0)]}$$

Linha pontilhada preta: início da alimentação; Linha pontilhada vermelha: retirada de 1,5L de microfiltrado; Linha pontilhada azul: adição de 1,3L de meio fresco.
 n = agitação; VPC = velocidade de produção de CO_2 .

Durante o cultivo não foram coletadas amostras do microfiltrado para acompanhar as concentrações de ácido e polissacarídeo. Assim, para estimar o ácido acético microfiltrado, foi realizado um balanço de massa, considerando que a concentração do ácido acético na corrente de microfiltrado era igual à concentração do mesmo na corrente de saída do biorreator, que por sua vez deve ser igual à concentração de ácido acético no interior do reator. Assim, a massa total de ácido acético acumulada no reservatório durante o período de operação em perfusão (entre 9,2 e 14 h) foi determinada pela integração numérica da equação (3.15)

$$m_{\text{HAc}} = 20,3 + \int_{14}^{9,2} C_{\text{HAc}} F dt \quad (3.15)$$

onde: m_{HAc} é a massa acumulada de ácido acético no reservatório; C_{HA} é a concentração de ácido acético presente na corrente de microfiltrado e F é a vazão da corrente de microfiltrado, que foi assumida como igual à vazão de alimentação. O valor 20,3 corresponde à massa de ácido acético presente nos 1,5 L de meio retirado na 9,2ª h.

A tabela 3.6 analisa a eficiência do sistema de reciclo de células e perfusão em remover os metabólitos formados. O sistema de microfiltração removeu 39% do volume total de meio, o qual continha 10% do total de polissacarídeo produzido e apenas 18,5% do total de ácido acético formado.

Tabela 3.6. Formação de ácido acético e produção de polissacarídeo em cultivo descontínuo alimentado com vazão exponencial com sistema de reciclo de células e perfusão.

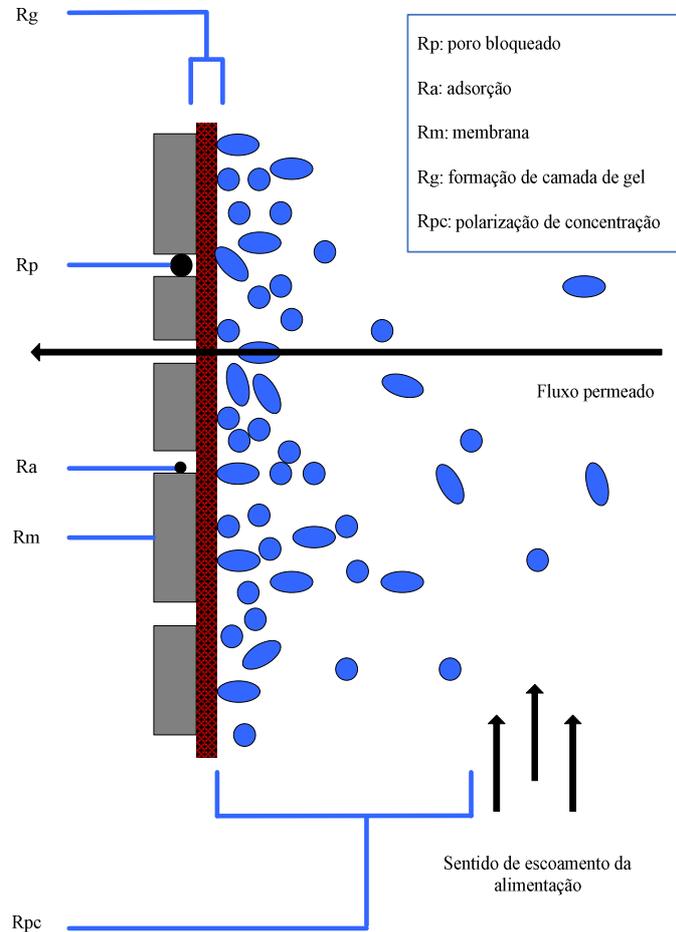
Descrição	HA (g/L)	HA (g)	HA (%)	PRP (mg/L)	PRP (g)	PRP (%)
Reator	22,6	153,7	81,5	1800	12,2	90
microfiltrado	—	34,9 ^(e)	18,5	286	1,3	10
Total		188,4	100		13,6	100

e= estimado

Mesmo com o início da perfusão foi observada que a concentração de ácido acético dentro do reator não diminuiu de forma expressiva, resultando em acúmulo do mesmo, ocasionando provável inibição do crescimento celular. Os motivos que podem estar relacionados ao acúmulo de ácido acético dentro do reator são: a concentração de substrato do meio de alimentação, assim como as vazões de alimentação e de perfusão. A adição de meio em concentração elevada de substrato e a escolha da vazão de alimentação e remoção podem levar a um acúmulo de ácido dentro do reator. A operação do cultivo com uma vazão diferente para a alimentação e para a perfusão, além de ajustes na concentração de glicose no meio de alimentação, poderia resultar em maior eficiência do sistema.

Outro fator que poderia limitar a remoção do ácido acético está relacionado a formação de *fouling* na superfície da membrana de filtração tangencial. O caldo fermentado que circula pelo sistema de microfiltração tangencial durante o cultivo contém células, debris celular, proteínas, lipídeos, polissacarídeos, lipolissacarídeos, ácidos nucléicos e outros componentes oriundos do metabolismo celular. Estas biomoléculas podem se depositar na superfície da membrana, reduzindo a transferência de massa e resultando em baixa eficiência na eliminação de determinados solutos. Fenômenos como polarização e obstrução (*fouling*) podem prejudicar o fluxo da membrana (figura 3.24). A resistência de polarização de concentração (R_{pc}) ocorre devido à maior concentração de moléculas próxima a superfície da membrana resultando em maior resistência na transferência de massa. Já o *fouling* é uma soma de resistências causadas pela adsorção na superfície e nos poros da membrana, que são inerentes ao processo de separação por filtração e levam ao gradativo entupimento da mesma.

A formação de *fouling* tem grande impacto no desempenho da membrana, reduzindo o tempo de vida útil da mesma e aumentando o custo de operação do processo (MULDER, 1951; PESSOA JUNIOR, 2005; WHEELWRIGHT, 1991).



(modificado Jr PESSOA, 2005)

Figura 3.24. Tipos de resistência (R) encontrados na membrana de microfiltração tangencial.

PANORAMA GERAL DOS CULTIVOS REALIZADOS

As tabelas 3.7 e 3.8 apresentam um resumo comparativo dos valores dos principais parâmetros obtidos para as diferentes estratégias de cultivo descontínuo alimentado. A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi calculada na fase exponencial de crescimento inicial do cultivo (antes do início da alimentação). Analisando os valores de $\mu_{\text{máx}}$ (tabela 3.7), nota-se que além da diferença na peptona de soja (ensaios 1 a 4), a vazão específica de ar parece também influenciar este parâmetro, já que os maiores valores foram observados em ensaios conduzidos com vazão específica de ar maiores (ensaios 7 e 8).

Nos primeiros quatro ensaios, cultivos descontínuos com adição intermitente de glicose, buscou-se verificar a influência de duas marcas de peptona de soja (BD e Sigma) e da

vazão específica de ar (0,2 VVM e 0,5 VVM) no crescimento celular e na produção de polissacarídeo capsular. O cultivo com peptona de soja da BD e 0,5 VVM (ensaio 4), apresentou $Y_{P/S}^G$ (33 mg PRP/g S) superior ao cultivo com peptona de soja da BD e 0,2 VVM (ensaio 2), 30 mg PRP/g S. Já o valor de $Y_{HA/S}^G$ foi menor, 0,4 g HA/g S e 0,5 g HA/g S, respectivamente. Além disso, o cultivo com peptona de soja da BD e 0,5 VVM apresentou maior densidade celular (6 g MS/L), produção de polissacarídeo (750 mg PRP/L) e produtividade (63 mg PRP/(L.h)) quando comparado com os demais cultivos com adição intermitente de glicose, provavelmente devido a marca da peptona de soja e a melhor mistura do meio promovida pela maior aeração. É importante ressaltar que devido à alta concentração de fontes de carbono presentes nos hidrolisados de peptona de soja e à diversidade dos mesmos, o cálculo e a análise dos parâmetros relacionados à conversão de glicose em células, ácido acético e PRP ficam comprometidos. A maior evidência dessas fontes contribuir efetivamente para o crescimento é o fato do consumo de glicose só se intensificar de 3 a 5 horas após o início dos cultivos. Diante dos resultados obtidos foram definidas que a peptona de soja da marca BD e a vazão específica de ar em 0,5 VVM para conduzir os ensaios seguintes (5 a 8).

Assim, os ensaios seguintes foram dois cultivos descontínuos alimentados com vazão constante: vazão de alimentação em 77 mL/h conduzido em reator de 7 litros de capacidade nominal e vazão específica de ar variando entre 0,3 a 1,0 VVM (ensaios 5); e vazão de alimentação em 131 mL/h conduzido em reator de 13 litros de capacidade nominal e vazão específica de ar mantida em 1,0 VVM (ensaios 6). O cultivo com vazão constante – 1 VVM apresentou maior produção de polissacarídeo capsular (1600 mg PRP/L) e produtividade (88 mg PRP/(L.h)) que o cultivo com vazão constante 0,3 – 1 VVM (1200 mg PRP/L e 65 mg PRP/(L.h)), provavelmente devido a maior transferência de oxigênio e a melhor mistura do meio proporcionada pelo maior suprimento de ar (1 VVM). Ao comparar a produtividade de polissacarídeo obtida em cultivo com vazão constante – 1 VVM (88 mg PRP/(L.h)) com os dados na literatura de cultivos descontínuos alimentados (aproximadamente 85 mg PRP/(L.h)) (MERRIT *et al.*, 2000) e com vazão gradual (90 mg PRP/(L.h)) (TAKAGI, 2003), os resultados foram semelhantes. É importante notar também que o aumento da vazão de ar contribui para uma mudança no perfil de agitação de modo que velocidades de agitação menores são suficientes para manter a concentração de oxigênio dissolvido no nível desejado, diminuindo o cisalhamento ao qual as células são expostas. Assim, talvez esse fator também

tenha contribuído para o desempenho superior dos cultivos conduzidos com maior vazão de ar.

Os cultivos com alimentação constante (CDAVC – ensaios 5 e 6) produziram mais que o dobro de polissacarídeo quando comparado com cultivo com peptona de soja (BD) e 0,5 VVM com adição intermitente de glicose. O $Y_{P/S}^G$ do cultivo com vazão constante - 1 VVM foi 44 mg PRP/g S contra 33 mg PRP/g S do ensaio com adição intermitente de glicose (BD, 05 VVM). No entanto, o $Y_{HA/S}^G$ foi 0,63 g HA/g S contra 0,4 g HA/g S, passando a concentração de ácido acético de 10 g/L para 25 g/L.

Nos ensaios 5 e 6 houve acúmulo de glicose no reator o que poderia contribuir para a formação de ácido acético. A elevada concentração de ácido pode inibir o crescimento celular e conseqüentemente a formação de produto. Sendo assim, foi utilizado como estratégia o cultivo descontínuo alimentado com limitação no fornecimento de glicose (ensaio 7). Nesta estratégia, houve produção de ácido similar ao dos outros cultivos em que se tinha acúmulo de glicose no meio, como mostram os valores de $Y_{HA/S}^G$ 0,64 g HA/g S e principalmente de $Y_{HA/X}^G$, que atingiu 1,8 g HA/g MS. A densidade celular foi de 10 g MS/L, a produção de polissacarídeo capsular de 1500 mg PRP/L e a produtividade 65 mg PRP/(L.h).

Como a formação de ácido ocorreu mesmo com limitação no fornecimento de glicose, a utilização de sistema de microfiltração para remoção do meio de cultivo com retenção de células foi investigada como estratégia de cultivo. Para tanto, foi realizado o ensaio 8, um cultivo descontínuo alimentado com reciclo de células e perfusão, onde a vazão de alimentação foi exponencial de forma manter constante o $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$. Neste cultivo, a densidade celular foi 18 g MS/L, a produção de polissacarídeo de 1800 mg PRP/L e a produtividade foi 129 mg PRP/(L.h). Esta última foi 35% superior à melhor obtida até então, correspondente ao ensaio 6, com vazão constante – 1 VVM (88 mg PRP/(L.h)), e 30% maior que o maior valor encontrado na literatura (90 mg PRP/(L.h)) obtido em cultivo com alimentação gradual (tabela 3.1). No entanto, observou-se acúmulo de ácido acético no reator levando a provável inibição do crescimento celular. Isso indica a necessidade de definir cuidadosamente as vazões de alimentação e de retirada de meio pelo sistema de perfusão, de preferência usando simulação para melhorar a eficiência do processo.

Tabela 3.7. Valores máximos de biomassa, ácido e produto nas diferentes estratégias de cultivo descontínuo alimentado.

Ensaio	Descrição	$\mu_{\text{máx}}$ h^{-1}	MS _{máx} g/L	HA _{máx} g/L	PRP _{máx} mg/L	Produtividade mg/(L.h)
1	adição intermitente - 0,2VVM – Sigma	0,29	3,6	9,0	400	33
2	adição intermitente - 0,2 VVM – BD	0,33	4,7	9,0	600	50
3	adição intermitente - 0,5 VVM Sigma	0,45	4,5	7,8	550	46
4	adição intermitente - 0,5 VVM – BD	0,34	6,0	10,0	750	63
5	vazão constante 77 mL/h - 0,3 a 1 VVM	0,28	13,0	26,0	1200	65
6	vazão constante 131 mL/h - 1VVM	0,30	12,0	25,0	1600	88
7	vazão exponencial $\mu 0,07$ - 1VVM	0,44	10,0	23,0	1500	65
8	vazão exp. $\mu 0,2 \text{ h}^{-1}$ +reciclo+perfusão -1 VMM	0,44	18,0	28,8 ^(e)	1800	129

e= estimado

Tabela 3.8. Fatores de conversão das diferentes estratégias de cultivo descontínuo alimentado.

Ensaio	Descrição	$Y_{X/S}^G$ gMS/gS	$Y_{P/X}^G$ mgPRP/gMS	$Y_{HA/X}^G$ gHA/gMS	$Y_{P/S}^G$ mgPRP/gS	$Y_{HA/S}^G$ gHA/gS
1	adição intermitente de glicose- 0,2VVM - Sigma	0,12	60	2,1*	19*	0,3*
2	adição intermitente de glicose - 0,2 VVM - BD	0,27	63*	1,1*	30	0,5
3	adição intermitente de glicose - 0,5 VVM Sigma	0,09	69	1,1*	23*	0,4
4	adição intermitente de glicose - 0,5 VVM - BD	0,25	86	1,2	33	0,4
5	vazão constante 77 mL/h - 0,3 a 1 VVM	0,33	94	1,4	33*	0,7
6	vazão constante 131 mL/h - 1VVM	0,29	91	1,3	44	0,6
7	vazão exp. $\mu 0,07 \text{ h}^{-1}$ - 1VVM	0,26	105	1,8*	38*	0,6
8	vazão exp. $\mu 0,2 \text{ h}^{-1}$ + reciclo +perfusão-1 VMM	0,25	98	1,3	38*	0,5

* $b \neq 0$

A figura 3.25 ilustra o perfil do crescimento celular e da formação de polissacarídeo capsular das diferentes estratégias de cultivo descritas neste capítulo. O cultivo descontínuo alimentado com reciclo de células e perfusão (CDAVE+P) se destaca tanto na formação de biomassa quanto na formação de produto, seguido pelo cultivo descontínuo com vazão constante (CDAVC) em 1 VVM. Ambos os cultivos foram finalizados quando ainda apresentavam uma tendência de aumento de PRP, portanto, a continuidade destes processos poderia resultar em maior produção de polissacarídeo.

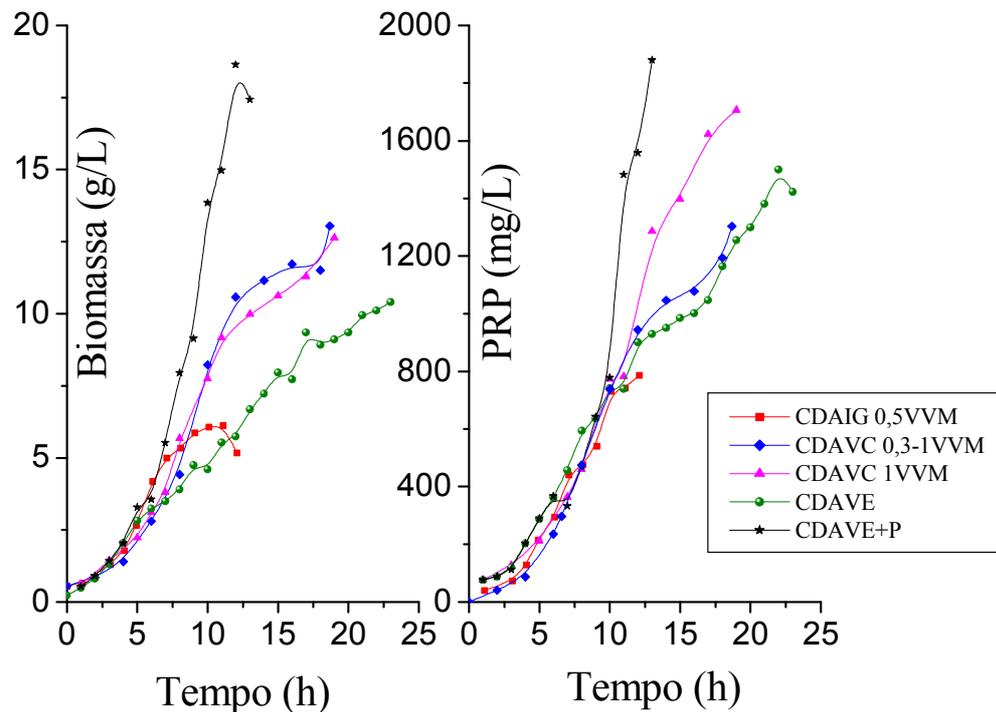


Figura 3.25. Perfil de crescimento celular e formação de polissacarídeo capsular (PRP) nas diferentes estratégias de cultivo descontínuo alimentado.

Diante do atual estágio de desenvolvimento em que os processos de purificação e conjugação da vacina conjugada Hib se encontram, seria necessário a produção de 2,42 kg de polissacarídeo (PRP) por ano (anexo 1). Considerando que a produção de PRP obtida em reatores de até 13 litros de capacidade nas diferentes estratégias de cultivo se mantenha, foram comparados quanto a produção e o número de fermentações necessários em biorreatores com 80 litros de cultura (tabela 3.9). Nota-se que os cultivos com reciclo de células e perfusão (CDAVE+P), vazão constante (CDVC) a 1 VVM e vazão exponencial (CDAVE) resultaram nos menores números de fermentações, sendo 17, 19 e 20 respectivamente.

Tabela 3.9. Volume de cultura e número de fermentações em biorreatores com 80 litros para atender a demanda de 2,42kg PRP/ano.

Descrição	Produção (kg PRP/L)	Volume (L) de cultura	n° de fermentações em reator com 80 L
CDAIG (BD-0,5VVM)	0,00075	3227	40
CDAVC (0,3 -1,0 VVM)	0,0012	2017	25
CDAVC (1VVM)	0,0016	1512	19
CDAVE (1VVM)	0,0015	1613	20
CDAVE+P (1VVM)	0,0018	1344	17

Essas estratégias de cultivo (CDAVE+P, CDVC-1 VVM, CDAVE) são, portanto, fortes candidatos a ser adotado em maior escala para a produção de polissacarídeo capsular em cultivos de *H. influenzae*. Entretanto, a escolha da melhor estratégia de cultivo irá depender da análise de viabilidade econômica.

3.4 CONCLUSÃO

Os cultivos descritos no presente capítulo refletem a experiência acumulada sobre a produção de PRP em cultivos de *H. influenzae b* desde 2000. Em relação aos inúmeros aspectos que influenciam o crescimento da bactéria e a formação da cápsula, foi possível concluir que:

Quanto a influência da composição do meio na produção de PRP, o nutriente “peptona de soja hidrolisada” atua não só como fonte de nitrogênio, mas também como fonte de carbono, devido à significativa presença de carboidratos (30 %) na sua composição. A marca de peptona de soja empregada no meio de cultivo influencia a formação de biomassa, a produção de ácido acético e conseqüentemente a produção de PRP. Diante da importância desse nutriente, é fundamental que estudos voltados para a otimização da formulação do meio de cultivo sejam realizados.

Quanto a minimização da produção de ácido acético, o aumento da vazão de ar para favorecer o metabolismo aeróbio, cultivo conduzido sob condições de limitação por glicose e com reciclo celular e perfusão, foram estratégias empregadas para tentar minimizar ou remover a produção de ácido acético, cujo acúmulo inibe o crescimento celular, prejudicando a produção de PRP e a sua produtividade. Estas estratégias são amplamente empregadas, com sucesso, em cultivos de *E. coli* recombinante, juntamente com o enriquecimento do ar com oxigênio, para evitar a formação de metabólitos inibidores. No caso específico dos cultivos de Hib, o mesmo sucesso não foi alcançado. Apesar do aumento da produtividade obtido (provavelmente devido à diluição do ácido acético pelo meio de alimentação), o metabolismo não foi realmente redirecionado das vias fermentativas para as vias respiratórias, conforme pretendido. Como já foi comentado anteriormente, possível deficiência na cadeia respiratória ou no ciclo do ácido cítrico podem estar relacionadas à inabilidade das células em responder às manipulações nas condições de cultivo. Quanto a estratégia de acoplamento do biorreator à sistema de microfiltração para operação em perfusão com reciclo de células, será avaliada mais detalhadamente na sequência.

Quanto a estratégia de cultivo mais adequada para a produção de PRP, o cultivo com adição intermitente de glicose se mostrou o cultivo mais simples. Não tem adição de meio fresco constantemente, mas tem como etapas críticas o pulso de substrato que é feito através de uma seringa e apresentou baixa produtividade (63 mg PRP/(L.h)).

O cultivo descontínuo alimentado com reciclo de células e perfusão resultou em alta produtividade (129 mg PRP/(L.h)), no entanto, exige equipamentos como membrana de microfiltração tangencial, manômetros, mangueiras, bombas peristálticas e *software* para controle das bombas o que aumenta o custo do processo. Além disso, há grande dificuldade operacional em manter as bombas de alimentação e perfusão na mesma vazão e há maior risco de contaminação. É altamente complexo, exigindo muita atenção do operador.

Os cultivos com vazão de alimentação constante e exponencial com limitação no fornecimento de glicose requerem apenas uma bomba peristáltica e *software* para controle da mesma. O cultivo com limitação no fornecimento de glicose não contribuiu para minimizar a formação de ácido, e o longo tempo de processo resultou em baixa produtividade (65 mg PRP/(L.h)). Já o cultivo com vazão de alimentação constante – 1 VVM apresentou produção de 1,6 g PRP/L, alta produtividade (88 mg PRP/(L.h)) e é relativamente simples de executar.

REFERÊNCIAS

- ASHWELL, G. Colorimetric analysis of sugar. **Methods Enzymology**, v. 3, p. 87-90, 1957.
- BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. Basic Biotechnology, London: Editora Academic Press., cap. 4, 1987.
- CARTY, C. E.; MANCINELLI, R.; HAGOPIAN, A.; KOVACH, F. X.; RODRIGUEZ, E.; BURKE, P.; DUNN, N. R.; MCALEER, W. L.; MAIGETTER, R. Z.; KNISKERN, P. Fermentation studies with *Haemophilus influenzae*. **Industrial Microbiology**, v. 26, p. 763-767, 1985.
- DORAN, P. M. Bioprocess Engineering Principles: Overall and instantaneous yields. London: Editora Academic Press., p. 257-295, 1995.
- DRURY, H. Identification and estimation of pentoses in the presence of glucose. **Archives of Biochemistry**, v. 19, p. 455-466, 1948.
- FLICKINGER, M. C.; DREW, S. W. The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation. United States of America, Editora John Wiley & Sons., 1999.
- GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 153-176, 2009.
- GREAVES, R. I. N. Preservation of living cells by freeze-drying. **Annual New York Academy Science**, v. 85, p. 723, 1960.
- HILLEMANN, M. R.; TAI, J. Y.; TOLMAN, R. L.; VELLA, P. P. Couple *Haemophilus influenzae b* vaccine. United States Patent. 4.459.286, 1984.
- Jr PESSOA, A. E.; KILIKIAN, B. V.; NOBREGA, R.; BORGES, C. P.; HABERT, A. C. Purificação de produtos biotecnológicos: processos de separação por membranas. Editora Manole., cap. 4, p. 37-88, 2005.
- KORZ, D. J.; RINAS, U.; HELLMUTH, K.; SANDERS, E. A.; DECKWER, W. D. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 39, p. 59-65, 1995.
- LEE, S. Y. High cell density culture of *Escherichia coli*. **TIBTECHT**, p. 98-105, 1996.
- LEE, J.; LEE, S. Y.; PARK, S. Fed batch culture of *Escherichia coli* by exponential feeding of sucrose as a carbon source. **Biotechnology Techniques**, v. 11, p. 59-62, 1997.
- LEVENSPIEL, O. Engenharia das reações químicas. São Paulo, Editora Edgard Blücher., v. 1, 1974.
- MAWAS, F.; BOLGIANO, B.; RIGSBY, P.; CRANE, D.; BELGRAVE, D.; CORBEL, M. J. Evaluation of the saccharide content and stability of the first WHO International Standard for *Haemophilus influenzae b* capsular polysaccharide. **Biologicals**, v. 35, p. 235 e 245, 2007.
- MERRITT, J.; ALLARD, G.; TOOLE, L. O.; SWARTZ, R.; LICARI, P. Development and scale-up of a fed-batch process for the production of capsular polysaccharide from *Haemophilus Influenzae*. **Journal of Biotechnology**, v. 81, p. 189-197, 2000.
- MULDER, M. Basic principles of membrane technology. Editora Kluwer Academic Publishers., cap. 7, p. 281-311, 1951.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. Microbiologia: observações microscópicas dos microrganismos. P. 75-76, 1980.
- POSTMA, P. W.; LENGELER, J. W.; JACOBSON, G. R. Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria. **Microbiological Reviews**, p. 543-594, 1993.

RODE, B.; ENDRES, C.; RAN, C.; STAHL, F.; BEUTEL, S.; KASPER, C.; GALUSKA, S.; GEYER, R.; MÜHLENHOFF, M.; GERARDY-SCHAHN, R.; SCHEPER, T. Large-scale production and homogenous purification of long chain polysialic acids from *E.coli* K1. **Journal of Biotechnology**, v. 135, p. 202-209, 2008.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI W. Biotecnologia Industrial. São Paulo, Edgard Blücher., v. 2, 2001.

SHULER, M. L.; KARGI, F. Bioprocess Engineering: Basic Concepts. 2. ed. Prentice Hall PTR., 2001.

SILVA, F. H.; BADINO, A.C. Software AnaBio 1.0 Um programa para análises de biorreatores. Departamento de Engenharia Química – UFSCar. Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ-IC e COBEQ, 2004

SILVA, A. J.; BAPTISTA NETO, A.; GIORDANO, R. C.; CILENTO, M. C.; ZANGIROLAMI, T. C. Bioreactor aeration conditions modulate growth and antigen expression during *Erysipelothrix rhusiopathiae* cultivation. **Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 23-31, 2008.

SUKUPOLVI-PETTY, S.; GRASS, S.; ST GEME III, J. W. The *Haemophilus influenzae* type b *hcsA* and *hcsB* gene products facilitate transport of capsular polysaccharide across the outer membrane and are essential for virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 3870-3877, 2006.

TAKAGI, M.; CABRERA-CRESPO, J.; BARUQUE-RAMOS, J.; ZANGIROLAMI, T. C.; RAW, I.; TANIZAKI, M. Characterization of polysaccharide production of *Haemophilus influenzae* type b and its relationship to bacterial cell growth. **Biochemistry and Biotechnology**, v. 110, p. 91-100, 2003.

TAKAGI, M. Produção e purificação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b. Tese (Doutorado em biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

TAKAGI, M.; CABRERA-CRESPO, J.; ZANGIROLAMI, T. C.; RAW, I.; TANIZAKI, M. Improved cultivated conditions for polysaccharide production by *H. influenzae* type b. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 182-188, 2006.

WARD, O. P. Fermentation Biotechnology. Editora John Wiley & Sons., v. 3, p. 38-58, 1989.

WHEELWRIGHT, S. M. Protein Purification: Design and scale up of downstream processing. Hanser Publisher., cap. 9, p. 99-125, 1991.

Capítulo 4

Planejamento experimental

*Melhoramento da composição do meio de cultura para cultivos de *H. influenzae* tipo b.*

4.1 O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Em processos fermentativos a formulação do meio de cultura é extremamente crítica, podendo influenciar diretamente no crescimento celular e na síntese do produto de interesse. Devido à diversidade de componentes presentes nos meios de cultivo, principalmente nos meios considerados complexos, o estudo de cada variável isoladamente demandaria muito tempo e experimentos a serem realizados. Uma forma de estudar várias variáveis ao mesmo tempo com menor número de ensaios é o planejamento experimental (KENNEDY e KROUSE, 1999; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

O planejamento experimental é fundamentado na teoria estatística e consiste em aplicar modelos matemáticos para predizer, por exemplo, a melhor composição de meio de cultura para um determinado microrganismo. Esta metodologia estabelece correlações entre as variáveis independentes (fatores) e uma ou mais variáveis dependentes (respostas) de forma a observar efeitos sinérgicos ou antagônicos dos fatores sobre as respostas (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Em um planejamento fatorial completo, se K variáveis independentes são fixadas em N níveis, terão que ser realizados N^K ensaios, correspondentes a todas as combinações entre todos os níveis de todos os fatores. A adição de pontos axiais ao fatorial permite ajustar um polinômio de segunda ordem aos dados experimentais, que contém ainda todos os efeitos de interação, e representar graficamente o polinômio ajustado como uma superfície. Os pontos axiais podem ser escolhidos de diferentes maneiras, uma delas é pelo posicionamento nos níveis $\pm \alpha$, onde $\alpha = (N^K)^{1/4}$. Quando os pontos axiais são assim definidos, a combinação do planejamento fatorial completo com os pontos axiais é denominada Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (KENNEDY e KROUSE, 1999; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

A metodologia de análise por superfície de resposta permite a visualização dos resultados em gráficos tridimensionais ou curvas de contorno, nos quais cada resposta é representada em função de duas variáveis independentes (KENNEDY e KROUSE, 1999). A partir da análise das superfícies ou das curvas de contorno obtidas, é possível identificar as condições de ótimo que levam à maximização (ou minimização) de uma resposta ou combinação de respostas. Essa metodologia vem sendo amplamente aplicada em estudos de otimização, como por exemplo, na otimização das variáveis de processos (temperatura, pH e agitação) de produção de polissacarídeo capsular por *Neisseria meningitidis* sorogrupo C (HENRIQUES *et al.*, 2006).

4.1.1 Meio de Cultura para *Haemophilus influenzae*

O meio de cultura é uma mistura de componentes nutricionais necessária ao crescimento microbiano e que deve atender às necessidades do grupo, família, gênero e espécie do microrganismo de interesse. A formulação do meio deve levar em consideração as fontes de energia e carbono assim como exigências nutricionais do microrganismo como suplementação do meio com vitaminas, aminoácidos ou co-fatores (TRABULSI *et al.*, 1999). O *Haemophilus influenzae* é considerado um microrganismo fastidioso, necessitando de micronutrientes para o seu desenvolvimento. Pelo fato de apresentar deficiência em seu sistema enzimático, é necessário o fornecimento de fatores de crescimento como o NAD e hemina na composição do meio de cultura ou então o uso de meios que contenham esses componentes, como por exemplo, o BHI (*Brain Heart Infusion*). O meio de cultura inicialmente descrito em patente para produção em escala industrial do polissacarídeo capsular de *H. influenzae* tipo b era composto por peptona de origem animal como principal fonte de nitrogênio e suplementado com extrato de levedura, glicose, hemina, NAD e sais inorgânicos (HILLEMANN *et al.*, 1984). Embora ideal para o seu crescimento, meios complexos contendo componentes de origem animal como o BHI são inadequados para a produção de vacina devido ao risco de desenvolvimento de doenças causadas por *prions* (JAYME *et al.*, 2000). Carty *et al.* (1985) testaram quatro diferentes meios de cultura para a produção de polissacarídeo pelo *H. influenzae*: 1) BHI suplementado com NAD e hemina; 2) BHI modificado, substituindo-o por peptona de soja; 3) meio de casaminoácido e 4) meio composto de peptona de soja e extrato de levedura designado como meio MP. Os resultados de seus estudos indicaram que o meio MP propiciou melhor desenvolvimento celular e produção de

polissacarídeo. Os estudos de Carty contribuíram para a definição do meio de cultura baseado em peptona de soja utilizado pela indústria farmacêutica para o cultivo de *Haemophilus influenzae* b a fim de produzir a vacina contra este microrganismo (CARTY *et al.*, 1985).

O meio definido para cultivo de *H. influenzae* tipo b (Hib) tem sido utilizado para o estudo do metabolismo deste microrganismo. No entanto, o cultivo em meio definido resulta em baixa densidade celular e produção de polissacarídeo capsular, o que torna o seu uso inviável em escala industrial (HERRIOT *et al.*, 1970; COLEMANN *et al.*, 2003).

Em 2003, Takagi *et al.* estudaram o melhoramento do meio de cultura estabelecido por Carty *et al.* no tocante às concentrações de NAD e Hemina. (TAKAGI *et al.*, 2003). No entanto, fontes de carbono e nitrogênio também podem afetar o crescimento celular e porventura a produção de polissacarídeo. A influência da concentração de fontes de carbono e nitrogênio na produção de polissacarídeo foi observada para *Klebsiella aerogenes*, *Xanthomonas campestris* e *Streptococcus pneumoniae* 23F. Para estes três microrganismos, a produção do polímero xantana ou de polissacarídeo é favorecida em altas concentrações de fonte de nitrogênio (WILKINSON, 1958; GONÇALVES *et al.*, 2002; KUHNERT e CHRISTENSEN, 2008).

Haemophilus influenzae tem sido estudado exaustivamente do ponto de vista da microbiologia molecular e epidemiologia. Entretanto, desde a produção da primeira vacina contra o Hib em 1985, poucos são os registros dedicados ao melhoramento da composição do meio de cultura ou mesmo do processo de produção de polissacarídeo de maneira a contribuir no aumento da produção de polissacarídeo. Além disso, as poucas informações disponíveis estão protegidas por patentes (KUO, 1983; FINN, 1993; MAITRE-WILMOTTE *et al.*, 2009).

Planejamento experimental e metodologia de análise de superfície de resposta têm sido amplamente utilizadas em estudos dedicados à formulação do meio em cultivos bacterianos de maneira a gerar resultados mais robustos com menor número de ensaios e tempo (KENNEDY e KROUSE, 1999; MACEDO *et al.*, 2002; RODRIGUES e IEMMA, 2005; KUMARI *et al.*, 2008).

Neste capítulo foi descrito o uso de metodologias de planejamento experimental com o objetivo de melhorar a composição do meio de cultura para o cultivo de *H. influenzae* b buscando identificar composições de meio que resultem no aumento do crescimento celular e da produção volumétrica de polissacarídeo capsular.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Microrganismo

Foi utilizado o microrganismo descrito no item 3.2.1 do capítulo 3.

4.2.2 Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado para o planejamento experimental teve como base o meio proposto por Takagi *et al* (2003), conforme descrito no item 3.2.3.3 do capítulo 3.

4.2.3 Planejamento Experimental

Para melhoramento da composição do meio de cultura no tocante à relação carbono/nitrogênio foi utilizada a metodologia de planejamento experimental. Foram considerados como variáveis independentes as concentrações de peptona de soja, o extrato de levedura e a glicose, e como variáveis dependentes a densidade óptica e a concentração de polissacarídeo capsular. Adotou-se uma estratégia de planejamento experimental, o qual foi conduzido em duas etapas seguidas por ensaios de validação para a região de ótimo.

4.2.4 Primeiro Delineamento Composto Central Rotacional

Foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^3 , com 6 pontos axiais e 6 repetições no ponto central, totalizando 20 ensaios. Os valores escolhidos para os diferentes níveis são apresentados na tabela 4.1 e a matriz completa para o planejamento está representada na tabela 4.3.

Tabela 4.1. Concentração das variáveis independentes nos diferentes níveis (1º DCCR).

	-1,41	-1	0	+1	+1,41
EL(g/L)	0,8	2,0	5,0	8,0	9,3
S (g/L)	3,0	5,0	10,0	15,0	17,0
G (g/L)	0,8	2,0	5,0	8,0	9,3

Extrato de levedura – EL; peptona de Soja – S; Glicose – G.

4.2.4.1 Meio de cultivo do 1º Delineamento Composto Central Rotacional

O meio de cultivo utilizado no 1º DCCR foi definido com auxílio dos dados da literatura (CARTY *et al.* 1985). Os valores das concentrações das variáveis independentes extrato de levedura (EL), peptona de soja (S) e glicose (G) no ponto central (PC) foram aqueles propostos por Carty *et al.* (1985). Os níveis mínimos e máximos foram definidos partindo dos valores do PC e considerando os pontos axiais, de forma que as concentrações não assumissem valores negativos (tabela 4.1). Foi utilizado $\alpha = \pm 1,41$, valor erroneamente encontrado na literatura (BARROS *et al.*, 2003).

4.2.4.2 Procedimento experimental do 1º DCCR

O pré inóculo foi preparado transferindo-se 50 µL da suspensão bacteriana armazenada em freezer a -70°C e/ou nitrogênio líquido, contendo aproximadamente $1,0 \times 10^{10}$ UFC/mL para um frasco *erlenmeyer* de 300 mL, com 30 mL de meio de cultura estéril. O pré inóculo foi incubado em jarra com vela de forma gerar atmosfera de 5-6 % de CO₂ a 37°C por 6 horas e, em seguida, submetido a uma agitação 200 rpm, 37°C por um período de 14 horas.

A quantidade de inóculo que resultasse em DO_{540nm} 0,15 foi transferida para frascos *erlenmeyer* de 500 mL contendo 50 mL de meio de cultura estéril específico, e incubados 300 rpm a 37°C.

Amostras foram coletadas em intervalos regulares de tempo para a leitura de densidade óptica e para determinação da concentração de polissacarídeo capsular.

4.2.5 Segundo Delineamento Composto Central Rotacional

O segundo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi um 2^3 , com 6 pontos axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios. Os valores escolhidos para os diferentes níveis são apresentados na tabela 4.2 e a matriz completa para o planejamento está representada na tabela 4.6.

Tabela 4.2. Concentração das variáveis independentes nos diferentes níveis (2° DCCR).

	-1,68	-1	0	+1	+1,68
EL(g/L)	0	1,0	2,5	4,0	5,0
S (g/L)	0	2,0	5,0	8,0	10,0
G (g/L)	5,0	7,0	10,0	13,0	15,0

Extrato de levedura – EL; peptona de soja – S; Glicose – G.

4.2.5.1 Meio de cultivo do 2° Delineamento Central Rotacional

O meio de cultivo utilizado no 2° DCCR foi definido a partir dos resultados do 1° DCCR (item 4.2.4.). Os valores do ponto central para as variáveis independentes concentrações de extrato de levedura e de peptona de soja foram definidos como a metade da concentração do PC do planejamento anterior, e o valor da concentração de glicose foi definido como o dobro da concentração do PC do planejamento anterior. Os valores mínimos e máximos foram definidos partindo dos valores definidos como PC e considerando a inclusão dos pontos axiais, de forma que as concentrações não assumissem valores negativos (tabela 4.2). Neste planejamento, foi utilizado como expansão em estrela $2^{(n/4)}$, sendo n o número de variáveis, resultando em $\alpha \pm 1,68$ (RODRIGUES e IEMMA, 2005)

4.2.5.2 Procedimento experimental do 2° DCCR

O mesmo procedimento experimental descrito em 4.2.4.2 foi empregado para a produção de pré inóculo no 2° planejamento experimental. Porém, uma quantidade de inóculo que resultasse em DO_{540nm} final de 0,1 foi transferida para frascos *erlenmeyer* de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura estéril, incubado a 300 rpm e 37°C.

Amostras durante o cultivo foram retiradas em intervalos regulares de tempo para a leitura da densidade óptica e para determinação da concentração do polissacarídeo capsular.

4.2.6 Validação dos Experimentos em Frascos Agitados e em Biorreator

Ensaio de validação foram realizados com o melhor meio de cultivo (MMC) e na condição do ponto central (CPC), como referência. Estes ensaios foram conduzidos em frascos agitados (*shaker*) e em biorreator.

4.2.6.1 Validação em frascos agitados

A mesma metodologia descrita no item 4.2.5.2 foi empregada para a realização dos ensaios de validação em frascos agitados.

4.2.6.2. Validação em Biorreator

Foi realizado cultivo descontínuo em reatores com 4,5 litros de meio de cultura. Os biorreatores e as condições de cultivo são os mesmos descritos no capítulo 3 (itens 3.2.6 e 3.2.7, respectivamente).

Amostras durante o cultivo foram coletadas em intervalos regulares de tempo para leitura da densidade óptica, determinação da concentração celular, de glicose, metabólitos e polissacarídeo capsular.

4.2.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *Statistica*[®] 7.0, o qual permitiu avaliar os efeitos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes.

O p-valor foi utilizado como parâmetro para identificar efeitos significativos e refinar os dados eliminando os termos não significativos. A análise de variância (ANOVA) forneceu o valor do coeficiente de regressão (R^2) e outros dados que permitiram realizar o teste F, imprescindível para avaliar o ajuste do modelo aos dados experimentais. A partir dos modelos

que representassem bem os dados experimentais foram geradas superfícies de resposta de forma ilustrar os efeitos das variáveis independentes na variável dependente.

4.2.8 Escolha do Melhor Meio de Cultivo

Através da análise dos gráficos tridimensionais de superfície de resposta e das curvas de contorno do 2º DCCR foi definido o melhor meio de cultivo (MMC), aquele correspondente à região de ótimo, na qual maior crescimento celular e produção de polissacarídeo foram previstos pelo modelo.

4.2.9 Metodologia Analítica

4.2.9.1 Crescimento celular

O crescimento celular foi acompanhado conforme a metodologia descrita no item 3.2.9.2 do capítulo 3.

4.2.9.2 Determinação da concentração de polissacarídeo capsular

A concentração do polissacarídeo foi realizada conforme a metodologia descrita no item 3.2.9.4 do capítulo 3.

4.2.9.3 Determinação da concentração de glicose e ácido acético

A concentração de glicose residual e a produção de ácido acético foram determinadas conforme a metodologia descrita no item 3.2.9.5 do capítulo 3.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O planejamento experimental é uma metodologia que permite analisar mais de uma variável ao mesmo tempo assim como as interações entre as mesmas. Esta metodologia foi aplicada para identificar as melhores concentrações das fontes de carbono e nitrogênio que resultassem no maior crescimento celular e produção de polissacarídeo capsular pelo *Haemophilus influenzae* b. Os resultados obtidos nos dois planejamentos experimentais realizados são apresentados e discutidos a seguir.

4.3.1 Planejamento Experimental 1– Primeiro Delineamento Composto Central Rotacional

Para este estudo foram utilizadas como variáveis independentes as concentrações de peptona de soja (S), extrato de levedura (EL) e glicose (G). Os ensaios foram conduzidos em frascos agitados (*shaker*) tendo como variáveis dependentes a maior densidade óptica (DO_{540nm}) e a maior produção de polissacarídeo capsular (PRP).

O planejamento contém 3 variáveis independentes e 2 dependentes e assim sendo, optou-se por fazer um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), cujos valores reais e codificados para os níveis estão relacionados na tabela 4.1.

A tabela 4.3 mostra a matriz contendo os 20 ensaios realizados e as respectivas respostas. Destes, 8 ensaios correspondem ao planejamento fatorial, 6 ensaios correspondem aos pontos axiais, além dos 6 ensaios no ponto central. Os maiores valores de densidade óptica e produção de polissacarídeo foram encontrados nos ensaios 6, 7, 8 e 13, onde os níveis de glicose foram +1 e +1,41.

Tabela 4.3. Matriz do 1º DCCR com os níveis codificados e as respostas: concentração de polissacarídeo capsular e densidade óptica.

Ensaio	S	EL	G	PRP (mg/L)	DO _{540nm}
1	-1	-1	-1	193	2,5
2	+1	-1	-1	236	4,1
3	-1	+1	-1	208	3,7
4	+1	+1	-1	227	5,0
5	-1	-1	+1	384	8,5
6	+1	-1	+1	409	8,9
7	-1	+1	+1	463	9,1
8	+1	+1	+1	447	11,0
9	+1,41	0	0	385	8,3
10	-1,41	0	0	329	5,9
11	0	+1,41	0	228	7,1
12	0	-1,41	0	353	5,2
13	0	0	+1,41	480	11,8
14	0	0	-1,41	71	2,4
15	0	0	0	340	7,2
16	0	0	0	333	7,1
17	0	0	0	336	6,8
18	0	0	0	336	7,6
19	0	0	0	331	7,6
20	0	0	0	322	7,7

Extrato de levedura – EL; peptona de Soja – S; Glicose – G.

4.3.1.1 Análise estatística e da superfície de resposta - variável dependente densidade óptica, 1º DCCR

A análise estatística para a variável dependente densidade óptica (DO_{540nm}) foi realizada considerando o valor do nível de significância (α) igual a 0,1. Os termos estatisticamente significativos foram glicose (linear), peptona de soja (linear) e extrato de levedura (linear e quadrático). Os termos com p-valor maior que 0,1 foram considerados estatisticamente não significativos, sendo estes excluídos do modelo refinado.

Após a exclusão dos termos não significativos, foi gerada a tabela de regressão (tabela 4.4) seguida pela análise de variância (ANOVA) (tabela 4.5). A glicose (linear) se mostrou o termo de maior efeito (tabela 4.4). O valor para o coeficiente de regressão foi 0,9806 e o F_{calc} oitenta vezes maior que o F_{tab} , indicando que o modelo (Eq. 4.1) é estatisticamente significativo, ajustando-se bem aos dados experimentais com nível de confiança de 90%. O modelo pode ser

considerado estatisticamente significativo quando o valor de F_{calc} é de três a quatro vezes superior ao de F_{tab} (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Tabela 4.4. Regressão do 1º DCCR, variável dependente maior densidade óptica.

Fatores	Coeficiente	p-valor	Limite de confiança	
			-90%	+90%
Média/Interação	7,238	0,000000	7,028	7,447
S (L)	0,721	0,000014	0,520	0,922
EL (L)	0,619	0,000074	0,418	0,820
EL (Q)	-0,584	0,000573	-0,819	-0,348
G (L)	2,971	0,000000	2,770	3,172

Coeficiente de regressão: Var. dep. = $DO_{540\text{nm}}$; $\alpha = 0,1$; $R^2 = 0,9806$

Tabela 4.5. Análise de variância do 1º DCCR, variável dependente maior densidade óptica.

Variação	SQ	GL	QM	F_{calc}
Regressão	119,49	4	29,87	189,78
Resíduo	2,36	15	0,16	
Total	121,85	19		

$F_{\text{tab } 0,1, 4, 15} = 2,36$
 SQ = soma dos quadrados; GL = grau de liberdade e QM = quadrado médio

$$DO_{540\text{nm}} = (7,24 \pm 0,12) + (0,72 \pm 0,11).S + (0,62 \pm 0,11).EL + (2,97 \pm 0,11).G - (0,58 \pm 0,13).EL^2 \quad (4.1)$$

A partir do modelo (Eq. 4.1) gerado pelo *Statistica*® foi construída a superfície de resposta da variável dependente densidade óptica em função das variáveis estatisticamente significativas: peptona de soja, extrato de levedura e glicose.

Ao analisar a superfície de resposta da $DO_{540\text{nm}}$ em função dos fatores extrato de levedura e peptona de soja (figura 4.1), os maiores valores de $DO_{540\text{nm}}$ (8,0) foram observados com extrato de levedura na faixa entre -0,25 e +1,25 (4,25 g EL/L e 8,75 g EL/L) e a peptona de soja acima de +1,5 (17,5 g S/L).

Para as superfícies de resposta da $DO_{540\text{nm}}$ em função dos fatores glicose e peptona de soja (figura 4.2), e $DO_{540\text{nm}}$ em função dos fatores glicose e extrato de levedura (figura 4.3), os

maiores valores de DO_{540nm} foram observados com a glicose acima de +1,5 (9,5 g G/L) e quaisquer valores para as concentrações de extrato de levedura e peptona de soja.

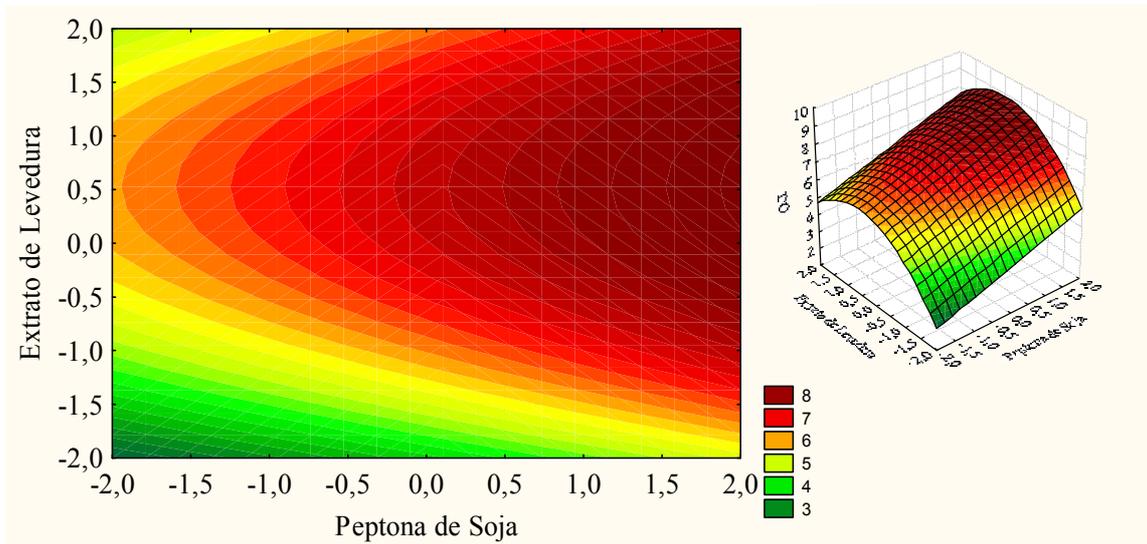


Figura 4.1. Superfície de resposta do 1º DCCR, densidade óptica (DO_{540nm}) em função da concentração de extrato de levedura (EL) e peptona de soja (S).

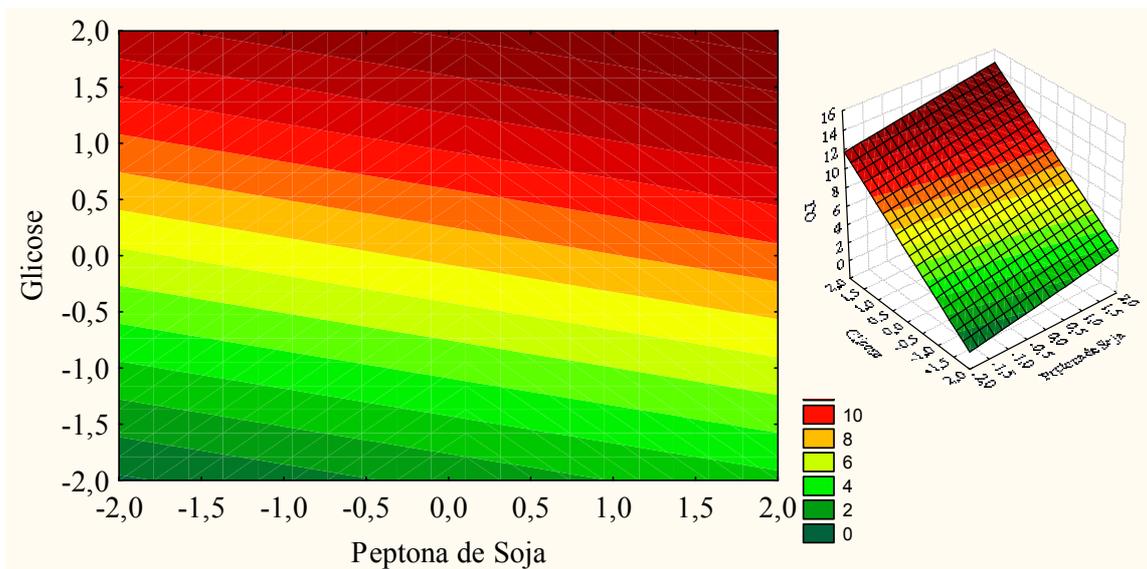


Figura 4.2. Superfície de resposta do 1º DCCR, densidade óptica (DO_{540nm}) em função da concentração de glicose (G) e peptona de soja (S).

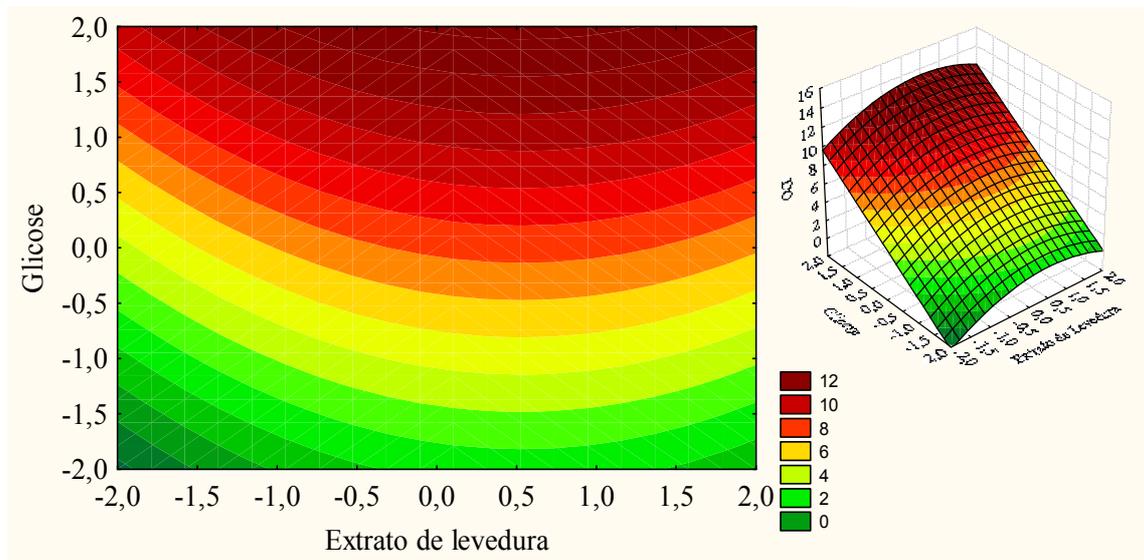


Figura 4.3. Superfície de resposta do 1º DCCR, densidade óptica (DO_{540nm}) em função da concentração de glicose (G) e extrato de levedura (EL).

4.3.1.2 Análise estatística e de superfície de resposta - variável dependente polissacarídeo capsular, 1º DCCR

A análise estatística da variável dependente polissacarídeo capsular (PRP) foi primeiramente realizada considerando o valor de nível de significância (α) igual a 0,1, sendo que o único termo que se mostrou estatisticamente significativo para esse valor de α foi a concentração de glicose (linear) (figura 4.4). Esse resultado indica que a concentração de glicose foi o substrato limitante da produção de PRP, podendo ter mascarado o efeito dos outros fatores. Sendo assim, foi realizado um novo planejamento experimental no qual foram redefinidas as concentrações dos fatores em cada nível de forma a evitar o efeito limitante da concentração de glicose.

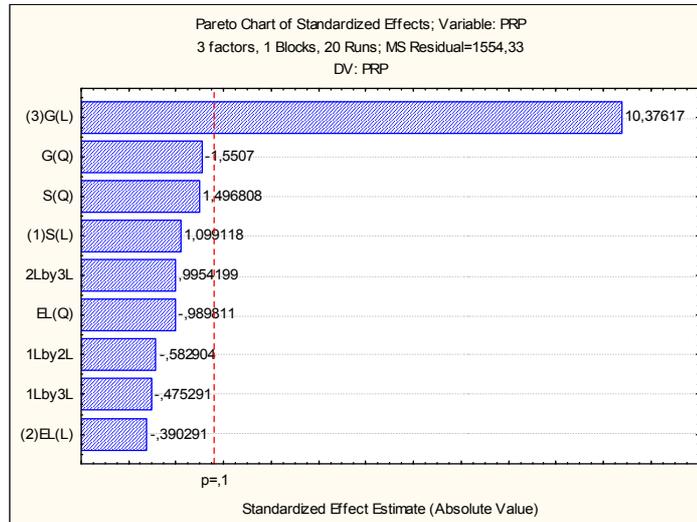


Figura 4.4. Pareto do 1º DCCR, variável dependente polissacarídeo capsular (PRP); $\alpha = 0,1$.

4.3.2 Planejamento Experimental 2 - Segundo Delineamento Composto Central Rotacional

Para o segundo planejamento experimental, o qual consistiu em um novo Delineamento Composto Central Rotacional (2º DCCR), foram utilizadas as mesmas variáveis independentes e dependentes do planejamento anterior. No entanto, a concentração dos fatores em cada nível foi redefinida (tabela 4.2).

As respostas escolhidas foram as medidas de densidade ótica (DO_{540nm}) e de concentração de PRP, correspondentes à décima hora de cultivo e não mais os valores máximos de cada resposta, como aconteceu no planejamento anterior (1º DCCR). Neste planejamento, decidiu-se fixar o tempo de cultivo na décima hora e, deste modo, evitar a influência do tempo nas respostas, tornando a análise dos resultados mais homogênea e confiável. A décima hora de cultivo foi definida pelo fato da maioria dos ensaios chegarem ao final da fase exponencial de crescimento após esse tempo.

Os valores do ponto central para as concentrações de extrato de levedura e peptona de soja foram definidos como a metade dos escolhidos no PC do planejamento anterior. Já o valor da concentração de glicose foi definido como sendo o dobro da empregada no PC do primeiro planejamento para evitar que esteja na faixa limitante e permitindo que os efeitos dos outros fatores sejam observados.

Os níveis dos pontos axiais foram estabelecidos em $\pm 1,68$ ($=2^{3/4}$). Os valores codificados e os valores reais correspondentes são também apresentados na tabela 4.2.

A tabela 4.6 mostra a matriz com os 18 ensaios realizados, incluindo os 8 pontos do planejamento fatorial, os 6 pontos axiais e as 4 repetições no ponto central, assim como as respectivas respostas. A maior produção de polissacarídeo foi observada no ensaio 7 (640 mg PRP/L). Os ensaios do PC assim como o ensaio 12 apresentaram produção de polissacarídeo correspondente a 370 ± 30 mg PRP/L. A maior densidade óptica observada corresponde à média no ponto central (DO_{540nm} $7,7 \pm 0,6$). Os ensaios referentes ao PC do 2º DCCR resultaram em produção de polissacarídeo similar aos ensaios do PC do 1º DCCR (± 330 mg PRP/L), sendo conduzidos com metade da concentração das fontes de nitrogênio (peptona de soja e extrato de levedura).

Tabela 4.6. Matriz do 2º DCCR com os níveis codificados e as respostas concentração de polissacarídeo capsular (PRP mg/L) e densidade óptica (DO_{540nm}).

Ensaios	S	EL	G	PRP (mg/L)	DO_{540nm}
1	-1	-1	-1	119	2,5
2	+1	-1	-1	254	5,9
3	-1	+1	-1	301	5,4
4	+1	+1	-1	314	7,0
5	-1	-1	+1	213	3,1
6	+1	-1	+1	93	1,2
7	-1	+1	+1	640	5,0
8	+1	+1	+1	332	7,5
9	-1,68	0	0	68	0,8
10	+1,68	0	0	304	7,6
11	0	-1,68	0	124	1,6
12	0	+1,68	0	383	7,6
13	0	0	-1,68	310	6,1
14	0	0	+1,68	354	7,4
15	0	0	0	342	6,9
16	0	0	0	383	7,6
17	0	0	0	386	8,3
18	0	0	0	320	7,1

Extrato de levedura – EL; peptona de Soja – S; Glicose – G.

4.3.2.1 Análise estatística e da superfície de resposta - variável dependente densidade óptica (2º DCCR)

A análise estatística para variável dependente densidade óptica (DO_{540nm}) foi realizada considerando o valor do nível de significância (α) igual a 0,1. Os termos estatisticamente significativos foram as concentrações de peptona de soja (linear e quadrático) e extrato de levedura (linear e quadrático). Os termos com p-valor maiores que 0,1 foram considerados estatisticamente não significativos, sendo excluídos do modelo refinado.

O modelo reduzido, contendo apenas os termos significativos, está representado na equação 4.2 (a partir dos coeficientes da tabela 4.7), enquanto que a análise estatística do ajuste do modelo aos dados experimentais está resumida na tabela 4.8. Com o aumento na concentração de glicose, não houve efeitos significativos deste fator na resposta de forma a mascarar a influência das fontes de nitrogênio. As concentrações de peptona de soja e extrato de levedura apresentaram coeficientes semelhantes, indicando que ambas influenciam o crescimento. O valor do coeficiente de regressão foi 0,7909 e o F_{calc} cinco vezes maior que o F_{tab} , indicando que o modelo (Eq. 4.2) é estatisticamente significativo, ajustando-se aos dados experimentais com nível de confiança de 90%.

Tabela 4.7. Regressão do 2º DCCR, variável dependente densidade óptica na décima hora de cultivo.

Fatores	Coeficiente	p-valor	Limite de confiança	
			-90%	+90%
Média/Interação	7,147	0,000000	6,221	8,073
S (L)	1,253	0,003788	0,622	1,884
S (Q)	-1,169	0,006604	-1,810	-0,528
EL (L)	1,640	0,000497	1,008	2,271
EL (Q)	-1,017	0,014801	-1,658	-0,376

Coeficiente de regressão: Var. dep. = DO_{540nm} ; $\alpha = 0,1$; $R^2 = 0,7909$.

Tabela 4.8. Análise de variância do 2º DCCR, variável dependente densidade óptica da décima hora de cultivo.

Varição	SQ	GL	QM	F _{calc}
Regressão	85,28	4	21,32	12,29
Resíduo	22,55	13	1,73	
Total	107,83	17		

F_{tab 0,1, 4, 13} = 2,43
 SQ= soma dos quadrados; GL= grau de liberdade e QM = quadrado médio

$$DO_{540nm} = (7,15 \pm 0,52) + (1,25 \pm 0,36).S + (1,64 \pm 0,36).EL - (1,17 \pm 0,36).S^2 - (1,02 \pm 0,36).EL^2 \quad (4.2)$$

A partir do modelo representado na equação 4.2 foi obtida a superfície de resposta da variável dependente densidade óptica em função das variáveis estatisticamente significativas concentrações de peptona de soja e extrato de levedura (figura 4.5).

Ao analisar a superfície de resposta da DO, os maiores valores de DO_{540nm} (8,0) foram observados com o extrato de levedura na faixa entre -0,25 e +1,75 (2,12 g EL/L e 5,12 g EL/L) e a peptona de soja na faixa entre -0,5 e +1,5 (3,5 g S/L e 9,5 g S/L). A região de ótimo engloba as condições empregadas no ponto central.

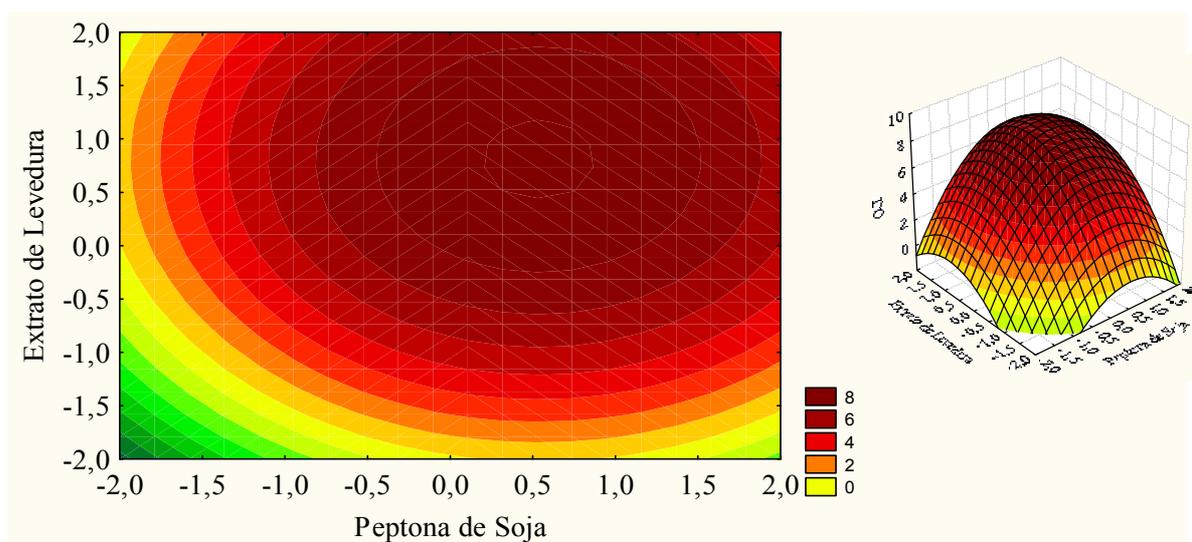


Figura 4.5. Superfície de resposta do 2º DCCR, densidade óptica (DO_{540nm}) em função da concentração do extrato de levedura (EL) e peptona de soja (S)

4.3.2.2 Análise estatística e da superfície de resposta - variável dependente produção de polissacarídeo capsular (2º DCCR)

A análise estatística da variável dependente polissacarídeo capsular (PRP) foi realizada considerando o valor do nível de significância (α) igual a 0,1. Os termos estatisticamente significativos foram concentração de extrato de levedura (linear), interação concentração de peptona de soja e concentração de glicose, concentração de peptona de soja (quadrático) e a interação concentração de extrato de levedura e concentração de glicose. Os termos com p-valor maiores que 0,1 foram considerados estatisticamente não significativos, sendo estes excluídos do modelo refinado.

O modelo reduzido, contendo apenas os termos significativos, está representado na equação 4.3 resultante dos coeficientes relacionados na tabela 4.9, enquanto que a análise estatística do ajuste do mesmo aos dados experimentais está resumida na tabela 4.10. Conforme desejado, a concentração de glicose não apareceu como efeito principal. A concentração de extrato de levedura (linear) apresentou o maior efeito positivo na concentração de PRP, enquanto a concentração de peptona apresentou um efeito negativo, de ordem grandeza menor (tabela 4.9). O valor do coeficiente de regressão foi 0,7305 e o F_{calc} 3,6 vezes maior que o F_{tab} , indicando que o modelo (Eq. 4.3) é estatisticamente significativo, ajustando-se aos dados experimentais com nível de confiança de 90%.

Tabela 4.9. Regressão do 2º DCCR, variável dependente produção de polissacarídeo na décima hora de cultivo.

Fatores	Coeficiente	p-valor	Limite de confiança	
			-90%	+90%
Média/Interação	327,688	0,000000	283,167	372,208
S (Q)	-48,209	0,045291	-86,765	-9,653
EL (L)	98,382	0,000574	59,852	136,911
S(L) por G(L)	-72,000	0,024990	-122,342	-21,658
EL(L) por G(L)	53,000	0,084991	2,658	103,342

Coeficiente de regressão: Var. dep. = PRP; $\alpha = 0,1$; $R^2 = 0,73053$.

Tabela 4.10. Análise de variância do 2º DCCR, variável dependente produção de polissacarídeo capsular na décima hora de cultivo.

Variação	SQ	GL	QM	F _{calc}
regressão	227825	4	56956	8,81
resíduo	84039	13	6465	
Total	311864	17		

$$F_{\text{tab } 0,1, 4, 13} = 2,43$$

SQ= soma dos quadrados; GL= grau de liberdade e QM = quadrado médio

$$\text{PRP} = (327,69 \pm 25,14) + (98,38 \pm 21,76) \cdot \text{EL} - (48,21 \pm 21,77) \cdot \text{S}^2 - (72,00 \pm 28,43) \cdot \text{S} \cdot \text{G} + (53,00 \pm 28,43) \cdot \text{EL} \cdot \text{G} \quad (4.3)$$

A partir do modelo representado na equação 4.3 foram obtidas as superfícies de resposta da variável dependente PRP em função das variáveis estatisticamente significativas concentrações de extrato de levedura, peptona de soja e interações extrato de levedura com glicose e peptona de soja com glicose (figuras 4.6, 4.7 e 4.8).

Ao analisar a superfície de resposta da produção de PRP em função dos fatores concentrações de extrato de levedura e de peptona de soja (figura 4.6), os maiores valores de PRP (500 mg PRP/L) foram observados com concentrações de extrato de levedura acima de +1,75 (5,1 g EL/L) e de peptona de soja entre -0,5 e +0,5 (3,5 g S/L e 6,5 g S/L).

De acordo com a superfície de resposta da produção de PRP em função dos fatores concentração de glicose e peptona de soja (figura 4.7), os maiores valores de PRP (400 mg PRP/L) foram observados para concentrações de glicose acima de +1,5 (14,5 g G/L), mantendo-se a concentração de peptona de soja abaixo de -0,5 (3,5 g S/L). A outra região experimental indicada como ótima pela figura 4.7 é definida por concentrações de glicose abaixo de -1,5 (5,5 g G/L) e de peptona de soja acima de +0,5 (6,5 g S/L).

Já para a superfície de resposta da concentração do PRP em função dos fatores glicose e extrato de levedura (figura 4.8), os maiores valores de PRP (700 mg PRP/L) foram observados com a glicose acima de +1 (13 g G/L) e o extrato de levedura acima de +1,5 (4,75 g EL/L).

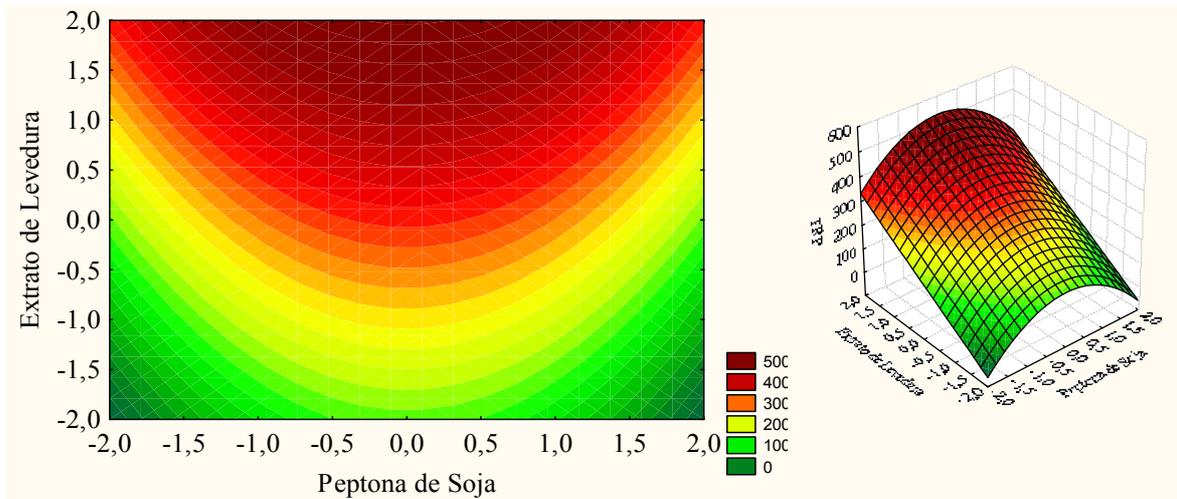


Figura 4.6. Superfície de resposta do 2º DCCR, polissacarídeo capsular (PRP) em função da concentração do extrato de levedura (EL) e peptona de soja (S).

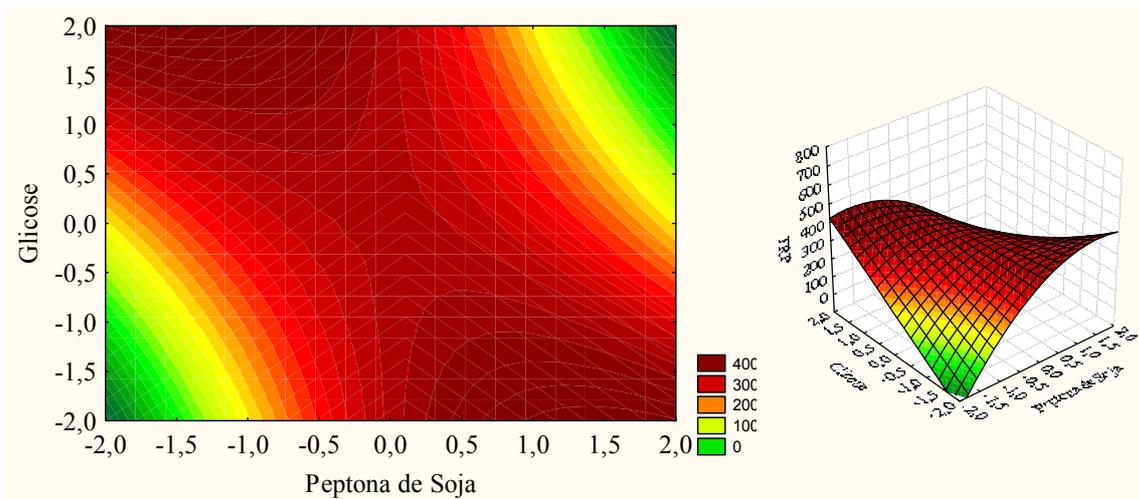


Figura 4.7. Superfície de resposta do 2º DCCR, polissacarídeo capsular (PRP) em função da concentração de glicose (G) e peptona de soja (S).

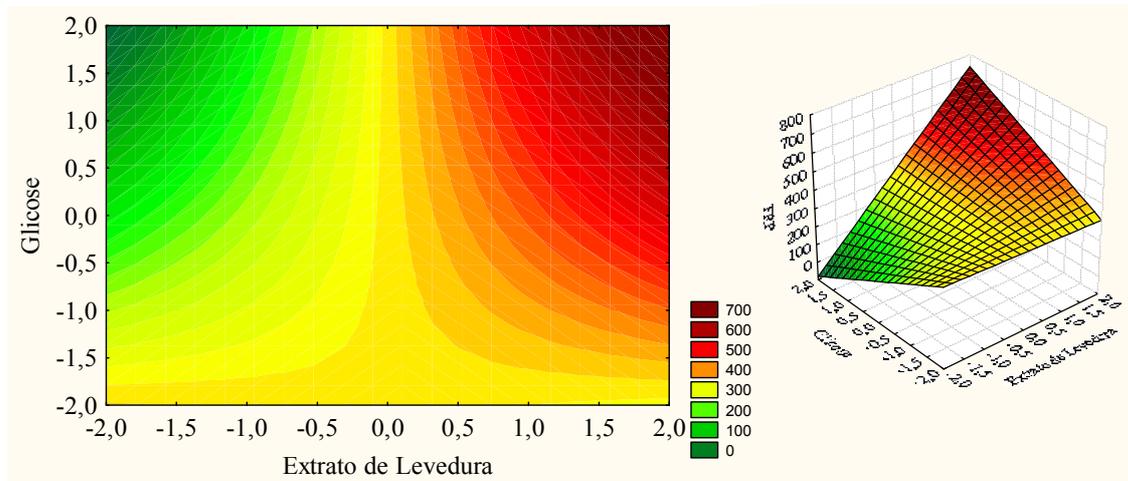


Figura 4.8. Superfície de resposta do 2º DCCR, polissacarídeo capsular (PRP) em função da concentração de glicose (G) e extrato de levedura (S).

Os valores dos coeficientes do modelo que representa matematicamente a produção de PRP em função dos fatores estudados (Eq. 4.3) assim como as superfícies de resposta correspondentes (figuras 4.6 a 4.8) indicam aumento na produção de polissacarídeo com alta concentração de extrato de levedura e de glicose, e baixa concentração de peptona de soja. Na figura 4.6, observa-se claramente a rampa de crescimento da concentração de PRP com o aumento na concentração de extrato de levedura. Já a figura 4.8 prevê um valor de 700 mg PRP/L para concentrações de extrato de levedura maiores que 5,4 g/L. Sendo assim, antes de iniciar os ensaios de validação do modelo decidiu-se investigar a produção de PRP e o crescimento em meios contendo maior concentração de extrato de levedura. Estes novos estudos foram agrupados e denominados como “Ensaio Complementares” e serão discutidos a seguir.

4.3.3 Ensaio Complementares

Nos ensaios complementares, identificados como ensaios 21 e 22, respectivamente (tabela 4.11), as concentrações de extrato de levedura foram aumentadas para 6,5 g EL/L (+2,66, em valor codificado) e 8 g EL/L (+3,66, em valor codificado). Já os valores da concentração de glicose e peptona de soja foram mantidos nos correspondentes ao ponto central (10 g G/L e 5 g S/L). A adição dos pontos adicionais com concentrações maiores de extrato de levedura fornecerá mais informações sobre a influência do fator concentração de extrato de levedura na resposta

concentração de PRP, confirmando, ou não, a previsão do modelo empírico obtido no 2º DCCR. Para garantir a confiabilidade dos ensaios, controles foram realizados nas condições do ponto central (ensaio 19 da tabela 4.11) e do ponto axial +1,68 (ensaio 12 da tabela 4.6), mostrado na tabela 4.11 e designado como ensaio 20. Assim, a tabela 4.11 mostra a matriz do 2º DCCR com os quatro ensaios adicionais realizados e as respectivas respostas. Destaque em **negrito** indica os ensaios adicionais: 1 ponto central, 1 repetição do ensaio 12 e 2 pontos complementares com maior concentração de extrato de levedura.

Os experimentos com concentrações elevadas de extrato de levedura (ensaios 21 e 22) não atingiram os valores de crescimento celular e produção de PRP preditos pelos modelos (equações 4.2 e 4.3). A média da produção de PRP foi 45% menor que aquela predita pela equação 4.3. Apesar dos valores menores de DO_{540nm} observados nos ensaios 21 e 22, conforme previa a equação 4.2 para altas concentrações de extrato de levedura. A equação 4.2 apresentou desvios elevados em relação os valores experimentais de DO_{540nm} nos ensaios complementares. Por outro lado, é importante destacar que os ensaios no ponto central (ensaios 15, 16, 17, 18 e 19) apresentaram desvio padrão de apenas 5,7 % para DO_{540nm} e 9,0 % para PRP. Portanto, pode-se afirmar que as equações 4.2 e 4.3 se ajustam a essa região experimental, a qual pertence à região de ótimo. Assim, o fato dos polinômios não descreverem bem os resultados dos ensaios complementares, que também pertencem à região de ótimo, pode estar relacionado à dificuldade destes se ajustarem à curvatura da superfície, já que poucos dados experimentais do 2º DCCR se encontravam nessa região. Desta forma, para descrever melhor a região de ótimo da superfície de resposta, um novo polinômio foi gerado para DO_{540nm} e PRP, a partir da matriz completa (ensaios de 1 a 22), da tabela 4.11, incluindo os resultados dos ensaios complementares (Eqs. 4.4 e 4.5).

Tabela 4.11. Matriz do 2º DCCR incluindo dados dos ensaios complementares com os níveis codificados e as respostas: concentração de polissacarídeo capsular (PRP mg/L) e densidade óptica (DO_{540nm}).

Ensaio	S	EL	G	PRP (mg/L)	DO _{540nm}
1	-1	-1	-1	119	2,49
2	+1	-1	-1	254	5,97
3	-1	+1	-1	301	5,45
4	+1	+1	-1	314	7,00
5	-1	-1	+1	213	3,09
6	+1	-1	+1	93	1,16
7	-1	+1	+1	640	5,04
8	+1	+1	+1	332	7,52
9	-1,68	0	0	68	0,76
10	+1,68	0	0	304	7,62
11	0	-1,68	0	124	1,62
12	0	+1,68	0	383	7,62
13	0	0	-1,68	310	6,10
14	0	0	+1,68	354	7,40
15	0	0	0	342	6,93
16	0	0	0	383	7,62
17	0	0	0	386	8,26
18	0	0	0	320	7,15
19	0	0	0	404	6,25
20	0	+1,68	0	403	5,64
21	0	+2,66	0	406	5,74
22	0	+3,66	0	411	5,70

Extrato de levedura – EL; peptona de Soja – S; Glicose – G.

$$DO_{540nm} = (6,57 \pm 0,43) + (1,25 \pm 0,37) * S + (1,55 \pm 0,33) * EL - (0,98 \pm 0,36) * S^2 - (0,57 \pm 0,14) * EL^2 \quad (4.4)$$

$$PRP = (350,34 \pm 22,17) + (95,79 \pm 17,36) * EL - (53,12 \pm 18,58) * S^2 - (23,93 \pm 7,27) * EL^2 - (72,00 \pm 24,91) * S * G + (53,00 \pm 24,91) * EL * G \quad (4.5)$$

As equações 4.4 e 4.5 representam os modelos reduzidos, após a eliminação dos termos não significativos a partir da análise do p-valor (figuras 4.9 a 4.12 e tabelas 4.12 a 4.15), conforme já descrito anteriormente no 1º e 2º DCCR.

Os termos estatisticamente significativos para a resposta densidade óptica foram a concentração de extrato de levedura (linear e quadrático) e a concentração de peptona de soja (linear e quadrático) (tabela 4.12). Para resposta concentração de PRP, os termos significativos foram a concentração de extrato de levedura (linear e quadrático), a concentração de peptona de soja (quadrático), incluindo ainda os efeitos de interação da concentração de glicose com a concentração de peptona de soja e de extrato de levedura (tabela 4.13).

Tabela 4.12. Regressão do DCCR variável dependente densidade óptica.

Fatores	Coeficiente	p-valor	Limite de confiança	
			-90%	+90%
Média/Interação	6,566	0,000000	5,821	7,311
S (L)	1,253	0,003374	0,613	1,894
S (Q)	-0,985	0,013757	-1,609	-0,361
EL (L)	1,549	0,000244	0,966	2,132
EL (Q)	-0,575	0,000750	-0,819	-0,331

Coeficiente de regressão: Var. dep. = DO_{540nm} ; $\alpha = 0,1$; $R^2 = 0,70987$

Tabela 4.13. Regressão do DCCR variável dependente polissacarídeo capsular.

Fatores	Coeficiente	p-valor	Limite de confiança	
			-90%	+90%
Média/Interação	350,342	0,000000	311,634	389,050
S (Q)	-53,122	0,011360	-85,558	-20,686
EL (L)	95,790	0,000047	65,479	126,101
EL (Q)	-23,934	0,004598	-36,628	-11,240
S(L) por G(L)	-72,000	0,010661	-115,497	-28,503
EL(L) por G(L)	53,000	0,049293	9,503	96,497

Coeficiente de regressão: Var. dep. = PRP; $\alpha = 0,1$; $R^2 = 0,77626$

O ajuste do modelo DO_{540nm} (Eq. 4.4) incluindo os ensaios complementares, apresentou coeficiente de regressão de 0,70987, e o F_{calc} 6,2 vezes maior que o F_{tab} . Nota-se ainda que o polinômio da equação 4.4 é similar ao da equação 4.2. O valor de R^2 foi menor, mas o F_{calc} maior (tabela 4.14). Os valores dos coeficientes foram parecidos assim como a significância dos termos.

Já o ajuste do novo modelo PRP (Eq. 4.5) aos dados experimentais incluindo os ensaios complementares foi superior ao obtido pela equação 4.3. O coeficiente de regressão foi 0,7763 e o F_{calc} 5,56 vezes maior que o F_{tab} (tabela 4.15).

Tabela 4.14. Análise de variância do DCCR variável dependente densidade óptica.

Varição	SQ	GL	QM	F_{calc}
Regressão	106,023	4	26,506	14,32
Resíduo	31,465	17	1,851	
Total	137,488	21		

$$F_{\text{tab } 0,1, 4, 17} = 2,31$$

SQ= soma dos quadrados; GL= grau de liberdade e QM = quadrado médio

Tabela 4.15. Análise de variância do DCCR variável dependente polissacarídeo capsular.

Varição	SQ	GL	QM	F_{calc}
Regressão	309506	5	61901	12,47
Resíduo	79449	16	4966	
Total	388955	21		

$$F_{\text{tab } 0,1, 5, 16} = 2,24$$

SQ= soma dos quadrados; GL= grau de liberdade e QM = quadrado médio

A partir dos modelos gerados e descritos nas equações 4.4 e 4.5 foi possível construir as superfícies de resposta para ambas respostas. A figura 4.9 mostra a variação da resposta densidade óptica em função dos fatores concentração de extrato de levedura e de peptona de soja. A análise dessa superfície permite identificar que os maiores valores de $DO_{540\text{nm}}$ (± 6) foram previstos pelo modelo para extrato de levedura na faixa entre -0,25 e +2,5 (2,8 g EL/L e 6,25 g EL/L) e peptona de soja na faixa entre -0,25 e +1,7 (4,25 g S/L e 10,2 g S/L).

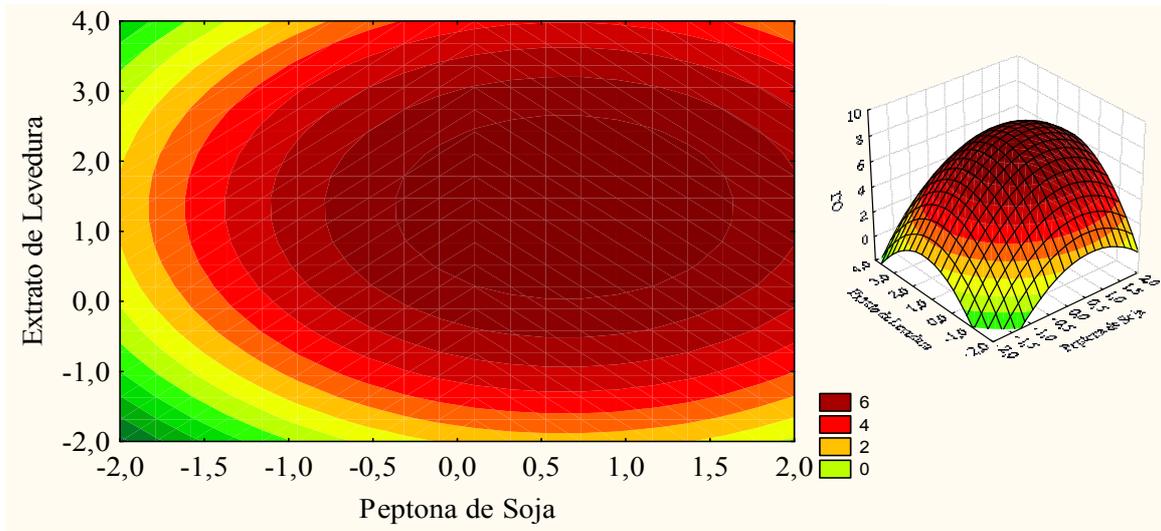


Figura 4.9. Superfície de resposta do 2º DCCR + ensaios complementares, densidade óptica (DO_{540nm}) em função do extrato de levedura (EL) e peptona de soja (S)

A variação da resposta do PRP em função dos fatores extrato de levedura, peptona de soja e glicose está representada nas figuras 4.10, 4.11 e 4.12. A análise dessas superfícies permite identificar as regiões de máximo para a concentração de PRP, de acordo com a previsão do modelo ajustado (Eq. 4.5). Assim, pela figura 4.10, os maiores valores de PRP (400 mg PRP/L) foram observados com extrato de levedura na faixa entre +1 e +3 (4 g EL/L e 7 g EL/L) e de peptona de soja entre -0,75 e +0,75 (2,75 g S/L e 7,25 g S/L). Já pela figura 4.11, os maiores valores de PRP (400 mg PRP/L) foram observados com glicose acima de +1,75 (15,25 g G/L) e mantendo peptona de soja abaixo de -0,5 (3,5 g S/L). Já de acordo com a superfície de resposta do PRP em função dos fatores glicose e extrato de levedura (figura 4.12), os maiores valores de PRP (600 mg PRP/L) foram observados com a glicose acima de +1,75 (15,25 g G/L) e o extrato de levedura acima de +2,1 (5.5 g EL/L).

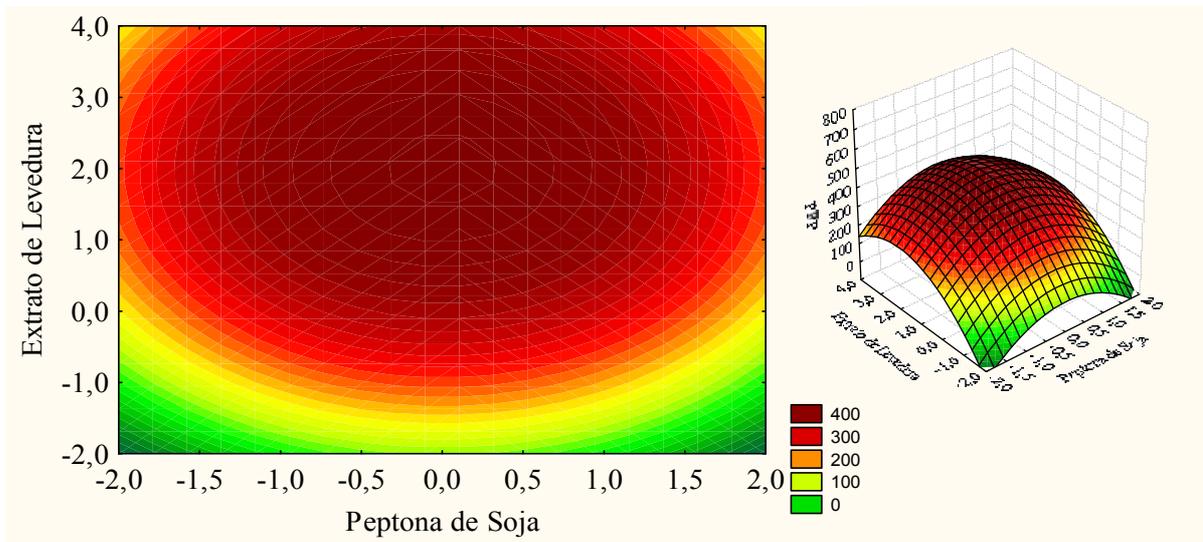


Figura 4.10. Superfície de resposta do 2º DCCR, polissacarídeo capsular (PRP) em função da concentração do extrato de levedura (EL) e peptona de soja (S)

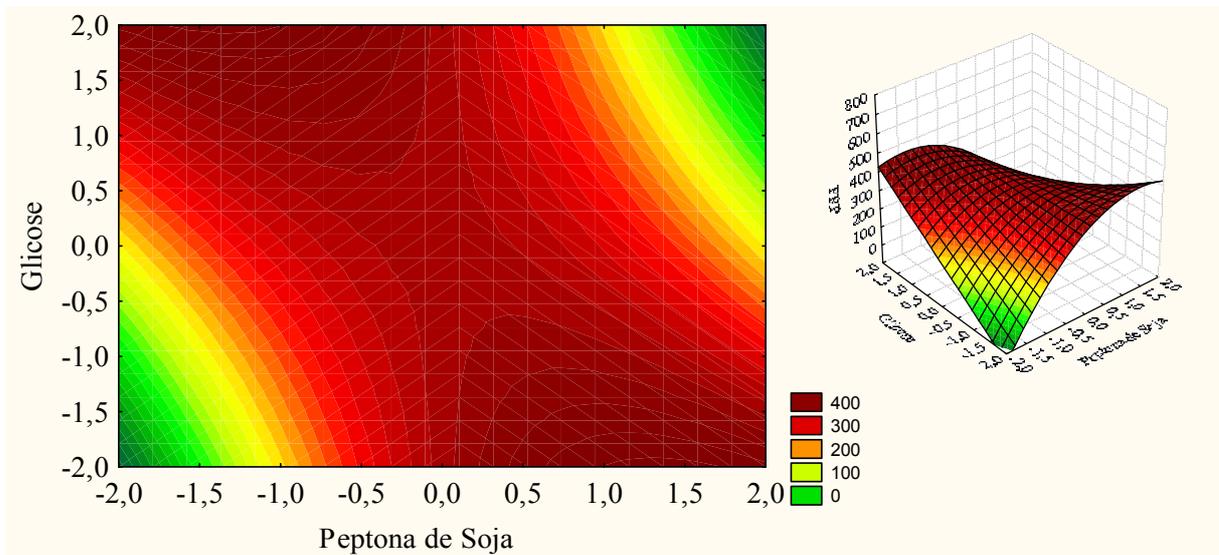


Figura 4.11. Superfície de resposta do 2º DCCR, polissacarídeo capsular (PRP) em função da concentração de glicose (G) e peptona de soja (S)

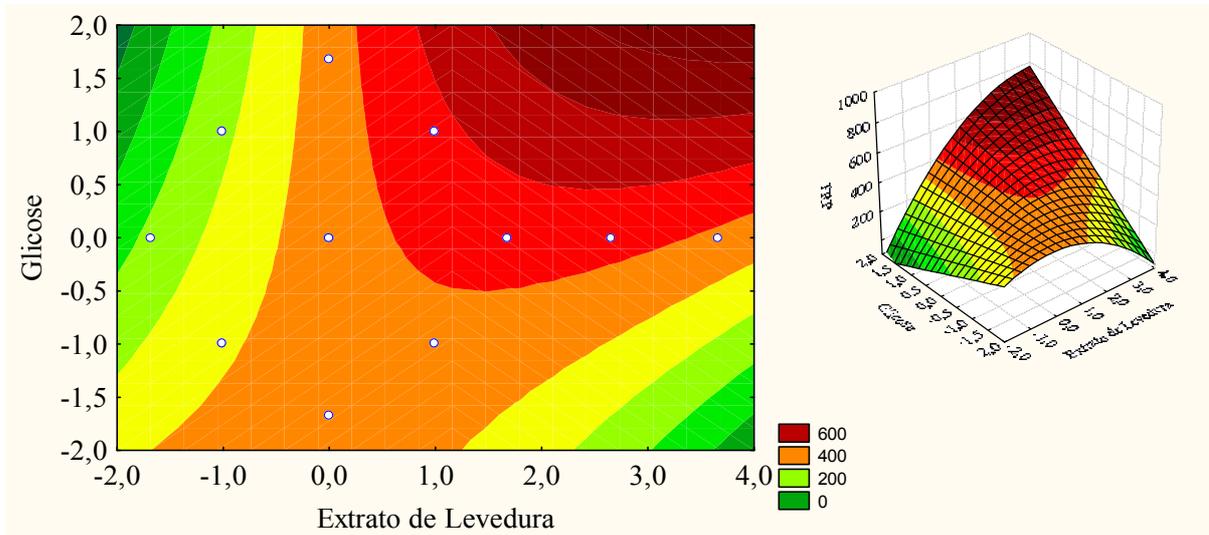


Figura 4.12. Superfície de resposta do 2º DCCR, polissacarídeo capsular (PRP) em função da concentração de glicose (G) e extrato de levedura (EL)

Considerando que as equações 4.4 e 4.5 fornecem descrições satisfatórias do topo da área da superfície de resposta para PRP e DO_{540nm} , a identificação da região de ótimo pode ser feita por meio da sobreposição das regiões de ótimo individuais identificadas nas figuras 4.9 a 4.12. Desta forma, para a realização dos experimentos de validação foi definida a melhor composição do meio de cultivo (MMC) pertencentes à região de ótimo: peptona de soja na concentração de 5 g/L, extrato de levedura na concentração de 5,5 g/L e glicose na concentração de 15,25 g/L.

4.3.4 Ensaios de validação

Os ensaios de validação foram realizados com o melhor meio de cultivo (MMC) e na condição do ponto central (CPC), como referência (tabela 4.16). Os ensaios foram conduzidos em frasco agitado (*shaker*) e em biorreator.

Tabela 4.16. Concentração dos fatores do melhor meio de cultivo (MMC) e da condição no ponto central (CPC).

Descrição	S	EL	G
CPC	0 (5,0 g/L)	0 (2,5 g/L)	0 (10 g/L)
MMC	0 (5,0 g/L)	+2 (5,5 g/L)	+1,75 (15,25 g/L)

Extrato de levedura – EL; peptona de Soja – S; Glicose – G.

A composição do meio de cultura utilizado para o ensaio de validação em *shaker* foi o mesmo utilizado no ensaio em biorreator, assim como na preparação do inóculo.

No ensaio em *shaker*, a CPC apresentou crescimento celular levemente superior ao MMC, DO_{540nm} 9,7 e 8,4 respectivamente (figura 4.13 A). A produção volumétrica de polissacarídeo capsular na décima hora de cultivo foi 37 % maior na CPC, 648 mg PRP /L contra 410 mg PRP/L no MMC (figura 4.13 B).

Ao comparar a CPC realizada no ensaio de validação com a CPC realizada no 2º DCCR, observamos aumento de 43% na produção de polissacarídeo. Este aumento poderia estar relacionado à mudança no lote de trabalho. Já a diferença observada entre a produção de PRP na CPC e no MMC, que partiram do mesmo lote de trabalho, pode ter sido causada pela maior concentração de glicose. Ensaio em *shaker* apresentam limitações na transferência de oxigênio devido à agitação limitada. Além disso, a ausência de controle de pH também pode afetar o crescimento (KENNEDY, 1999). O melhor meio de cultivo proposto neste estudo contém maior concentração de glicose (tabela 4.16) o que pode ter causado maior formação de ácido acético, o que leva à acidificação do meio por ausência do controle de pH. Consequentemente, ocorreria inibição do crescimento celular e da formação de produto.

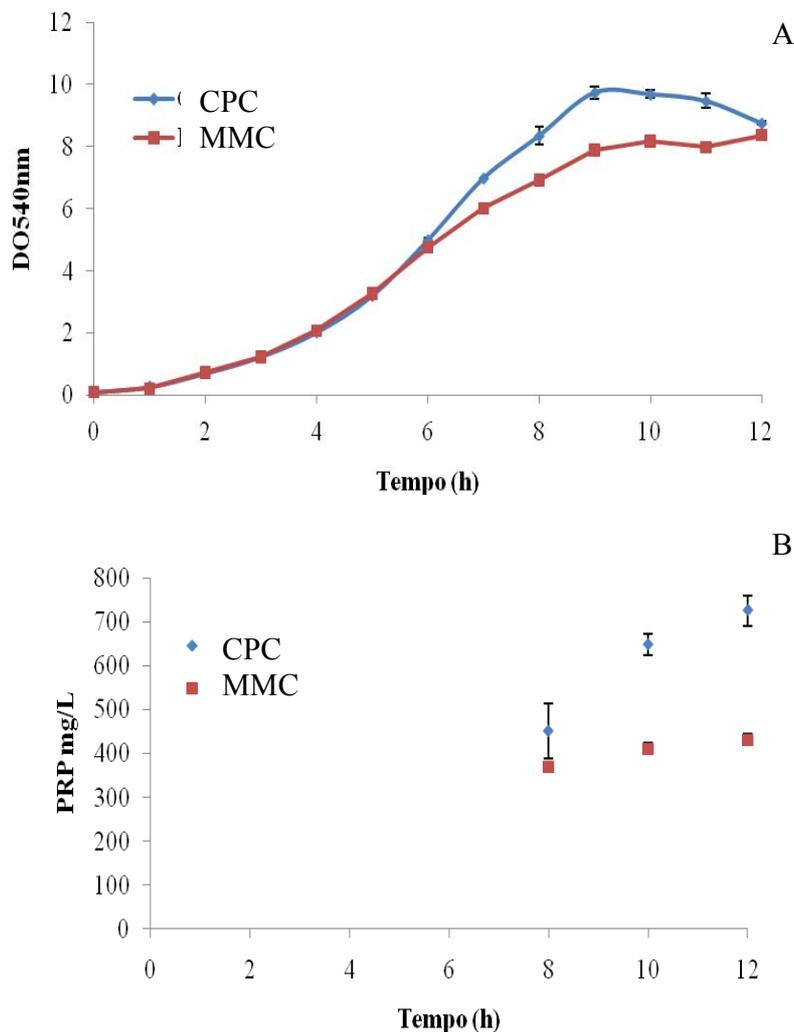


Figura 4.13. Ensaio em shaker - Condição no Ponto Central (CPC) e Melhor Meio de Cultivo (MMC). A) Perfil de crescimento celular DO_{540nm}. B) Perfil da produção volumétrica de polissacarídeo capsular (PRP)

Em biorreator foram realizados cultivos descontínuos com suprimento de ar variando entre 0,2 e 0,6 VVM.

No cultivo utilizando a CPC, após a sexta hora de cultivo a glicose começou a ser consumida rapidamente. Na décima oitava hora de cultivo houve queda da concentração de biomassa e aumento da concentração de polissacarídeo no meio. O esgotamento de substrato pode ter levado a morte e lise celular e consequente liberação de polissacarídeo no meio, explicando a queda na concentração celular e o aumento na concentração de polissacarídeo. Na décima sétima hora de cultivo a concentração de biomassa foi de 2,1 g MS/L, a produção de

ácido acético e polissacarídeo capsular foram de aproximadamente 5 g HA/L e 550 mg PRP/L respectivamente (figura 4.14).

No cultivo utilizando a composição do MMC, após a sétima hora de cultivo a glicose começou a ser consumida rapidamente. Na décima sétima hora houve queda na concentração de biomassa e aumento na concentração do polissacarídeo no meio, assim como observado no cultivo CPC. Ao final da fase estacionária, a concentração de biomassa foi de aproximadamente 3,0 g MS/L, a produção de ácido acético e polissacarídeo capsular foram aproximadamente 8 g HA/L e 600 mg PRP/L respectivamente (figura 4.15).

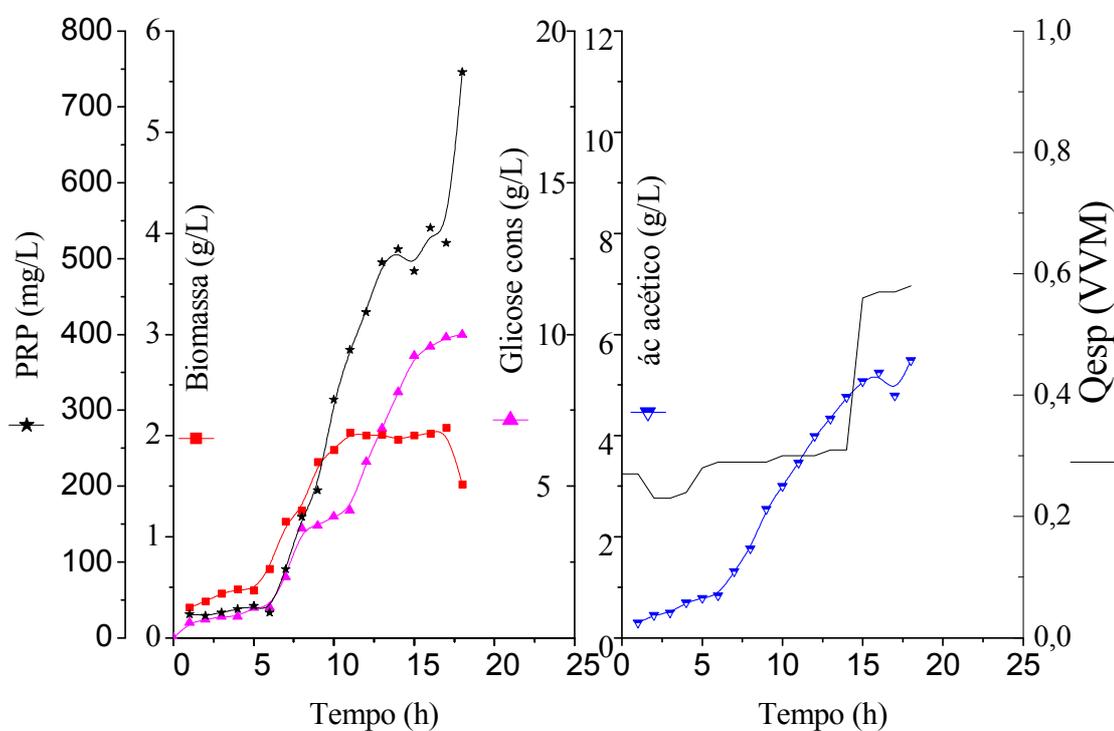


Figura 4.14. Cultivo descontínuo, condição do ponto central (CPC).

Qesp – vazão específica de ar

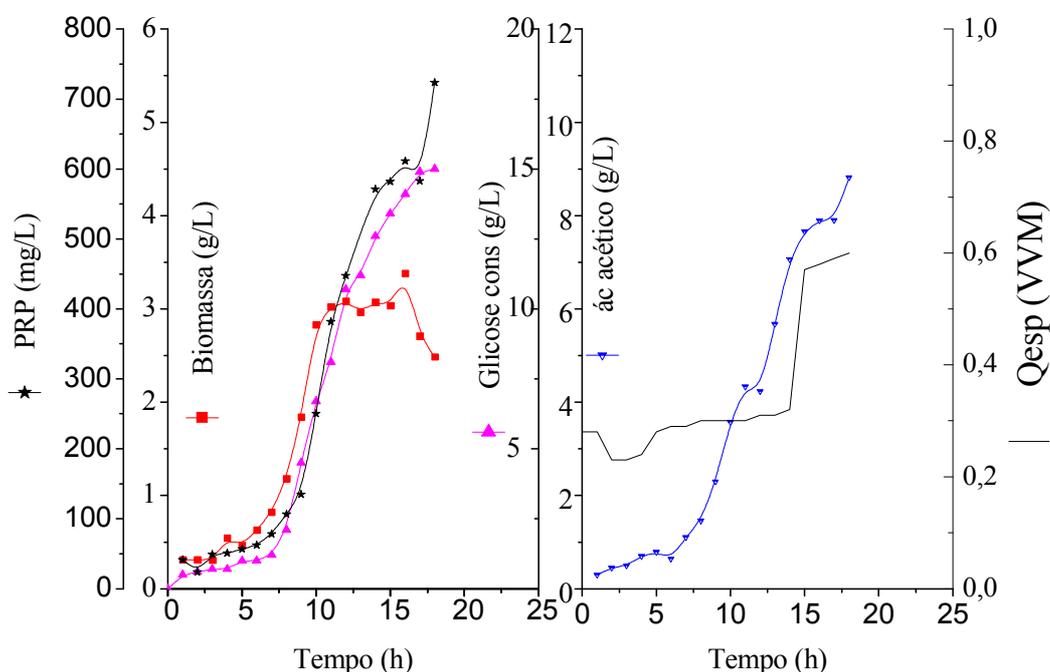


Figura 4.15. Cultivo descontínuo, melhor meio de cultivo (MMC).

Qesp – vazão específica de ar

Em biorreator, o MMC apresentou maior crescimento celular (30%) que a CPC, e a produção de polissacarídeo capsular foi levemente superior (8,3%). A semelhança observada na produção volumétrica de polissacarídeo capsular pode ser explicada pelo fato de tanto a CPC quanto o MMC pertencerem à região de ótimo.

Quando os cultivos descontínuos em biorreator utilizando os meios gerados pelo planejamento (MMC e CPC) são comparados com aqueles realizados com o meio até então disponível na literatura (CARTY *et al.*, 1985), houve aumento de 55% na produção volumétrica de polissacarídeo capsular.

4.4 CONCLUSÃO

No primeiro Delineamento Composto Central Rotacional (1° DCCR) constatou-se que a variável independente concentração de glicose era limitante, mascarando o efeito dos outros fatores (concentração de peptona de soja e extrato de levedura).

Ao realizar um segundo DCCR em que a variável independente concentração de glicose foi mantida com o dobro da concentração no ponto central (10 g/L), esta deixou de ser limitante, o que permitiu observar o efeito dos outros fatores. No 2° DCCR foi incorporado ensaios complementares e os modelos obtidos foram validados após a identificação da região de ótimo.

Ensaio de validação em *shaker* e em biorreator com o melhor meio de cultivo (MMC) e com a condição do ponto central (CPC) resultaram em aproximadamente 600 mg PRP/L, exceto para o MMC quando realizado em *shaker*.

Tanto o MMC como a CPC representam a região de ótimo, sendo que o meio na CPC se destaca por ser conduzido com menor concentração de glicose (30%) e de extrato levedura (50%). Quando comparado a CPC com o meio atualmente disponível (CARTY *et al.*, 1985), este possui metade da concentração das fontes de nitrogênio (peptona de soja e extrato de levedura) e resultou em aumento de 50% na produção de PRP em cultivo descontínuo em biorreator.

Cultivos descontínuos conduzidos em biorreator com a CPC e com o MMC resultaram em produção de polissacarídeo 33 % maior que cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose (CDAIG), peptona de soja BD e vazão específica de ar em 0,2 VVM. Porém, inferior a produção obtida em CDAIG com maior vazão de ar (0,5 VVM) (tabela 3.4 do capítulo 3). Estes dados mostram que pode-se operar o biorreator com 10 g/L de glicose desde o início do processo, com metade da concentração de peptona de soja e extrato de levedura, e dispensando pulsos de glicose. No entanto, o maior fornecimento de ar (0,5 VVM) desde o início do processo se faz necessário para maior crescimento celular e formação de produto.

REFERÊNCIAS

- BARROS, N. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas, UNICAMP, 2003.
- CARTY, C. E.; MANCINELLI, R.; HAGOPIAN, A.; KOVACH, F. X.; RODRIGUEZ, E.; BURKE, P.; DUNN, N. R.; MCALEER, W. L.; MAIGETTER, R. Z.; KNISKERN, P. Fermentation studies with *Haemophilus influenzae*. **Development Industrial Microbiology**, v. 26, p. 763-767, 1985.
- COLEMAN, N. H.; DAYNES, D. A.; JARISCH, J.; SMITH, A. L. Chemically defined media for growth of *Haemophilus influenzae* strains. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4408-4410, 2003.
- FILDES, P. The nature of the effect of blood-pigment upon growth of *H. influenzae*. **Brazilian Journal Experimental Pathology**, v. 2 p. 16, 1921.
- FINN, C. W. **PRP overproducing Haemophilus influenzae strain**. European Patent, 0546349 A2, 1993
- GONÇALVES, V. M.; ZANGIROLAMI, T. C.; GIORDANO, R. L. C.; RAW, I.; TANIZAKI, M. M.; GIORDANO, R. C. Optimization of medium and cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus Pneumoniae* serotype 23F. **Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 713-717, 2002.
- HENRIQUES, A. W. S.; JESSOURON, E.; LIMA, E. L.; ALVES, T. L. M. Capsular polysaccharide production by *Neisseria meningitides* serogroup C: Optimization of process variables using response surface methodology **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1822-1828, 2006.
- HERRIOT, R. M.; MEYER, E. Y.; VOGT, M.; MODAN, M. Defined medium for growth of *Haemophilus influenza* **Journal of Bacteriology**, v. 101, n. 2, p. 513-516, 1970.
- HILLEMAN, M. R.; TAI, J. Y.; TOLMAN, R. L.; VELLA, P. P. **Couple Haemophilus influenzae b vaccine**. United States Patent, 4.459.286, 1984.
- JAYME, D.W and SMITH, S.R. **Media formulation options and manufacturing process controls to safeguard against introduction of animal origin contaminants in animal cell culture**. *Cytotechnology* **33**: 27–36, 2000.
- KENNEDY, M.; KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 456-475, 1999.
- KUHNERT, P.; CHRISTENSEN, H. **Pasteurellaceae: Biology, genomics and molecular aspects**. Academic Press., ISBN 978-1-904455-34-9, 2008.
- KUMARI, M.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Production of Schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCM. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1036-1043, 2008.
- KUO, J. S. C. **Combined Haemophilus influenzae and Diptheria, Pertussis, Tetanus vaccine**. European Patent, 01015262 A2, 1983
- MACEDO, M. G.; LACROIX, C.; GARDNER, N. J.; CHAMPAGNE, C. P. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 5, p. 419-426, 2002.
- MAITRE-WILMOTTE, G.; SPECK, D.; ROKBI, B. **Culture medium for Haemophilus influenzae type b**. United States Patent, 0017074, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processo. Uma estratégia seqüencial de planejamentos.** Campinas, Editora Casa do Pão., 2005.

TAKAGI, M.; CABRERA-CRESPO, J.; BARUQUE-RAMOS, J.; ZANGIROLAMI, T. C.; RAW, I.; TANIZAKI, M. Characterization of polysaccharide production of *Haemophilus influenzae* type b and its relationship to bacterial cell growth. Applied **Biochemistry and Biotechnology.**, v. 110, p. 91-100, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; COMPERTZ O. F.; CANDEIAS, J. G. N. **Microbiologia.** 3. ed. São Paulo, Editora Atheneu., 1999.

WILKINSON, J. F. The extracelular polysaccharides of bacteria. **Bacterial Review.**, v. 122, p. 46-73, 1958.

Capítulo 5

Parâmetros de qualidade

5.1 CONTROLE DE QUALIDADE

Todo e qualquer fármaco deve chegar ao mercado com uma formulação segura e atividade terapêutica comprovada e garantida. Para tanto, o controle de qualidade se mostra de suma importância.

A garantia de qualidade juntamente com o controle de qualidade, monitoram e controlam a excelência de um processo com o propósito de obter um produto uniforme com maior segurança e eficácia. Isto implica em sistemas detalhados de inspeção, controle de produção, avaliação e distribuição (LEVI *et al.*, 1964)

A produção e o controle das vacinas conjugadas são mais complexas em relação às demais vacinas por envolverem três etapas até a elaboração do produto final: fermentação, purificação e conjugação. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda uma série de controles de qualidade para a elaboração de uma vacina que vão desde o preparo do lote semente de trabalho até o produto final. Vários tipos de vacinas conjugadas de Hib têm sido desenvolvidos e licenciados na Europa e nos EUA, atendendo aos requerimentos necessários para esta vacina (WARD, 1989). O *H. influenzae* tipo b, por ser uma bactéria patogênica e classificada como microrganismo de classe 2, exige uma manipulação que atenda os requerimentos para esta classificação (WHO, 2000).

O projeto de produção da vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b desenvolvido pelo Laboratório de Bioprocessos do Centro de Biotecnologia – Instituto Butantan está com o processo de produção do polissacarídeo capsular em escala de bancada seguindo para ampliação em escala piloto, enquanto as etapas de purificação e de conjugação estão em fase de desenvolvimento.

Como parte dos parâmetros de qualidade a serem comprovados durante um processo de produção de polissacarídeo derivado do Hib, a Organização Mundial da Saúde recomenda que a distribuição molecular do polissacarídeo capsular deva se caracterizar por tamanhos de massas moleculares definidos e homogêneos entre lotes, sendo que cabe ao produtor estipular os limites de distribuição molecular aceitável (WHO, 2000; EP, 2005).

Neste capítulo foram abordadas as análises realizadas para verificar a qualidade do polissacarídeo produzido, isto é, verificar a variação do tamanho da massa molecular com o tempo de incubação para cultivos com diferentes vazões no suprimento de ar. A caracterização celular do *Haemophilus influenzae* b quanto à morfologia e seu metabolismo durante os cultivos sob diferentes condições também foi analisada.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Metodologia Analítica

5.2.1.1 Coloração de Gram

Para visualizar os aspectos morfológicos do microrganismo foi realizada metodologia de coloração de Gram, conforme descrito no item 3.2.8.1 do capítulo 3.

5.2.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para visualizar os aspectos morfológicos e estruturas intracelulares do microrganismo (SKOV SORENSEN *et al.*, 1988). Amostras coletadas em tempos diferentes da cultura e diluídas para uma DO_{540nm} 0,5 em volume de 1 mL de paraformaldeído foram levemente homogeneizadas e incubadas a 4°C por aproximadamente 72 horas.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 11500 g por 5 minutos, o *pellet* foi ressuscitado com 20 µL de anticorpo anti-Hib, obtido em burro, e fixado com 500 µL de solução *karsnovsky* (aldeído glutárico 2,5 %, paraformaldeído 2 %, em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2) e incubado a 4°C, por 16 a 20 horas. No dia seguinte, o material foi centrifugado a 11500 g por 2 minutos, e o *pellet* submetido a lavagens, por três vezes, com 1 mL de solução fisiológica contendo sacarose (4,5 g de NaCl, 8,9 g de sacarose e completado a 500 mL com água destilada e pH ajustado para 7,4), sob movimento de rotação, realizando trocas a cada 15 minutos. Após remover a solução de lavagem foi adicionado 500 µL de tetróxido de ósmio (tetróxido de ósmio - Os O₄) 1 % em tampão cacodilato 0,1 M e a suspensão resultante foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente, sob movimento de rotação. Em seguida, o material foi centrifugado a 11500 g por 2 minutos e o *pellet* submetido a três novas lavagens com 1 mL de solução fisiológica com sacarose, a cada 15 minutos, também sob agitação. Após remover a solução de lavagem, foi adicionado 500 µL de solução de acetato de uranila (acetato de uranila 0,5 % com sacarose 13,3 %) e a suspensão resultante foi incubada na geladeira por 16 a 20 horas.

Após a incubação, seguiram-se as etapas de desidratação. O material foi inicialmente centrifugado a 11500 g por 2 minutos e o *pellet* assim obtido foi ressuspenso sucessivamente nas soluções descritas a seguir para a desidratação:

- ✓ 2 x 1 mL de álcool 70°10', sob agitação;
- ✓ 2 x 1 mL de álcool 95°15', sob agitação;
- ✓ 3 x 1 mL de álcool absoluto.....15', sob agitação;
- ✓ 1 x 1 mL de óxido de propileno.....10', estático;
- ✓ 1 x 1 mL de óxido de propileno + resina.....2 horas, sob agitação, à temperatura ambiente.

Após incubação em óxido de propileno contendo resina, o sedimentado foi transferido para cápsula *Been* com auxílio de uma pipeta (Pasteur) e foi adicionada resina pura e incubado por 1 hora sob condição estática a temperatura ambiente. Em seguida, as cápsulas foram transferidas para *ependorfs* e centrifugadas a 11500 g por 2 minutos. Estas foram então devidamente identificadas e o volume de resina completado e incubado em estufa a 60°C durante 2 a 3 dias. Em seguida, cortes ultrafinos com 70 nm de espessura foram obtidos no ultramicrotomo (MT 6000 *Sorvall*) e colhidos sobre grades de cobre com 300 *mesh*. Os cortes foram submetidos a contrastes com acetato de uranila 2% durante 10 minutos e com citrato de chumbo por 3 a 5 minutos. O material foi examinado em microscópio eletrônico de transmissão (*LEO 906E - Zeiss*) com voltagem de aceleração de 80 kV. As imagens foram capturadas por uma câmera *CCD Olympus Megaview III* através do programa *iTEM - Universal TEM Imaging Platform (Olympus Soft Imaging Solutions GMBh, Germany)* e salvas em extensão *TIF*. As medidas das bactérias e dos diâmetros dos grânulos foram feitas através da interface *measurement user interface* do mesmo programa e exportadas para *MS Excel*.

O preparo das amostras foi realizado com auxílio da Técnica Simone Jared do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan. Os cortes ultrafinos e as fotografias por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram realizados pela Dra. Sylvia Mendes Carneiro do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

5.2.1.2.1 Procedimentos morfométricos

Os procedimentos morfométricos foram realizados utilizando as fotografias de microscopia eletrônica de transmissão dos cultivos de *H. influenzae*. Para tanto, foi aplicado uma matriz com pontos equidistantes sobre a imagem. A contagem do número de pontos do sistema teste foi realizada considerando os pontos da matriz sobre a bactéria (Pt) e número de pontos sobre a estrutura (Pe).

A estimativa da densidade de volume dos grânulos, ou seja, a fração de volume que os grânulos ocupam na célula foi realizada através da equação 5.1.

$$Vv = \frac{Pe}{Pt} \cdot 100 \quad (5.1)$$

Vv = densidade do volume dos grânulos (%);

Pe = pontos incidentes sobre a estrutura;

Pt = pontos totais incidentes sobre a bactéria.

O número total de pontos a incidirem sobre a bactéria de forma obter um nível de erro associado à estimativa de densidade de volume dos grânulos inferior a 10% foi determinado pela equação 5.2. Para tanto, uma estimativa prévia da densidade do volume dos grânulos foi efetuada a partir de um número limitado de pontos do sistema teste.

$$Pt = \frac{1 - Pp}{e^2 - Pp} \quad (5.2)$$

Pt = número de pontos incidentes sobre a bactéria;

Pp = estimativa prévia da densidade do volume dos grânulos;

e = erro padrão.

5.2.1.3 Determinação da concentração de polissacarídeo capsular

A determinação de polissacarídeo capsular liberado ao sobrenadante da cultura foi realizada pelo método modificado de Bial conforme descrito no item 3.2.8.4 do capítulo 3.

5.2.1.4 Determinação da massa molecular do polissacarídeo capsular

Para determinação da massa molecular do polissacarídeo capsular no decorrer do cultivo, foi coletado um volume de 30 mL do caldo fermentado, o qual foi centrifugado a 12800g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi dialisado contra água por aproximadamente 24 horas com troca de água a cada 2 horas. Em seguida, o pH foi

ajustado para 5,4, com ácido acético e adicionou-se acetato de sódio 7% final e etanol 80% final. A amostra foi incubada em repouso na geladeira a 4°C por 24 horas. Após incubação, centrifugou-se a 6797 g a 4°C por 30 minutos. O *pellet* foi diluído com água destilada para um volume final de 10 mL, homogeneizado e centrifugado 1699 g por 30 minutos. O sobrenadante foi separado e o precipitado novamente ressuspendido com 10 ml de água destilada, homogeneizado e centrifugado 1699 g por mais 30 minutos. Os sobrenadantes oriundos das duas centrifugações foram transferidos para um mesmo *falcon* (50 mL) e concentrados em filtro *Centriprep* (*Amicon*®) com corte molecular de 10 kDa. Os concentrados foram coletados e congelados a -20°C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram levadas para *freezer* -70°C, onde permaneceram por 72 horas, para então, serem liofilizadas (*Freeze Dryer – Modulyod- Edwards*).

A massa molecular foi determinada por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) – (*Shimadzu*). As amostras liofilizadas foram ressuspendidas com 400 µL de tampão da fase móvel e filtradas em membrana de 0,22 µm antes de injetar na coluna TSKgel GMPWXL. A fase móvel utilizada foi o tampão fosfato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, com fluxo de 0,6 mL/min a 35°C. A massa molecular foi determinada através do *software Class VP – Version 6.2* utilizando padrão de dextranas nas seguintes massas moleculares: 1,5 kDa, 6 kDa, 10 kDa, 40 kDa, 70 kDa e 229 kDa.

Para identificar o tempo de retenção do polissacarídeo de interesse, foi injetado no cromatógrafo (HPLC) o polissacarídeo (PRP) purificado em diferentes concentrações. O PRP apresentou pico com tempo de retenção de 24,06 minutos. Este foi confirmado como pico de referencia do PRP, submetendo amostras da eluição da corrida para determinação de polissacarídeo pelo método modificado de Bial (ASHWELL, 1957). As amostras dos cultivos CDAIG 0,25 e 0,5VVM injetadas na coluna, apresentaram pico (P1) com tempo de retenção entre 23,5 a 24 minutos que foi identificado como polissacarídeo através da determinação colorimétrica.

5.2.1.5 Determinação de polissacarídeo na célula

Para a determinação do polissacarídeo na célula, foram coletadas amostras na sexta e décima segunda hora do cultivo de maneira obter uma quantidade equivalente a 50 mg em massa seca. A quantidade de amostra coletada para resultar na massa seca desejada foi calculada através do fator de conversão de densidade óptica (DO_{540nm}) em massa seca (dados não mostrados). As amostras coletadas foram centrifugadas a 12800 g por 5 minutos a 4°C, e o precipitado celular ressuscitado em solução salina para remover os resíduos do meio de cultura e submetidos novamente a centrifugação a 12800 g por 5 minutos a 4°C. Os precipitados contendo a bactéria foram ressuscitados com 500 µL de solução salina e transferidos para frascos e congelados em *freezer* -20°C por 72 horas. Em seguida, os frascos foram transferidos para *freezer* -70°C onde permaneceram por mais 72 horas, e então levados para serem liofilizadas *Freeze Dryer – Modulyod*. As amostras liofilizadas foram denominadas massa celular liofilizada (MCL).

Amostras coletadas na sexta e décima segunda hora de cultivo foram submetidas à ruptura celular. Para tanto, utilizou-se 10 mg de MCL, que foram transferidas para tubos *ependorf* e ressuscitadas com 5 mL de solução de lise (25 mM Tris HCL, pH 7,5 contendo lisozima (20 mg/mL)) por grama de massa celular seca com auxílio de uma micropipeta e incubado à temperatura ambiente, em 130 rpm (*Tecnal TE-140*) por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12800 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o *pellet* ressuscitado com 100 µL de Tris HCL 25 mM. O *pellet* foi novamente centrifugado a 12800 g por 5 minutos e o sobrenadante transferido para o tubo contendo o primeiro sobrenadante, e o *pellet* ressuscitado com 100 µL de Tris HCL 25 mM. Ambos, sobrenadante e *pellet* foram armazenados em *freezer* -20°C até o momento do uso.

Para a determinação do polissacarídeo na célula, 5 µL do sobrenadante e *pellet* oriundos da massa celular liofilizada (MCL) após a ruptura foram submetidos a gel de imunoeletroforese (*rocket Immunoelectrophoresis*) (LAURELL, 1966).

Gel de Agarose a 1,5 % foi inicialmente aquecido a 100°C até total dissolução da agarose, e posteriormente levado para banho seco a 60°C. A temperatura do gel foi acompanhada com termômetro, e assim que a temperatura alcançou 60°C, 100 µL de

anticorpo (de burro) anti-Hib foi adicionado e homogeneizado. Em seguida, o gel foi transferido sobre o filme de acetato (*GelBond[®] film, Pharmacia*) até solidificar. O polissacarídeo capsular (PRP) purificado foi utilizado para a curva padrão.

A corrida foi realizada em sistema de Eletroforese (*LKB – Pharmacia*) nas seguintes condições: 210 V, 24 mA, 5 W por 3 horas.

Após a corrida, o gel foi lavado quatro vezes com solução NaCl 0,9%, sob agitação, por 30 minutos cada, e quatro vezes com água destilada, sob agitação, por 15 minutos cada. Após as lavagens, a água foi removida e o gel foi coberto com uma camada de papel filtro umedecido com água destilada e com um peso em cima, a temperatura ambiente, para que o gel seque formando um filme transparente sobre o acetato. Após a secagem, o filme de acetato foi corado com solução *Comassie Blue* por 2 horas, e depois descorado até a remoção completa do corante. O filme de acetato foi novamente coberto com papel filtro umedecido com água e deixado a temperatura ambiente até secar.

As soluções e os materiais utilizados nesta análise são descritos abaixo.

- ✓ Tampão Acetato (*Full Strenght*) pH 8,6: acetato de sódio 9,72 g; trizma base 17,46 g; EDTA 0,66 g e água Mili-Q 2L;
- ✓ Tampão do Gel: 20 mL do tampão acetato pH8,6; 80 mL de água Milli-Q;
- ✓ Gel de Agarose 1,5 %: 16 mL do tampão do gel; Agarose 0,24 g;
- ✓ Solução de *Comassie Blue*: ácido acético glacial 10%; *Comassie Blue* R250 0,25 %; metanol 45 %;
- ✓ Solução descorante: ácido acético glacial 10 %; metanol 30 %.

5.2.1.6 Determinação de aminoácidos do sobrenadante do cultivo

A análise de aminoácidos por HPLC foi realizada pelos técnicos Tiago Martins Pereira e Amadeus Gomes de Azevedo, ambos do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

5.2.1.7 Determinação de polihidroxidoalcanoato (PHA)

A quantidade e composição de polihidroxidoalcanoato (PHA) foram determinadas através de cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (GOMEZ *et al.*, 1996). Cerca de

10 a 15 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos, aos quais foram adicionados 2 mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2-dicloroetano e 100 µL de uma solução de ácido benzóico (40 g/L) em propanol. Os tubos foram fechados fortemente, e as amostras agitadas e submetidas a propanólise por 3 horas a 100°C, com agitação após os primeiros 30 minutos de propanólise. Após resfriamento, foram adicionados aos tubos 4 mL de água destilada, agitando-os vigorosamente por 30 segundos. Após a separação das fases, a fase aquosa (superior) foi descartada e a fase orgânica (inferior) utilizada para análise. Um volume de 1 µL da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra (*split* 1:20) em cromatógrafo gasoso HP7890 *Series GC System* equipado com uma coluna HP-5 (5% fenil-metil-siloxane, comprimento 30 m, diâmetro 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm). A análise foi conduzida nas seguintes condições:

- ✓ Gás de arraste: hélio (0,8 mL/ min)
- ✓ Temperatura do injetor: 250°C.
- ✓ Temperatura do detector: 300°C.
- ✓ Sistema de detecção: ionização de chama (FID).
- ✓ Programa de temperaturas do forno: 100°C por 1 minuto, elevação da temperatura até 200°C a 8°C/min e 185°C por 15 minutos.

Como padrão interno foi utilizado ácido benzóico. Polímeros produzidos por *P. oleovorans* ou *P. putida* a partir de diferentes fontes de carbono ou P3HB e P3HB-*co*-3HV (Aldrich) foram utilizados como padrões para a geração das curvas de calibração. O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes 3HB (3-Hidroxibutirato), 3HV (3-Hidroxivalerato), 3HHx (3-Hidroxihexanoato), 3HHp (3-Hidroxieptanoato), 3HO (3-Hidroxi octanoato), 3HN (3-Hidroxinonanoato), 3HD (3-Hidroxidecanoato) e 3HDd (3-Hidroxidodecanoato).

A determinação de polihidroxidoalcanoato (PHA) foi realizada pelos alunos Rogério de Sousa Gomes e Mariana Rendeiro Gonçalves que fizeram a propanólise e a injeção no cromatógrafo gasoso, respectivamente. Ambos trabalharam sob a supervisão do Dr. José Gregório C. Gomez do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB II) - Universidade de São Paulo (USP).

5.2.1.8 Determinação dos elementos Carbono, Nitrogênio e Hidrogênio

A porcentagem total dos elementos carbono (C), nitrogênio (N) e hidrogênio (H) nas células de *H. influenzae* b foi determinada por Análise Elementar (CHN 2400 *Perkin-Elmer*). Um montante de 5 mg de massa celular liofilizada (MCL) foi encaminhada para Central Analítica do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo – USP para realização destas análises.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conhecimento acumulado sobre o microrganismo a ser utilizado em um determinado processo fermentativo se faz fundamental para direcionar e ou conduzir um cultivo da melhor maneira, assim como definir pontos de controle de qualidade durante o processo. Portanto, conhecer melhor a morfologia, metabolismo e o comportamento do *H. influenzae* tipo b pode fornecer informações importantes e fundamentais que permitam realizar ajustes estratégicos no processo fermentativo de forma a resultar em maior produção, produtividade e homogeneidade do produto.

Melhoramentos na etapa inicial do processo de purificação vêm sendo realizados em pontos chaves como, por exemplo, a separação celular realizada através da centrifugação (sobrenadante) ao invés do uso da microfiltração tangencial em membranas de 0,11 µm pelo fato da membrana reter o polissacarídeo junto ao concentrado celular resultando em baixo rendimento no microfiltrado. O primeiro passo da purificação, após a separação celular, é a concentração do sobrenadante da cultura por meio da ultrafiltração tangencial em membrana com corte molecular de 100 kDa para eliminar moléculas interferentes menores de 100 kDa como metabólitos e componentes do meio de cultura.

A recuperação do PRP no concentrado de 100 kDa, a partir dos sobrenadantes de diferentes cultivos ficou em torno de 50 %, sendo este valor inferior ao anteriormente obtido de 74% (TAKAGI *et al.*, 2003). O baixo rendimento obtido pode sugerir que nos processos fermentativos atuais o polissacarídeo sintetizado seja de menor massa molecular. No tocante a purificação, é importante destacar que recentemente foi inserido na etapa inicial maior número de lavagens com uso de detergente o que poderia resultar na perda do polissacarídeo através da membrana (100 kDa) levando a menor recuperação de PRP no concentrado (ALBANI, 2008).

Para verificar se os processos fermentativos mais recentes vêm formando polissacarídeo de menor massa molecular, primeiramente foi realizado um levantamento das alterações feitas nos cultivos depois do trabalho realizado por Takagi (TAKAGI *et al.*, 2003). Para isso foi utilizado o cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose (CDAIG) a fim de comparação (tabela 5.1).

Tabela 5.1. Itens alterados no processo descontínuo alimentado com vazão intermitente de glicose para produção de polissacarídeo de *H. influenzae* tipo b.

item	Descrição	Alteração
1	Peptona de Soja	de Difco para BD
2	Tempo de Cultivo	de 24h para 12h
3	Vazão de específica de ar	de 0,25 para 0,5 VVM

No estudo realizado por Takagi foi utilizado cultivos descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose (CDAIG), peptona de soja da Difco e vazão específica de ar de 0,25 VVM, em um cultivo com 24 horas de duração (TAKAGI *et al.*, 2003).

Atualmente, o mesmo processo, CDAIG, vem sendo conduzido com peptona de soja da BD, vazão específica de ar de 0,2 ou 0,5 VVM em um processo de 12 horas.

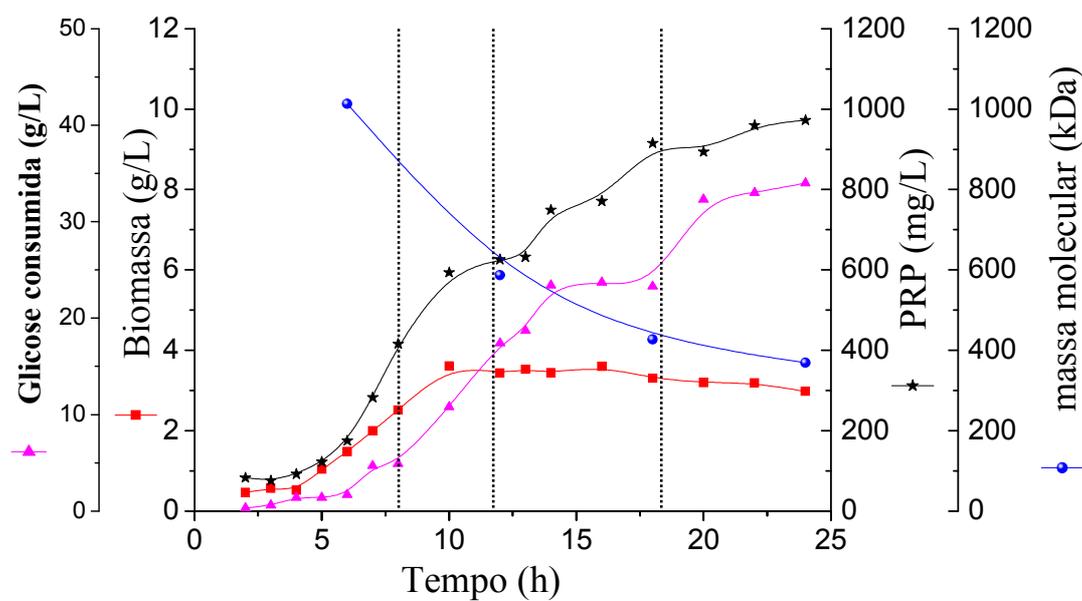
Na tentativa de conhecer melhor este microrganismo, bem como esclarecer se uma das variáveis citadas na tabela 5.1, ou a combinação delas, poderiam influenciar no tamanho da massa molecular do polissacarídeo e ser o responsável pela menor recuperação do produto na etapa inicial do processo de purificação, foram estudados a vazão específica de ar (0,25 e 0,5 VVM) e o tempo de cultivo (24 horas), assim como os aspectos morfológicos e do metabolismo do Hib em CDAIG.

5.3.1 Influência do tempo e vazão específica de ar na massa molecular do polissacarídeo capsular (PRP)

Cultivos descontínuos alimentados com adição intermitente de glicose (CDAIG) foram realizados com peptona de soja da BD. A adição de glicose foi realizada no momento em que a glicose presente no meio foi completamente consumida, sinalizada pelo aparecimento de um pico na concentração de oxigênio dissolvido (COD) (dados não mostrados). O montante de glicose adicionado (5 g/L) foi calculado para restaurar a concentração inicial de glicose do meio.

No cultivo CDAIG com vazão específica de ar em 0,25VVM (figura 5.1), a concentração de biomassa atingiu 3,4 g MS/L na décima segunda hora de cultivo, mantendo nesta concentração até a décima sexta hora de cultivo e então começou a diminuir. Ao final do cultivo, a concentração de biomassa estava em 3,0 g MS/L. A concentração de polissacarídeo atingiu aproximadamente 600 mg PRP/L na décima

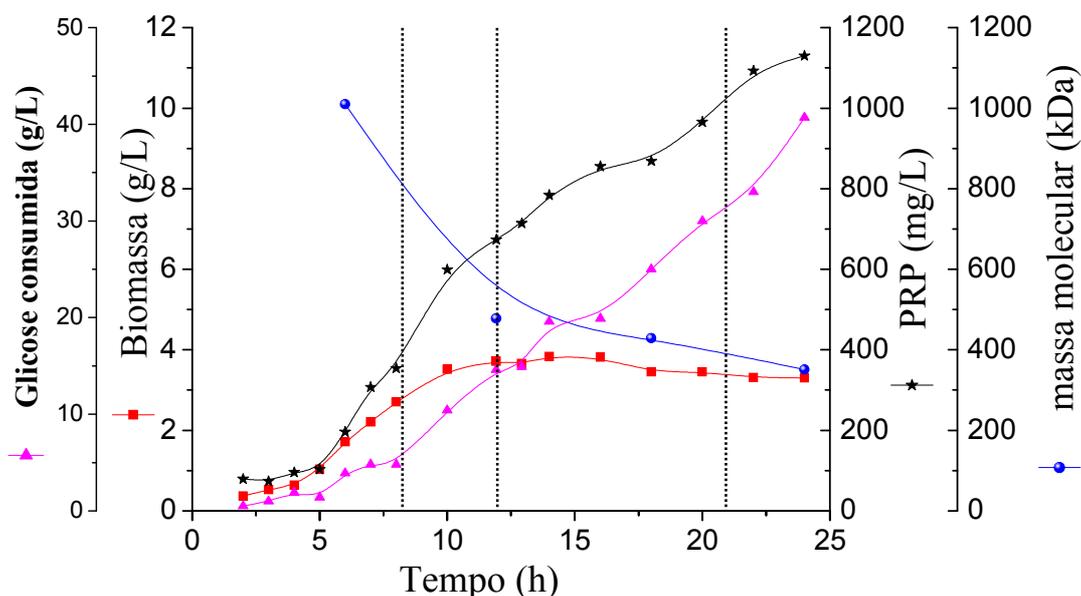
segunda hora de cultivo, e continuou a aumentar mesmo com a estagnação da biomassa chegando em torno de 970 mg PRP/L (24^a hora). A massa molecular do polissacarídeo mostrou uma tendência de queda com o decorrer do cultivo, passando de 1013 kDa na sexta hora de cultivo, para 370 kDa ao final do cultivo.



Linha pontilhada indica o momento do pulso de glicose.

Figura 5.1. Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose com suprimento de ar em 0,25 VVM.

No cultivo CDAIG com vazão específica de ar em 0,5VVM (figura 5.2), a concentração de biomassa atingiu 3,8 g MS/L na décima segunda hora de cultivo, mantendo nesta concentração até a décima sexta hora de cultivo e então começou a cair. Ao final do cultivo a concentração de biomassa estava em 3,3 g MS/L. A concentração de polissacarídeo atingiu aproximadamente 700 mg PRP/L na décima segunda hora de cultivo, e continuou a aumentar mesmo com a estagnação da biomassa, chegando em torno de 1130 mg PRP/L (24^a hora). A massa molecular do polissacarídeo mostrou tendência a queda com o decorrer do cultivo, passando de 1009 kDa na sexta hora de cultivo, para 350 kDa ao final do cultivo.



Linha pontilhada indica o momento do pulso de glicose.

Figura 5.2. Cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose com suprimento de ar em 0,5 VVM.

Ao comparar os CDAIG (tabela 5.2) quanto ao suprimento de ar, com aumento da vazão específica de ar de 0,25 VVM para 0,5 VVM, observamos que resultou em aumento no crescimento celular e na formação de polissacarídeo, 10% e 14% respectivamente. Mas não mostrou influência quanto ao tamanho da massa molecular do polissacarídeo, sendo que as duas condições atingiram massa molecular de aproximadamente 360 kDa ao final do cultivo.

Quanto ao tempo de cultivo (tabela 5.2) o prolongamento da duração do processo de doze para vinte quatro horas mostrou influenciar positivamente a formação de polissacarídeo com aumento na produção de PRP de 38% nas duas condições, mesmo com a estagnação seguida de queda no crescimento celular (decréscimo de 12% na massa celular seca). Já a massa molecular do polissacarídeo, diminuiu da décima segunda hora até a vigésima quarta hora, com queda de 37% e 27% em cultivo com 0,25 VVM e 0,5 VVM, respectivamente.

Tabela 5.2. Influência da vazão de ar e do tempo de cultivo na formação de biomassa, e na produção e massa molecular do polissacarídeo em cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose.

Descrição	tempo (h)	Biomassa (g/L)	PRP (mg/L)	Massa molecular (kDa)
CDAIG 0,25VVM	6	1,5	175	1013
	12	3,4	626	587
	18	3,3	915	427
	24	3,0	973	369
CDAIG 0,5VVM	6	1,7	196	1010
	12	3,7	674	478
	18	3,5	869	429
	24	3,3	1130	351

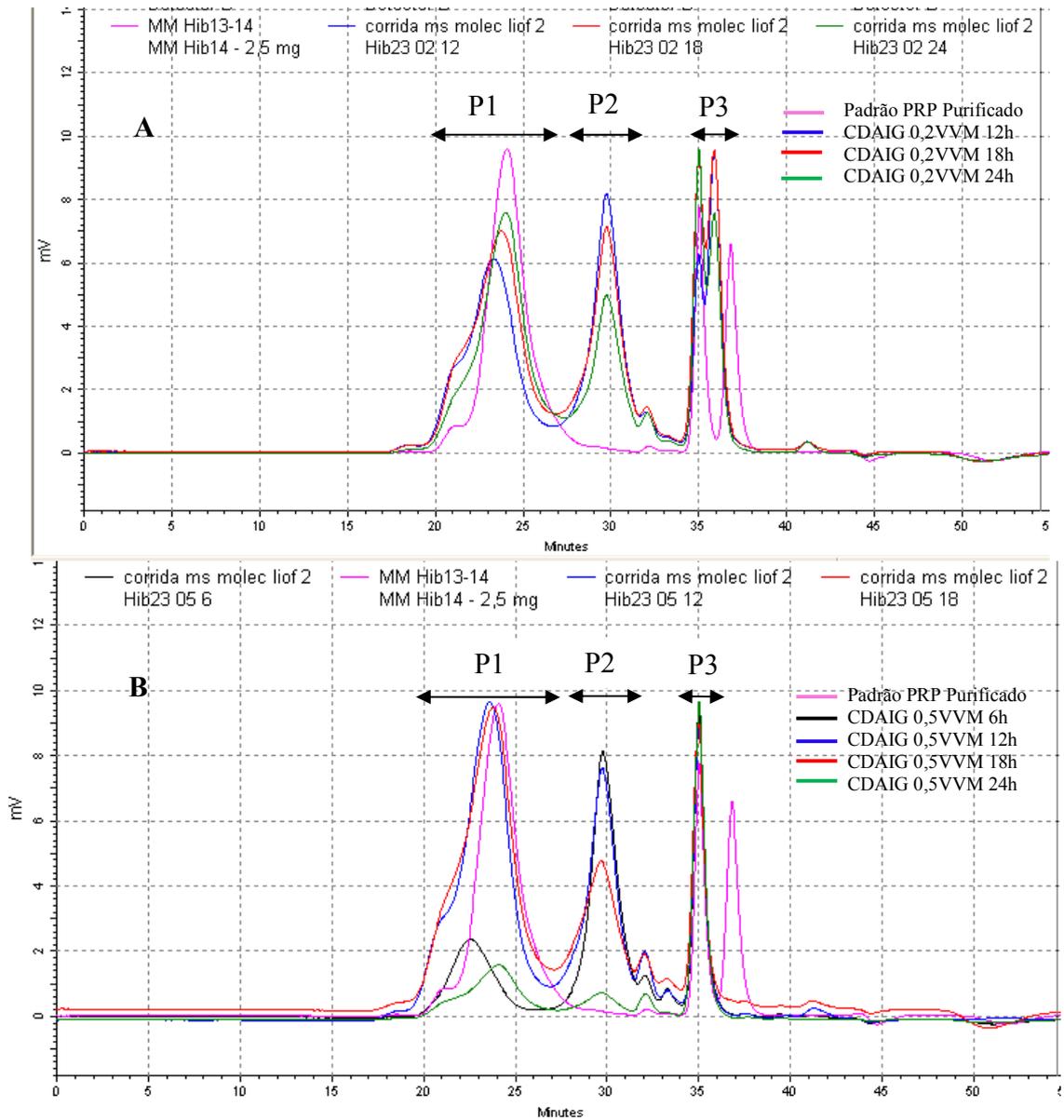
A figura 5.3 ilustra o perfil da massa molecular do polissacarídeo capsular de *H. influenzae* b em diferentes vazões de ar no decorrer do tempo de cultivo. Ao sobrepor os cromatogramas do cultivo (figura 5.3A e B), foi observado maior tempo de retenção, referente ao pico do polissacarídeo, com o decorrer do tempo de cultivo.

A massa molecular do polissacarídeo foi determinada através do coeficiente de regressão linear do padrão de dextrans de diferentes massas moleculares e respectivos tempos de retenção (figura 5.4A e B).

Os resultados mostram que o tempo de cultivo mostrou exercer influência significativa no tamanho da massa molecular do polissacarídeo, principalmente nas primeiras doze horas de cultivo com queda acentuada. A figura 5.4C ilustra que quanto maior o tempo de cultivo ocorre uma redução no tamanho da massa molecular do polissacarídeo atingindo a um valor próximo de 400kDa no final do cultivo.

Nos cromatogramas foi observado um segundo pico (P2) com tempo de retenção de aproximadamente 30 minutos (figura 5.3A e B). Este segundo pico não foi observado na amostra de PRP purificado, provavelmente devido às várias etapas de purificação, que podem ter eliminado possíveis contaminantes. Mesmo que o P2 seja polissacarídeo, sua recuperação não é interessante, pois refere-se a uma molécula de baixa massa molecular (7 kDa).

Já o terceiro pico (P3) com tempo de retenção na faixa de 35 a 37 minutos, foi observado tanto nas amostras do cultivo como no PRP purificado, e refere-se a um pico do tampão fosfato, utilizado como fase móvel (figura 5.3A e B).



P1 – pico do polissacarídeo (PRP); P2 – pico de interferentes; P3 – pico do tampão fosfato.

Figura 5.3. Cromatograma de gel filtração das amostras dos cultivos de *H. influenzae* b em diferentes tempos de cultivo e vazões específica de ar. A) CDAIG 0,25VVM; B) CDAIG 0,5VVM.

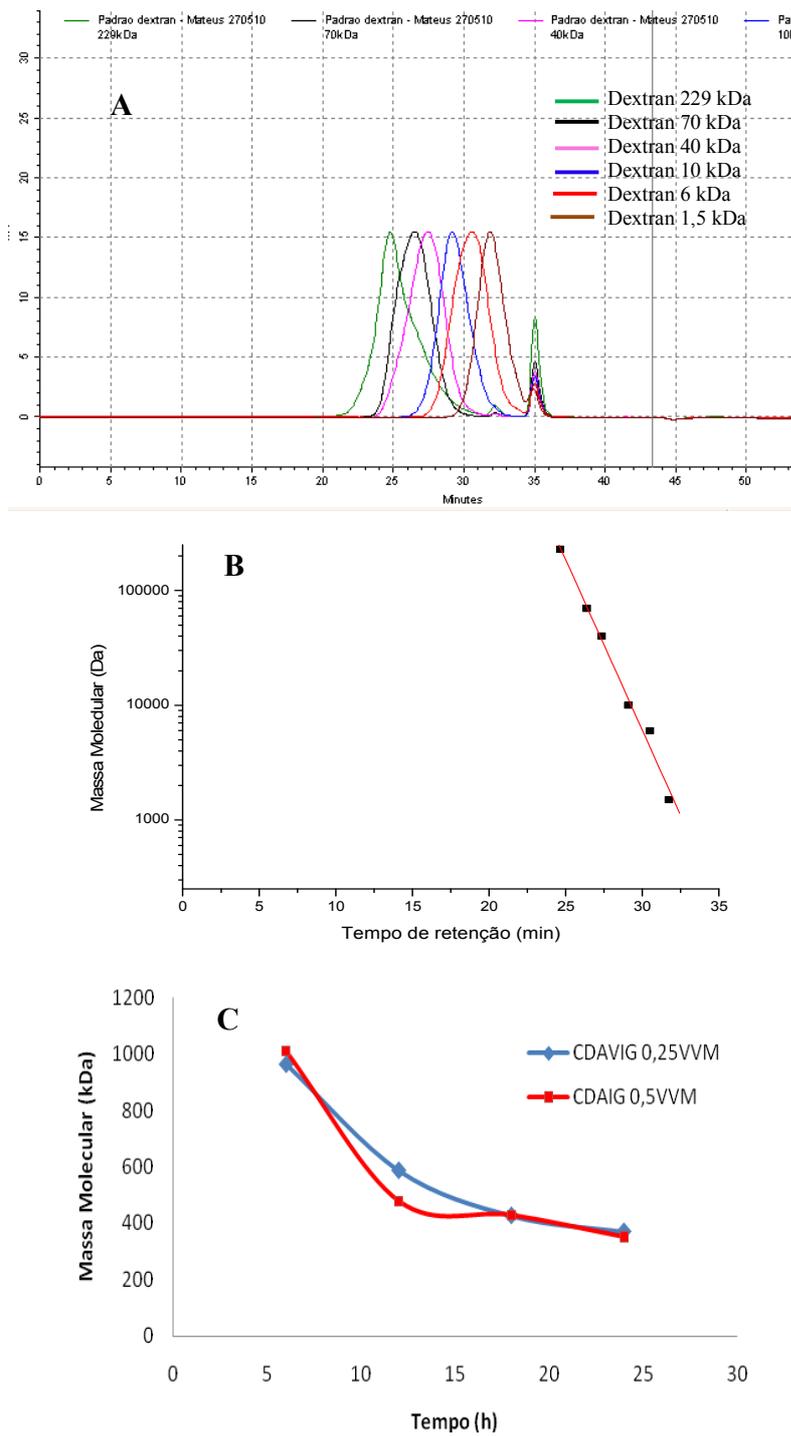


Figura 5.4. Gel filtração dos padrões de dextrans e das amostras. A) Cromatograma do padrão dextrans; B) Curva padrão de dextrans; C) Perfil da massa molecular do PRP em diferentes tempos de cultivo e vazões específica de ar.

Os resultados da cromatografia mostraram que não foram o aumento no suprimento de ar de 0,25 para 0,5VVM e/ou a redução no tempo de cultivo de 24 horas para 12 horas (tabela 5.1) as variáveis responsáveis pela menor recuperação de PRP na etapa inicial da purificação.

Apesar de influenciar na massa molecular, o tempo de cultivo exerceu efeito negativo, ou seja, quanto maior o tempo de cultivo, menor massa molecular. Portanto, o fato de estarmos trabalhando com menor tempo de cultivo (tabela 5.1), é esperado um polímero (PRP) de maior massa molecular.

O maior tempo de cultivo poderia expor mais o polissacarídeo as condições agressivas do ambiente no biorreator, como o cisalhamento, ou uma possível ação de enzimas, levando a um polímero de menor massa molecular.

5.3.2 Análise de aminoácidos

Nos cultivos de *H. influenzae* descritos no capítulo 3, assim como os ilustrados no presente capítulo (figuras 5.1 e 5.2) observou-se que o consumo de glicose ocorreu em maior intensidade entre a 3^a e 5^a hora de cultivo, sugerindo assim que o *H. influenzae* poderia estar consumindo outro nutriente preferencialmente à glicose. Fato este que acontece com muitos microrganismos, como por exemplo, a *Escherichia coli*, que quando expostos a diferentes carboidratos, utilizam um, em preferência a outro (POSTMA *et al.*, 1993).

O meio de cultura utilizado no cultivo de *H. influenzae* é um meio complexo composto por extrato de levedura e peptona de soja. Em sua composição, a peptona de soja apresenta uma quantidade significativa de carboidratos, em torno de 30 % e que poderia estar sendo consumido preferencialmente em relação a glicose (BD Bionutriens, 2007).

Visando conhecer melhor os requerimentos nutricionais deste microrganismo, amostras do sobrenadante do cultivo foram coletadas em intervalos regulares de tempo e submetidas à cromatografia (HPLC) para análise de aminoácidos.

A figura 5.5 ilustra o perfil de consumo dos aminoácidos disponibilizados no meio de cultura no decorrer do tempo de cultivo. Os aminoácidos alanina, leucina e valina se encontravam presentes em maior quantidade (figura 5.5A e B). No entanto, os aminoácidos

aspartato, cisteína, glutamato, glutamina e serina foram consumidos preferencialmente nas primeiras horas (5 horas) de cultivo (figura 5.6), sendo a glicose consumida em maior velocidade depois deste período (figura 5.1 e 5.2).

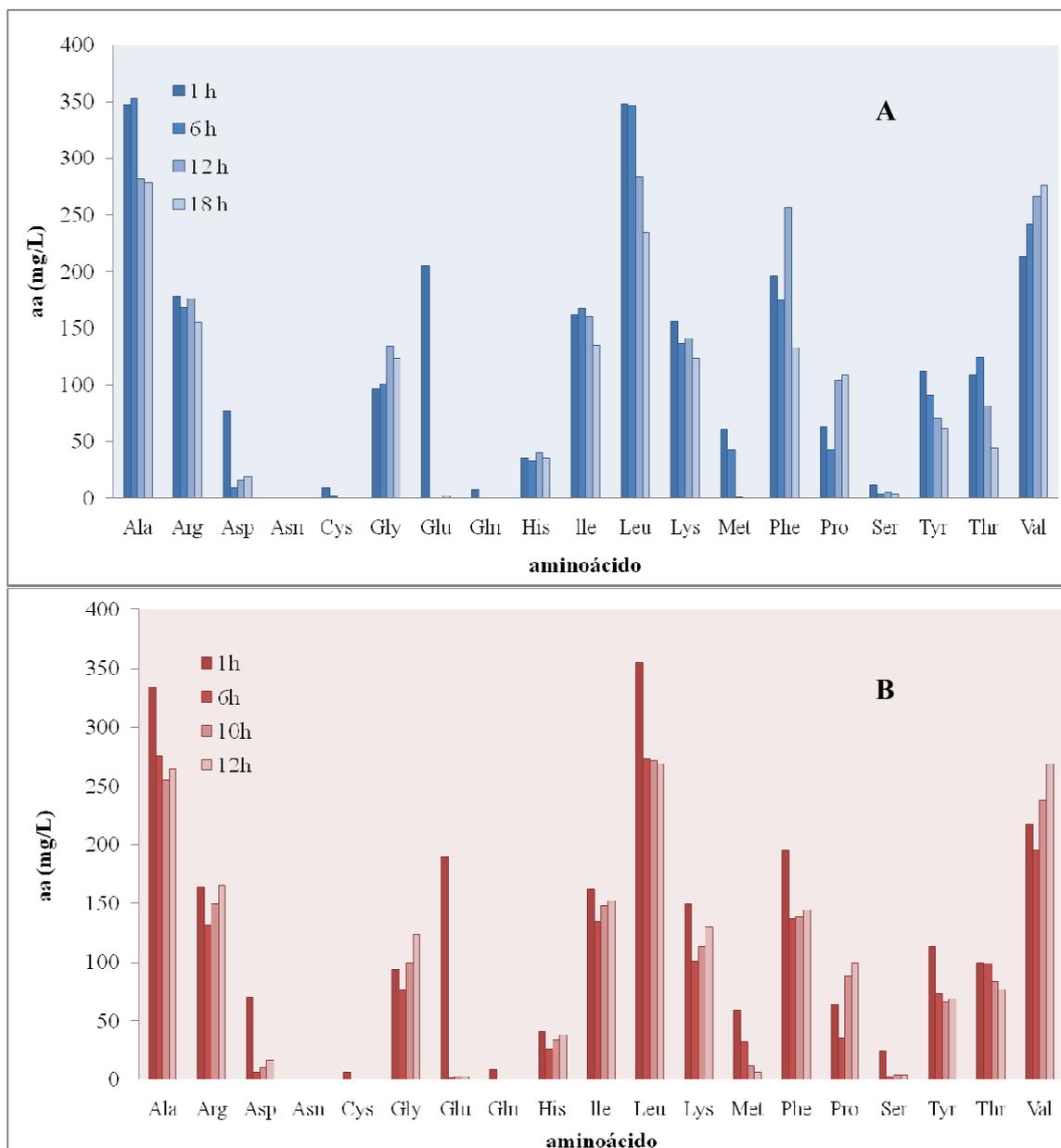
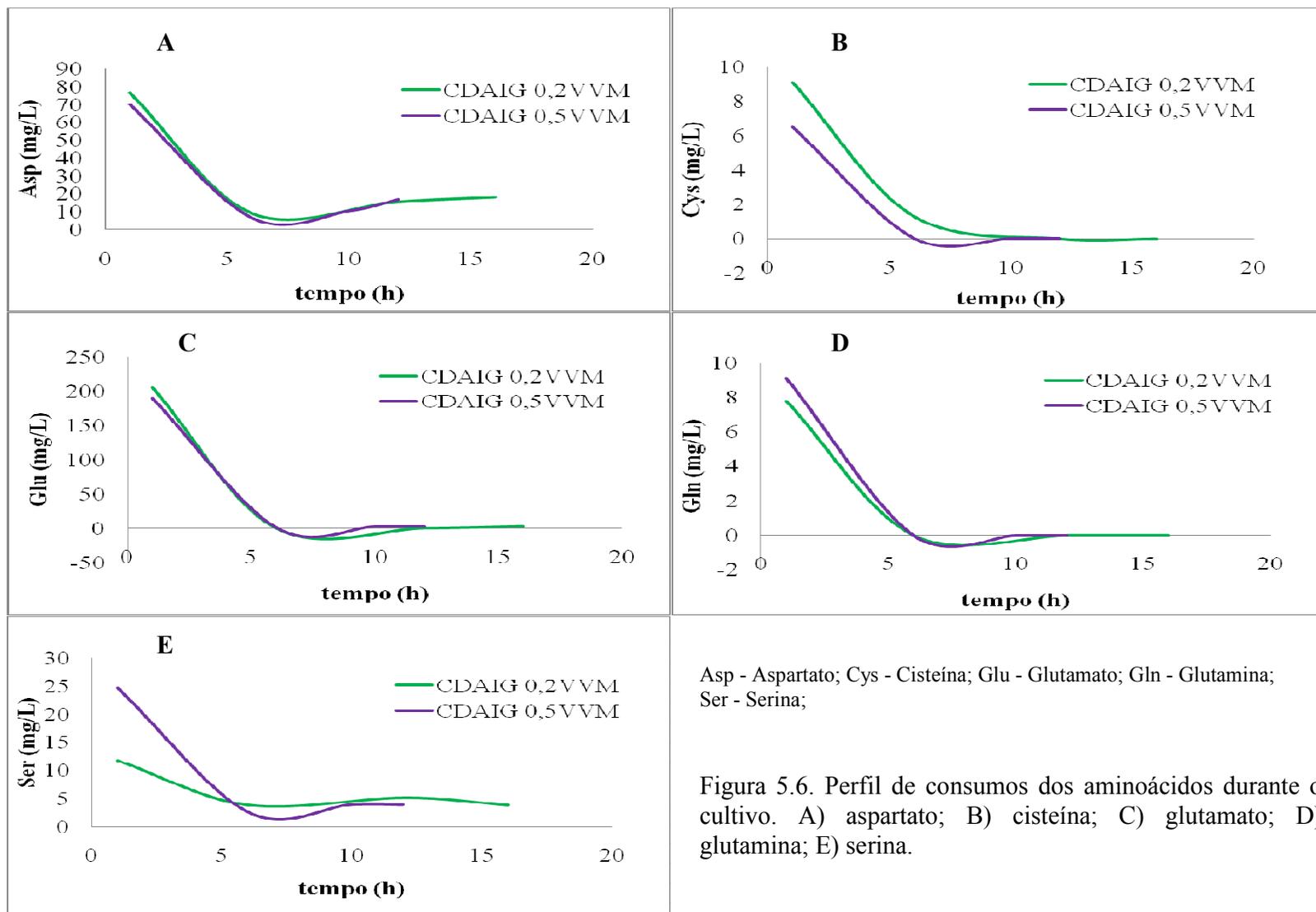


Figura 5.5. Perfil de consumo dos aminoácidos presente no meio de cultura para cultivos de *H. influenzae* b. A) CDAIG com 0,25VVM; B) CDAIG com 0,5VVM.

Ala - Alanina; Arg - Arginina; Asn - Asparagina; Asp - Aspartato; Cys - Cisteína; Gly - Glicina; Glu - Glutamato; Gln - Glutamina; His - Histidina; Ile - Isoleucina; Leu - Leucina; Lis - Lisina; Met - Metionina; Phe - Fenilalanina; Pro - Prolina; Ser - Serina; Thr - Treonina; Tyr - Tirosina; Val - Valina.



O consumo dos aminoácidos nas primeiras 5 horas de cultivo, em destaque na figura 5.6, provavelmente tem participação na parte da via metabólica na qual Hib é mais deficiente, ou seja, no ciclo de Krebs. O aproveitamento desses aminoácidos poderia permitir de maneira mais eficaz a produção de energia para o crescimento celular.

O aspartato pode ingressar no ciclo de Krebs pela conversão direta em oxaloacetato (E.C 2.6.1.1), ou em fumarato (E.C 4.3.1.1), ou ainda pela conversão em fumarato através de dois intermediários, L-Arginina-succinato (E.C 6.3.4.5 e 4.3.2.1) e Adenilo-succinato (E.C 6.3.4.4 e 4.3.2.2). A cisteína (E.C 4.4.1.8) e a serina (E.C 4.3.1.17 e 4.3.1.19) podem ser convertidas em piruvato e participarem do metabolismo do piruvato. A glutamina pode participar do metabolismo de purina (EC 2.4.2.14) ou do metabolismo de amino açúcares (EC 2.6.1.16) (anexo 2) (KEGG, 2010).

Dentre os aminoácidos consumidos nas primeiras horas de cultivo (figura 5.6), o glutamato foi disponibilizado no meio de cultura em maior quantidade, em torno de 200 mg/L. O glutamato pode alimentar o ciclo de Krebs servindo como um intermediário (α -cetoglutarato) e produzindo energia (figura 2.13 do capítulo 2) (FLEISCHMANN *et al.*, 1995; TATUSOV *et al.*, 1996; TANG *et al.*, 1997).

Além dos aminoácidos, há pequenos peptídeos presentes na peptona de soja e no extrato de levedura e que também poderiam ser utilizados pelo *H. influenzae* (BD Bionutriens, 2007). Estes podem suprir o requerimento de peptídeos, aminoácidos e atuar como fontes de carbono e nitrogênio (MACFADYEN e REDFIELD, 1996).

Podemos observar que nos cultivos em biorreatores, *H. influenzae* b mostrou consumir outros nutrientes em preferência a glicose, o que foi reforçado pelo maior consumo de aminoácidos nas primeiras horas de cultivo (figura 5.6). Estes achados podem contribuir na elaboração da composição de um meio de cultura mais direcionado, suplementando o meio com os aminoácidos preferencialmente consumidos.

5.3.3 Aspectos Morfológicos

No capítulo 3 foram descritas as diferentes estratégias de cultivo descontínuo alimentado visando alcançar maior produção e produtividade do polissacarídeo capsular. No entanto, de modo geral, observou-se excesso de formação de ácido acético limitando o

crescimento celular e conseqüentemente a formação do produto (PRP). Ao desenhar e executar um cultivo com limitação no fornecimento de glicose, como estratégia para evitar o acúmulo de ácido acético, estratégia esta que em *E. coli* recombinante possibilita o controle da formação de ácido acético, em *H. influenzae*, a formação de ácido ocorreu independente da limitação no fornecimento de glicose (LEE *et al.*, 1997). O *H. influenzae* é um microrganismo fastidioso, com sistema enzimático deficiente (figura 2.13 do capítulo 2) (FLEISCHMANN *et al.*, 1995) o que poderia justificar a dificuldade em induzir que este microrganismo a deixar de utilizar as vias fermentativas e com isso minimizar a formação de ácido.

Visando verificar se as características morfológicas e intracelulares deste microrganismo sofreriam modificações frente ao estresse ao qual é submetido no decorrer do cultivo em presença de ácido acético no ambiente do reator, amostras foram coletadas em intervalos regulares de tempo, as quais foram submetidas à microscopia óptica através de coloração de Gram e a microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Estes resultados foram obtidos utilizando-se duas amostras da cultura, coletadas na sexta e na décima segunda hora de cultivo. Observou-se que as células na sexta hora de cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose (CDAIG) com vazão específica de ar em 0,25 VVM ou 0,5 VVM, apresentaram morfologia arredondada e aparentemente saudável (figura 5.7A e 5.8A) ou sem alteração significativa. Enquanto as amostras coletadas na décima segunda hora, as células mostraram-se mais alongadas e exibiram pontos brancos com aparência de grânulos (figura 5.7B e 5.8B).

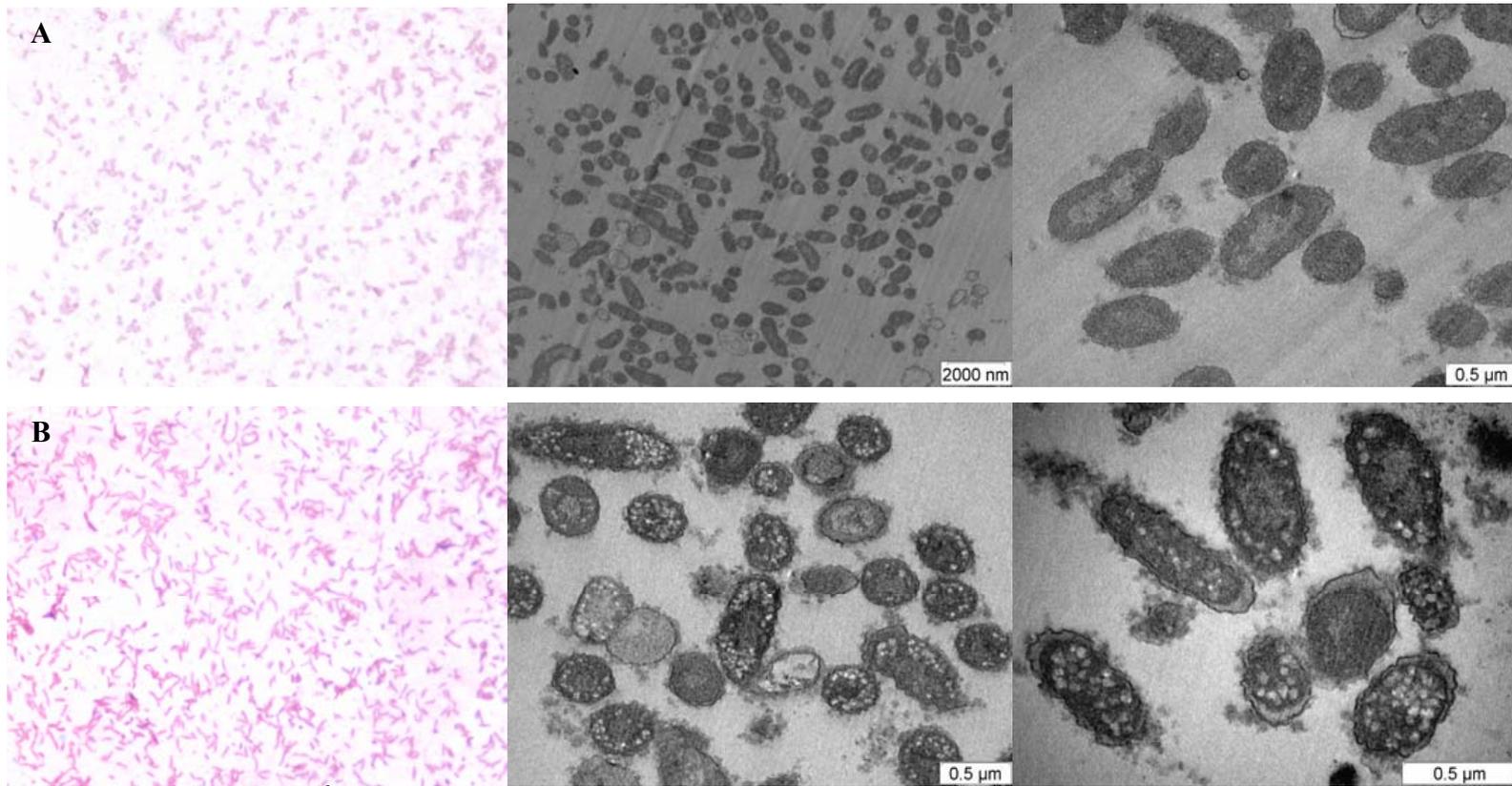


Figura 5.7. Microscopia Óptica (MO) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) – CDAIG: 0,25 VVM, A) sexta hora de cultivo; B) décima segunda hora de cultivo.
CDAIG – Cultivo Descontínuo Alimentado com Adição Intermitente de Glicose

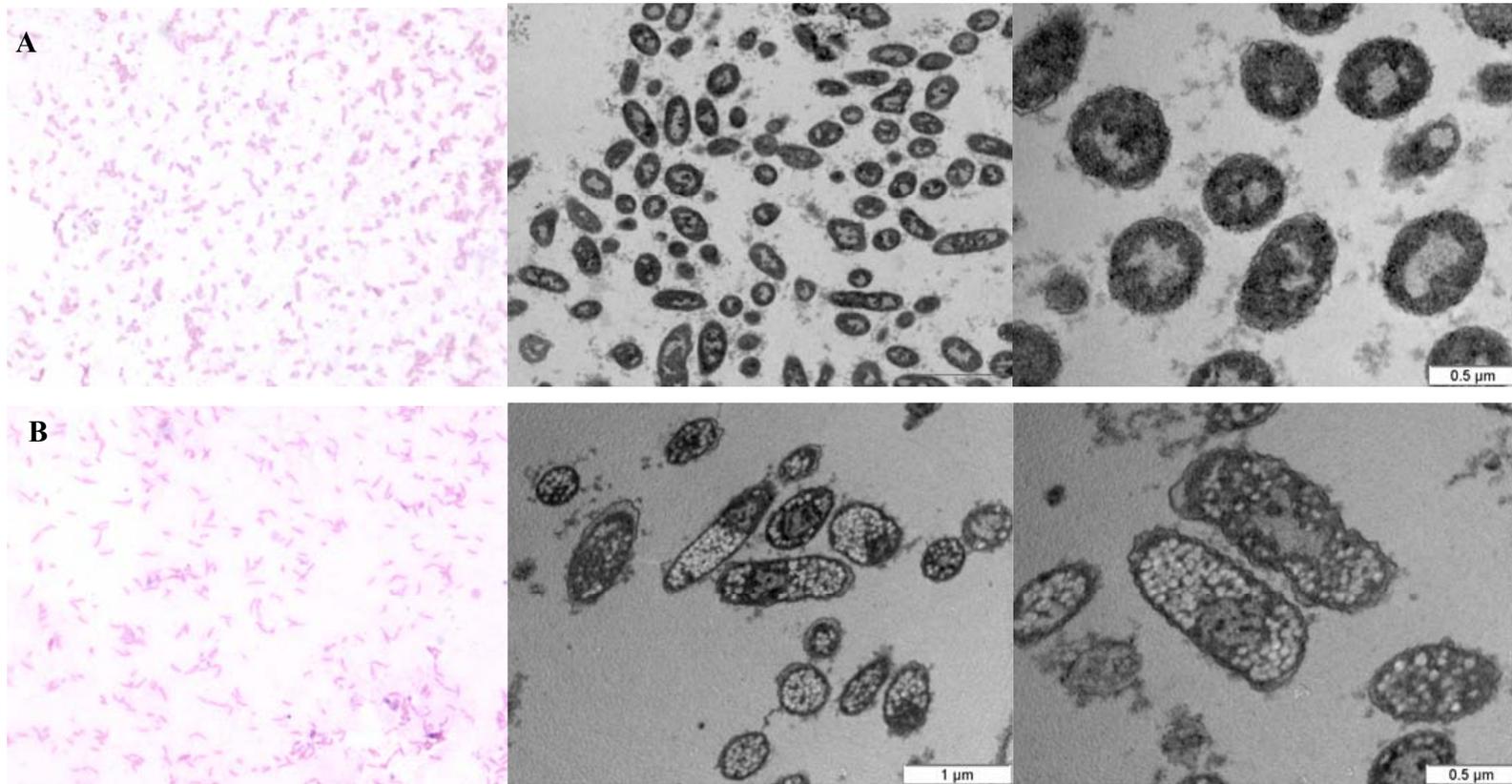


Figura 5.8. Microscopia Óptica (MO) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) – CDAIG: 0,5 VVM, A) sexta hora de cultivo; B) décima segunda hora de cultivo.
CDAIG – Cultivo Descontínuo Alimentado com Adição Intermitente de Glicose

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) também foi realizada para amostras coletadas durante os cultivos realizados na Condição no Ponto Central (CPC) e com o Melhor Meio de Cultivo (MMC), ambas com vazão específica de ar em 0,25 VVM. Para estes cultivos, uma nova relação carbono/nitrogênio foi definida na composição do meio de cultura, como descrito no capítulo 4. Ao analisar as microfotografias observou-se que as amostras da sexta hora de cultivo (figura 5.9A e 5.10A) apresentavam morfologia arredondada e aparentemente sem alterações. Já para as amostras coletadas na décima segunda hora, as células mostraram-se mais alongadas e também exibiram pontos brancos com aparência de grânulos (figura 5.9B e 5.10B).

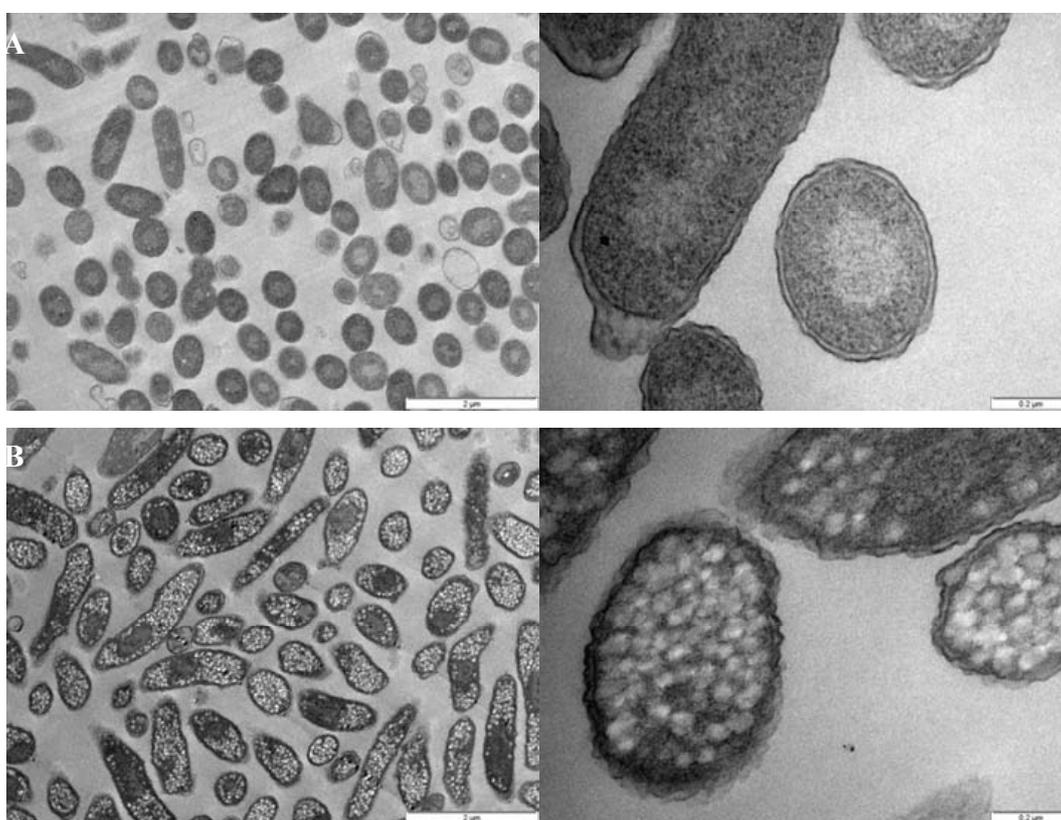


Figura 5.9. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) - Condição no Ponto Central (CPC): A) sexta hora de cultivo; B) décima segunda hora de cultivo.

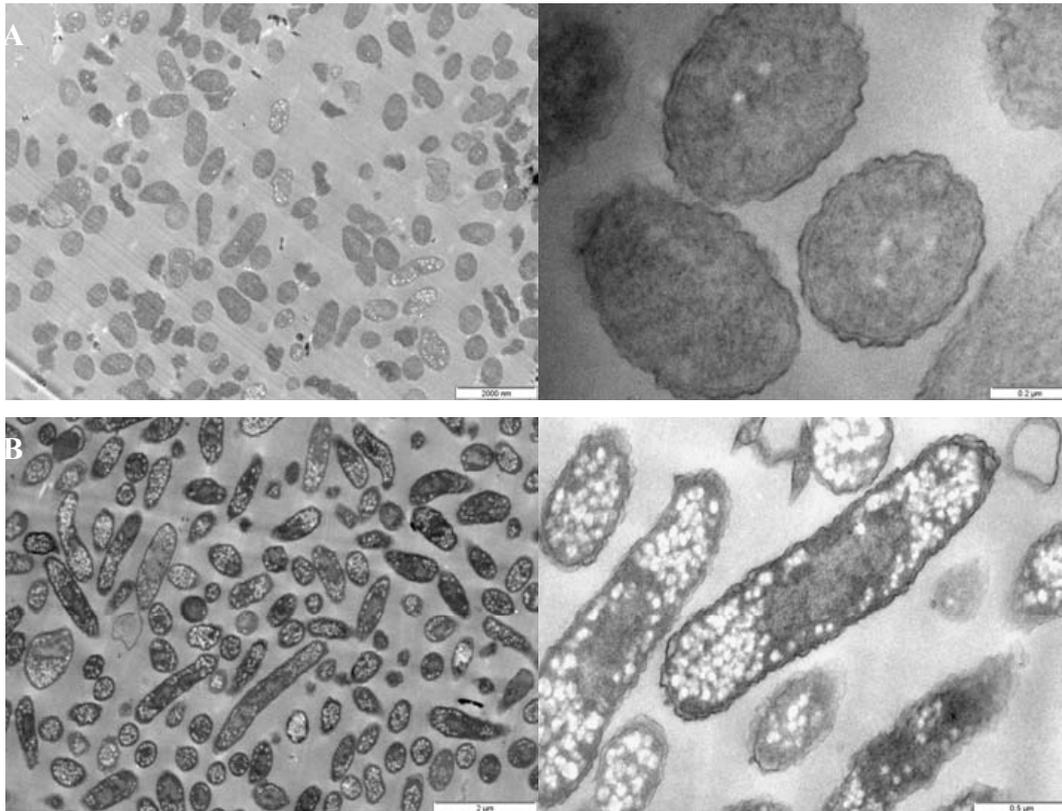


Figura 5.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) - Melhor Meio de Cultivo (MMC): A) sexta hora de cultivo; B) décima segunda hora de cultivo.

Ao comparar as microfotografias oriundas dos cultivos CDAIG 0,25 VVM, CDAIG 0,5 VVM, CPC e MMC (figura 5.11) foi possível observar células com morfologia muito similares nos respectivos tempos. Na sexta hora, as células apresentaram morfologia arredondada, enquanto na décima segunda hora de cultivo, exibiram morfologia mais alongada. Esta constatação é reforçada ao comparar a área e o perímetro das células nos diferentes tempos dos cultivos CDAIG 0,5VVM e CPC, tendo sido observados maior perímetro (31%) e área (40%) nas células da décima segunda hora de cultivo (tabela 5.3). Uma exceção foi o CDAIG 0,25 VVM, para o qual a área e o perímetro das células foram maiores na sexta hora de cultivo.

As fotografias de MET foram obtidas a partir de bactérias em suspensão, onde as células são fixadas e assumem diferentes posições no plano espacial o que poderia comprometer a eficácia da análise de área e perímetro das células.

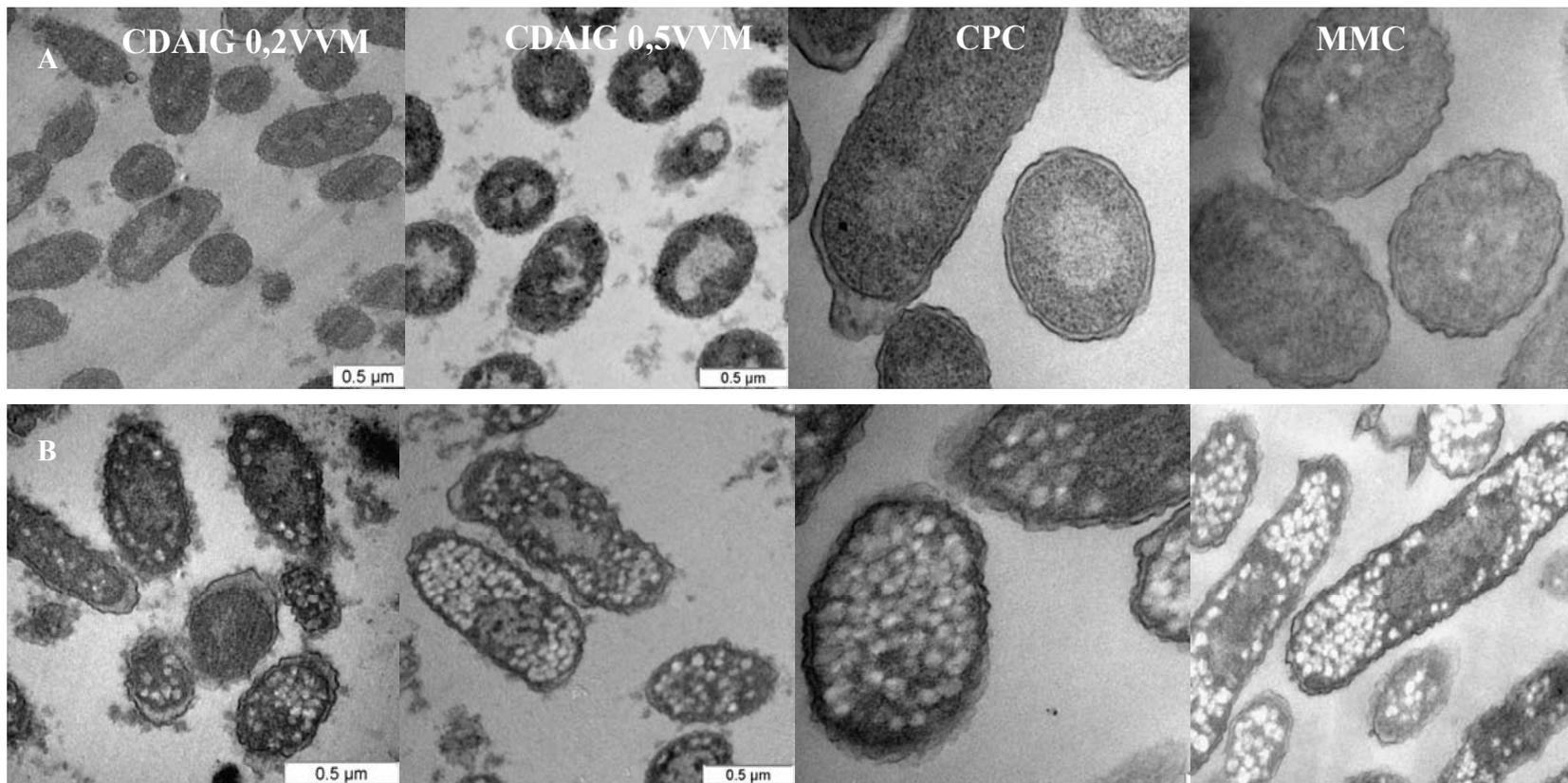


Figura 5.11. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) – CDAIG 0,25VVM; CDAIG 0,5VVM; CPC; MMC. A) sexta hora de cultivo; B) décima segunda hora de cultivo.

Tabela 5.3. Área (nm²) e perímetro (nm) das células de *H. influenzae* b determinados por análise de microscopia eletrônica de transmissão

Descrição	CDAIG 0,25 VVM		CDAIG 0,5 VVM		CPC		MMC
	6h	12h	6h	12h	6h	12h	12h
Área							
nm ²	460.966	216.926	380.294	588.124	429.231	750.399	720.213
mínimo	326.522	159.449	288.664	482.761	207.703	334.475	512.501
máximo	598.874	303.036	596.635	772.607	580.653	1.620.044	1.177.926
desvio padrão	96.275	50.228	73.896	86.441	98.608	227.670	172.694
Perímetro							
nm	3.418	2.356	2.913	4.023	3.136	4.749	4.798
mínimo	2.652	1.957	2.542	3.358	2.044	2.586	3.697
máximo	4.634	3.033	4.072	4.922	3.984	9.350	7.765
desvio padrão	551	362	378	586	512	1.257	998

CDAIG – cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose; CPC – condição no ponto central; MMC – melhor meio de cultivo.

O CDAIG 0,25 VVM, conduzido com menor fornecimento de fonte de carbono, ou seja, menor concentração de glicose (5 g/L) e menor vazão de ar (0,25 VVM) apresentou grânulos com diâmetro menor, em média de 47 nm, e ocupando menor fração de volume da célula, com Vv em torno de 34 % (tabela 5.4).

Grânulos de maior diâmetro e ocupando maior fração de volume da célula foram observados em duas situações: em maior concentração de glicose, (10 g/L e 15 g/L) ou na presença de maior vazão específica de ar (0,5 VVM) (tabela 5.4).

Nos cultivos descontínuos alimentados CDAIG 0,25 VVM e CDAIG 0,5 VVM, quando a glicose foi completamente consumida, uma solução concentrada de glicose foi fornecida por meio de pulsos de forma a resultar na concentração inicial do substrato (5 g/L) dentro do reator. Portanto, a concentração de glicose residual no reator não passou de aproximadamente 5 g/L. Já os cultivos descontínuos (CPC e MCC) apesar de terem sido conduzidos com vazão específica de ar em 0,25 VVM, iniciaram no mínimo com o dobro da concentração de glicose (10 g/L e 15 g/L), o que poderia resultar em maior acúmulo de material de reserva na forma de inclusões citoplasmáticas.

Tabela 5.4. Densidade de volume (Vv) e diâmetro (nm) dos grânulos observados em células de *H. influenzae* b na décima segunda hora de cultivo.

Descrição	CDAIG			
	0,2VVM	0,5VVM	CPC	MMC
Vv (%)	33,67	54,73	51,15	42,69
média (nm)	46,97	62,64	65,32	59,90
mínimo (nm)	31,79	41,52	48,52	48,11
máximo (nm)	63,40	87,28	87,83	74,30
desvio padrão	6,38	9,60	9,45	7,55

Ao analisar a produção de PRP, nos pontos de coleta das amostras para MET, observamos que os cultivos descontínuos alimentados CDAIG 0,25 VVM e CDAIG 0,5 VVM produziram maior quantidade de PRP que os cultivos descontínuos (CPC e MCC) (tabela 5.5).

Tabela 5.5. Condições dos cultivos, no início e no momento de retirada de amostras para MET nos experimentos em biorreator CDAIG (0,25 e 0,5 VVM), CPC e MMC e PRP produzido

Cultivos	VVM	Meio de cultura			PRP (mg/L)		G _{residual} (g/L)	
		G (g/L)	EL (g/L)	S (g/L)	6 hora	12 hora	6 hora	12 hora
CDAIG	0,25	5	5	10	175	626	3	5
CDAIG	0,5	5	5	10	196	714	1	5
CPC	0,2	10	2,5	5	33	429	8	4
MCC	0,2	15	5,5	5	62	448	14	4

Embora as bactérias possam apresentar uma variedade de estruturas intracelulares na forma de inclusões citoplasmáticas como o polihidroxialcanoato, glicogênio, vesículas de gás e polifosfatos (FULLER, 1999), o relato e a identificação por MET da intensa formação de estruturas intracelulares na forma de grânulos de reserva em *H. influenzae* b é inédita.

5.3.4. Identificação das inclusões na forma de grânulos nas células de *H. influenzae* b

Para identificar a natureza das estruturas na forma de grânulos intracelulares presentes nas células de *H. influenzae* b, foram realizadas as seguintes determinações:

5.3.4.1. Determinação de polihidroxialcanoato

Muitas bactérias acumulam polímeros de hidroxialcanoato (PHA) como fonte de carbono e energia. A composição das unidades de repetição e o tamanho da cadeia dependem da espécie da bactéria e da fonte de carbono fornecida durante a síntese do polímero (FULLER, 1999; LÜTKE-EVERSLOH e STEINBÜCHEL, 2004). Dentro deste contexto, para identificar se as estruturas na forma de grânulos intracelulares eram de PHA, amostras dos cultivos CDAIG 0,25 VVM e CDAIG 0,5 VVM foram submetidas a cromatografia gasosa (CG) após tratamento adequado. Cromatogramas resultantes da cromatografia gasosa (figura 5.12A e B) não apresentaram picos com tempo de retenção dentro da faixa dos padrões de polihidroxialcanoatos, indicando que as inclusões observadas pela microscopia eletrônica não são PHAs.

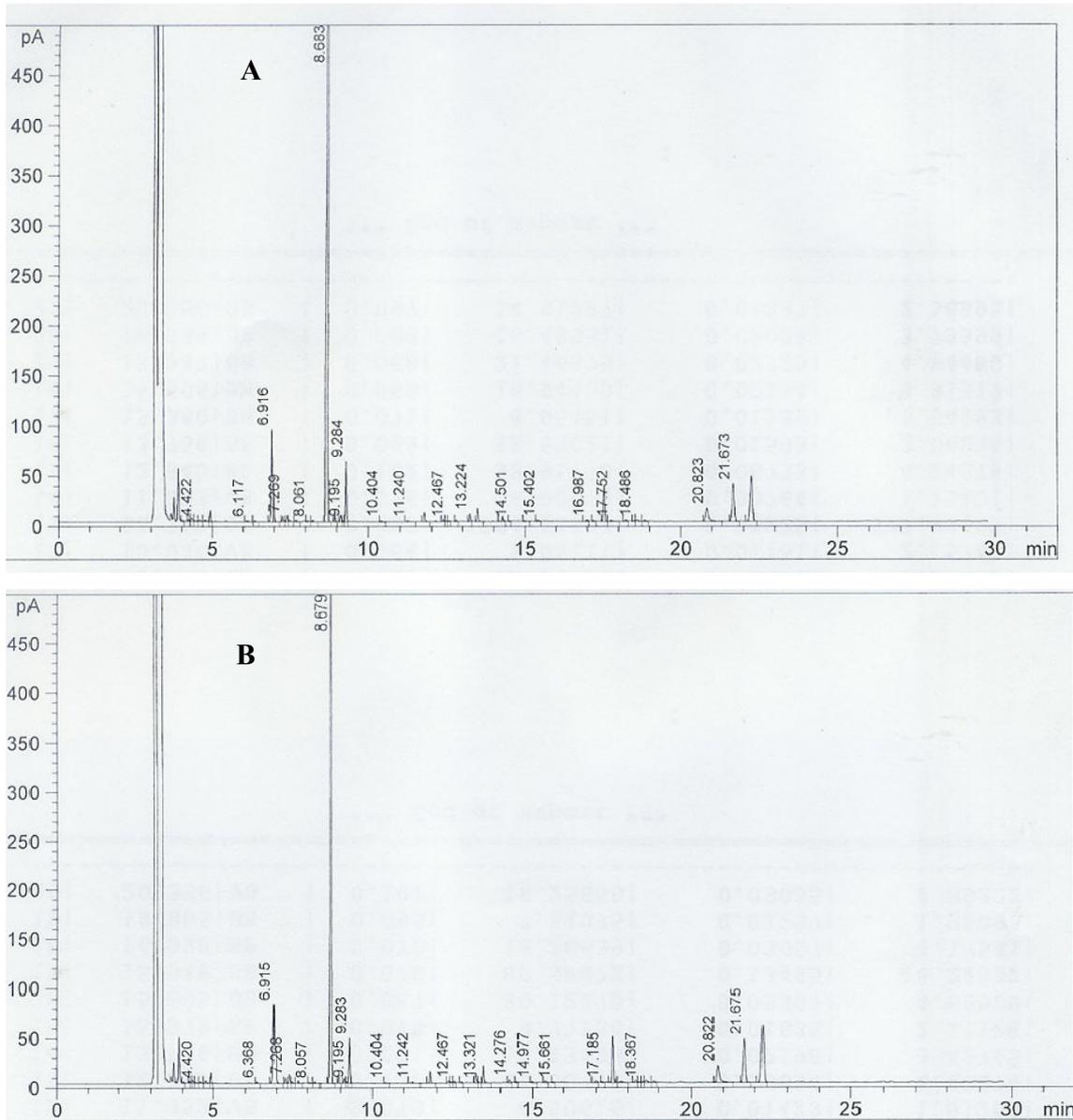


Figura 5.12. Cromatografia Gasosa (CG) – Cromatogramas: A) CDAIG 0,2VVM décima segunda hora de cultivo; B) CDAIG 0,5 VVM décima segunda hora de cultivo.

Ao descartar a hipótese de acúmulo de polihidroxialcanoato na forma de grânulos intracelular, investigamos se os grânulos poderiam ser resultados do acúmulo de polissacarídeo da cápsula.

5.3.4.2 Determinação de polissacarídeo na célula de *H. influenzae* b

H. influenzae b possui um locus denominado *cap* que é responsável pela síntese do polissacarídeo capsular (KONEMAM *et al.*, 1997). Este locus é dividido em três regiões, onde a região II está envolvida com a biossíntese do polissacarídeo, e as regiões I e III, estão envolvidas com a exportação do polissacarídeo capsular para a superfície da bactéria (KROLL *et al.*, 1989; KROLL *et al.*, 1990; VAN ELDERE *et al.*, 1995; SUKUPOLVI-PETTY *et al.*, 2006). Uma deficiência na expressão de algum dos genes presentes nas regiões I e III poderia resultar em falha no transporte do polissacarídeo capsular para a superfície da célula e acumular este material como inclusão intracelular.

Para investigar se os grânulos poderiam ser resultado de um acúmulo de polissacarídeo capsular, amostras da sexta e décima segunda hora do cultivo CDAIG 0,25 VVM foram coletadas. A massa celular liofilizada (MCL) foi submetida a tratamento de ruptura celular e posteriormente centrifugada, e as frações do *pellet* e do sobrenadante submetidas a imunoeletroforese, conforme descrito no item 5.2.1.5 deste capítulo.

A figura 5.13 ilustra o polissacarídeo presente nas frações do *pellet* e do sobrenadante que reagiram ao anticorpo anti-Hib formando uma linha de precipitação em forma de foguete.

Através do gel de imunoeletroforese foi possível quantificar o polissacarídeo da célula somando-se o polissacarídeo das frações *pellet* e sobrenadante oriunda da célula lisada. A tabela 5.6 mostra que a quantidade de PRP total na célula aumenta de 5,44 µg na sexta hora de cultivo para 12,1 µg na décima segunda hora de cultivo para uma mesma massa celular liofilizada (10 mg), um aumento significativo correspondendo a mais de duas vezes. Entretanto, quando comparado a quantidade de polissacarídeo presente na célula com aquela liberada ao sobrenadante do cultivo, esta se mostra muito reduzida, como ilustra a figura 5.14.

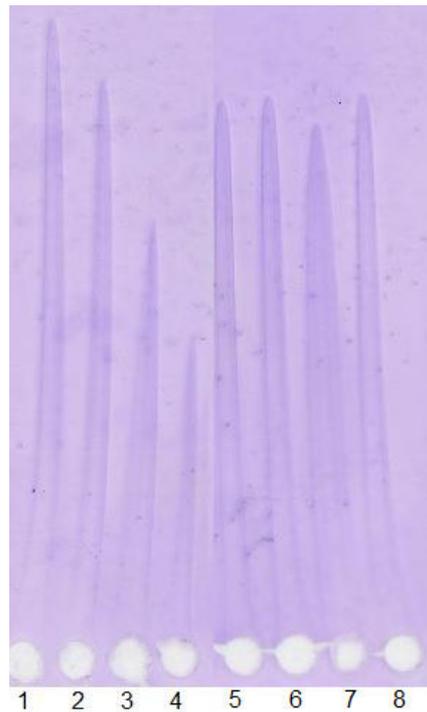


Figura 5.13. Imunoeletroforese em foguete (*Rocket*) realizadas nas frações após ruptura celular oriunda do cultivo CDAIG 0,2VVM.
 PRP Padrão ($\mu\text{g}/\text{ml}$) canaletas de 1 a 4:1) 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 2) 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 3) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; e 4) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$;
 Canaleta:5) Sobrenadante - 6h; 6) *pellet* - 6h; 7) Sobrenadante - 12h; 8) *pellet* - 12h.

Tabela 5.6. Determinação do polissacarídeo na célula de *H. influenzae* b com as amostras do ensaio CDAIG 0,25 VVM

Tempo (h)	Amostra	Fração PRP (μg total)	Célula		
			PRP (μg total)	μg PRP/mg MS	mgPRP/L
6	Sob	4,19			
	<i>Pellet</i>	1,25			
	Sob + <i>Pellet</i>		5,44	0,54	0,8
12	Sob	9,72			
	<i>Pellet</i>	2,39			
	Sob + <i>Pellet</i>		12,12	1,21	4,1

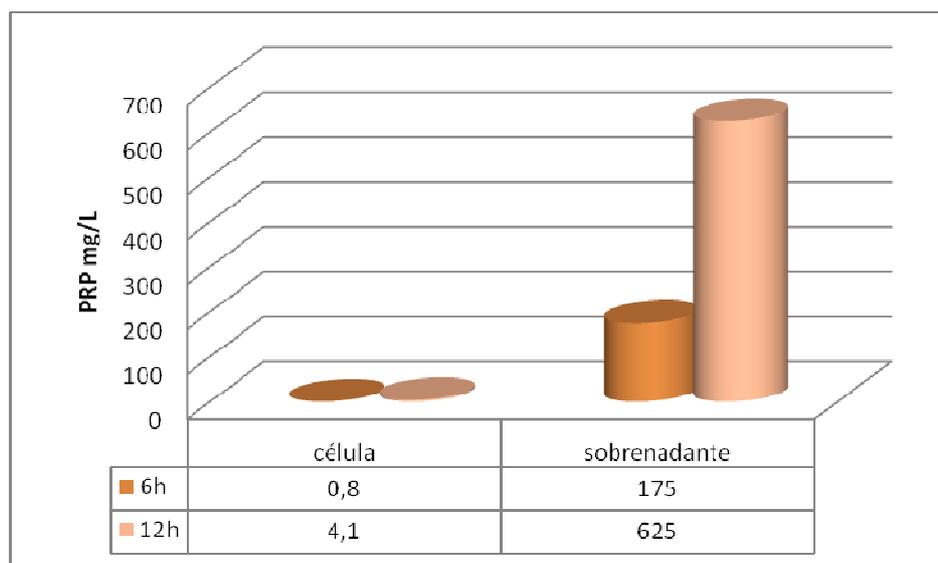


Figura 5.14. Comparação das concentrações de polissacarídeo de *H. influenzae* tipo b na célula e no sobrenadante do cultivo do experimento CDAIG 0,25 VVM.

Outra análise realizada foi a determinação das porcentagens dos elementos carbono, nitrogênio e hidrogênio nas células de *H. influenzae*.

5.3.4.3 Determinação dos elementos C-N-H

A análise da porcentagem dos elementos Carbono (C), Nitrogênio (N) e Hidrogênio (H) na célula de *H. influenzae*, no decorrer do tempo de cultivo, foi realizada com a finalidade de direcionar melhor as investigações quanto a identificação das inclusões citoplasmáticas na forma de grânulos.

O polissacarídeo capsular é composto por repetições das pentoses ribose ($C_5H_{10}O_5$) e ribitol ($C_5H_{12}O_5$), unidas por pontes fosfodiéster (poli-ribosil-ribitol-fosfato - PRP) (CRISEL *et al.*, 1975), e seu acúmulo poderia ser observado com aumento dos elementos C, H e O.

Um possível acúmulo de glicogênio, um polímero formado de unidades do monossacarídeo glicose ($C_6H_{12}O_6$), também poderia ser observado no aumento da porcentagem dos seus elementos constituintes no decorrer do tempo de cultivo. Em cultivo de *H. influenzae* linhagem KW20 Rd em condições de microaerobiose e anaerobiose foi observado que no final da fase exponencial a atividade de enzimas responsáveis pelo fluxo

glicolítico a partir de polissacarídeo estocado, como o glicogênio, com expressão das enzimas glicogênio fosforilase e glicogênio sintase (RAGHUNATHAN *et al.*, 2004).

Para verificar se os grânulos poderiam ser acúmulo de polissacarídeo capsular ou glicogênio, a determinação dos elementos carbono (C), nitrogênio (N) e hidrogênio (H) em amostras da massa celular liofilizada (MCL) em diferentes pontos do cultivo foram realizados por análise elementar. Esta análise foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo – USP.

A análise elementar realizada com amostras da sexta e décima segunda hora de cultivo não mostrou aumento quanto as porcentagens dos elementos Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio como mostrado na tabela 5.7.

Tabela 5.7. Análise Elementar dos elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio na célula de *H. influenzae* b

Descrição	tempo (h)	Carbono (%)	Hidrogênio (%)	Nitrogênio (%)
CDAIG 0,25VVM	6	37,6	6,3	9,7
	12	37,3	6,4	7,3
CDAIG 0,5VVM	6	38,5	6,5	9,9
	12	37,6	6,4	7,6

Os resultados não permitiram visualizar uma diferença dos elementos (C, N e H) entre as massas geradas após seis horas e após doze horas de cultivo, quando é observada a presença dos corpúsculos.

Uma maneira adequada seria primeiramente fazer uma extração e purificação do material em forma de grânulos e posteriormente realizar a análise elementar de modo a eliminar interferências.

Outras inclusões citoplasmáticas citadas na literatura são as de polifosfatos que são formadas por grânulos de fosfato ligados por pontes de alta energia, semelhante a fonte de energia em ATP. Estes grânulos funcionam como reserva em momento de escassez do fosfato (FULLER, 1999) e serão investigados posteriormente.

5.4. CONCLUSÃO

Em cultivos descontínuos alimentados com adição intermitente de glicose (CDAIG), ao aumentar a vazão específica de ar de 0,25 VVM para 0,5 VVM observou-se maior crescimento celular (10%) e a formação de polissacarídeo capsular (14%), no entanto, não houve interferência no tamanho da massa molecular do polissacarídeo.

Com relação ao tempo de cultivo, ao aumentar o tempo do cultivo de doze para vinte quatro horas, verificou-se o aumento de 38% na produção de PRP, mesmo com a estagnação no crescimento celular. O tempo de cultivo também apresentou uma influência no tamanho da massa molecular do polissacarídeo, mostrando que quanto maior o tempo de cultivo o PRP acumulado no sobrenadante apresentava massa molecular de menor tamanho.

Em diferentes estratégias de cultivo, o consumo da glicose é observado entre a terceira e a quinta hora de cultivo, sugerindo que *H influenzae* estaria consumindo preferencialmente outros nutrientes em detrimento da glicose. A análise de aminoácidos nas amostras do sobrenadante coletados no decorrer do cultivo mostrou uma redução de Aspartato, Cisteína, Glutamato, Glutamina e Serina nas primeiras cinco horas de cultivo, corroborando a hipótese levantada. .

Células de *H. influenzae* analisadas por microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelaram que na sexta hora de cultivo uma morfologia arredondada, enquanto na décima segunda hora, estas se mostraram mais alongadas. A MET revelou ainda a presença de inclusões citoplasmáticas na forma de grânulos nas fotografias da décima segunda hora. Estes grânulos se mostraram presentes em duas situações, quando a glicose era fornecida em concentrações elevadas ou quando na presença de maior vazão específica de ar, sugerindo acúmulo de material de reserva.

A quantidade de polissacarídeo presente na célula é menor do que a liberada ao sobrenadante, entretanto houve um aumento significativo durante o cultivo quando medido em uma mesma massa celular.

A análise elementar do carbono, nitrogênio e hidrogênio em células na sexta e décima segunda hora de cultivo, não apresentaram diferença, entretanto nova análise deverá ser realizada após uma purificação do material granular.

REFERÊNCIAS

- ALBANI, S. M. F. Métodos alternativos de purificação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b. Dissertação (mestrado em biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- ASHWELL, G. Colorimetric analysis of sugar. **Methods Enzymology**, v. 3, p. 87-90, 1957.
- BD Bionutrients – Technical Manual, 3. ed. **BD Bioscience**, 2007.
- EP – EUROPEAN PHARMACOPOEIA. *Haemophilus type b* conjugate vaccine. p. 662-664, 2005.
- FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v. 269, p. 496-512, 1995.
- FULLER, R. C. Microbial inclusions with special reference to PHA inclusions and intracellular boundary envelopes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 21-29, 1999.
- GOMEZ, J. G. C.; RODRIGUES, M. F. A.; ALLI, R. C. P. TORRES, B. B.; BUENO NETTO, C. L.; OLIVEIRA, M. S.; SILVA, L. F. Evaluation of soil Gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Microbiol and Biotechnol.**, v. 45, p. 785-791, 1996.
- KONEMAM, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. J. *Haemophilus*. **Diagnos. Microbiol.**, 15. ed. **Lippincott**, v. 7, p. 363-384, 1997.
- KROLL, J. S., ZAMZE, S., LOYNDS, B.; MOXON, E. R. Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysaccharides in *Haemophilus influenzae*. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 3343-3347, 1989.
- KROLL, J. S.; LOYNDS, B.; BROPHY, L. N.; MOXON, E. R. The *bex* locus in encapsulated *Haemophilus influenzae*: a chromosomal region involved in capsule polysaccharide export. **Mol. Microbiol.**, v. 4, p. 1853-1862, 1990.
- LAURELL, C. B. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. **Anal. Biochem.**, v. 15, p. 45-52, 1966.
- LEE, J.; LEE, S. Y.; PARK, S. Fed batch culture of *Escherichia coli* by exponential feeding of sucrose as a carbon source. **Biotechnology Techniques**, v. 11, p. 59-62, 1997.
- LEVI, L.; WALKER, G. C.; PUSLEY, L. I. Quality control of pharmaceuticals. **The Canadian Medical Association**, v. 91, n. 15, p. 781-785, 1964.
- LÜTKE-EVERSLOH, T.; STEINBÜCHEL, A. Microbial Polythioesters. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, p. 165-174, 2004.
- MACFADYEN, L. P.; REDFIELD, R. J. Life in mucus: sugar metabolism in *Haemophilus influenzae*. **14th Forum in Microbiology**, p. 541-551, 1996.
- POSTMA, P. W.; LENGELER, J. W.; JACOBSON, G. R. Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria. **Microbiological Reviews**, p. 543-594, 1993.
- RAGHUNATHAN, A.; PRICE, N. D.; GALPERIN, M. Y.; MAKAROVA, K. S.; PURVINE, S.; PICONE, A. F.; CHERNY, T.; XIE, T.; REILLY, T. J.; MUNSON-JR, R.; TYLER, R. E.; AKERLEY, B. J.; SMITH, A. L.; PALSSON, B. O.; KOLKER, E. *In silico* metabolic model and protein expression of *Haemophilus*

influenzae strain Rd KW20 in rich medium OMICS Annual **Journal Integrity Biological.**, v. 8, n. 1, p. 25-41, 2004.

SKOV SORENSEN, U. B.; BLOM, J.; BIRCH-ANDERSEN, A.; HENRICHSEN, JØRGEN. ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in Pneumococci. **Infection and Immunity.**, n. 8, v. 56, p. 1890-1896, 1988.

SUKUPOLVI-PETTY, S.; GRASS, S.; ST GEME III, J. W. The *Haemophilus influenzae* type b *hcsA* and *hcsB* gene products facilitate transport of capsular polysaccharide across the outer membrane and are essential for virulence. **Journal Bacteriology.**, v. 188, n. 11, p. 3870-3877, 2006.

TANG, C. M.; HOOD, D. W.; MOXON, E. R. *Haemophilus influenzae* the impact of whole genome sequencing on microbiology. v. 13, n. 10, p. 399-404, 1997.

TAKAGI, M.; CABRERA-CRESPO, J.; BARUQUE-RAMOS, J.; ZANGIROLAMI, T. C.; RAW, I. E TANIZAKI, M. Characterization of polysaccharide production of *Haemophilus influenzae* type b and its relationship to bacterial cell growth. **Biochemistry and Biotechnology.**, v. 110, p. 91-100, 2003.

TAKAGI, M. Produção e purificação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b. Tese (Doutorado em biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

TATUSOV, R. L.; MUSHEGIAN, A. R.; BORK, P.; BROWN, N. P.; HAYES, W. S.; BORODOVSKY, M.; RUDD, K. E.; KOONIN, E. V. Metabolism and evolution of *Haemophilus influenzae* deduced from a whole-genome comparison with *Escherichia coli*. **Current Biology.**, v. 6, n. 3, p. 279-291, 1996.

VAN ELDERE, J.; BROPHY, L.; LOYNDS, B.; CELIS, P.; HANCOCK, I.; CARMAN, S.; KROLL, J. S.; MOXON, E. R. Region II of the *Haemophilus influenzae* type b capsulation locus is involved in serotype-specific polysaccharide synthesis. **Molecular Microbiology.**, v. 15, p. 107-118, 1995.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **WHO Technical Report Series.**, n. 897, p. 27-60, 2000.

Capítulo 6

Análise econômica

6.1. PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS

No Brasil, a produção de imunobiológicos e vacinas, considerados pouco atrativos para o setor privado, é historicamente desenvolvida pelas instituições públicas com apoio governamental. A partir de 1980, com a grande expansão das atividades do Programa Nacional de Imunização, tornaram-se críticas as dificuldades encontradas para atendimento da demanda interna, em termos quantitativos e qualitativos desses produtos. Então, o Ministério da Saúde instituiu o Programa Nacional de Auto-Suficiência em Imunobiológicos, baseado em investimentos no parque produtor nacional, de acordo com o plano que buscava o cumprimento de metas nacionais (RISI JUNIOR, 2003)

O benefício resultante da implantação do Programa Nacional de Imunização foi uma redução drástica da incidência de diversas doenças como sarampo, poliomielite, caxumba e outras. Por outro lado, a política de auto-suficiência significou muita economia de recursos para o país, principalmente se for levado em consideração que quase 100% das compras de vacinas é via recursos públicos (SILVEIRA, 2004).

O desenvolvimento e a produção de vacinas ou produtos farmacêuticos demandam de tempo e elevado investimento em toda cadeia, incluindo desde a produção, o controle de qualidade, a validação do produto e principalmente na regulamentação e documentação exigidas pelos órgãos competentes para os testes clínicos. No Brasil, o grande problema estava relacionado à precariedade de incentivo em pesquisa e desenvolvimento para possibilitar o desenvolvimento dos processos de produção e de purificação dos antígenos ou de biomoléculas constituintes de uma vacina (TEMPORÃO, 2002; GADELHA, 2003).

A gestão e a inovação tecnológica tornam-se necessários para que os laboratórios públicos produtores de vacinas se tornem competitivos e sejam econômica e tecnologicamente auto-sustentáveis. A competência em gestão e em inovação tecnológica está diretamente relacionada com a redução do custo do processo de produção e com a garantia de qualidade para que os produtos atendam aos rigorosos padrões de controle de qualidade estabelecidos pela OMS (Organização Mundial da Saúde) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Além disso, constituem fatores imprescindíveis para a inclusão de novas vacinas nos programas de imunização. Assim, o sucesso de um bioprocessamento não depende somente de

considerações técnicas, mas também de considerações econômicas (BAILEY e OLLIS, 1986) que permitam identificar a viabilidade econômica de um projeto através de uma adequada análise econômica (ROLDÃO, 2004).

A análise econômica é realizada tendo como base os seguintes componentes do custo total: custo de capital (equipamentos), custo de produção (salários, manutenção, impostos, depreciação, etc.) e custo com materiais e utilidades (aditivos, embalagens, gás, vapor, água e matéria prima). A partir da quantificação do custo, relacionado a cada componente, é possível identificar a viabilidade econômica de uma determinada metodologia ou processo (BAILEY e OLLIS, 1986; VILLEN *et al.*, 2001).

Neste capítulo foi apresentada a análise econômica das diferentes estratégias de cultivo de *Haemophilus influenzae* tipo b discutidas no capítulo 3, com o objetivo de identificar a estratégia economicamente mais favorecida e passível de ser escalonada.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Recursos Requeridos

Para o estudo da análise econômica, primeiramente foram definidos o número de cultivos passíveis de serem realizados no período de um ano para cada estratégia utilizada (tabela 6.1), e o levantamento dos recursos requeridos para cada processo em escala de laboratório, como: recursos físicos-RF (tabela 6.2A e B), insumos (tabela 6.2C) e recursos humanos-RH (tabela 6.2D).

Tabela 6.1. Número de ensaios possíveis de serem realizados no período de um ano, para cada tipo de cultivo descontínuo alimentado

Descrição	Código	cultivos (horas)	tempo adicional (horas)	cultivos /mês	cultivos /ano
Cultivo Des Alim. c/ adição de Glicose	CDAIG 12	12	2	2	20
Cultivo Des Alim. c/ adição de Glicose	CDAIG 24	24	2	2	20
Cultivo Des Alim. vazão constante	CDAVC	18	2	2	20
Cultivo Des Alim. vazão exponencial	CDAVE	24	2	2	20
Cultivo Des Alim. vazão exp. + perfusão	CDAVE+P	14	2	1,5	15

Tabela 6.2A. Recursos físicos: equipamentos de uso contínuo.

Equipamentos de uso contínuo	Marca
Geladeira 300L	Prosdocimo
Freezer -20°C Mod. CVU30DB 246L	Electrolux
Estufa bacteriológica	Tecnal
Geladeira dupla porta JR-30	Jabur
Purificador de água - MilliRo90	Millipore
Purificador água p/ autoclave	Baumer
Lâmpadas do laboratório	Osram

Tabela 6.2B. Recursos físicos: equipamentos de uso específico.

Equipamentos de uso específico	Marca
Autoclave Industrial	Baumer
Autoclave	Hirayama
Forno de secagem	Luferco
Forno microondas 27L	Panasonic
4 bal. semi-analítica	Ohaus/MT
Balança analítica	Gehaka
Agitador magnético	Stainless Steel
Agitador vortex	Gilson GVLab
pHmetro	Micronal
Condutivímetro	Mettler T
Capela química	Braslab
Ar condicionado	Fujitsu/Springer
LabScale	Millipore
Shaker	NBS
Microscópio	Nikon
Espectrofotômetro	Hitachi
Fluxômetro ar/N2	Aalborg
Fluxo laminar	Veco
Bioflo2000	NBS
1 manta elétrica	NBS
2 compressores de ar	Schuz
Analisador de gases	Sick/Maihak
CPU+ interfaces	NI
Banho de refrigeração	Grant LTD 20
Estufa 60°C	Fanem
Microcentrifuga	Hettich
Centrifuga	Eppendorf
3 bomba peristálticas	Watson M

Tabela 6.2C. Insumos.

Descrição dos insumos
Filtros e Membranas
Materiais Plásticos
Outros acessórios
Reagentes
Vidrarias

Tabela 6.2D. Recursos humanos.

Mão de Obra
Técnico especializado
Aux. de apoio a pesquisa científica e tecnológica
Agente de apoio a pesquisa científica e tecnológica
Pesquisador científico nível V

Os fluxogramas dos procesos CDAIG, CDAVC e CDAVE, e CDAVE+P (destaque em branco) assim como todos os equipamentos (destaque em cinza) necessários para a realização dos cultivos estão respectivamente ilustrados nas figuras 6.1, 6.2 e 6.3.

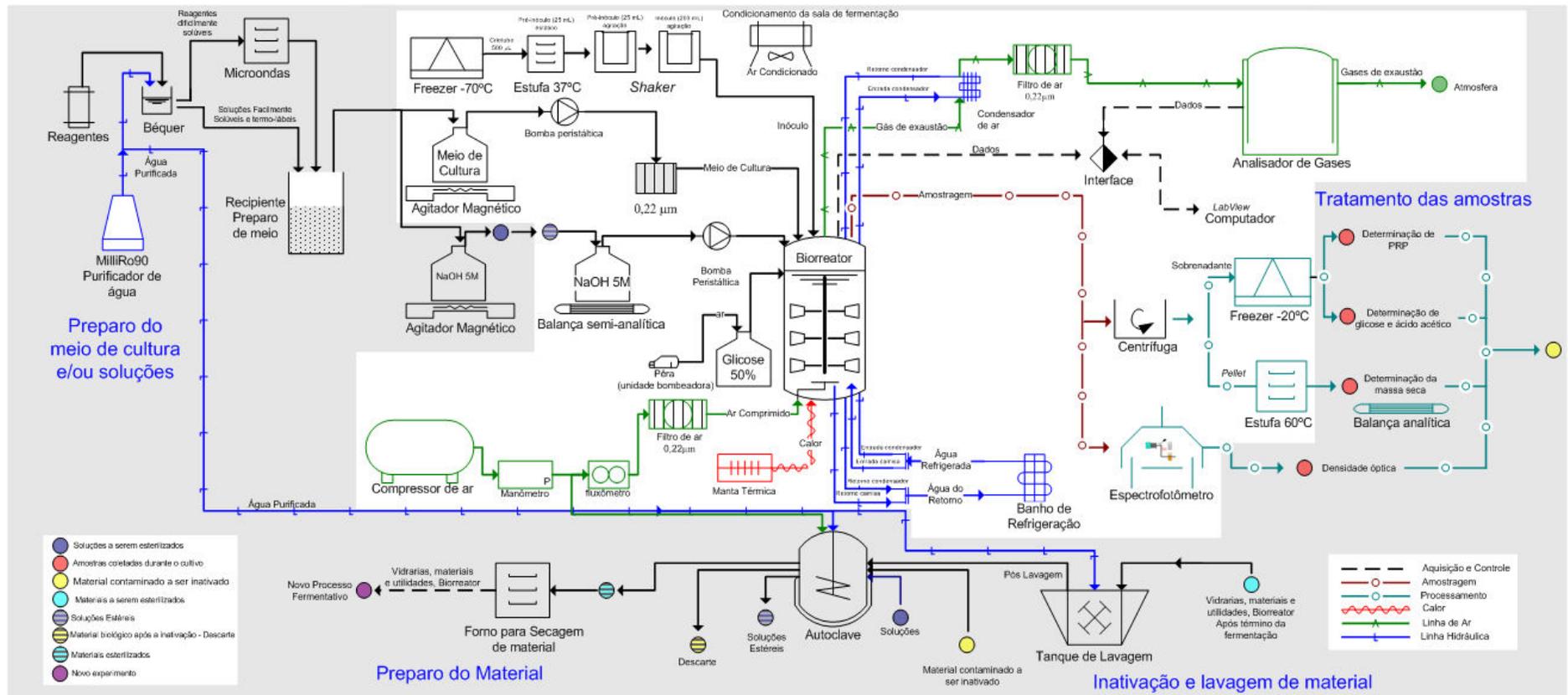


Figura 6.1. Fluxograma do processo e indicação das utilidades durante a produção do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* b por meio de Cultivo Descontínuo Alimentado com Adição Intermitente de Glicose (CDAIG)

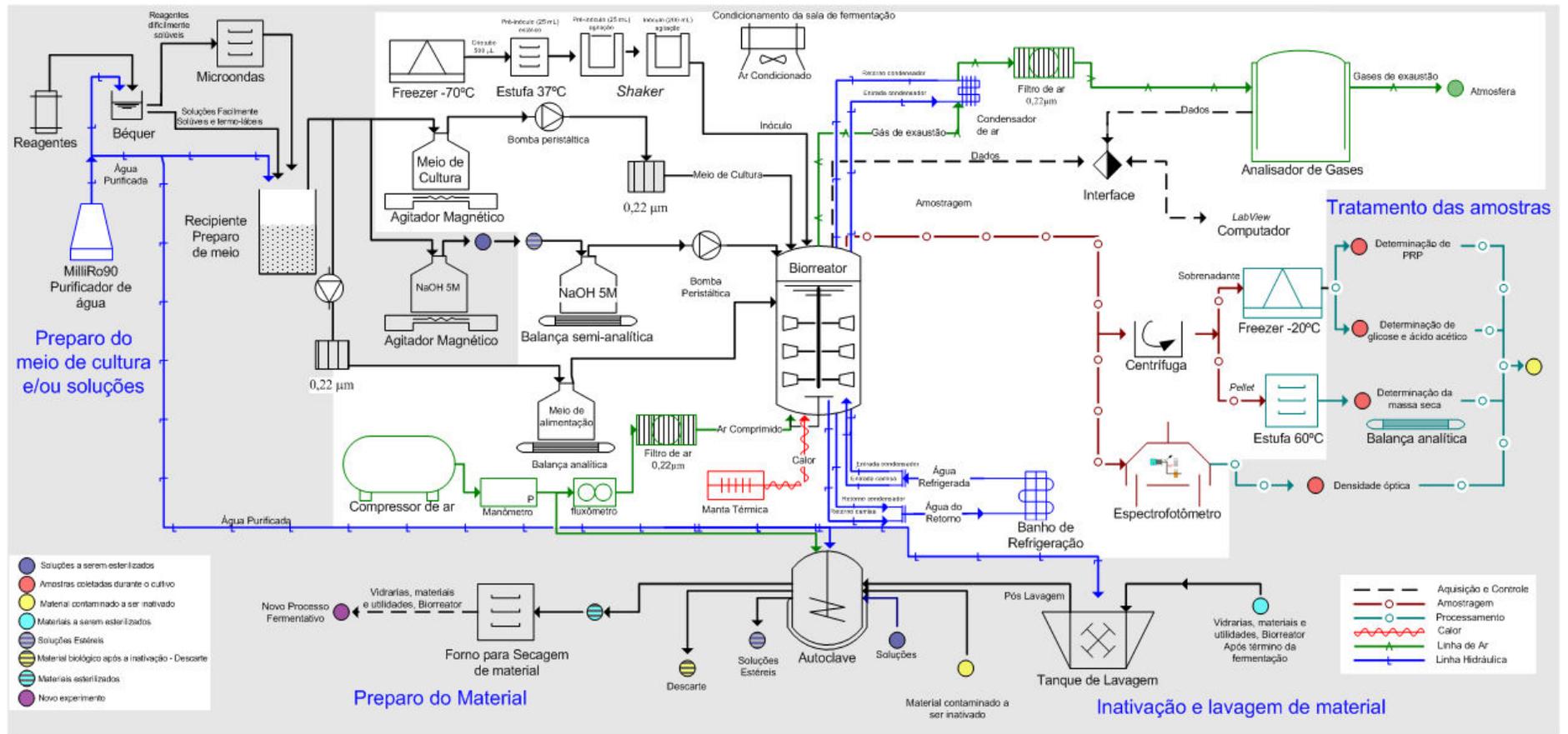


Figura 6.2. Fluxograma de produção e indicação das utilidades durante a produção do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* b por meio de Cultivo Descontínuo Alimentado com Vazão Constante (CDAVC) e vazão exponencial (CDAVE).

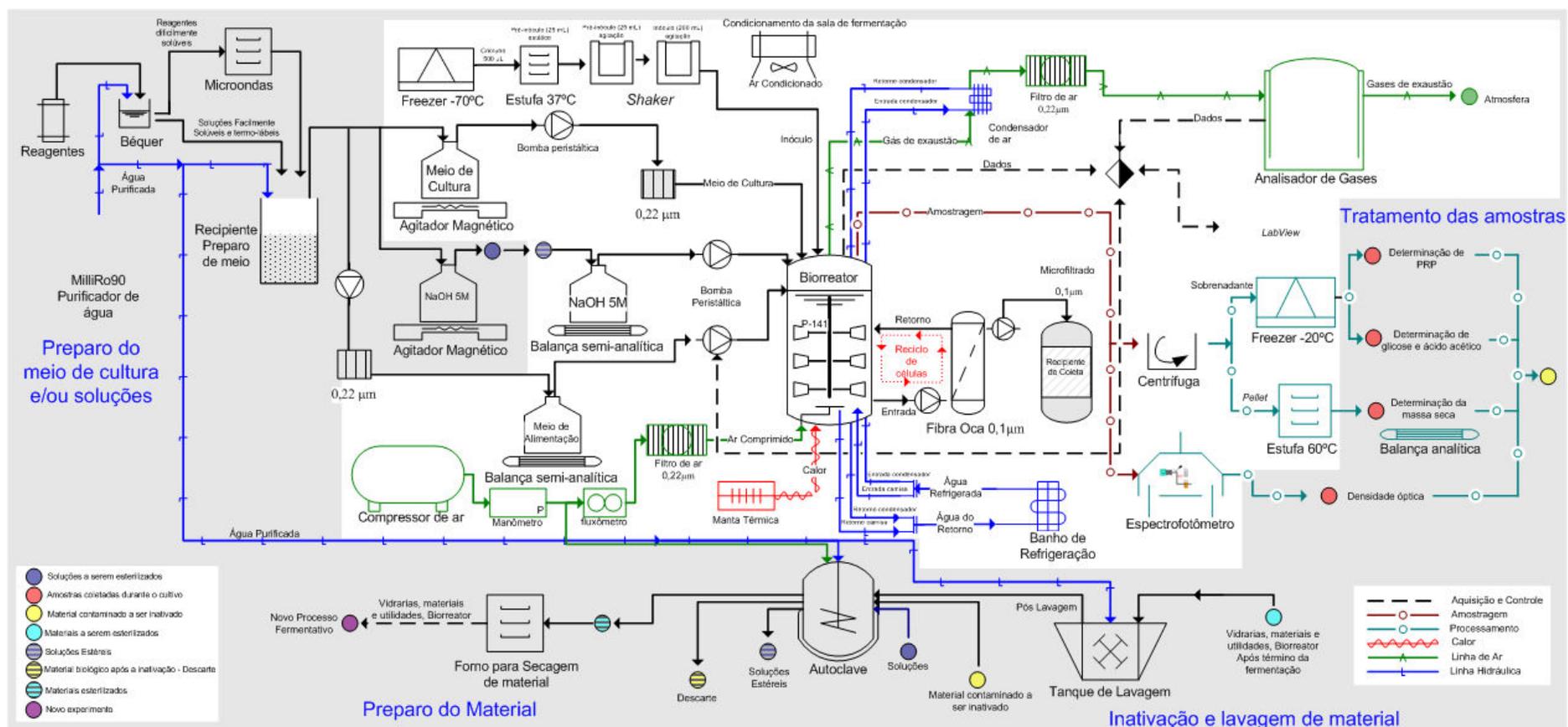


Figura 6.3. Fluxograma de processo e indicação das utilidades durante a produção do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* b por meio de Cultivo Descontínuo Alimentado com Vazão Exponencial, Reciclo de Células e Perfusão (CDAVE+P).

6.2.2 Estimativa de Custo

Com a finalidade de se obter uma aproximação dos custos dos recursos necessários para cada tipo de processo, foi feito um levantamento do valor de cada item dos recursos utilizados e foram expressos em dólar, considerando a cotação de R\$ 1,85 de acordo com o Banco Central do Brasil (BCB, 2010) em 11/02/2010.

6.2.2.1 Estimativa de custo da água purificada.

O custo da água purificada foi estimado através de dados fornecidos pela *Millipore* (tabela 6.3), onde se levou em consideração o modelo do purificador de água, a vazão de água purificada por hora e o número de cartuchos e filtros de reposição necessários por ano.

O purificador de água RiOs 90 é um equipamento de uso contínuo e que possui um número mínimo de trocas de cartuchos e filtros de osmose reversa, que representa o maior custo. Portanto, embora o consumo máximo de água nos cultivos (20m^3) tenha sido inferior à capacidade de fornecimento máximo do equipamento ($86,8\text{ m}^3$), o custo da água foi considerado como se o equipamento trabalhasse em sua capacidade máxima (US\$ 2135,00/ano).

Tabela 6.3. Custo estimado da água purificada pelo Rios 90.

RiOs Running Cost	
Please Make sure that all data in the yellow boxes are correct:	
RiOs instant flow-rate (L/h)	100
Number of RO Modules	2
Working day /year	217
Quantity of water per day	200
Recovery (factory setting)	50%
Prepak (enter price only if Prepak needed)	\$ -
Progard Price	\$ 350
RO Cartridge Price	\$ 1.100
Vent Filter	\$ 210
System UV lamp	\$ 176
Tap Water Price /m3	\$ 3,00
Electricity Price / Kw	\$ 0,10
Running cost:	
# of Packs sets per Year	2,4
Consumable Cost / Year	\$ 1.871
Water Consumption (L)	86800
Water Cost	\$ 260
Electricity cost	\$ 4
Total Operating Cost / Year	\$ 2.135
Cost / L	\$ 0,049
Millipore	
The information above is developed based on the feedwater conditions given to the Millipore Application Specialist. Any modification of these data can impact the Running Cost calculation.	

System Under Used
Adjust if needed

1 Set = (Prepak + Progard)
1 Vent filter per year

Millipore Brazil, 2010

6.2.2.2 Estimativa de custo da energia

A energia consumida por um aparelho ou equipamento depende de dois fatores: potência do aparelho e tempo que o aparelho fica ligado.

A potência mede a taxa de energia que o aparelho consome. É uma característica intrínseca do aparelho que independe do tempo em que o aparelho fica ligado e é expresso em

watt (W) ou quilowatt (kW). Já o tempo em que o aparelho fica ligado, pode ser expresso em segundos (s), minutos (min) ou horas (h). Quanto maior o tempo em que o aparelho ficar ligado, maior é o consumo de energia. Portanto, a energia consumida é expressa em Potência x Tempo, ou seja, kWh conforme descrito na equação 6.1.

$$E = P \cdot t \quad (6.1)$$

E = Energia (kWh)
P = Potência (kW)
t = Tempo (h)

Para o cálculo do consumo de energia durante os processos, os equipamentos foram divididos em dois grupos:

- ✓ Equipamentos de uso contínuo: itens de uso comum a todos os cultivos (tabela 6.2A) e ativos 24 horas por dia.
- ✓ Equipamentos específicos: itens de uso específico para cada tipo de cultivo (tabela 6.2B);

O consumo de energia foi calculado utilizando a equação 6.1 para cada equipamento, onde a potência de cada item foi primeiramente multiplicada pelo tempo de uso do equipamento por cultivo e, em seguida, pelo número de cultivos por ano (equação 6.2).

$$E_{\text{cons}} = P \cdot t_{\text{uso}} \cdot C \quad (6.2)$$

E_{cons} = Energia consumida (kWh)
P = Potência (kW)
 t_{uso} = Tempo de uso do equipamento (h)
C = número de cultivos por ano

Para os equipamentos (uso específico) da sala de lavagem as seguintes considerações foram feitas:

- ✓ Autoclave industrial (Baumer) – foram considerados 3 ciclos de 3 horas em cada cultivo;
- ✓ Autoclave pequena (Hirayama) – foram considerados 2 ciclos de 2 horas em cada cultivo;
- ✓ Forno de secagem de material – foi considerado 4 vezes de 2 horas em cada cultivo.

Ao final, o consumo de energia total foi considerado como a soma dos consumos de energia (kWh) dos equipamentos de uso específico e de uso contínuo para cada tipo de cultivo, para depois expressar em valor monetário (tabela 6.4).

A conversão do consumo de energia (kWh) em valor monetário (US\$) foi realizada utilizando uma tabela de tarifas para o fornecimento de energia elétrica da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL - 2009). Foi considerada a tarifa do grupo A, de alta e média tensão. Como nesta tabela existem várias classificações de tarifas, dependentes da tensão, foi feita uma consulta ao departamento de Engenharia Elétrica do Instituto Butantan para identificar a classificação de tarifa a ser utilizada neste estudo, sendo assim adotada a tarifa convencional do subgrupo A4 de 2,3 KV a 25 KV, onde, 1MWh = R\$ 179,35 = US\$ 99,08 (ELETROPAULO, 2010).

Tabela 6.4. Consumo de energia anual dos equipamentos de uso específico e contínuo.

Descrição	(CDAIG)12h	(CDAIG)24h	(CDAVC)	(CDAVE)	CDAVE+P)
Equip. específico kWh	17.084,44	20.420,74	18.922,30	20.674,18	13.289,78
Equip. contínuo kWh	69.707,52	69.707,52	69.707,52	69.707,52	69.707,52
Cons Total em kWh	86.791,96	90.128,26	88.629,82	90.381,70	82.997,30
Valor Total em US\$	8.600,08	8.930,66	8.782,19	8.955,78	8.224,07

6.2.2.3 Estimativa de custo dos equipamentos

Para a estimativa de custo dos equipamentos, foi realizado o levantamento do custo de cada item por processo. A depreciação anual ou a perda do valor do investimento ao longo do tempo foi considerada como sendo 10% do valor total dos equipamentos, isto é, a vida útil dos equipamentos seria de 10 anos (tabela 6.5). Deste modo, a recuperação do valor investido sob a forma de custo (amortização) a ser deduzido da receita bruta seria 10% do valor total do equipamento/ano.

Tabela 6.5. Valores monetários dos equipamentos necessários para a realização dos cultivos.

Descrição	(CDAIG)	(CDAIG)	(CDAVC)	(CDAVE)	(CDAVE+P)
Custo Equipamentos Total US\$	272.867,40	272.867,40	277.421,45	277.421,45	284.475,50
Custo Equipamento + serviços US\$	276.887,96	276.887,96	281.442,01	281.442,01	288.496,06
Custo amortização/ano US\$	27.688,79	27.688,79	28.144,20	28.144,20	28.849,60

6.2.2.4 Estimativa de custo de serviços terceirizados

A estimativa de custos com serviços terceirizados por ano foi incluída à tabela de custo de equipamentos como serviços (tabela 6.5).

6.2.2.5 Estimativa de custo dos insumos

Para a estimativa de custo dos insumos, estes foram separados por itens similares e o custo levantado para os diferentes tipos de cultivo conforme ilustrado na tabela 6.6.

Tabela 6.6. Estimativa de custo dos insumos.

Material	(CDAIG)12	(CDAIG)24h	(CDAVC)	(CDAVE)	(CDAVE+P)
Filtros e Membranas	8.762,46	8.762,46	7.572,55	8.110,93	11.044,58
Materiais Plásticos	2.147,20	2.669,95	2.876,26	2.876,26	2.628,34
Outros acessórios	6.653,77	6.653,77	6.653,77	6.653,77	6.653,77
Reagentes	4.819,78	4.819,78	9.919,38	9.985,08	10.602,6
Vidrarias	2.972,16	2.972,16	2.960,33	2.960,33	3.163,56
Total US\$	25.355,37	25.878,12	29.982,29	30.586,37	34.092,85

6.2.2.6 Salário dos profissionais especializados

A estimativa de custo com salário dos profissionais foi realizada com dados referentes à mão de obra necessária para realização dos processos e os respectivos salários considerando folgas, décimo terceiro e férias (tabela 6.2D).

6.2.3 Orçamento

O orçamento de cada processo envolveu a agregação dos custos estimados para os recursos requeridos de forma estabelecer uma linha de base para os custos totais (equação 6.3) (modificado ROLDÃO, 2004).

$$OP = EC_A + EC_E + EC_d + EC_I + EC_S \quad (6.3)$$

OP = orçamento do processo (US\$).

EC_A = estimativa de custo de consumo de água (US\$);

EC_E = estimativa de custo de consumo de energia (US\$);

EC_d = estimativa de custo da depreciação (US\$);

EC_I = estimativa de custo dos insumos (US\$);

EC_S = estimativa de custo dos salários (US\$).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de produção da vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) é composta por três etapas: a produção de polissacarídeo capsular (fermentação), o *downstream process* (purificação) e a conjugação do polissacarídeo purificado por meio da reação química a uma proteína de escolha, no caso, ao toxóide tetânico.

A etapa de purificação do polissacarídeo tem sido um dos grandes obstáculos ao desenvolvimento da vacina conjugada. As exigências de alta pureza, permitindo apresentar menos de 1% de proteínas e de ácidos nucleicos residuais, além da exigência da massa molecular com tamanho em faixa definida contribuem para o baixo rendimento final em polissacarídeo purificado (WHO, 2000). O processo de conjugação também tem apresentado baixa eficiência resultando em baixo rendimento de produto final. Uma alternativa que poderia reduzir consideravelmente o custo da vacina seria o melhoramento das condições de cultivo visando obter processo com alta produção de PRP, o que contribuiria para a redução do custo não só da etapa de produção do polissacarídeo, mas também das outras etapas.

A análise econômica é empregada para identificar a viabilidade econômica de um determinado projeto (ROLDÃO, 2004). Esta ferramenta foi utilizada para avaliar economicamente a produção de poli (3-hidroxi-butirato) (PHB) em cultivo de *Escherichia coli* recombinante, mostrando que a utilização da estratégia de reciclo de células foi eficaz na redução do custo de produção do PHB. Da mesma forma, após a análise econômica aplicada à produção de 3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato [P(3HB/V)] por *E. coli* recombinante, os autores verificaram que o cultivo descontínuo alimentado era a alternativa com maior potencial para escalonamento (AHN *et al.*, 2001; BAILEY e OLLIS, 1986; CHOI *et al.*, 2002; KINDERMANN *et al.*, 2007).

Para identificar o processo mais viável do ponto de vista econômico e passível de escalonamento, foi realizada análise econômica das diferentes estratégias de cultivo descritas no capítulo 3. Na análise econômica foram considerados os custos com capital, produção, materiais e utilidades em escala de laboratório compatíveis a reatores de até 13 litros de capacidade nominal.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioprocessos do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan que possui uma área de 180 m², comportando todo parque de equipamentos listado nas tabelas 6.2A e 6.2B. Um montante de aproximadamente US\$ 300.000,00 de recursos seria necessário para equipar um laboratório semelhante, de maneira que tenha as principais utilidades necessárias para realizar os cultivos. Uma estimativa de

custo anual foi realizada para cada tipo de recurso requerido. A soma das estimativas de custo permitiu a geração de orçamentos anuais para os diferentes processos (tabela 6.7).

Ao analisar o orçamento das diferentes estratégias de cultivo, o processo mais oneroso foi o cultivo descontínuo com alimentação exponencial, reciclo de células e perfusão (CDAVE+P), seguido pelos cultivos com vazão exponencial (CDAVE) e com vazão constante (CDAVC). No entanto, esses foram os processos que resultaram em maior produção e produtividade de PRP (tabela 6.8). A produção e a produtividade são fatores que devem ser levados em consideração, pois interferem diretamente na análise econômica (CHOI e LEE, 2000).

Tabela 6.7. Orçamento anual dos diferentes tipos de processos descontínuos alimentados.

Descrição	(CDAIG)12h	(CDAIG)24h	(CDAVC)	(CDAVE)	CDAVE+P
Água	2.135,00	2.135,00	2.135,00	2.135,00	2.135,00
Energia	8.600,08	8.930,66	8.782,19	8.955,78	8.224,07
Depreciação	27.688,79	27.688,79	28.144,20	28.144,20	28.849,60
Insumos	25.355,37	25.878,12	29.982,29	30.586,37	34.092,85
Salários + encargos	67.117,12	67.117,12	67.117,12	67.117,12	67.117,12
Total (US\$/ano)	130.896,36	131.749,69	136.160,80	136.938,47	140.418,68

Os cultivos com adição intermitente de glicose (CDAIG) com 12h ou 24h de cultivo, resultaram em menor custo do processo por ano, mas apresentaram também menor produtividade (63 mg PRP/(L.h) e 47 mg PRP/(L.h)) e produção de polissacarídeo (150 g PRP/ano e 226 g PRP/ano, respectivamente) (tabela 6.8). Ao analisar o custo do processo por grama de polissacarídeo por ano, estes apresentaram os maiores valores (US\$ 872,64/g PRP e US\$ 582,96/g PRP, respectivamente).

O cultivo com reciclo de células e perfusão (CDAVE+P) apresentou a maior produtividade (129 mg PRP/(L.h)). Mesmo assim, a produção anual se mostrou baixa em relação aos demais processos (270 g PRP/ano), e o custo do processo por grama de polissacarídeo por ano (US\$ 520,06/g PRP) foi similar ao CDAIG de 24 horas. A complexidade do processo (CDAVE+P) inviabiliza a realização de um grande número de operações por ano o que resulta na menor produção anual de polissacarídeo.

Quando comparado o cultivo CDAVE+P com os cultivos CDAVC e CDAVE, os dois últimos apresentaram menor produtividade (84 mg PRP/(L.h) e 65 mg PRP/(L.h), respectivamente). No entanto, apresentaram os maiores valores de produção anual de

polissacarídeo (320 g PRP/ano e 300 g PRP/ano, respectivamente) e os menores custos por grama de polissacarídeo em relação as demais estratégias de cultivo realizadas (tabela 6.8).

Tabela 6.8. Produção, produtividade e orçamento dos diferentes tipos de processos descontínuos alimentados.

Descrição	(CDAIG)12h	(CDAIG)24h	(CDAVC)	(CDAVE)	CDAVE+P)
Custo do processo (US\$ /ano)	130.896,36	131.749,69	136.160,80	136.938,47	140.418,68
produção por cultivo (PRP g)	7,5	11,3	16	15	18
produtividade (mg/(L.h))	63	47	84	65	129
produção total (PRP g / ano)	150	226	320	300	270
Custo processo(US\$ /PRP g/ ano)	872,64	582,96	425,50	456,46	520,06

Dentre as diferentes estratégias de cultivo submetidas à análise econômica, o cultivo descontínuo alimentado com vazão constante (CDAVC) foi o processo que resultou em maior produção anual (tabela 6.8). Portanto, o CDAVC se mostrou o processo mais viável economicamente, além de ser um processo simples de realizar e passível de escalonamento sem obstáculos operacionais.

Diante dos resultados obtidos e com base no valor de produção de polissacarídeo, o cultivo descontínuo alimentado com vazão constante (CDAVC) foi utilizado como modelo para uma simulação da escala dimensionada de modo a atender a demanda nacional de produção da vacina conjugada Hib.

O grande desafio de uma instituição pública para a produção de imunobiológicos e/ou vacinas é que o produto final atenda todos os requisitos de qualidades exigidos pelos órgãos competentes como a OMS ou ANVISA e que seu custo seja o menor possível, podendo ser absorvido pelo governo e ser disponibilizado gratuitamente no programa nacional de imunização. O preço da dose da vacina conjugada Hib disponibilizadas por laboratórios particulares (Delboni e Lavoisier, levantamento referente a julho de 2010) está na faixa de US\$ 37,8, o que inviabiliza o acesso pela faixa mais carente da população e que geralmente é a mais vulnerável.

A inovação tecnológica que permita encontrar processos que resultem na maior produção de polissacarídeo possibilitando reduzir o tamanho do reator e como consequência redução no custo do processo, é o desejável, pois permitirá que a planta de produção seja muito próxima da planta piloto em dimensões.

Para atender a demanda nacional da vacina conjugada contra Hib é necessário produzir 2,42 kg de polissacarídeo no processo de fermentação por ano (anexo 1). Portanto, seria necessário realizar 19 cultivos descontínuo com vazão constante em escala de 80 litros, considerando que a produção volumétrica alcançada e o número de ensaios passíveis de serem realizados no período de um ano sejam os mesmos daqueles obtidos na escala de 10 litros, ou seja, de 1600 mg/L de PRP e 20 ensaios.

6.4 CONCLUSÃO

De acordo com a análise econômica realizada para as diferentes estratégias de cultivo descritas neste capítulo, o cultivo descontínuo alimentado com vazão constante (CDAVC) mostrou ser o processo economicamente mais favorável, pois apresentou a maior produção anual (320 g PRP/ano) com uma produtividade de 84 mg PRP/(L.h).

É um processo relativamente simples de executar e passível de escalonamento do ponto de vista tanto operacional como de viabilidade econômica, permitindo atingir a produção de PRP necessária para atender a demanda nacional da vacina conjugada aumentando a escala de 10 para 80 litros de cultivo.

REFERÊNCIAS

- AHN, W. S.; PARK, S. J.; LEE, S. Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters.**, v. 23, p. 235-240, 2001.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals: Bioprocess Economics., 2. ed. **McGraw-Hill.**, cap. 12, p. 798-852, 1986.
- BCB – BANCO CENTRAL DO BRASIL. Disponível em <http://www.bcb.gov.br/>. Acessado em fevereiro de 2010.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. Economic considerations in the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **Microbiology and Biotechnology.**, v. 53, p. 646-649, 2000.
- CHOI, J.; LEE, S. Y.; SHIN, K.; LEE, W. G.; PARK, S. J.; CHANG, H. N.; CHANG, Y. K. Pilot scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioprocess Engineering.**, v. 7, p. 371-374, 2002.
- ELETROPAULO. Tabela de tarifas para fornecimento de energia elétrica da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL) de 09/07/2009. Disponível em <http://www.aeseletropaulo.com.br/portal/clientes/>. Acessado em fevereiro de 2010.
- GADELHA, C. Inovação em vacinas no Brasil: experiência recente e constrangimentos estruturais. *História, Ciências, Saúde. Manguinhos.*, v. 10, p. 697-724, 2003.
- RISI JUNIOR, J. B. *História, Ciências, Saúde. Manguinhos.*, v. 10, p. 771-83, 2003.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em junho de 2009.
- KINDERMANNA, M.; WEISA, K.; LIPPERTB, C.; MÜLLERA J. Economic analysis of different processing methods for small-scale coconut oil production in the Philippines. **Conference on International Agricultural Research for Development.**, University of Göttingen, 2007.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo, Edgard Blücher., cap. 13, v. 3, p. 307-346, 2001.
- ROLDÃO, V. S. Gestão de projetos: **Uma Perspectiva Integrada.** São Carlos, EduFSCar, 2004.
- SILVEIRA, J. M. F. J.; DAL POZ, M. E.; FONSECA, M. G. D. ; BORGES, I. C.; MELO, F. M. **Evolução recente da biotecnologia no Brasil. Texto para Discussão.** IE/UNICAMP., n. 114, 2004.
- TEMPORÃO, J. G. O complexo industrial da saúde: público e privado na produção e consumo de vacinas no Brasil. Tese de doutorado em Saúde Coletiva-- do Instituto de Medicina Social da Universidade do Estado do Rio de Janeiro., 2002.
- VILLEN, R. A.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial.** São Paulo, Edgard Blücher., cap.22, v. 2, p. 523-541, 2001.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **WHO Technical Report Series.**, n. 897, p. 27-60, 2000.

Capítulo 7

Conclusões gerais e perspectivas

O estudo realizado e apresentado nesta dissertação pretende ser um contributo no desenvolvimento e estabelecimento de um processo de produção de polissacarídeo com boa produção, produtividade, simples de ser realizado operacionalmente, com possibilidade de escalonamento e viável do ponto de vista econômico.

Estudo de parâmetros de qualidade também foi o foco deste estudo. Na tentativa de aumentar a produção volumétrica de polissacarídeo foi realizado um estudo utilizando planejamento experimental para melhorar a composição do meio de cultura. Outro parâmetro estudado foi quanto a qualidade do polissacarídeo, durante o cultivo, por meio da avaliação da massa molecular. O polissacarídeo deve possuir massa molecular elevada e homogênea nos diferentes lotes de produção.

Neste capítulo são apresentadas as principais conclusões do trabalho realizado e ainda proposta algumas sugestões de trabalho futuro.

7.1 CONCLUSÕES

Os estudos realizados neste trabalho resultaram nas seguintes conclusões:

Cultivos conduzidos com peptona de soja da marca BD apresentaram maior crescimento celular e produção do polissacarídeo quando comparado com a peptona de soja da Sigma.

Ao avaliar a influência do fornecimento de ar, verificou-se que o aumento da vazão específica de ar de 0,2 VVM para 0,5VVM resultou no aumento do crescimento celular e na produção de polissacarídeo capsular.

Dentre as diferentes estratégias de cultivos realizadas, o cultivo descontínuo alimentado com adição intermitente de glicose (CDAIG) e vazão específica de ar em 0,5VVM resultou em produção de polissacarídeo de 750 mg PRP/L e produtividade de 63 mg PRP/(L.h). O cultivo descontínuo alimentado com vazão constante (CDAVC) a 1 VVM apresentou o dobro da produção de polissacarídeo (1600 mg PRP/L) e produtividade de 88 mg PRP/(L.h) quando comparado com o CDAIG, entretanto resultou em acúmulo de glicose no biorreator e conseqüentemente aumento da concentração de ácido acético. Já o cultivo

descontínuo alimentado com vazão exponencial (CDAVE) e limitação no fornecimento de glicose, realizado com a finalidade de evitar a formação de ácido acético, atingiu a produção de polissacarídeo em 1500 mg PRP/L, similar ao CDAVC e produtividade em polissacarídeo de 65 mg PRP/(L.h), não tendo sido eficaz na minimização da formação de ácido acético. O cultivo descontínuo alimentado com reciclo de células e perfusão (CDAVE+P), realizado com o propósito de remover o ácido acético de dentro do biorreator e aumentar a produção de polissacarídeo capsular, apresentou produção de polissacarídeo (1800 mg PRP/L) similar aos cultivos CDAVC e CDAVE, com produtividade em polissacarídeo foi de 129 mg PRP/(L.h).

Em análise da viabilidade econômica das diferentes estratégias de cultivo, o processo descontínuo alimentado com vazão constante e 1 VVM, mostrou-se mais viável por apresentar a maior produção de polissacarídeo total por ano (320 mg PRP/ano), a qual foi similar à calculada para os processos CDAVE e CDAVE+P. Além disso, o CDAVC é mais simples de ser executado do ponto de vista operacional e, portanto passível de ser escalonado, sendo que com CDAVC, é possível atingir a produção de PRP necessária para atender a demanda nacional da vacina conjugada aumentando a escala de 10 para 80 litros de cultivo.

O estudo da composição do meio de cultura baseado em seus componentes chaves (concentrações de Peptona de Soja, Extrato de Levedura e Glicose) foi realizado através do uso de Delineamento Composto Central Rotacional seguida por análise de superfície de resposta, o qual foi executado em duas etapas. No 1º DCCR, os resultados mostraram que a variável independente concentração de glicose estava limitante, mascarando o efeito dos outros fatores. Já no 2º DCCR, após adequação nos valores dos níveis dos fatores, foi possível identificar a região de ótimo por análise da superfície de resposta dos modelos empíricos obtidos, explorar regiões promissoras por meio da realização de ensaios complementares e, validar os modelos finais obtidos realizando ensaios nas condições identificadas ótimas para a composição do meio de cultivo. Ensaios de validação em *shaker* e em biorreator com o melhor meio de cultivo (MMC) e com a condição do ponto central (CPC) confirmaram que o modelo representava bem os dados experimentais. Os ensaios em *shaker* e em biorreator resultaram aproximadamente em 600 mg PRP/L, exceto para o MMC quando realizado em *shaker*. Tanto o MMC como a CPC representam a região de ótimo, sendo que o meio na CPC se destaca por ser conduzido com menor concentração de glicose (30%) e de extrato levedura (50%) do que o MMC, e possui metade da concentração das fontes de nitrogênio (peptona de soja e extrato de levedura) quando comparado com o meio atualmente utilizado.

Nas análises dos parâmetros de qualidade, o aumento da vazão específica de ar de 0,2 VVM para 0,5VVM não interferiu na massa molecular do polissacarídeo. Já ao estender o cultivo de doze para vinte quatro horas, verificou-se um aumento de 38% na produção de polissacarídeo no sobrenadante, resultando porém em um produto (PRP) de menor massa molecular.

Quanto ao consumo de nutrientes, a análise de aminoácidos realizadas nas amostras do sobrenadante da cultura no decorrer do cultivo revelou que o Aspartato, Cisteína, Glutamato, Glutamina e Serina são consumidos nas primeiras horas de cultivo, confirmando que o crescimento inicial de *H. influenzae* é sustentado principalmente pela assimilação dos nutrientes presentes na peptonina de soja e extrato de levedura.

De acordo com a análise dos aspectos morfológicos do microrganismo no decorrer do cultivo através das fotografias de microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelou que na sexta hora de cultivo as células apresentaram morfologia arredondada, enquanto que na décima segunda hora de cultivo revelaram células mais alongadas com a presença de inclusões citoplasmáticas na forma de grânulos. A análise dos elementos Carbono, Nitrogênio e Hidrogênio nas células de *H. influenzae* na sexta e décima segunda hora de cultivo, não apresentaram diferença, indicando que o material presente nos grânulos apresenta composição semelhante à da célula para esses elementos.

7.2 PERSPECTIVAS

O presente trabalho contribuiu de forma significativa para agregar conhecimento ao estudo dos cultivos de *H. influenzae* para a produção de polissacarídeo capsular e revelar novos aspectos até então desconhecidos sobre a morfologia celular, o metabolismo e a estabilidade do PRP produzido. Assim, como sugestões para a continuidade do trabalho, destacam-se:

A identificação das inclusões citoplasmáticas precisa ser realizada. Uma possibilidade para essa identificação seria, inicialmente, realizar a extração e purificação dos grânulos para eliminar possíveis interferentes da célula (mascarando o resultado) e depois realizar os testes para glicogênio, polifosfatos que ainda não foram realizados e repetir as análises para o polissacarídeo e também análise elementar do material purificado.

Um dos fatos mais surpreendentes revelados nos estudos realizados foi a diminuição da massa molecular do PRP com o tempo de cultivo. Assim, experimentos específicos para identificar a causa da degradação do PRP, a qual pode estar relacionada ao cisalhamento provocado pela

agitação no biorreator, à presença de enzimas no meio ou simplesmente à própria labilidade da estrutura do polissacarídeo, são necessários. Caso a agitação seja a responsável pela degradação, outros tipos de biorreatores, como os pneumáticos ou o de vórtice poderiam ser estudados. Outra possibilidade é tentar proteger as células dos efeitos diretos da agitação, por meio da imobilização das mesmas em esferas de alginato ou outros suportes inertes.

Diante do alto consumo dos aminoácidos aspartato, cisteína, glutamato, glutamina e serina logo no início do cultivo e do crescimento observado nessa fase, experimentos específicos visando estudar a influência da suplementação do meio de cultura com estes nutrientes no crescimento celular e produção de polissacarídeo poderiam ser realizados, assim como análises mais detalhadas dos nutrientes preferencialmente consumidos por este microrganismo no decorrer o cultivo.

Em termos de estratégia de cultivo, a alternativa mais interessante de ser investigada consiste na combinação do modo de operação do biorreator identificado como mais viável (CDAVC) com a melhor a composição de meio de cultura resultante do planejamento experimental (PC), associado ainda às informações da análise dos nutrientes preferencialmente consumidos pelo Hib. E, finalmente realizar o aumento de escala em biorreator de 80 L da condição de cultivo e meio resultante do estudo direcionado.

ANEXO 1

Quantidade estimada de polissacarídeo bruto necessário para atender a demanda nacional

O cálculo para estimar a quantidade de polissacarídeo necessário a ser produzido no processo de fermentação de modo a atender a demanda nacional, foi realizado baseado nos seguintes critérios: 1) na quantidade de polissacarídeo necessário para cada criança; 2) no número de crianças que nascem por ano; 3) no rendimento obtido na etapa de conjugação; 4) no rendimento obtido na etapa de purificação.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose da vacina Hib conjugada contenha 10 µg de polissacarídeo conjugado (WHO, 2000), e de acordo com o calendário nacional de vacinação, crianças de até 2 anos são imunizadas com 3 doses e mais um reforço da vacina conjugada contra Hib. Diante deste panorama, são necessários 40 µg de polissacarídeo conjugado por criança. Segundo a estimativa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a taxa de natalidade no Brasil é da ordem de 3 milhões de crianças por ano. Para este cálculo foi considerado o registro de crianças nascidas em 2008 no total de 3.085.452 crianças (IBGE, 2008). O valor de polissacarídeo conjugado necessário para atender essa população seria de 123 gramas (3.085.452 de crianças* 40 µg de polissacarídeo necessário por criança)

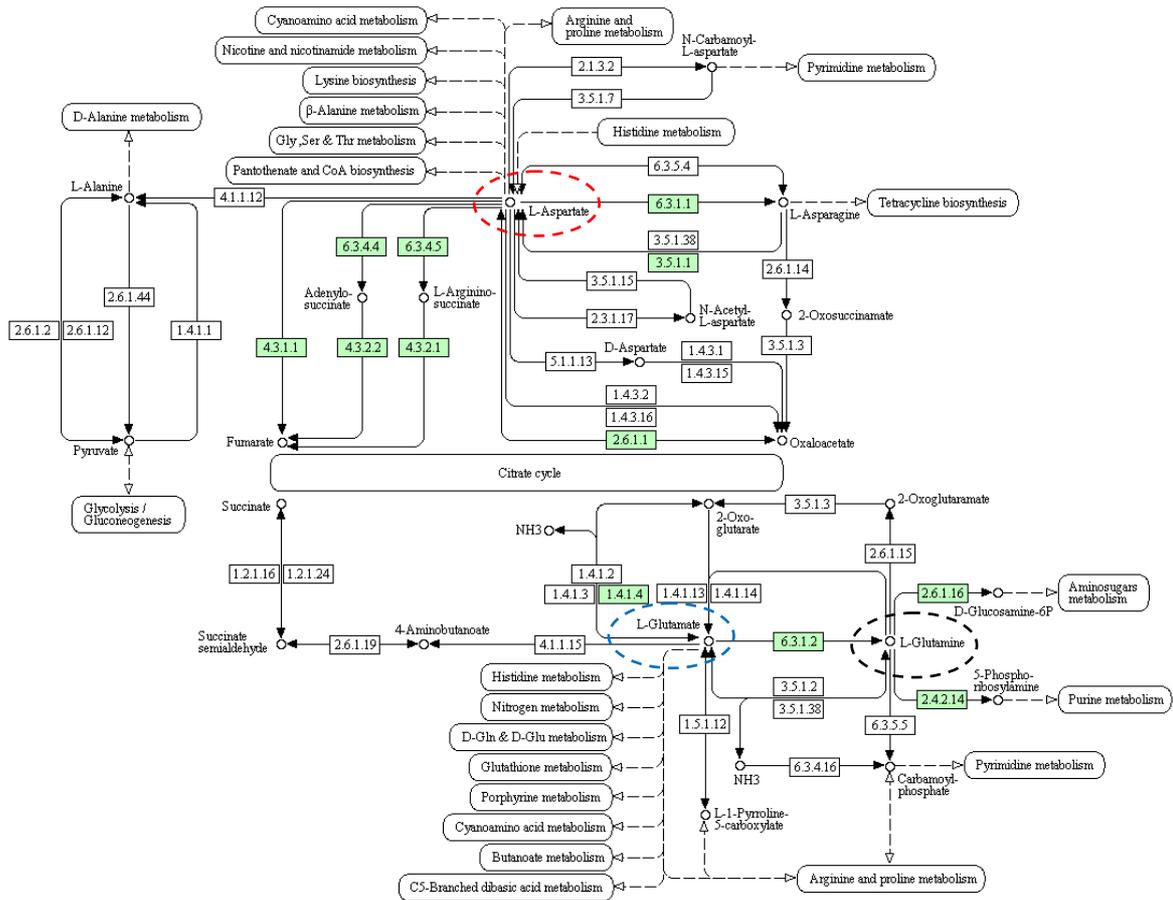
A etapa de conjugação tem apresentado eficiência de recuperação de 30 % na forma de polissacarídeo conjugado, portanto necessitaria de 410 g de polissacarídeo purificado (123 gramas de PS conjugado*100/30 (recuperação da conjugação)). Por outro lado, a etapa de purificação apresenta gargalos para atingir as exigências requeridas, com recuperação em torno de 17%. Deste modo, necessitaríamos de 2420 gramas de polissacarídeo bruto (410 g de PS purificado *100/ 17 (recuperação da purificação)). Portanto, no processo de fermentação são necessários a produção de 2,42 kg de PRP bruto por ano para atender a demanda nacional de produção da vacina conjugada contra Hib.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA: Estatísticas do registro civil. Rio de Janeiro. **IBGE.**, v. 35, 2008.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION: Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **WHO Technical Report Series.**, n. 897, p. 27-60. 2000.

ANEXO 2 – A

Metabolismo do Aspartato, Glutamato e Glutamina



KEGG, 2010.

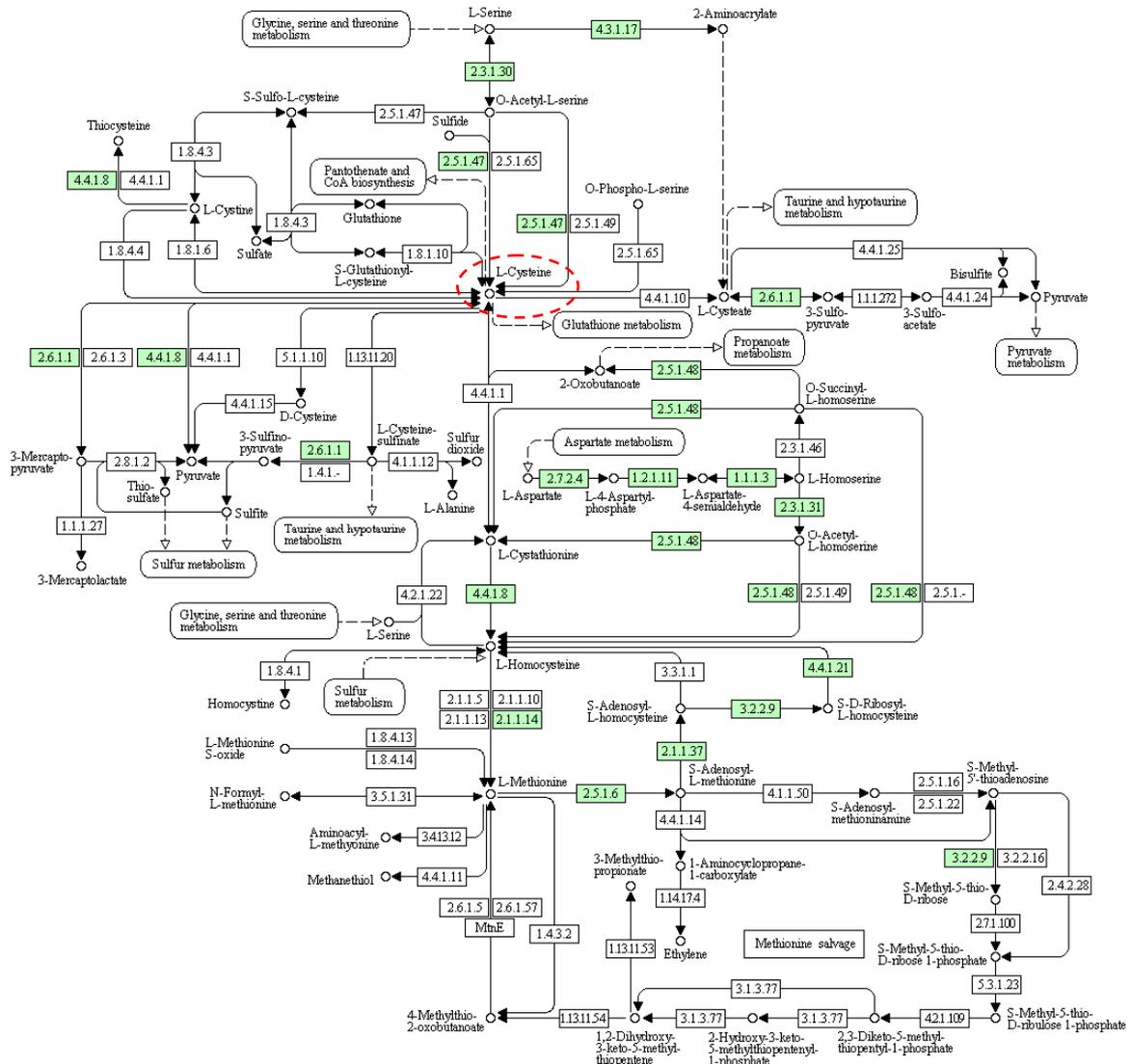
círculo tracejado vermelho – Aspartato
 círculo tracejado azul – Glutamato
 círculo tracejado preto – Glutamina

Figura Anexo 2A. Mapa do metabolismo dos aminoácidos aspartato, glutamato e glutamina pelo *H. influenzae b*.

KEGG PATHWAY Database. Disponível em <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>. Acessado em jun, 2010.

ANEXO 2 – B

Metabolismo da Cisteína



KEGG, 2010.

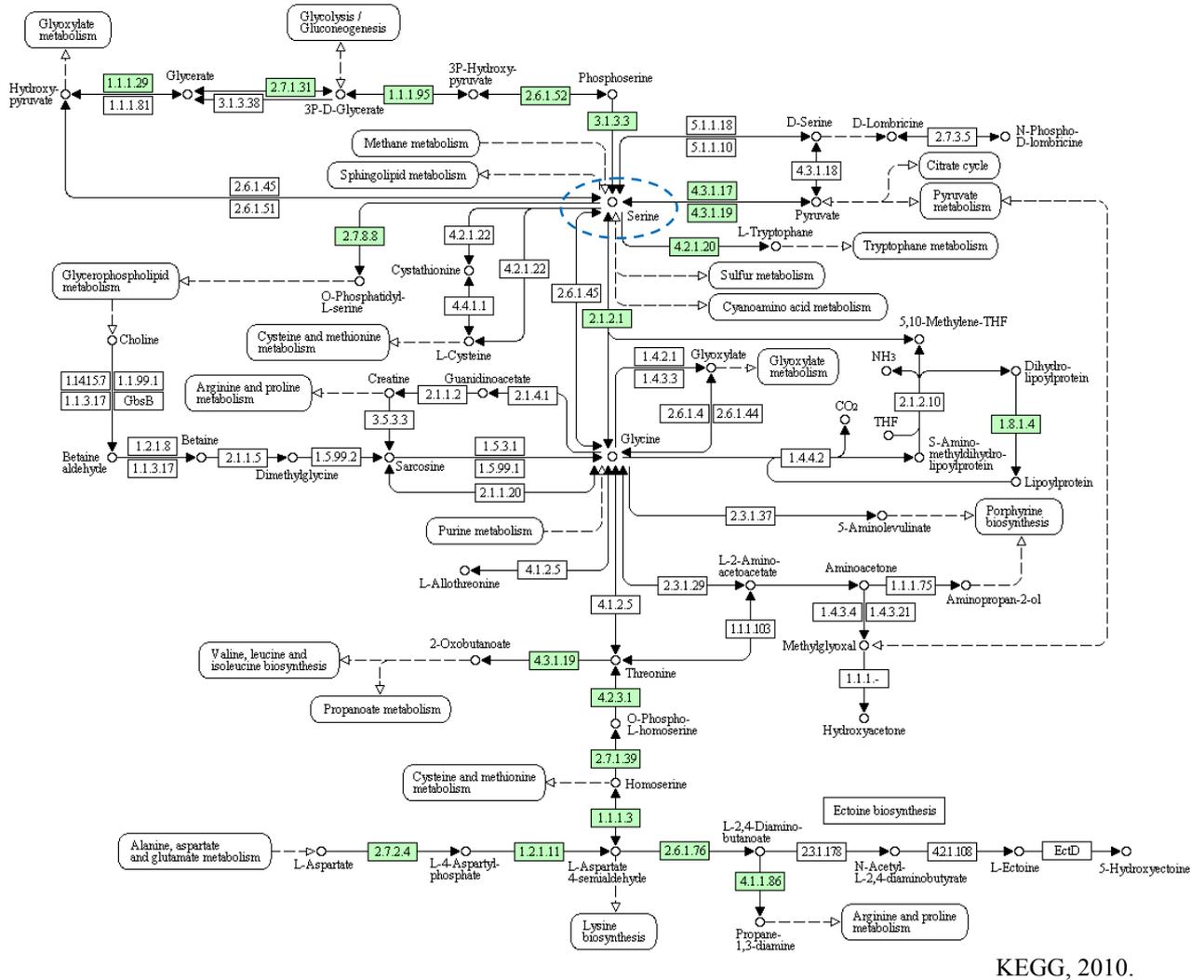
círculo tracejado vermelho – Cisteína

Figura Anexo 2B. Mapa do metabolismo do aminoácido cisteína pelo *H. influenzae* b.

KEGG PATHWAY Database. Disponível em <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>. Acessado em jun, 2010.

ANEXO 2 – C

Metabolismo da Serina



círculo tracejado azul – Serina

Figura Anexo 2C. Mapa do metabolismo do aminoácido serina pelo *H. influenzae* b.

KEGG PATHWAY Database. Disponível em <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>. Acessado em jun, 2010.

ANEXO 3 – A

Tabela Anexo 3. Relação de enzimas descritas no mapa das principais vias metabólicas do metabolismo de *H. influenzae* b.

EC	Nomenclatura
1.1.1.1	alcohol dehydrogenase
1.1.1.27	L-lactate dehydrogenase
1.1.1.28	D-lactate dehydrogenase
1.1.1.37	malate dehydrogenase
1.1.1.41	isocitrate dehydrogenase (NAD ⁺)
1.1.1.42	isocitrate dehydrogenase (NADP ⁺)
1.1.1.44	phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating);
1.1.1.49	glucose-6-phosphate dehydrogenase
1.1.2.3	L-lactate dehydrogenase
1.1.2.4	D-lactate dehydrogenase
1.1.2.5	D-lactate dehydrogenase
1.1.99.7	malate-lactate transhydrogenase
1.2.1.12	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
1.2.1.59	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
1.2.1.9	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
1.2.2.2	pyruvate dehydrogenase
1.2.3.3	pyruvate oxidase
1.2.4.1	pyruvate dehydrogenase
1.2.4.2	alpha-ketoglutarate decarboxylase
1.2.7.1	pyruvate synthase
1.2.7.3	2-oxoglutarate synthase
1.2.7.5	aldehyde ferredoxin oxidoreductase
1.2.7.6	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (ferredoxin);
1.3.5.1	succinate dehydrogenase
1.3.99.1	fumarate reductase subunit D
1.4.1.2	glutamate dehydrogenase
1.4.1.3	glutamate dehydrogenase
1.4.1.4	glutamate dehydrogenase
1.8.1.4	dihydrolipoamide dehydrogenase
2.2.1.1	transketolase
2.2.1.2	transaldolase
2.3.1.12	dihydrolipoamide acetyltransferase
2.3.1.61	dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase
2.3.1.8	phosphate acetyl transferase
2.3.3.1	citrate (Si)-synthase
2.3.3.8	ATP citrate synthase

continua

ANEXO 3 – B

EC	Nomenclatura
2.4.2.14	amidophosphoribosyltransferase
2.6.1.16	glutamine---fructose-6-phosphate transaminase
2.7.1.11	6-phosphofructokinase
2.7.1.15	ribokinase
2.7.1.40	pyruvate kinase
2.7.1.45	2-dehydro-3-deoxygluconokinase
2.7.1.69	glucose permease
2.7.2.1	acetate kinase
2.7.2.3	phosphoglycerate kinase
2.7.4.23	ribose 1,5-bisphosphate phosphokinase
2.7.6.1	ribose-phosphate diphosphokinase
2.8.3.10	citrate lyase alpha chain
3.1.1.31	6-phosphogluconolactonase
3.1.2.3	succinyl-CoA hydrolase
3.1.3.11	fructose-bisphosphatase
3.1.3.13	bisphosphoglycerate phosphatase
4.1.1.1	pyruvate decarboxylase
4.1.1.31	phosphoenolpyruvate carboxykinase
4.1.1.32	phosphoenolpyruvate carboxykinase
4.1.1.49	phosphoenolpyruvate carboxykinase
4.1.2.-	Lyases
4.1.2.13	fructose-bisphosphate aldolase
4.1.2.14	2-dehydro-3-deoxy-phosphogluconate aldolase
4.1.2.4	deoxyribose-phosphate aldolase
4.1.2.9	phosphoketolase
4.1.3.34	citrate lyase beta chain
4.1.3.6	citrate lyase alpha chain
4.2.1.11	phosphopyruvate hydratase
4.2.1.12	phosphogluconate dehydratase;
4.2.1.2	fumarate hydratase
4.2.1.3	aconitate hydratase
5.1.1.3	glutamate racemase
5.1.3.1	ribulose-phosphate 3-epimerase
5.3.1.1	triose phosphate isomerase
5.3.1.6	ribose-5-phosphate isomerase
5.3.1.9	glucose-6-phosphate isomerase
5.4.2.1	phosphoglycerate mutase

continuação

ANEXO 3 – C

EC	Nomenclatura
5.4.2.2	phosphoglucomutase
5.4.2.4	bisphosphoglycerate mutase
5.4.2.7	phosphopentomutase
6.2.1.18	citrate---CoA ligase
6.2.1.4	succinate---CoA ligase
6.2.1.5	succinyl-CoA synthetase beta subunit
6.3.1.2	glutamine synthetase
6.4.1.1	pyruvate carboxylase

EC – *Enzyme commission*

Conclusão

KEGG, 2010.

KEGG PATHWAY Database. Disponível em <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>. Acessado em jun, 2010.