

VERÔNICA MARIA RODEGE GOGOLA

**CULTIVO CONTÍNUO DE *Streptococcus pneumoniae* SOROTIPO 14:
METABOLISMO E CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO
CAPSULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

SÃO PAULO
2011

VERÔNICA MARIA RODEGE GOGOLA

**CULTIVO CONTÍNUO DE *Streptococcus pneumoniae* SOROTIPO 14:
METABOLISMO E CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO
CAPSULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora:
Dra. Viviane Maimoni Gonçalves

SÃO PAULO
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Gogola, Verônica Maria Rodege.

Cultivo contínuo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14:
metabolismo e cinética de produção de polissacarídeo capsular /
Verônica Maria Rodege Gogola. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Viviane Maimoni Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Bioprocessos na produção de
vacinas.

Versão do título para o inglês: Continuous cultivation of
Streptococcus pneumoniae serotype 14: metabolism and kinetics of
capsular polysaccharide production.

Descritores: 1. *Streptococcus* 2. Vacinas 3. Polissacarídeos
bacterianos 4. Metabolismo 5. Bioreatores I. Gonçalves, Viviane
Maimoni II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB074/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Verônica Maria Rodege Gogola.

Título da Dissertação: Cultivo contínuo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14: metabolismo e cinética de produção de polissacarídeo capsular.

Orientador(a): Viviane Maimoni Gonçalves.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

*Ao meu afilhado, João Miguel, que com poucas palavras
e muitos sorrisos, me ensinou o que é realmente
importante na vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Viviane, pela companhia, por sofrer comigo tantos problemas burocráticos... Pela gigantesca ajuda nas intermináveis fermentações, pela paciência com meu perfeccionismo em tudo, por ter mente aberta às minhas teorias e por sempre acreditar e confiar no meu trabalho. Agradeço de coração todo o apoio, conselhos e conhecimentos, que me fizeram crescer muito como profissional e pessoa!

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram com este projeto: Talita, Natália, Carol, Douglas, Anne, Bruno, Sílvia e Mateus; seja preparando litros e litros de meio, ajudando em dias (e também em noites e finais de semana) de fermentação ou passando amostras no HPLC. Em especial às minhas anjinhas Talita e Natália, que me acolheram tão carinhosamente em São Paulo... Sou muito grata por toda a ajuda (que foram muitas!), pela torcida, confiança, risadas, comilanças e parceria em tantas coisas. Sou uma pessoa muito abençoada e feliz por ter vocês na minha vida, meninas!

Às minhas amigas Sílvia e Giovana, sou grata pela amizade, pelas conversas sempre oportunas, pelos ótimos conselhos, pela preocupação e pela partilha dos momentos difíceis, principalmente os finais... À Cátia, pela ótima (e engraçadíssima!) amizade, pela companhia também aos sábados e domingos no Butantan, pela força, por me fazer ver que alguma coisa ruim pode ser muito pior e por ter me passado toda a base de um bom ELISA.

Um agradecimento especial a todos os pesquisadores, funcionários e alunos do Laboratório de Fermentação e da Central do Instituto Butantan. Sou muito grata aos que partilharam tantos conhecimentos comigo, desde os tempos de estágio. Também agradeço pelas caronas e pelo cuidado com meu bem-estar. Ao seu Lori, dona Ana, Hélio e Máximo pela paciência e impagável ajuda com minhas listas de materiais intermináveis e complicadas.

Aos meus amigos de faculdade, que sempre torceram pelo meu sucesso e que são presença constante na minha vida, muito obrigada. Também agradeço a os amigos de Curitiba, Santa Catarina, São Paulo e Campinas. São muitos pra citar! Agradeço muito o carinho, interesse e incentivo a

cada encontro! Agradeço de maneira especial à família da Natália, ao Marcel e também ao Boris (meu terapeuta canino), por "brincar comigo".

Ao meu amado, Daniel, que me deu suporte em tantas situações (são muitas mesmo!), escutou inúmeras reclamações, acompanhou de perto minhas dificuldades, crises e sucessos e que, principalmente, não me deixou desistir, agradeço profundamente. Agradeço pela presença que se fez constante (seja física ou pelo telefone/e-mail/pensamento) apesar da distância, pelas palavras de coragem, pela inesgotável paciência, por apoiar meus sonhos e sonhá-los comigo e por tantas outras coisas.... Obrigada por esse amor tão lindo e por não desistir de mim!

Agradeço também à família do Daniel, por toda torcida, afeto e amor.

À minha família, agradeço tanto... A todos que torceram e rezaram muito à distância e que me motivaram nas viagens de volta a São Paulo, mesmo sem entender direito o que é um cultivo, polissacarídeo e por que e o quê eu estava fazendo. Especialmente à minha madrinha Marisa, e à minha avó Wilma, agradeço pelo sorriso caloroso a cada visita em Curitiba.

Agradeço carinhosamente à minha irmã querida, Milena, por sempre me transmitir coragem e esperança, por me escutar e me entender melhor do que eu mesma. Por todo o apoio, pelas palhaçadas, pelo olhar sempre doce e por me fazer sentir tão amada... Ao meu cunhado, Edgar, pelo carinho e por sempre trazer humor às situações mais adversas. Ao meu afilhado João Miguel, meu solzinho lindo, por todas as demonstrações de carinho: sorrisos, beijinhos e "diiiiinnndaa" falados. Aos meus pais, Gilberto e Girley, por tanto amor.... Pelos conselhos e apoio na vida acadêmica, por suportarem a distância... Pela partilha das dificuldades e alegrias, pelas orações, pela paciência com esse mestrado interminável e com as visitas pouco frequentes nos meses finais. Agradeço muito o interesse e respeito por minha profissão, e por sempre verem um brilho a mais no meu trabalho!

É um agradecimento bem particular a Deus (e também a Mãezinha do Céu, anjos e Santos invocados constantemente), que me deu forças para dar um passo a mais.

*Só sabemos com exatidão quando sabemos
pouco; à medida que vamos adquirindo
conhecimentos, instala-se a dúvida.*

Johann Goethe

RESUMO

GOGOLA, V. M. R. **Cultivo Contínuo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14: Metabolismo e Cinética de Produção de Polissacarídeo Capsular.** 2011. 137 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

S. pneumoniae, micro-organismo causador de pneumonia, bacteremia, meningite e otite aguda do ouvido médio, é detentor de altas taxas de mortalidade em crianças. Seu principal fator de virulência, o polissacarídeo capsular (PS), é utilizado como antígeno nas vacinas pneumocócicas existentes e é a base para a classificação do pneumococo em mais de 90 sorotipos. Atualmente, o sorotipo 14 é o que mais atinge crianças no Brasil, sendo então escolhido para este estudo. Apesar da sua grande importância, pouco são os trabalhos dedicados ao estudo do metabolismo do pneumococo. O objetivo desta dissertação foi estudar o metabolismo de crescimento, de carbono e de produção de PS em cultivo contínuo em biorreator, uma abordagem inédita para este micro-organismo. Para este estudo, foi desenvolvido um método para a quantificação de polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 14 (PS14) por ELISA de captura e a melhor cepa produtora foi escolhida dentro oito cepas disponíveis. Cultivos descontínuos em biorreator foram então conduzidos com meio complexo e meio quimicamente definido (CDM) e rendimentos semelhantes de crescimento e produção de PS14 foram observados entre os dois meios, o que viabilizou o uso do CDM para estudos de metabolismo em biorreator. Diferenças no requerimento de vitaminas foram verificadas para cultivos em frasco (necessidade de duas vitaminas) e cultivos descontínuos em biorreator (necessidade de seis vitaminas, CDMv6); correlacionas à diferença de anaerobiose total/parcial entre biorreator e frascos. Em cultivos contínuos em biorreator foram estudadas as influências da vazão específica de alimentação (D), concentração de glicose, colina e glutamina sobre o crescimento e a produção de PS14. Através destes cultivos comprovou-se que a produção de PS14 livre no sobrenadante (PS14_L) e associado às células (PS14_C) é associada ao crescimento celular. A maior produtividade em células e PS14 ocorreu em $D = 0,8 \text{ h}^{-1}$ utilizando meio complexo. Nos estudos de limitação em CDMv6, observou-se que a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ a glicose foi o substrato com maior impacto sobre a produção de PS14, sendo que um efeito positivo sobre a produção de PS14_L foi observado quando ela esteve em excesso. Nesta condição ocorreu desacoplamento da formação de ácidos orgânicos da formação de biomassa; efeito não observado para excesso de colina/glutamina. Também foi determinado que em menores concentrações de glicose/colina/glutamina os fatores de conversão de PS14 e biomassa sobre a glicose foram maiores, bem como os fatores de conversão de PS14 sobre biomassa. Desta forma, conclui-se que, uma vez determinada que a formação de PS14 é associada ao crescimento, as estratégias de produção de PS14 devem focar na alta densidade celular e em condições de limitação de nutrientes, de forma a aumentar a eficiência da conversão de substrato e células a produto.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. Polissacarídeo capsular. Metabolismo. Cultivo contínuo.

ABSTRACT

GOGOLA, V. M. R. **Continuous Cultivation of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14: Metabolism and Kinetics of Capsular Polysaccharide Production.** 2011. 137 p. Masters thesis (Biotechnology) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

S. pneumoniae, causative agent of pneumonia, bacteremia, meningitis and acute otitis media, is a major cause of children mortality. The capsular polysaccharide (PS) is the most important pneumococcal virulence factor and has been used as antigen in all available pneumococcal vaccines. The PS is also the basis for *S. pneumoniae* classification in more than 90 serotypes. Despite its importance, very little attention has been devoted to pneumococcal metabolism. The serotype 14, the most common pediatric serotype in Brazil, was selected for this study aiming to evaluate the growing, carbon and PS production metabolism in reactor by continuous cultivation, a novel approach to this microorganism. In order to do this, a Sandwich ELISA method was developed for quantification of PS from *S. pneumoniae* serotype 14 (PS14) and the best producer strain was selected among eight strains. Batch cultures in reactor were conducted with two media: complex medium and chemically defined medium (CDM), and similar growth and PS14 production yields were observed for both media, which has validated the CDM for metabolism studies in reactor. Differences in vitamin requirements were verified in flask cultivation (two vitamins required) and reactor cultivation (six vitamins required, CDMv6). These finds were correlated to the degree of anaerobiosis (total/partial) in reactor and flasks. The influence of dilution rate (D), glucose, choline and glutamine concentration on growth and PS14 production were evaluated in continuous cultivation. By these cultivations, it was proved that PS14 free in the supernatant (PS14_L) as well cell-bound PS14 (PS14_C) were associated to cell growth. The highest cell and PS14 productivity occurred in $D = 0.8 \text{ h}^{-1}$ using complex media. In limitation experiments with CDMv6 at $D = 0.5 \text{ h}^{-1}$, the glucose was the substrate with major impact on PS14 production, and a positive effect on PS14_L production was observed in conditions of glucose excess. In this condition occurred the uncoupling of growth and acid production, effect did not observed in condition of choline/glutamine excess. It was also determined that in limitation of glucose/choline/glutamine the yield factors of PS14 and biomass per glucose consumed were highest as well as the yield factors of PS14 per biomass produced. Once it was verified that PS14 production is cell associated, to improve PS14 production it is necessary to adopt cultivation techniques that focuses in high cell density in addition to conditions of substrate limitation, increasing therefore the efficiency of substrate conversion in biomass and product.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*. Capsular polysaccharide. Metabolism. Continuous cultivation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1: À esquerda: imunomicroscopia de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 23F. À direita: diagrama da estrutura da superfície celular pneumocócica.....	27
Figura 3.2: Distribuição de sorotipos para o grupo etário < 6 anos no ano de 2009 no Brasil	32
Figura 3.3: Diferenças na resposta imunes entre polissacarídeos e polissacarídeos conjugados	33
Figura 3.4: Variação geográfica na cobertura fornecida pelos sorotipos incluídos na PCV7	34
Figura 3.5: Visão simplificada do Metabolismo de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14.....	37
Figura 3.6: Catabolismo do Piruvato e suas diferentes conexões.....	38
Figura 3.7: Lócus genético do <i>cps</i> de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14.....	41
Figura 3.8: Representação da biossíntese do polissacarídeo capsular de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14.....	42
Figura 3.9: Modelo de regulação de produção de polissacarídeo capsular por fosforilação de tirosina de CpsD.....	44
Figura 3.10: Interação entre ácidos teicóicos e lipoteicóico com a membrana e a peptidoglicana do pneumococo.....	46
Figura 4.1: Esquema de formação de precipitado antígeno-anticorpo em <i>rocket</i> imunoeletroforese.....	59
Figura 4.2: Esquema para quantificação de PS14 através de ELISA competitivo ...	60
Figura 4.3: Esquema para quantificação de PS14 através de ELISA de captura.....	62
Figura 4.4: Disposição de linhas de entrada e saída entre biorreator e reservatórios utilizados em cultivo contínuo.....	69
Figura 5.1: Efeito do tempo de incubação a 90 °C na detecção de PS14 ATCC a 100 µg/mL pelo método de fenol-sulfúrico	75
Figura 5.2: Variação diária em análise por fenol-sulfúrico na (A) quantificação de PS14 livre no sobrenadante (PS14 _L) de amostras de cultura de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 2721, (B) curva padrão de PS14 ATCC	76
Figura 5.3: Perfil de eluição de PS14 ATCC a 2 mg/mL em colunas TSKGel GMPW _{XL} com detecção por índice de refração e solução de fosfato de sódio dibásico 10 mM e cloreto de sódio 0,15 M pH 7,2 como fase móvel.....	77

Figura 5.4: Diferenças na curva padrão de ELISA de Competição utilizando diferentes lotes de PS14 ATCC para etapas de sensibilização e de amostra.....	79
Figura 5.5: Curvas de titulação do anticorpo secundário (soro de cabra) em diferentes diluições, com relação ao anticorpo de captura (soro de coelho), com concentrações do antígeno (PS14 ATCC) e anticorpo conjugado constantes.....	81
Figura 5.6: Efeito da solução de diluição de anticorpo secundário e anticorpo conjugado em ELISA de captura para quantificação de PS14.....	82
Figura 5.7: Curvas de titulação de PS14 ATCC para variadas concentrações de anticorpo secundário diluído em PBS-T-BSA em ELISA de captura.....	83
Figura 5.8: Variação diária em análise por ELISA de captura na (A) quantificação de PS14 livre no sobrenadante (PS14 _L) de amostras de cultura de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287, (B) linearidade de 22 curvas padrão de PS14 ATCC.....	84
Figura 5.9: Curvas de crescimento e de produção de (PS14 _L) de 6 cepas de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cultivadas em frascos com meio complexo.....	88
Figura 5.10: Relação PS14 _L por unidade de DO ₆₀₀ no ponto máximo de crescimento celular de 6 cepas de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cultivadas em frasco com meio complexo.....	89
Figura 5.11: Perfis de crescimento celular, concentração de glicose e ácidos orgânicos por <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em cultivo descontínuo com meio complexo.....	90
Figura 5.12: Perfis de crescimento celular, concentração de PS14 _L e PS14 _C e da relação PS14 _C por biomassa de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em cultivo descontínuo com meio complexo.....	91
Figura 5.13: Curva de relação entre massa seca e DO ₆₀₀ para <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 obtida de massa celular em crescimento exponencial em cultivo descontínuo com meio complexo.....	91
Figura 5.14: Perfis de crescimento celular, concentração de glicose e ácidos orgânicos de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em cultivo descontínuo com CDMv10.....	92
Figura 5.15: Perfis de crescimento celular, concentração de PS14 _L e PS14 _C e da relação PS14 _C por biomassa de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em cultivo descontínuo com CDMv10.....	93
Figura 5.16: Microscopia óptica (aumento de 1000x) de células em fase exponencial de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em cultivo descontínuo com meios (A) complexo (B) CDMv10.....	95
Figura 5.17: Influência da omissão de vitaminas/cofatores sob o crescimento celular máximo de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em frascos com CDM.....	99

Figura 5.18: Crescimento de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em frascos (●) e em biorreator (■). Laranja: CDMv2, azul: CDMv10	100
Figura 5.19: Comparação do crescimento celular de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator com meio quimicamente definido contendo 10 vitaminas (CDMv10) e 6 vitaminas (CDMv6).....	101
Figura 5.20: Efeito da vazão específica de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de lactato, acetato e glicose residual em cultivo contínuo de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 com meio complexo	103
Figura 5.21: Efeito da vazão específica de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de PS14 _L e PS14 _C e relação PS14 _C por biomassa em cultivo contínuo de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 com meio complexo	104
Figura 5.22: Determinação dinâmica de μ_{max} de cultivo contínuo de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em $D = 1,5 \text{ h}^{-1}$ com meio complexo	106
Figura 5.23: Relação de μ_s com as vazões específicas de alimentações testadas em cultivo contínuo de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 com meio complexo	107
Figura 5.24: Relação de μ_p com as vazões específicas de alimentações testadas em cultivo contínuo de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 com meio complexo para (A) PS14 _L , PS14 _C e (B) lactato.....	108
Figura 5.25: Efeito da concentração de glicose no meio de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de lactato, acetato e glicose residual em cultivo contínuo de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6	110
Figura 5.26: Efeito da concentração de glicose no meio de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de PS14 _L e PS14 _C e relação PS14 _C por biomassa em cultivo contínuo de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6.....	110
Figura 5.27: Efeito da concentração de colina no meio de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de lactato, acetato e glicose residual em cultivo contínuo de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6 e glicose a 20 g/L	114
Figura 5.28: Efeito da concentração de colina no meio de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de PS14 _L e PS14 _C e relação PS14 _C por biomassa em cultivo contínuo de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6 e glicose a 20 g/L.....	114
Figura 5.29: Efeito da concentração de glutamina no meio de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de PS14 _L e PS14 _C e relação PS14 _C por biomassa em cultivo contínuo de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6, glicose a 20 g/L e colina a 25 mg/L.....	118

Figura 5.30: Efeito da concentração de glutamina no meio de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de PS14_L e PS14_C e relação PS14_C por biomassa em cultivo contínuo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6, glicose a 20 g/L e colina a 25 mg/L..... 118

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1: Doenças Causadas pelo Pneumococo.....	30
Quadro 4.1: Equações para cálculo de parâmetros de cultivos descontínuo e contínuo	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Composição de Meio Ágar-BHI Sangue	62
Tabela 4.2 - Composição de Meio Todd-Hewitt com Extrato de Levedura - THY	63
Tabela 4.3 - Composição de Meio Complexo	63
Tabela 4.4 - Composição do Meio Quimicamente Definido (CDM) suplementado com colina	63
Tabela 4.5 - Composição em vitaminas de CDM completo (CDMv10) e CDM modificado para vitaminas (CDMv6)	68
Tabela 5.1 - Comparação entre cinco métodos testados para quantificação de PS14 em amostras de cultivo de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14	85
Tabela 5.2 - Produção de inóculo de 8 cepas de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 a partir do estoque congelado	86
Tabela 5.3 - Comparação entre cultivos descontínuos de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em meio complexo e CDMv10.....	97
Tabela 5.4 - Comparação entre cultivos descontínuos de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em CDMv10 e CDMv6.....	101
Tabela 5.5 - Parâmetros de cultivo contínuo de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em meio complexo para as velocidades específicas de alimentação testadas	105
Tabela 5.6 - Efeito da concentração de glicose no meio de alimentação em cultura contínua de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6	111
Tabela 5.7 - Efeito da concentração de colina no meio de alimentação em cultura contínua de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6 e glicose a 20 g/L	115
Tabela 5.8 - Efeito da concentração de glutamina no meio de alimentação em cultura contínua de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6, glicose a 20 g/L e colina a 25 mg/L	119

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs: absorvância

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosina Trifosfato

BHI: Infusão de cérebro e coração

CBP: proteínas com domínio ligante de colina

CBT: *chessboard titration* (titulação em tabuleiro de xadrez)

CDM: meio quimicamente definido

CDMv10: meio quimicamente definido com 10 vitaminas em sua composição

CDMv2: meio quimicamente definido com 2 vitaminas em sua composição

CDMv6: meio quimicamente definido com 6 vitaminas em sua composição

CFU: unidades formadoras de colônia

cps: locus genético de síntese de polissacarídeo capsular

DL₅₀: concentração de uma substância química capaz de matar 50% da população de animais testados

DO₄₉₂: densidade óptica a 492 nm

DO₆₀₀: densidade óptica a 600 nm

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EMP: Embden-Meyerhof-Parnas (via clássica glicolítica)

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

HPSEC: cromatografia de exclusão molecular de alta eficiência

LDH: lactato desidrogenase

MHC: complexo de histocompatibilidade principal

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma oxidada

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma reduzida

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PBS-T: Tween 20 a 0,05% em solução salina tamponada com fosfato

PCV7: vacina pneumocócica 7-valente conjugada

PDH_C: complexo piruvato desidrogenase

PFL: piruvato formato liase

PS14: polissacarídeo capsular produzido por *S. pneumoniae* sorotipo 14

PS14_C: polissacarídeo capsular produzido por *S. pneumoniae* sorotipo 14 associado às células

PS14_L: polissacarídeo capsular produzido por *S. pneumoniae* sorotipo 14 livre no sobrenadante de cultura

PSB-T-BSA: Tween 20 a 0,05% e albumina bovina a 0,5% em solução salina tamponada com fosfato

PSB-T-L10%: Tween 20 a 0,05% e leite em pó desnatado a 10% em solução salina tamponada com fosfato

PSB-T-L5%: Tween 20 a 0,05% e leite em pó desnatado a 5% em solução salina tamponada com fosfato

QS: *quorum sensing system*

RID: detector de índice de refração

T_H: linfócito T auxiliar

THY: meio Todd-Hewitt suplementado com 0,5% de extrato de levedura

UDP: uracila difosfato

UTP: uracila trifosfato

UV: (detecção por) ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

a: acetato

l: lactato

ps: polissacarídeo capsular

s: glicose

x: massa celular

α_l : constante de formação associada ao crescimento para lactato ($g_{\text{lactato}}/g_{\text{célula}}$)

α_{ps_L} : constante de formação associada ao crescimento para PS14_L ($mg_{\text{PS14L}}/g_{\text{célula}}$)

α_{ps_C} : constante de formação associada ao crescimento para PS14_C ($mg_{\text{PS14L}}/g_{\text{célula}}$)

β_l : constante de formação não associada ao crescimento para lactato
($g_{\text{lactato}} \cdot g_{\text{célula}}^{-1} \cdot h^{-1}$)

D: vazão específica de alimentação (h^{-1})

D_c : vazão específica de alimentação a partir da qual ocorre lavagem do reator (h^{-1})

m_s : coeficiente de manutenção ($g_{\text{glicose}} \cdot g_{\text{célula}}^{-1} \cdot h^{-1}$)

Q_x : produtividade em células ($g_{\text{célula}} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

Q_{ps_L} : produtividade em PS14_L ($mg_{\text{PS14L}} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

Q_{ps_C} : produtividade em PS14_C ($mg_{\text{PS14C}} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

Q_l : produtividade em lactato ($g_{\text{lactato}} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

Q_a : produtividade em acetato ($g_{\text{lactato}} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

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

μ_a : velocidade específica de produção de acetato ($g_{\text{acetato}} \cdot g_{\text{célula}}^{-1} \cdot h^{-1}$)

μ_l : velocidade específica de produção de lactato ($g_{\text{lactato}} \cdot g_{\text{célula}}^{-1} \cdot h^{-1}$)

μ_{\max} : velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1})

μ_p : velocidade específica de formação de um produto ($g_{\text{produto}} \cdot g_{\text{célula}}^{-1} \cdot h^{-1}$)

μ_{ps_L} : velocidade específica de produção de PS14_L ($mg_{\text{PS14L}} \cdot g_{\text{célula}}^{-1} \cdot h^{-1}$)

μ_{ps_C} : velocidade específica de produção de PS14_C ($mg_{\text{PS14C}} \cdot g_{\text{célula}}^{-1} \cdot h^{-1}$)

μ_s : velocidade específica de consumo de glicose ($g_{\text{glicose}} \cdot g_{\text{célula}}^{-1} \cdot h^{-1}$)

$Y_{a/x}$: fator de conversão de acetato sobre células ($g_{\text{acetato}}/g_{\text{célula}}$)

Y_G : fator de conversão glicose a células verdadeiro ($g_{\text{célula}}/g_{\text{glicose}}$)

$Y_{l/x}$: fator de conversão de lactato sobre células ($g_{\text{lactato}}/g_{\text{célula}}$)

$Y_{\text{ps}_L/x}$: fator de conversão de PS14_L sobre células ($mg_{\text{PS14L}}/g_{\text{célula}}$)

$Y_{\text{ps}_C/x}$: fator de conversão de PS14_C sobre células ($mg_{\text{PS14C}}/g_{\text{célula}}$)

$Y_{a/s}$: fator de conversão de glicose a acetato ($g_{\text{acetato}}/g_{\text{glicose}}$)

$Y_{l/s}$: fator de conversão de glicose a lactato ($g_{\text{lactato}}/g_{\text{glicose}}$)

$Y_{\text{ps}_L/s}$: fator de conversão de glicose a PS14_L ($mg_{\text{PS14L}}/g_{\text{glicose}}$)

$Y_{\text{ps}_C/s}$: fator de conversão de glicose a PS14_C ($mg_{\text{PS14C}}/g_{\text{glicose}}$)

$Y_{x/s}$: fator de conversão de glicose a células ($g_{\text{célula}}/g_{\text{glicose}}$)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1 PNEUMOCOCO	26
3.2 POLISSACARÍDEO CAPSULAR	27
3.3 DOENÇAS PNEUMOCÓCICAS.....	29
3.3.1 Epidemiologia	31
3.3.2 Envolvimento de Sorotipos	31
3.3.3 Tratamentos e Vacinas	32
3.4 METABOLISMO DE <i>S. PNEUMONIAE</i>	36
3.4.1 Metabolismo Energético e de Carbono	36
3.4.1.1 Metabolismo Energético em Anaerobiose	38
3.4.1.2 Metabolismo Energético em Aerobiose	40
3.4.2 Metabolismo de Polissacarídeo Capsular	40
3.4.2.1 Controle da Síntese do Polissacarídeo Capsular	42
3.4.3 Metabolismo de Nitrogênio	45
3.4.4 Metabolismo de Colina e Proteínas Associadas	45
3.4.5 Implicações para o Cultivo de <i>S. pneumoniae</i>	47
3.4.5.1 Quantificação de Polissacarídeo Capsular de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 ...	49
3.5 ESTRATÉGIAS DE CULTIVO EM BIORREACTORES E MELHORAMENTO DE MEIOS DE CULTURA.....	50
3.5.1 O Cultivo Contínuo	51
3.5.1.1 Equacionamento para Cultivo Contínuo	52
3.5.1.2 Cultivo Contínuo para Produção de Polissacarídeos por Bactérias Láticas ..	55
4 MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1 ESTUDO DO MÉTODO DE DOSAGEM DE PS14 EM AMOSTRAS DE CULTIVO	57
4.1.1 Fenol-Sulfúrico	57
4.1.2 High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC)	58
4.1.3 Rocket Imunoeletroforese	58
4.1.4 ELISA Competitivo Indireto	60

4.1.5 ELISA de Captura	61
4.2 CULTIVOS	62
4.2.1 Meios de Cultura	62
4.2.2 Seleção da Cepa Produtora	64
4.2.2.1 Lote Semente	65
4.2.2.2 Inóculo.....	65
4.2.2.3 Produção de Polissacarídeo Capsular	65
4.2.3 Lote Trabalho	66
4.2.4 Comparação entre Cultivos Descontínuos utilizando CDM e Meio Complexo	66
4.2.4.1 Inóculo.....	66
4.2.4.2 Cultivo Descontínuo	67
4.2.5 Análise de Vitaminas Essenciais para Crescimento	68
4.2.6 Cultivos Contínuos	69
4.2.6.1 Cultivo Contínuo com Meio Complexo	70
4.2.6.2 Cultivo Contínuo com Meio Quimicamente Definido	70
4.2.7 Determinação de Variáveis de Cultivo	71
4.2.8 Determinação de Parâmetros	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1 ESTABELECIMENTO DO MÉTODO E PROTOCOLO DE QUANTIFICAÇÃO DE PS14	75
5.1.1 Fenol-Sulfúrico	75
5.1.2 HPSEC	77
5.1.3 Rocket Imunoeleforese	78
5.1.4 ELISA de Competição	79
5.1.5 ELISA de Captura	80
5.2 SELEÇÃO DA CEPA PRODUTORA.....	86
5.3 COMPARAÇÃO ENTRE CULTIVOS DESCONTÍNUOS COM CDMV10 E MEIO COMPLEXO	90
5.4 ANÁLISE DE VITAMINAS ESSENCIAIS PARA CRESCIMENTO	98
5.5 CULTIVOS CONTÍNUOS	103
5.5.1 Efeito da Vazão Específica de Alimentação	103
5.5.2 Estudos de Limitação em Cultivo Contínuo	109
5.5.2.1 Efeito da Concentração de Glicose	109

5.5.2.2 Efeito da Concentração de Colina.....	113
5.5.2.3 Efeito da Concentração de Glutamina.....	117
5.5.3 Considerações Gerais.....	120
6 CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS	126
ANEXO - SOLUÇÕES ESTOQUE PARA PREPARO DE CDM	137

1 INTRODUÇÃO

O polissacarídeo capsular é um polímero envolvido na virulência do pneumococo, bactéria de importância epidemiológica mundial. Este polissacarídeo é composto de oligossacarídeos repetitivos sendo que diferentes polissacarídeos capsulares são produzidos por diferentes estirpes de pneumococo, classificadas então como sorotipos (KOLKMAN et al., 1997).

Os 92 sorotipos pneumocócicos conhecidos até o momento (MUÑOZ-ALMAGRO; SELVA; PALLARES; 2010) possuem distribuição regional e entre grupos de idade irregulares. O sorotipo 14 é o que apresenta maior frequência em casos de doença pneumocócica em crianças menores de 6 anos no Brasil. Tais doenças são de difícil tratamento, ampla disseminação por contato direto e em muitos casos provocam sequelas. Assim, a vacinação é o melhor instrumento no combate às doenças pneumocócicas.

Atualmente 2 vacinas antipneumocócicas são disponibilizadas pelo Ministério da Saúde no Brasil: a 23-valente e a 10-valente conjugada. Estas vacinas foram elaboradas para cobrir os sorotipos prevalentes nos Estados Unidos e na Europa e não possuem a cobertura adequada para os sorotipos mais frequentes no Brasil. Além disso, acredita-se que o uso extensivo de tais vacinas possa alterar a distribuição dos sorotipos pelo mundo, o que resulta na busca por novas vacinas que possuam a maior cobertura possível. Uma vez que os países em desenvolvimento são os que registram os maiores números de mortes por doença pneumocócica, é desejável que as novas vacinas sejam mais acessíveis comercialmente.

Há mais de dez anos pesquisadores do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan trabalham no desenvolvimento de vacinas pneumocócicas alternativas, atuando em duas abordagens principais: vacina celular acapsulada e vacina de polissacarídeo capsular conjugado à proteína de superfície do pneumococo, produzida por *E.coli* recombinante.

Apesar da grande importância da produção de polissacarídeo capsular como antígeno vacinal, poucos são os estudos disponíveis sobre a otimização do meio de cultura e do entendimento de seu metabolismo de produção frente a diferentes substratos. Ainda não está claro se a produção do polissacarídeo capsular é ou não

associada ao crescimento celular, o que define que tipo de estratégia deve ser usada para aumentar sua produtividade.

O polissacarídeo capsular é produzido por *Streptococcus pneumoniae* com produção máxima de 300 mg/L, dependendo do sorotipo. Em trabalhos anteriores foram estudadas a relação da produção de polissacarídeos capsulares pneumocócicos com a introdução de ar na cultura, condições de inóculo, relação carbono:nitrogênio e concentração de fonte de carbono sob as operações descontínua e descontínua alimentada.

O presente trabalho envolve estudos conduzidos em cultivo contínuo, o qual gera dados mais fáceis de interpretar e elimina variáveis problemáticas, como: condição do inóculo e momento de adição de fonte de carbono extra. Experimentos conduzidos em diferentes velocidades de crescimento e sob variadas condições de limitação, associados à análise metabólica proporcionaram melhor conhecimento do metabolismo de produção do polissacarídeo capsular do sorotipo 14 (PS14), com consequente impacto sobre seu processo de produção.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo estudar o metabolismo de produção de polissacarídeo capsular por *S. pneumoniae* do sorotipo 14 em cultivo contínuo em biorreator, de forma a encontrar melhores condições de produção.

Para tanto, foram realizados estudos em biorreator sob diferentes condições de velocidade de crescimento e de limitação/excesso dos substratos glicose, colina e glutamina, que estão envolvidos na síntese e ancoramento do PS14 à parede celular. Também foram avaliados dois tipos de meio de cultura: meio quimicamente definido e meio complexo.

Para estudar as interações entre o metabolismo central e a produção de PS14 em cultivo contínuo, metas prévias foram traçadas:

- estabelecer um método de dosagem para o PS14 produzido;
- selecionar uma cepa produtora de PS14; e
- comparar o crescimento e a produção de PS14 entre meios complexo e quimicamente definido, a fim de validar o meio quimicamente definido para estudos de metabolismo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PNEUMOCOCO

O *Streptococcus pneumoniae*, ou pneumococo, é um dos micro-organismos mais extensivamente estudados desde seu primeiro isolamento em 1881 (ALONSODEVELASCO et al., 1995). Ele foi objeto de muitas investigações, como o princípio da transformação (AVERY; MacLEOD; McCARTY, 1944), a eficiência terapêutica da penicilina *in vivo* (TILLET; CAMBIER; McCORMACK, 1944) e seu polissacarídeo capsular foi a primeira substância não proteica que mostrou ser antigênica em humanos, o que culminou no uso de antígenos polissacarídicos como agentes vacinais (AUSTRIAN, 1981).

O pneumococo é um micro-organismo Gram-positivo, em forma de lanceta, com 1 a 2 μm de diâmetro, tipicamente encontrados em pares, mas algumas vezes sozinhos ou em pequenas cadeias. Sua identificação é baseada na morfologia das colônias em placa de ágar sangue, onde cresce como α -hemolítico¹ e forma colônias planas; sensibilidade à optoquina², solubilidade em bile³, teste de catalase⁴ e presença de cápsula polissacarídica (KAIJALAINEN, 2006).

O *S. pneumoniae* é parte da microbiota do trato respiratório superior do homem. Juntamente com *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* e vários estreptococos hemolíticos, coloniza o nicho nasofaríngeo humano (BOGAERT et al., 2004b). Tal colonização por *S. pneumoniae* é comum: provavelmente todos os humanos foram colonizados por este patógeno pelo menos uma vez no início da vida (BOGAERT et al., 2004b).

¹ Em cultura de sangue, micro-organismos α -hemolíticos produzem um halo mucoide esverdeado em torno da colônia em função da hemólise incompleta de eritrócitos, que, no caso, decorre da produção de peróxido de hidrogênio pelo pneumococo.

² A optoquina (etilhidrocupreína, derivado da quinina) é um fármaco que inibe de forma acentuada e diferenciada o crescimento do pneumococo em relação a outros estreptococos.

³ Os sais biliares têm a capacidade de ativar enzimas autolíticas do pneumococo, o que provoca uma aceleração da reação lítica natural desta bactéria.

⁴ O pneumococo não tem atividade de catalase, daí o acúmulo de peróxido de hidrogênio na cultura em presença de oxigênio.

Apesar do vasto número de publicações sobre *S. pneumoniae*, muitas questões sobre sua virulência ainda não estão esclarecidas (JOHNSTON, 1991). Sua patogenicidade é atribuída a vários fatores, como cápsula polissacarídica, enzimas autolíticas, polissacarídeo da parede celular e proteínas de superfície, entre outros (GARCÍA et al., 2000).

3.2 POLISSACARÍDEO CAPSULAR

Várias bactérias patogênicas para o homem, como *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* e *S. pneumoniae*, têm cápsula polissacarídica (KAIJALAINEN, 2006). Como ilustrado na Figura 3.1, a cápsula polissacarídica forma a camada mais periférica das células do *S. pneumoniae* e tem espessura de 200 a 400 nm (SØRENSEN et al., 1990).

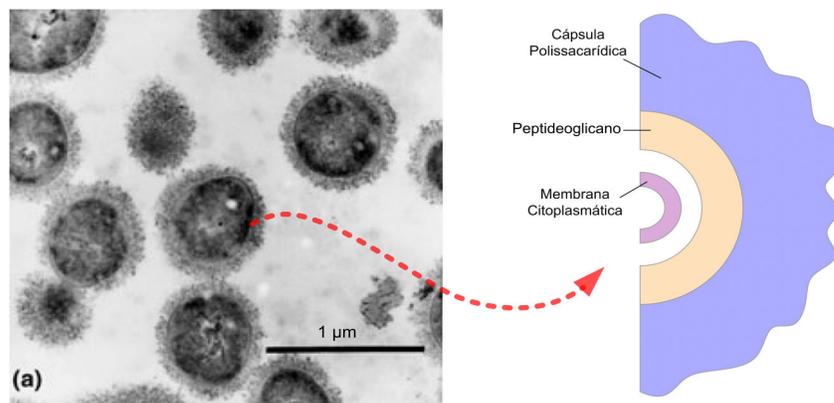


Figura 3.1: À esquerda: imunomicroscopia de *S. pneumoniae* sorotipo 23F. À direita: diagrama da estrutura da superfície celular pneumocócica
FONTE: Adaptado de: Gonçalves et al., 2006.

Segundo Roberts (1996), a cápsula polissacarídica tem por funções:

- modular a passagem de moléculas e íons para o envelope celular da bactéria;
- regular a aderência da bactéria a superfícies biológicas e inorgânicas e a formação de biofilmes e microcolônias;
- prevenir contra a dissecação, função relevante no auxílio da transmissão de um hospedeiro para outro;
- mascarar estruturas celulares que podem ser potentes ativadores de componentes do sistema imunológico, e
- mimetizar moléculas do hospedeiro, o que evita, assim, seu reconhecimento imunológico.

A produção da cápsula é indispensável para a virulência do pneumococo e é fortemente antifagocítica em hospedeiros não imunes (AUSTRIAN, 1981). Quanto à produção da cápsula e, em decorrência, sua virulência, duas variantes fenotípicas intracepas podem ocorrer em colônias de *S. pneumoniae* crescendo em meio sólido: variante opaca e variante transparente (GRIFFITH, 1928). O fenótipo transparente produz menor quantidade de polissacarídeo capsular, o que expõe moléculas adesivas e, portanto, é mais hábil para se ligar estreitamente a células epiteliais (KIM e WEISER, 1998). Em contraste, fenótipos opacos possuem expressão máxima da cápsula, o que esconde as estruturas celulares da bactéria que podem ativar o sistema imunológico do hospedeiro e, conseqüentemente, são mais comuns em infecções sistêmicas; onde apresentam maior capacidade patogênica (HAMMERSCHMIDT et al., 2005). Esta maior capacidade patogênica das variantes opacas é sustentada pela observação de Watson e Musher (1990), na qual cepas capsuladas obtiveram uma DL_{50} até 10^5 vezes maior que cepas que não possuíam cápsula.

O polissacarídeo capsular do pneumococo é composto de oligossacarídeos repetitivos, consistindo de 2 a 10 unidades monossacarídicas, algumas vezes complementado com outros componentes (KOLKMAN et al., 1997). Dado o número variado de diferentes monossacarídeos dentro de uma subunidade e as diferentes formas pelas quais podem ser ligados, incluindo ramificações na cadeia e a

substituição por moléculas orgânicas e inorgânicas, uma enorme variedade de estruturas polissacarídicas pode ser formada (KOLKMAN et al., 1997).

Um total de 92 sorotipos pneumocócicos distintos são conhecidos até hoje (MUÑOZ-ALMAGRO; SELVA; PALLARES, 2010), distinguidos por diferenças de estrutura química em seus polissacarídeos capsulares e, por conseguinte, na habilidade do sistema imune em reconhecer tais diferenças e responder com anticorpos específicos (GARAU e CALBO, 2007).

A estrutura química do polissacarídeo capsular e, em menor extensão a espessura da cápsula, determina a habilidade diferenciada dos sorotipos em sobreviver na corrente sanguínea e possivelmente causar a doença invasiva (ALONSODEVELASCO et al., 1995).

3.3 DOENÇAS PNEUMOCÓCICAS

Embora a colonização do pneumococo no trato respiratório superior humano seja assintomática em sua maioria, esta pode progredir a doenças respiratórias e sistêmicas se não for impedida pelo sistema imune inato e adaptativo (BOGAERT et al., 2004b). Todas as doenças pneumocócicas começam com o estabelecimento da colonização, isto é, com a criação do estado portador (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004a).

Admite-se que a propagação de um indivíduo para outro ocorre através do contato direto com secreções de indivíduos colonizados. Uma vez adquirida, a estirpe individual pode ser portada de semanas a meses antes de sua eventual eliminação pelo sistema imunológico (KADIOGLU et al., 2008).

O *S. pneumoniae* causa tanto doenças invasivas graves quanto infecções brandas do trato respiratório superior (Quadro 3.1). Em algumas circunstâncias, o pneumococo da nasofaringe entra em estruturas adjacentes (como os seios paranasais e o ouvido médio) e pode ser aspirado para os pulmões ou ainda entrar na corrente sanguínea. A infecção da corrente sanguínea e a infecção subsequente de locais secundários são referidas como doenças invasivas (WHO STRATEGIC ADVISORY GROUP OF EXPERTS - SAGE, 2006).

Quadro 3.1: Doenças Causadas pelo Pneumococo

Doenças Invasivas	Doenças Não Invasivas
Bacteremia/Sepse	Otite Aguda do Ouvido Médio
Pneumonia Bacterêmica/Empiema	Sinusite
Meningite	Conjuntivite
Peritonite	Bronquite
Artrite/Osteomielite	Pneumonia

FONTE: Adaptado de: Bricks e Berezin, 2006.

De acordo com Bricks e Berezin (2006), os principais grupos de risco para a doença pneumocócica são:

- crianças menores de 5 anos;
- idosos (> 65 anos);
- pessoas com resposta imune comprometida por doença congênita ou adquirida (incluindo pacientes de HIV sintomáticos e assintomáticos) ou aqueles que estão sob tratamento com imunossupressores;
- pessoas com asplenia funcional anatômica, pessoas com doenças crônicas (nefropatia, doenças cardio-respiratórias, diabetes, alcoolismo, cirrose, asma e trissomia) e pacientes que foram vítimas recentemente de infecções virais, particularmente gripe;
- alguns grupos étnicos (índios Navajo, índios Apache, nativos do Alasca e Austrália, negros), e
- pessoas que vivem em ambientes aglomerados, como creches, hospitais, escolas, lar de idosos e cadeias.

Dada a maior frequência de colonização pneumocócica e o maior índice de concentração em crianças, acredita-se que este grupo de risco é o vetor mais importante para disseminação horizontal de estirpes pneumocócicas dentro de comunidades. Então, parte da estratégia para prevenir doenças pneumocócicas deve focar na prevenção da colonização da nasofaringe de crianças (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004a).

3.3.1 Epidemiologia

Em 2005, a Organização Mundial da Saúde estimou que as doenças pneumocócicas vitimam cerca de 1,6 milhões de pessoas a cada ano, sendo que destas, 1 milhão são crianças menores de 5 anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2007). Segundo Closing [...] (2009), a pneumonia causada por *S. pneumoniae* e *H. influenzae* é responsável por 20% de todas as mortes de crianças menores que 5 anos pelo mundo, índice maior que os índices de HIV/AIDS, sarampo e malária somados.

No Brasil, em 2004, a frequência de hospitalização devido à pneumonia em crianças menores de 5 anos foi de 2,5% e a taxa de mortalidade da doença respiratória alcançou 25/100.000 neste grupo de idade. O número de casos de pneumonia adquirida na comunidade confirmada por exame radiológico em crianças menores de 5 anos é substancialmente maior (566/100.000), particularmente para crianças que vivem em condições precárias (BRICKS e BEREZIN, 2006).

A meningite pneumocócica tem uma alta taxa de caso-fatalidade: 20 e 50% em países mais ou menos desenvolvidos, respectivamente. Dependendo da idade, 30 a 60% dos sobreviventes desenvolvem sequelas de longo prazo incluindo perda auditiva, déficits neurológicos e disfunções neuropsicológicas (KOEDEL et al., 2002).

3.3.2 Envolvimento de Sorotipos

Prevalência e virulência, dependendo de fatores múltiplos, incluindo hospedeiro, idade, apresentação clínica do paciente, resistência a antimicrobianos, região e país, variam entre os diferentes sorotipos pneumocócicos (OBARO, 2002).

Dentre os 92 sorotipos, alguns são mais virulentos que outros. Aproximadamente 20 sorotipos estão associados com mais de 70% das doenças invasivas pneumocócicas em todos os grupos de idade no mundo. Destes 20 sorotipos, cerca de metade, principalmente os sorotipos 6A, 6B, 14, 15, 18C, 19F e 23F, são frequentemente relacionados a infecções pediátricas (SAGE, 2006).

Em 2009, o sorotipo 14 foi responsável por 39,8% das doenças pneumocócicas invasivas em crianças menores de 6 anos no Brasil (Figura 3.2). Em países como Argentina, Chile e Colômbia apresentou incidência de 25, 34 e 41%, respectivamente (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - OPAS, 2010).

Dada sua grande importância epidemiológica no Brasil, o sorotipo 14 foi escolhido para a realização deste trabalho.

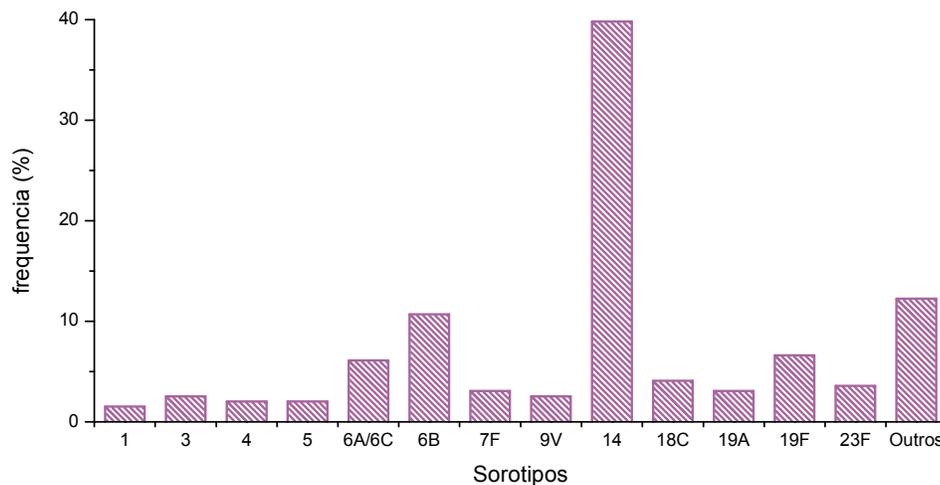


Figura 3.2: Distribuição de sorotipos para o grupo etário < 6 anos no ano de 2009 no Brasil
 FONTE: Adaptado de: OPAS, 2010.

3.3.3 Tratamentos e Vacinas

Infecções humanas causadas por patógenos bacterianos Gram-positivos são difíceis de tratar e com o surgimento de estirpes multirresistentes, o tratamento da doença pneumocócica envolve antibióticos caros e longos tempos de hospitalização. Apesar do rápido desenvolvimento de antimicrobianos mais potentes, a melhor forma de lidar com as doenças pneumocócicas é através da prevenção de infecções por meio de vacinas (OBARO, 2002).

Atualmente 4 vacinas antipneumocócicas estão licenciadas no Brasil: a 23-valente, a 7-valente conjugada, a 10-valente conjugada e a 13-valente conjugada. A Vacina 23-valente (Pneumovax® - Merck, Whitehouse Station, New Jersey, USA) inclui polissacarídeos capsulares livres dos sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V,

10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33 F. Esta formulação foi baseada no conhecimento prévio da distribuição dos sorotipos nos EUA e na Europa e é eficaz contra aproximadamente 90% dos sorotipos causadores da doença nestes países (KADIOGLU et al., 2008).

Polissacarídeos induzem resposta imune diretamente pela ativação de linfócitos B. Como não necessitam da ativação de linfócitos T auxiliares (T_h), são classificados como antígenos T-independentes (MOSIER et al., 1977). Vacinas polissacarídicas não são eficientes em crianças menores de 2 anos porque ainda não há o amadurecimento total das células B. Portanto, é fundamental transformar o polissacarídeo capsular em um antígeno T-dependente, para o qual existe resposta em crianças pequenas, caracterizada por memória imunológica, maturação de afinidade e resposta de reforço em uma subsequente exposição ao antígeno (SAGE, 2006).

Uma forma de alterar a resposta de polissacarídeos de T-independente para T-dependente é através de sua conjugação a uma proteína carreadora, que é um antígeno T-dependente (Figura 3.3). Este conceito foi aplicado com sucesso para *H. influenzae* tipo b no final da década de 80, e em 2000 a primeira vacina conjugada pneumocócica foi licenciada nos EUA, a 7-valente conjugada ou PCV7.

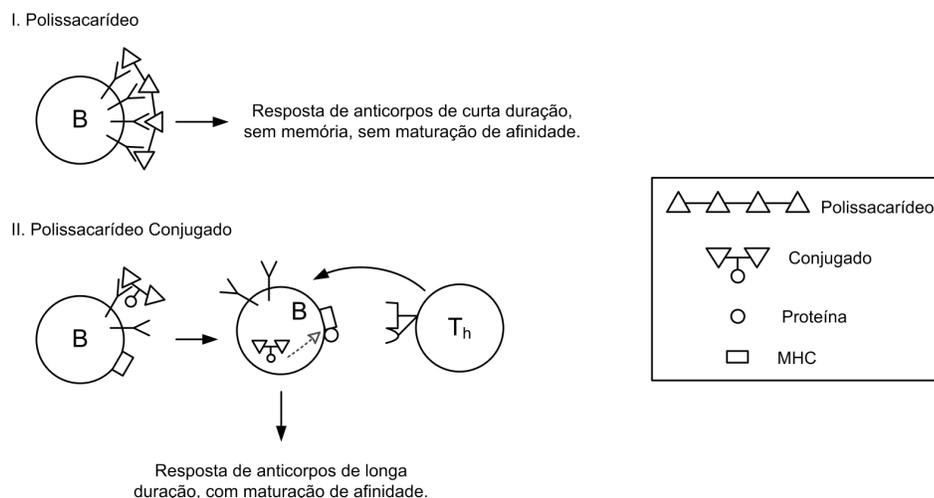


Figura 3.3: Diferenças na resposta imunes entre polissacarídeos e polissacarídeos conjugados
 FONTE: Adaptado de: Peeters et al., 2003.

A PCV7 (Prevenar® - Wyeth, Philadelphia, Pennsylvania, USA) foi licenciada em pelo menos 70 países e incluía polissacarídeos capsulares dos sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F conjugados independentemente a toxina diftérica CRM₁₉₇ (SAGE, 2006). Os sorotipos incluídos na PCV7 foram selecionados baseando-se na distribuição de sorotipos associados com doença invasiva entre crianças nos EUA. Na época, os sete sorotipos selecionados representavam aproximadamente 80% das infecções invasivas pediátricas neste país. Em outras partes do mundo, a proporção da doença invasiva causada por sorotipos incluídos na PCV7 variava (SAGE, 2006), como ilustrado na Figura 3.4.

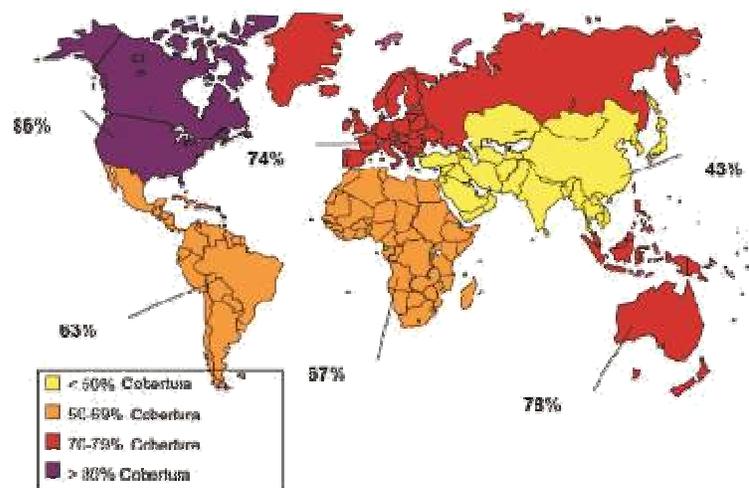


Figura 3.4: Variação geográfica na cobertura fornecida pelos sorotipos incluídos na PCV7
 FONTE: Adaptado de: SAGE, 2006; Hausdorff et al., 2000.

A vacina conjugada 10-valente (Synflorix™ - GlaxoSmithKline (GSK), Uxbridge, Middlesex, United Kingdom) possui os polissacarídeos da PCV7 mais os dos sorotipos 1, 5 e 7F, conjugados independentemente à proteína D de *H. influenzae*. Esta vacina oferece um aumento na cobertura da PCV7 na África, Ásia e América Latina e foi licenciada nos EUA em 2009. No Brasil, a 10-valente foi incluída no calendário de imunização infantil em 2010, substituindo então a PCV7; e será produzida no Laboratório Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), através de um acordo de transferência de tecnologia assinado entre o Ministério da Saúde e a GSK.

É estimado que a 13-valente (Prevenar 13[®] - Wyeth, Philadelphia, Pennsylvania, USA), já disponível em clínicas particulares no Brasil em substituição à PCV7, seja responsável por uma cobertura superior a 80% para doenças invasivas pneumocócicas em todas as regiões do mundo entre crianças menores de 5 anos (FEAVERS et al., 2009). Esta vacina apresenta cobertura contra os sorotipos presentes da 10-valente mais os sorotipos 3, 6A e 19A e tem a mesma proteína carreadora da PCV7.

As vacinas conjugadas, além de produzirem uma resposta T-dependente conferem imunidade sistêmica e de mucosa (SAGE, 2006). Isto contribui grandemente para a limitação a disseminação horizontal do pneumococo, diminuindo o número de portadores dentro de uma comunidade de crianças vacinadas.

Entretanto, como enfatizado no trabalho de Kadioglu et al. (2008), a cobertura vacinal das vacinas conjugadas é limitada, porque outros sorotipos não vacinais podem ocupar o nicho desocupado ou outros sorotipos podem surgir por capacidade de adaptação. Portanto, a longo prazo, a introdução generalizada de vacinas conjugadas pode meramente alterar a distribuição de sorotipos causadores da doença pneumocócica invasiva, em vez de reduzir o seu ônus global. Além disso, o custo destas vacinas é alto, o que impossibilita seu uso extensivo em países em desenvolvimento, onde a taxa de morte de crianças por doença pneumocócica invasiva é maior.

Face a esses fatos, há uma urgência para o desenvolvimento de vacinas pneumocócicas alternativas que superem estas insuficiências. A mais promissora abordagem até agora é o desenvolvimento de vacinas baseadas em PspA e PsaA - proteínas de superfície do pneumococo envolvidas nos processos de colonização e adesão - que são proteínas relativamente comuns para todos os sorotipos (KADIOGLU et al., 2008). Um dos projetos do Instituto Butantan é o desenvolvimento de uma vacina conjugada utilizando como carreador a PspA que seria então covalentemente ligada a polissacarídeos dos sorotipos mais importantes no Brasil. A conjugação do polissacarídeo capsular à PspA resultará em uma maior resposta imunológica para o polissacarídeo e para a proteína. Visto que a PspA induziria uma proteção independente do sorotipo, seria possível incluir um menor número de polissacarídeos na vacina, reduzindo desta forma seu custo.

3.4 METABOLISMO DE *S. PNEUMONIAE*

O pneumococo faz parte do grupo de bactérias lácticas e uma das características deste grupo de bactérias é a alta exigência nutricional, necessitando de meios muito complexos para obter boas condições de crescimento. O *S. pneumoniae* também requer colina para crescer em meio definido e agentes redutores são quase essenciais (BADGER, 1944). O crescimento de muitas cepas requer ainda várias vitaminas do complexo B, adenina, uracila e guanina (RESTREPO et al., 2005).

Uma visão simplificada do metabolismo do pneumococo é ilustrada a seguir (Figura 3.5).

3.4.1 Metabolismo Energético e de Carbono

O *S. pneumoniae* é classificado dentro do grupo de bactérias anaeróbicas porque em seu genoma faltam muito genes requeridos para a respiração, ciclo de Krebs e gliconeogênese, além de citocromos. É incapaz de fazer metabolismo respiratório, seja anerobicamente ou aerobicamente, portanto, obtém energia estritamente via fermentação (RESTREPO et al., 2005; HOSKINS et al., 2001).

O catabolismo da glicose é evidente no *S. pneumoniae*, mas análises de genoma publicadas sugerem a existência de vias para catabolismo de pentoses, bem como para celobiose, frutose, galactose, galacticol, glicose, glicerol, lactose, manitol, manose, rafinose, sacarose, trealose e maltossacarídeos (HOSKINS et al., 2001; KAIJALAINEN, 2006).

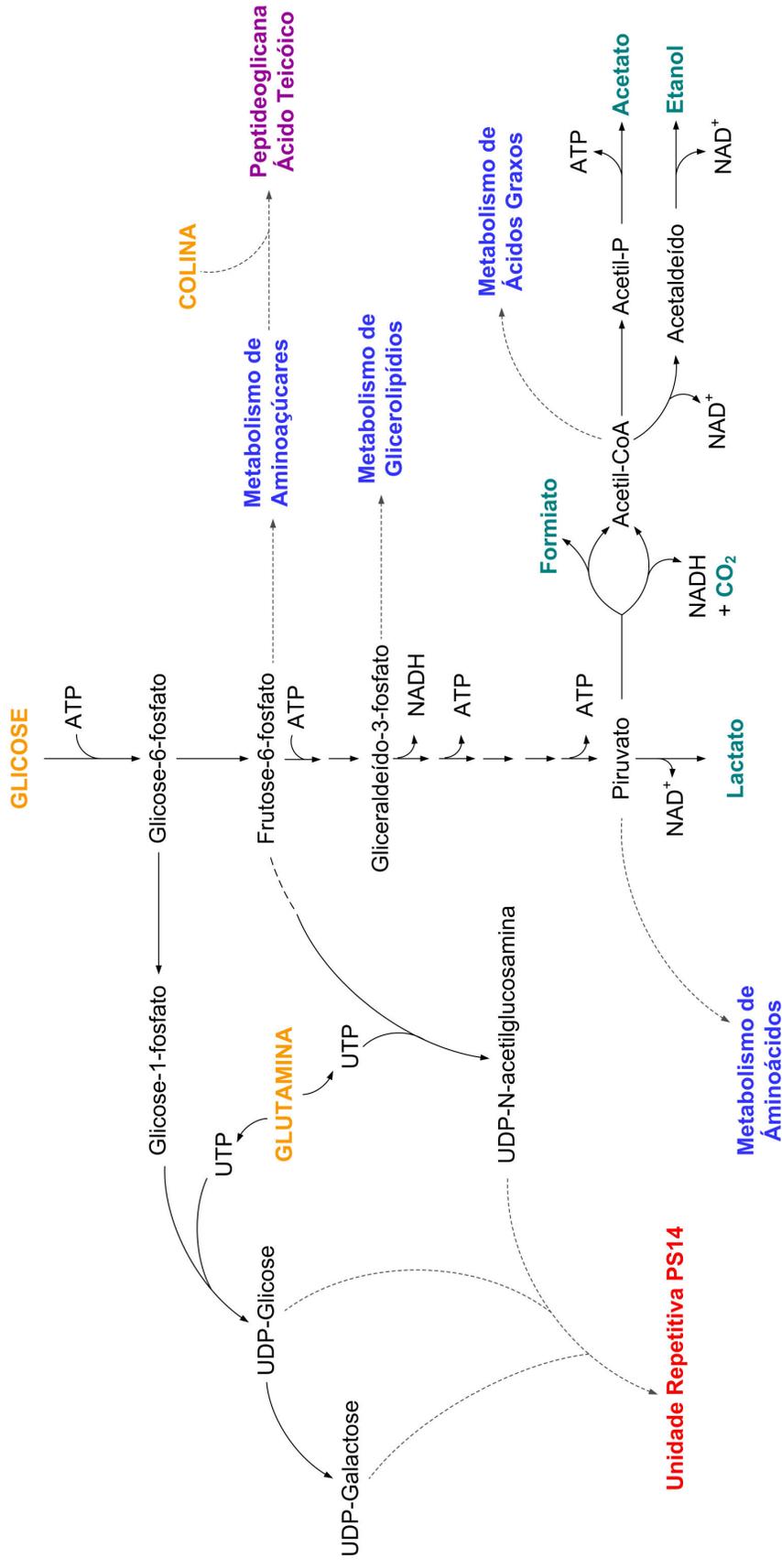


Figura 3.5: Visão simplificada do Metabolismo de *S. pneumoniae* sorotipo 14

O catabolismo da glicose em *S. pneumoniae* ocorre pela via clássica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), com o rendimento de duas moléculas de piruvato, duas de ATP e duas de NADH para cada molécula de glicose oxidada. O NADH gerado é então reoxidado por diferentes reações, dependendo das condições da cultura, o que pode caracterizar dois tipos de metabolismo: homofermentativo, onde ocorre produção majoritária de lactato; ou heterofermentativo, também conhecido por misto, onde há produção de lactato e outros ácidos orgânicos, como o formiato, acetato e de etanol (NEIJSSEL; SNOEP; TEIXEIRA DE MATOS, 1997). As vias pelas quais estes produtos são obtidos estão ilustradas na Figura 3.6.

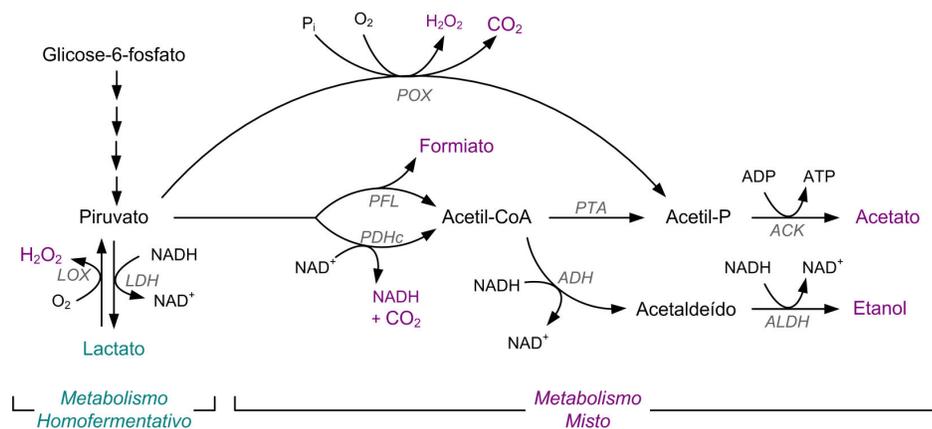


Figura 3.6: Catabolismo do Piruvato e suas diferentes conexões

LDH - lactato desidrogenase, LOX - lactato oxidase, POX - piruvato oxidase, PFL - piruvato formiato liase, PDHc - complexo piruvato desidrogenase, PTA - fosfato acetil transferase, ACK - acetato quinase, ADH - aldeído desidrogenase, ALDH - álcool desidrogenase.

FONTE: Adaptado de: Storaï, 2008; Taniai et al., 2008.

3.4.1.1 Metabolismo Energético em Anaerobiose

Sob condições anaeróbicas, a via fermentativa mais conhecida e mais simples utilizada por bactérias lácticas é catalisada pela lactato desidrogenase (LDH). Esta via produz lactato e promove a reoxidação do NADH gerado na glicólise, no entanto, não ocorre a formação de ATP (NEIJSSEL; SNOEP; TEIXEIRA DE MATOS, 1997). O lactato formado é tóxico para a bactéria em elevadas concentrações, provocando a inibição de seu crescimento (EVEN et al., 2002).

Outra via é catalisada pela piruvato formiato liase (PFL), rendendo acetil-CoA e formiato. O formiato não é metabolizado adiante, mas o acetil-CoA pode ser convertido a acetato pela acetato quinase, o que gera ATP e torna esta via mais favorável energeticamente do que a via de produção de lactato. Entretanto, para cada piruvato dividido em acetil-CoA e formiato, um NADH formado na glicólise permanece reduzido. A reoxidação do NADH faltante é alcançada pela conversão adicional de um piruvato a acetil-CoA e formiato, seguido pela redução do acetato a etanol (via aldeído desidrogenase e álcool desidrogenase) (NEIJSSSEL; SNOEP; TEIXEIRA DE MATOS, 1997). Nestas condições se obtém metabolismo misto, e os principais produtos desta reação, acetato e formiato, são inibidores mais potentes do crescimento celular que o lactato (GUARRIGUES et al., 1997).

Para *Lactococcus lactis*, Garrigues et al. (1997) propuseram que a razão NADH/NAD⁺ controla a mudança do metabolismo homolático para misto. No caso de um fluxo glicolítico elevado (metabolismo de glicose), a elevada razão NADH/NAD⁺ ativa a atividade da LDH e inibe a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase⁵, enzima consumidora de NAD⁺. Isto resulta no aumento das concentrações intracelulares de dihidroxiacetona fosfato, gliceraldeído-3-fosfato e frutose-1,6-bifosfato, intermediários da glicólise anteriores à reação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Então, tais intermediários estão presentes dentro da célula em concentrações tais que inibem a PFL e o fluxo glicolítico desvia-se principalmente para a LDH (metabolismo homolático). Quando o fluxo glicolítico é mais baixo (catabolismo de lactose ou limitação de carbono), a baixa razão NADH/NAD⁺ inibe fortemente a LDH e fracamente a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. As concentrações intracelulares de trioses fosfato e frutose-1,6-fosfato permanecem baixas e a PFL não é mais inibida, caracterizando metabolismo misto.

⁵ enzima da via EMP que promove a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato, com a redução de um NAD⁺

3.4.1.2 Metabolismo Energético em Aerobiose

Em aerobiose, o *S. pneumoniae* ainda reduz o piruvato a lactato, porém uma maior quantidade é agora oxidada a acetil-CoA e CO₂. Esta reação é catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase e o acetil-CoA gerado é então convertido a acetato via acetato quinase, gerando 1 ATP (NEIJSSEL; SNOEP; TEIXEIRA DE MATOS, 1997).

A capacidade de colonização das vias aéreas superiores do homem pelo pneumococo indica que este micro-organismo possui diferentes mecanismos para suportar o oxigênio. Três enzimas asseguram este papel: a NADH oxidase, a piruvato oxidase e a lactato oxidase.

A NADH oxidase produz H₂O e NAD⁺ e provavelmente participa da modificação do equilíbrio redox da célula em presença de oxigênio. A piruvato oxidase participa da conversão do piruvato a acetil-P, formando CO₂ e H₂O₂. Já a lactato oxidase catalisa a formação de piruvato e H₂O₂ a partir do lactato e de O₂. Tanto a lactato oxidase quanto a piruvato oxidase formam peróxido de hidrogênio, molécula tóxica para a própria bactéria, já que esta não possui atividade de catalase (STORAÏ, 2008).

3.4.2 Metabolismo de Polissacarídeo Capsular

A estrutura, organização e funcionamento dos genes responsáveis pela síntese do polissacarídeo capsular (*cps*) em *S. pneumoniae* foram investigados apenas muito recentemente e em sua maioria são genes sintetizados por uma via dependente de flipase e polimerase (Wzx/Wzy) (BENTLEY et al., 2006). A organização do operon *cps* (Figura 3.7) é similar à observada na biossíntese da cápsula de outras bactérias, como *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *L. lactis* (YOTHER, 2004).

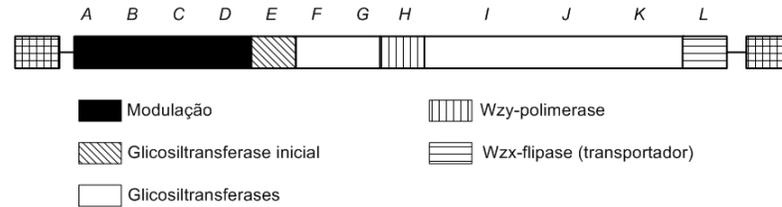
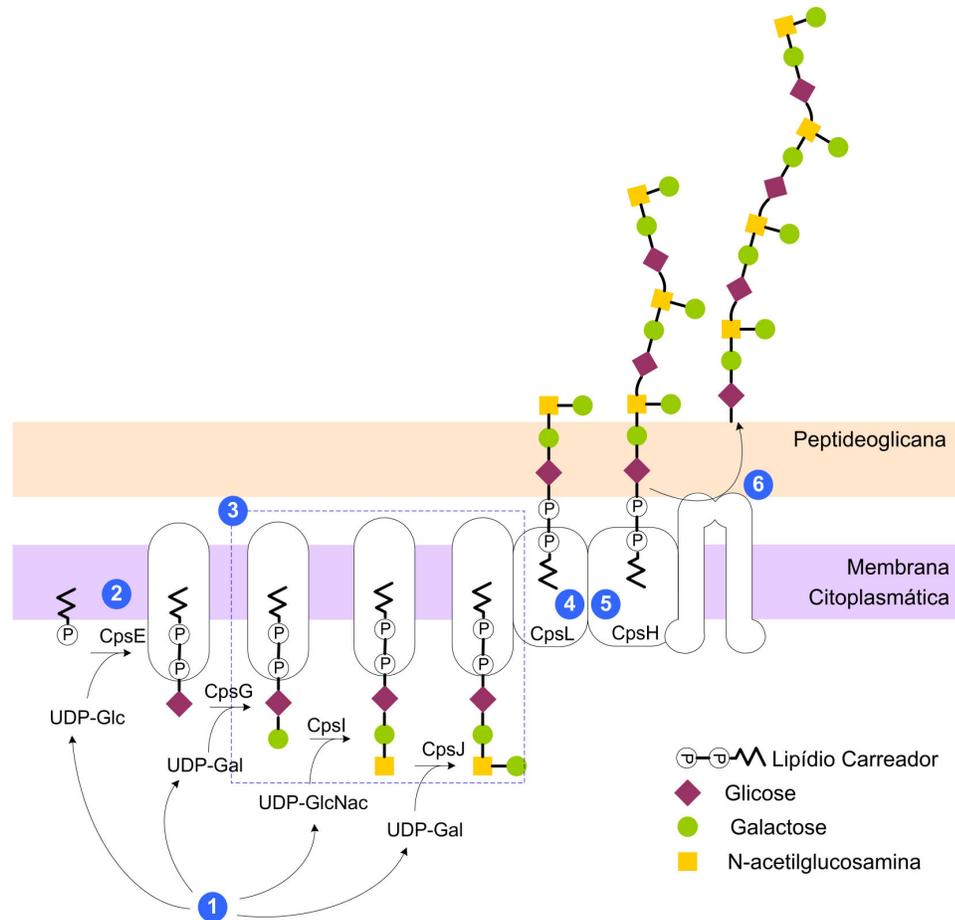


Figura 3.7: Locus genético do *cps* de *S. pneumoniae* sorotipo 14
 FONTE: Adaptado de: Yother, 2004.

A organização do *cps* envolve três regiões: a primeira região compreende quatro genes que são comuns a todos os sorotipos (*cps A-D*), exceto para os sorotipos 3 e 37. As proteínas que são codificadas por estes genes regulam o nível de expressão do polissacarídeo capsular. A região central é específica para cada sorotipo e codifica enzimas responsáveis pela síntese e polimerização do polissacarídeo, como glicosiltransferases e transferases. Esta região também inclui uma flipase (Wzx) que transporta a unidade repetitiva à face externa da membrana e uma polimerase (Wzy), que une as unidades repetitivas. A região final do locus compreende genes que codificam para a síntese dos precursores de açúcares ativados (KADIOGLU et al., 2008; YOTHER, 2004).

A Figura 3.8 ilustra a síntese do polissacarídeo capsular, que se inicia com a transferência de um monossacarídeo fosfato de um açúcar nucleotídico difosfato (usualmente UDP-glicose) para um carreador lipídico associado à membrana, seguido pela transferência sequencial de monossacarídeos adicionais para produzir a unidade repetitiva. A unidade repetitiva recém-formada é transferida para a outra face da membrana citoplasmática e é polimerizada para formar o polissacarídeo capsular maduro que é então anexado à peptidoglicana.

Apesar de ainda não estar totalmente caracterizada para o pneumococo, acredita-se que a ligação do polissacarídeo capsular à peptidoglicana seja covalente e que a exemplo de *S. agalactiae* tipo III, tal ligação seria do tipo fosfodiéster com resíduos de N-acetil-glucosamina da peptidoglicana (SØRENSEN et al., 1990; YOTHER, 2004).



- 1 Biossíntese de açúcares nucleotídicos
- 2 A transferase inicial (*CpsE*) liga o açúcar inicial como açúcar fosfato a um lipídio de membrana carreador (normalmente um undecaprenil fosfato)
- 3 Glicosil transferases ligam os açúcares adicionais sequencialmente para gerar a unidade repetitiva
- 4 A flipase (*Wzx*) transporta a unidade repetitiva através da membrana citoplasmática
- 5 Uma polimerase (*Wzy*) liga as unidades repetitivas para formar o polissacarídeo maduro
- 6 Um complexo ainda não conhecido desloca o PS maduro para ser ligado à peptidoglicana

Figura 3.8: Representação da biossíntese do polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 14
 FONTE: Adaptado de: Bentley et al., 2006.

3.4.2.1 Controle da Síntese do Polissacarídeo Capsular

Pouco se sabe sobre os mecanismos de controle da expressão e do peso molecular do polissacarídeo capsular. A seguir são elencados alguns fatores envolvidos:

- variação intra-sorotipo: existe variação na quantidade de polissacarídeo capsular produzida entre isolados do mesmo sorotipo (MacLEOD e KRAUSS, 1950);
- controle transcricional: a proteína CpsA, localizada na região moduladora de *cps*, pode estar envolvida na regulação transcricional, por homologia com *Bacillus subtilis* (GUIDOLIN et al., 1994);
- disponibilidade de precursores: se os açúcares nucleotídicos precursores não ocorrem em estruturas celulares, como a ramnose e ácido urônico, a síntese destes é catalisada por enzimas codificadas no locus *cps*. Porém, se são utilizados em outras vias celulares como, por exemplo, a UDP-Glicose e UDP-acetilglucosamina, que são utilizados na síntese da peptideoglicana e dos ácidos teicóico e lipoteicóico, há competição pelo uso destes com outras vias do metabolismo central (YOTHER; BENTLEY; HENNESSEY, 2008);
- disponibilidade de lipídio carreador: a síntese envolve a iniciação da unidade repetitiva no mesmo lipídio aceptor que é utilizado na síntese da peptideoglicana e na síntese do ácido teicóico (YOTHER; BENTLEY; HENNESSEY, 2008);
- (des)equilíbrio entre quantidade de precursores: para o sorotipo 3, a probabilidade de ejeção da cadeia aumenta quando a concentração de um UDP-açúcar diminui e as outras permanecem altas (VENTURA et al., 2006);
- ejeção: tanto polímeros de baixo e alto peso molecular são transferidos para a parede celular do pneumococo, o que sugere que o mecanismo de transferência do polissacarídeo capsular para a parede celular não seja influenciado pelo grau de polimerização (BENDER; CARTEE; YOTHER, 2003);
- fosforilação de proteínas reguladoras: a biossíntese de polissacarídeo capsular da maioria dos sorotipos pneumocócicos, tanto em relação ao tamanho da molécula quanto à quantidade, mostrou ser dependente de um sistema regulatório que é determinado pelas proteínas CpsB, CpsC e CpsD (Figura 3.9). A CpsB é uma fosfotirosina fosfatase, CpsC uma proteína de membrana relacionada a polimerases de polissacarídeos e CpsD uma

tirosina quinase autofosforilante. Acredita-se que a forma não-fosforilada de CpsD seja ativa na biossíntese de polissacarídeo (KADIOGLU et al., 2008);

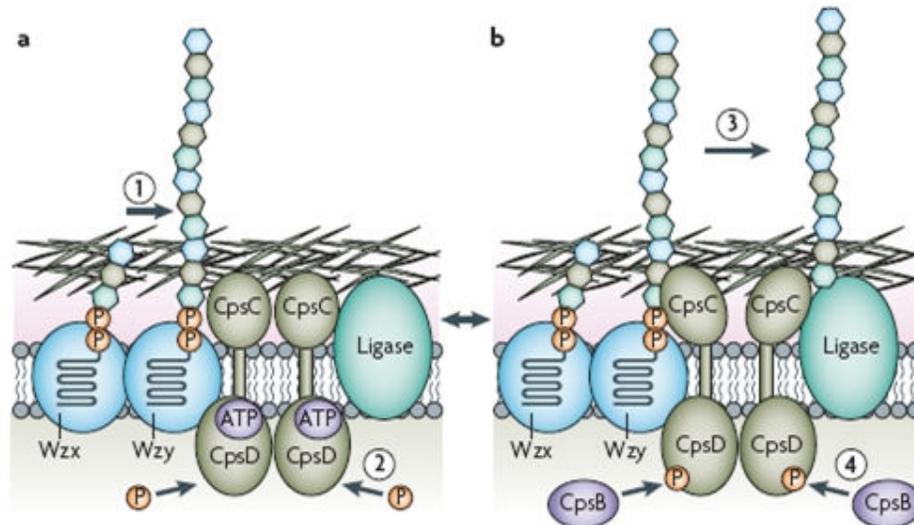


Figura 3.9: Modelo de regulação de produção de polissacarídeo capsular por fosforilação de tirosina de CpsD

- ① CpsC, CpsD e ATP interagem para promover a síntese de PS pela polimerase Wzy
- ② CpsD se autofosforila, o que resulta em uma mudança na interação da proteína e diminui a biossíntese do PS
- ③ O polímero é transferido para uma suposta ligase e ligado à parede celular
- ④ CpsB desfosforila CpsD, permitindo então que o ciclo recomece.

FONTE: Kadioglu et al., 2008.

- concentração de oxigênio: há maior produção de polissacarídeo capsular em ambiente de anaerobiose comparativamente à ambiente microaerófilo ou atmosférico (WEISER et al., 2001). Foi verificado que em ambientes com menor concentração de oxigênio, além de maior produção de polissacarídeo capsular, houve maior quantidade de CpsD na forma fosforilada (não-ativa). Sugere-se que este alto nível de CpsD fosforilada provoque uma redução na taxa global de biossíntese de polissacarídeo capsular e aumente a taxa de ligação deste à parede celular. No trabalho de Gonçalves et al. (2006), um cultivo em anaerobiose seguido de introdução de ar fez com que as cadeias de polissacarídeo capsular ligadas à parede celular se soltassem, mas este evento não foi relacionado à quantidade de CpsD fosforilada ou não-fosforilada.

3.4.3 Metabolismo de Nitrogênio

A observação do genoma do *S. pneumoniae* permitiu a identificação de 22 genes codificantes para 7 transportadores ABC específicos para glutamina, o que sugere que a glutamina é um elemento-chave no crescimento do pneumococo (HOSKINS et al., 2001).

Através da análise do metabolismo central e de suas diferentes conexões é possível ver que a glutamina está diretamente envolvida em vários aspectos cruciais do metabolismo do pneumococo, como precursora da síntese de purinas e pirimidinas (síntese de nucleotídeos) e do metabolismo dos aminoaçúcares necessários na síntese da peptidoglicana e dos ácidos teicóicos, componentes da parede celular (STORAĬ, 2008).

Dada a ausência do ciclo de Krebs, o pneumococo é incapaz de sintetizar aspartato, glutamato, lisina, metionina, glicina, histidina ou treonina, daí a necessidade de complementar o meio de cultura com estes compostos (HOSKINS et al., 2001; STORAĬ, 2008). Porém, apesar de não conseguir sintetizar grande parte dos aminoácidos, existe uma via de síntese de aminoácidos ramificada, diretamente ligada ao metabolismo central do piruvato, que permite a síntese de isoleucina, leucina e valina (STORAĬ, 2008).

3.4.4 Metabolismo de Colina e Proteínas Associadas

Além do polissacarídeo capsular, o *S. pneumoniae* possui outro polissacarídeo ancorado à parede celular, o polissacarídeo-C (Figura 3.10). Este tem em sua estrutura o ácido teicóico com resíduos de fosforilcolina, cuja composição é conservada entre os sorotipos. Estes resíduos de fosforilcolina são reconhecidos por proteínas que possuem um domínio ligante de colina (CBP). Uma delas é a amidase LytA, que cliva a peptidoglicana e está envolvida no processo de divisão celular. Também conhecida por autolisina, esta enzima induz a lise do pneumococo sob certas condições, como na fase estacionária de crescimento (TOMASZ, 1981).

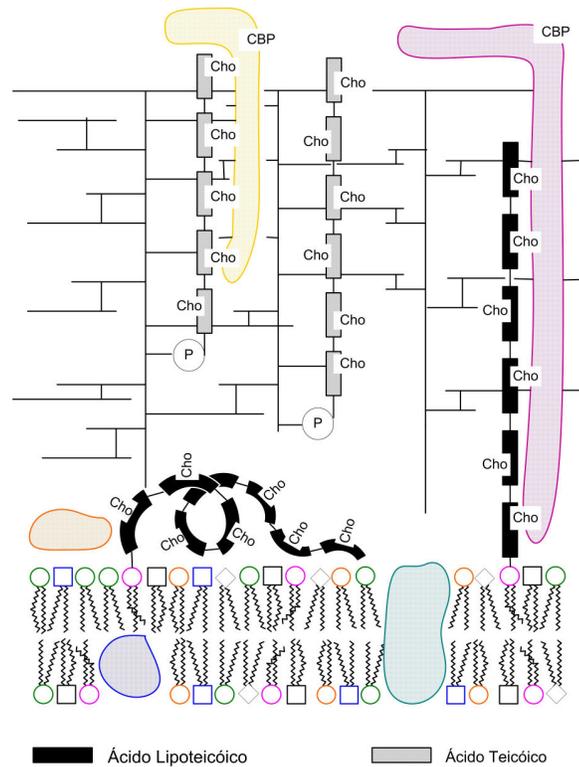


Figura 3.10: Interação entre ácidos teicóicos e lipoteicóicos com a membrana e a peptidoglicana do pneumococo
 Cho: fosforilcolina, CBP: proteínas dependentes de ligação com colina.
 FONTE: Adaptado de: Fischer, 2000.

Outra estrutura importante é o ácido lipoteicóico, também conhecido por antígeno de Forssman (Figura 3.10). Este contém um ácido teicóico similar ao polissacarídeo-C com um material lipídico adicional ligado covalentemente. O ácido lipoteicóico possui igualmente fosforilcolina e é um poderoso inibidor da autolisina. Durante a fase estacionária de crescimento, as células pneumocócicas liberam o antígeno de Forssman, o que resulta na atividade irrestrita da autolisina e na subsequente lise bacteriana (ALONSODEVELASCO et al., 1995).

Dentro deste contexto, a colina se encaixa como um importante requerimento nutricional para o pneumococo. O pneumococo não consegue sintetizá-la e, sem esta, as células crescem em longas cadeias que falham em se separar em formas características de diplococcos ou pequenas cadeias (WARE; WATT; SWIATLO, 2005). Sua substituição por um análogo, como a etanolamina, pode ocasionar defeitos fisiológicos múltiplos, como divisão celular aberrante, incapacidade para submeter-se à transformação genética, resistência à autólise e fago-resistência. Isto

porque, sem os resíduos de fosforilcolina, a LytA não consegue ligar-se à parede celular e com isto não possui atividade; o que também ocorre para a LytB, uma importante glucosamidase que também atua no processo de divisão celular (FISCHER, 2000).

Segundo Storai (2008), colina a 5 g/L no meio de cultura foi a condição onde houve maior crescimento e produção de polissacarídeo capsular para 5 sorotipos de *S. pneumoniae*. Apesar de a colina ser altamente requerida para o crescimento do pneumococo, mudanças idênticas às observadas na sua ausência também podem ser verificadas quando sua concentração é maior que 20 g/L no meio de cultura (BRIESE e HAKENBECK, 1985).

As autolisinas estão também ligadas ao que se chama de *quorum sensing system* (QS). O QS é um mecanismo de sinalização célula-célula, que regula a expressão de genes em resposta a flutuações na densidade populacional de células (MILLER e BASSLER, 2001). Ele está ligado à habilidade da bactéria em responder a moléculas químicas semelhantes a hormônios chamadas autoindutores. Quando um autoindutor alcança uma concentração limite, devido ao aumento na concentração de células, a bactéria o detecta e responde a este sinal com a alteração na expressão de determinados genes. Bactérias usam o QS para regular diversas atividades fisiológicas, como: simbiose, virulência, competência, conjugação, produção de antibióticos, esporulação e formação de biofilme.

Sob certas condições, o QS do *S. pneumoniae* é acionado por peptídeos (READING e SPERANDIO, 2005) ou pela acidificação da cultura (RESTREPO et al., 2005), o que gera uma reação em cascata e ativa as autolisinas dentro de uma população crescente, provocando a diminuição da densidade populacional da cultura.

3.4.5 Implicações para o Cultivo de *S. pneumoniae*

O pneumococo possui um pH ótimo de crescimento entre 7 e 7,8 (JOHNSTON, 1991) e temperatura entre 36 e 37 °C. Vários meios são usados atualmente para o estudo do pneumococo em cultura: BHI, hidrolisado trípico de soja, Todd-Hewitt com extrato de levedura (THY), meio definido (van der RIJN e

KESSLER, 1980), meio semissintético, meios baseados em hidrolisados de caseína (KIM et al., 1996; GONÇALVES et al., 2002; CARMO, 2010), meio de soja (LIBERMAN et al., 2008) e meios suplementados com sangue de cavalo e extrato de levedura (RESTREPO et al., 2005). Apesar deste grande número de meios, poucos estudos buscam sua otimização e, até o momento, não existem estudos sobre a cinética de produção do polissacarídeo capsular.

No caso do pneumococo, o preparo e o manuseio da bactéria antes da inoculação são fatores importantes que influenciam a virulência do pneumococo. É importante crescer as bactérias em condições ótimas e armazená-las em seu pico ótimo de virulência para preservar sua virulência e manter o número de bactérias estável.

Além disso, quando se visa a produção de polissacarídeo capsular e sua futura purificação, é necessário que a cultura atinja uma alta densidade celular, já que o polissacarídeo capsular parece ser um produto associado ou parcialmente associado ao crescimento celular, e que a lise da cultura seja evitada. Estes dois pontos são cruciais e de difícil alcance no cultivo de *S. pneumoniae*.

Isto ocorre porque o catabolismo do pneumococo leva principalmente à formação de ácido láctico que, de um lado, é fundamental para que a bactéria reoxide o NADH formado durante a glicólise em condições de anaerobiose e, por outro lado, inibe a via glicolítica por retro-alimentação. Além disso, o pneumococo tende à autólise ao alcançar o estado estacionário, por ação da LytA e da LytB e pode ainda estimular o QS.

Em alguns trabalhos, foi observado que a relação carbono:nitrogênio (GONÇALVES et al., 2002) e que as condições do inóculo (CARMO, 2010) interferem na produção do polissacarídeo capsular no sobrenadante. Apesar dos esforços em aumentar a produção, os valores máximos de produção de polissacarídeo capsular no sobrenadante alcançados em nosso laboratório estão em torno de 400 mg/L (CARMO, 2010), obtidos através de cultivos descontínuos com pulsos de glicose e acetato de amônio. Uma patente desenvolvida pela Novartis (SWEENNEN, 2007) alcança altos níveis de produção de polissacarídeo capsular por *S. agalactiae*, da ordem de 800 mg/L, através de duas etapas de alimentação e uma alimentação exclusiva de carbono. Segundo os inventores, a mesma técnica pode ser utilizada com sucesso para *S. pneumoniae*.

3.4.5.1 Quantificação de Polissacarídeo Capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 14

A estrutura química do polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 14 (PS14) consiste de unidades repetitivas de: $\rightarrow 6$)- β -D-N-acetilglucosamina-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galactose-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glicose-(1 \rightarrow , com uma cadeia lateral de β -D-Galactose-(1 \rightarrow ligada ao C4 de cada resíduo de N-acetilglucosamina (LINDBERG; LÖNNGREN; POWELL, 1977). Este polissacarídeo é neutro, o que dificulta sua detecção.

Os métodos colorimétricos tradicionais de detecção de PS14 são fenol-sulfúrico e reação com antrona, que detectam açúcares totais. Pelas recomendações da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005), o PS14 deve ser caracterizado pelo teor de hexosamina, que pode ser feito pela reação de deaminação com indol e ácido clorídrico. Uma dificuldade na utilização da dosagem de hexosaminas em amostras do cultivo é que pode ocorrer detecção da N-acetilglucosamina da parede celular do pneumococo. Portanto, assim como para fenol-sulfúrico e antrona, pode ocorrer interferência com o polissacarídeo da parede celular, riboses do DNA e açúcares do meio de cultura.

Como alternativa para os métodos colorimétricos citam-se os imunoenaios, tradicionalmente empregados na detecção de antígenos pneumocócicos em amostras de pacientes, como a contraimunoeletroforese e *rocket* imunoeletroforese (SZU e ORAVEC, 1982); imunodifusão (GROOT; GODEFROOIJ; KLEEREBEZEM, 2008), ELISA e aglutinação por látex (MASSALDI et al., 2010). As técnicas de imunodifusão e aglutinação por látex são semiquantitativas, apresentam baixa sensibilidade e são relativamente fracas na detecção de misturas complexas. Já as técnicas que envolvem eletroforese não detectam facilmente polissacarídeos neutros. Nesse campo, as variadas técnicas de ELISA ganham destaque, principalmente ELISA de competição e ELISA de captura, pela alta especificidade e sensibilidade. Na literatura existem protocolos para ELISA de captura com sensibilidade de até 1 ng de PS14/mL (HARDING et al., 1979), contudo, este é um método laborioso e caro.

Outro método que poderia ser empregado é o HPLC de exclusão molecular (HPSEC). A técnica do HPSEC vem sendo utilizada na caracterização de

preparações polissacarídicas para a produção de vacinas pneumocócicas. Especificamente, a HPSEC pode ser usada diretamente para definir uma série de propriedades físicas do polissacarídeo capsular, como distribuição do peso molecular, volume hidrodinâmico, viscosidade intrínseca e, por conseguinte, densidade, rigidez e estrutura (BEDNAR e HENNESSEY, 1993). Logo, este método pode fornecer, em uma mesma análise, valores de concentração de polissacarídeo capsular na amostra e seu respectivo o peso molecular, variáveis ao longo do cultivo (MASSALDI et al., 2010).

3.5 ESTRATÉGIAS DE CULTIVO EM BIORREADORES E MELHORAMENTO DE MEIOS DE CULTURA

Existem 3 modos principais de operação de biorreatores: descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo. A eleição de uma estratégia de operação representará um importante efeito sobre a conversão de substrato, a formação de produto, a possibilidade de contaminação e a confiabilidade do processo (DORAN, 1998).

- Descontínuos: operam em sistemas fechados de maneira que o substrato é adicionado no começo do processo e os produtos são retirados somente ao final do mesmo.
- Descontínuo alimentado: a alimentação de nutrientes se realiza de maneira intermitente ou contínua a fim de controlar a concentração de substrato existente no biorreator. Esta forma de operação é empregada quando elevadas concentrações de substrato podem inibir a reação e/ou produzir uma via metabólica não desejada; ou quando há repressão catabólica.
- Cultivo contínuo: também é conhecido como CSTR (*continuous stirred-tank reactor*) ou quimiostato, caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura fresco a uma vazão determinada e constante e retirada do caldo fermentado na mesma vazão da alimentação, o que mantém o volume de caldo no biorreator constante.

Quando se desenvolve uma fermentação, o desenho do meio de fermentação é de crucial importância, porque sua composição pode afetar significativamente a concentração de produto, rendimento e produtividade volumétrica. A composição do meio também pode afetar a facilidade e o custo da operação de purificação do produto (KENNEDY e KROUSE, 1999).

Entre as mais difundidas estratégias para otimização de meios, pode-se citar: composição de meio semelhante à composição elementar do micro-organismo; mudança de um fator por vez; planejamento fatorial; superfície de resposta de Placket & Burman, aplicada para fatores sem efeito interativo; redes neurais e técnicas de fermentação contínua.

3.5.1 O Cultivo Contínuo

Um dos principais recursos que discrimina culturas contínuas das culturas descontínuas é a habilidade do crescimento celular ocorrer balanceado entre a entrada de meio estéril e a retirada de meio usado, células vivas e *debris*. Com a manutenção de volume constante, o sistema pode atingir a condição de estado estacionário ou regime permanente, condição na qual as variáveis de estado (concentração de células, de substrato limitante e de produto) permanecem constantes ao longo do tempo de operação do sistema (FACCIOTTI, 2001). Assim sendo, o cultivo contínuo é um ambiente constante e definido, controlável e de condições físico-químicas ajustáveis (HOSKISSON e HOBBS, 2005). Já na cultura descontínua, dadas as condições físico-químicas dinâmicas, a concentração de alguns nutrientes diminui e a concentração de produtos metabólicos aumenta com o crescimento do micro-organismo. Isto frequentemente resulta em dados complexos difíceis e até impossíveis de interpretar (HOSKISSON e HOBBS, 2005).

A manutenção das células em um mesmo estado fisiológico torna o processo contínuo uma excelente ferramenta para estudos de mecanismos de regulação metabólica ou ainda, para estudos de melhoramento da composição de meio de cultura. Isto porque é possível observar a atividade do micro-organismo em diferentes ambientes controlados pelo investigador, mudando simplesmente a vazão

específica de alimentação ou a composição do meio de alimentação (HOSKISSON e HOBBS, 2005; TODA, 2003).

3.5.1.1 Equacionamento para Cultivo Contínuo

Para efeitos de cálculo e equacionamento de um biorreator contínuo sem reciclo de células, admite-se agitação perfeita, de forma que o biorreator possa ser considerado com homogêneo. Assim, pode-se escrever o seguinte balanço material para o micro-organismo:

$$\begin{aligned} (\text{Variação da massa de células no biorreator}) = & (\text{Massa de células que entra}) - \\ & (\text{Massa de células que sai}) + (\text{Massa de células que cresce}) \end{aligned} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

Considerando o volume constante, tem-se:

$$V \cdot \frac{dX}{dt} = F \cdot X_a - F \cdot X + V \cdot \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{crescimento}} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

Sendo:

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

V = volume de meio no reator (L)

X = concentração de células no biorreator (g/L)

X_a = concentração de células no meio de alimentação (g/L)

A velocidade instantânea de crescimento pode ser expressa como:

$$\left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{crescimento}} = \mu \cdot X \quad (\text{Eq. 3.3})$$

Onde:

μ = velocidade específica de crescimento (h⁻¹)

Define-se vazão específica de alimentação (D), como sendo a relação entre a vazão volumétrica de alimentação e o volume de meio no biorreator. Assim, tem-se que:

$$D = \frac{F}{V} \quad (\text{h}^{-1}) \quad (\text{Eq. 3.4})$$

Sendo que $1/D$ é tempo de residência hidráulica no biorreator (t_r). Deste modo, substituindo a Equação 3.4 e 3.3 na Equação 3.2 e assumindo que o meio de alimentação é estéril ($X_a = 0$), obtém-se:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - D \cdot X \quad (\text{Eq. 3.5})$$

Considerando que se tenha atingido a situação de estado estacionário no biorreator, no qual a concentração celular permanece constante ($dX/dt = 0$), obtém-se:

$$\mu \cdot X = D \cdot X \quad \text{ou ainda} \quad \mu = D \quad (\text{Eq. 3.6})$$

Portanto, na condição de estado estacionário a concentração celular se mantém constante devido a um equilíbrio entre a velocidade de crescimento celular e a velocidade de retirada de células do fermentador e, ainda, ao fato de que a velocidade específica de crescimento (μ) é igual à vazão específica de alimentação (D) (FACCIOTTI, 2001).

Considerando a mesma situação de estado estacionário para substrato limitante S e para o produto genérico P para equacionar os balanços materiais, se obtém as expressões a seguir:

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_a - S) - \mu_s \cdot X \rightarrow D \cdot (S_a - S) = \mu_s \cdot X \quad \therefore \quad \mu_s = \frac{D}{Y_{x/s}} \quad (\text{Eq. 3.7})$$

$$\frac{dP}{dt} = -D \cdot P + \mu_p \cdot X \rightarrow D \cdot P = \mu_p \cdot X \quad \therefore \quad \mu_p = \frac{D \cdot P}{X} \quad (\text{Eq. 3.8})$$

Onde:

S = concentração de substrato limitante no biorreator (g/L)

S_a = concentração de substrato limitante no meio de alimentação (g/L)

μ_s = velocidade específica de consumo de substrato ($g_{\text{substrato}} \cdot g_{\text{célula}}^{-1} \cdot h^{-1}$)

$Y_{x/s}$ = fator de conversão de substrato limitante S a células ($g_{\text{célula}}/g_{\text{substrato}}$)

P = concentração de produto P no biorreator (g/L)

μ_p = velocidade específica de produção do produto ($g_{\text{produto}} \cdot g_{\text{célula}}^{-1} \cdot h^{-1}$)

Considerando a velocidade específica de produção conforme proposto por Luedeking e Piret (1959):

$$\mu_p = \alpha \cdot \mu + \beta \quad (\text{Eq. 3.9})$$

Sendo α e β constantes que representam:

α = a parcela de formação de produto dependente do crescimento ($g_{\text{produto}}/g_{\text{célula}}$)

β = a parcela de formação de produto independente do crescimento ($g_{\text{produto}} \cdot g_{\text{célula}}^{-1} \cdot h^{-1}$)

Substituindo a Eq. 3.9 na Eq. 3.8, tem-se:

$$\frac{D \cdot P}{X} = \alpha \cdot D + \beta \rightarrow P = X \cdot \alpha + \frac{\beta \cdot X}{D} \quad (\text{Eq. 3.10})$$

Em uma grande faixa dos valores de D, os valores de X permanecem praticamente constantes, ocorrendo uma brusca queda até o valor zero, quando D se aproxima do valor de μ_{max} . Neste ponto o valor de S tende ao infinito, o que na prática significa tender ao maior valor possível, ou seja, a concentração de substrato na alimentação. Quando $S = S_a$, obtém-se um valor nulo para a concentração celular em estado estacionário. Tal condição de operação é conhecida como “estado transiente de lavagem” (*washout*), situação na qual ocorre um arraste das células do biorreator. Nesse ponto, o valor da vazão específica de crescimento é denominado “D crítico” (D_c) (FACCIOTTI, 2001).

A lavagem do biorreator é usualmente empregada para a determinação da velocidade máxima de crescimento (μ_{max}), sendo esta técnica conhecida como método dinâmico de determinação de μ_{max} . Esta técnica consiste em, partindo-se de um estado estacionário ($\mu = D$), impõem-se uma vazão específica de alimentação nitidamente superior a μ_{max} , de forma a se obter um decréscimo da concentração

celular no reator. Assim, integrando-se a equação 3.5 entre t_0 e t , o instante em que se fez $D > \mu_{\max}$, no qual se tinha uma concentração celular igual a X_i , tem-se:

$$\ln\left(\frac{X}{X_i}\right) = (\mu_{\max} - D) \cdot (t - t_0) \quad (\text{Eq. 3.11})$$

Plotando-se $\ln(X/X_i)$ em função do tempo, obtém-se uma reta, cujo coeficiente angular é igual a $\mu_{\max} - D$. Como D é conhecido, calcula-se assim o valor de μ_{\max} .

3.5.1.2 Cultivo Contínuo para Produção de Polissacarídeos por Bactérias Lácticas

Segundo a literatura, os maiores valores de fator de conversão de biomassa em polissacarídeo por bactérias lácticas são alcançados quando o quimiostato é operado em altas vazões específicas de alimentação (D). Isto foi observado, por exemplo, na produção de polissacarídeo capsular por *S. agalactiae* (PAOLETTI; ROSS; JOHNSON, 1996; ROSS; MADOFF; PAOLETTI, 1999). Por outro lado, na produção de exopolissacarídeos⁶ por *L. lactis* (LOOIJESTEIJN et al., 2000) e *S. zooepidemicus* (BLANK; MCLAUGHLIN; NIELSEN, 2005), os maiores fatores de conversão de biomassa em polissacarídeo acontecem quando as culturas são operadas em baixos valores de D .

Paoletti, Ross e Johnson (1996) propuseram que, dado que a produção de polissacarídeo capsular por *S. agalactiae* tipo III aumenta com D , e conseqüentemente, com a velocidade específica de crescimento, a expressão deste polissacarídeo capsular é modulada por um mecanismo que envolve a velocidade de crescimento. Se uma bactéria patogênica produtora de polissacarídeo capsular cresce a uma menor velocidade, então expressa menores quantidades de polissacarídeo capsular, o que expõe outros componentes celulares, como os envolvidos em sua adesão ao hospedeiro, que favorecerão a condição de colonização. Entretanto, se cresce a maior velocidade, então produz maiores

⁶ Exopolissacarídeos: polissacarídeos produzidos extracelularmente e que não são ancorados à peptidoglicana

quantidade de polissacarídeo capsular e mascara os componentes envolvidos na colonização, caracterizando, então a condição de invasão.

Sob limitação de fonte de carbono e sob altos D, observou-se que para *S. agalactiae* tipo III houve maior produção de polissacarídeo capsular ligado às células por biomassa, cerca de 4 a 15 vezes mais dependendo da cepa (ROSS; MADOFF; PAOLETTI, 1999). O mesmo fenômeno foi observado para produção de exopolissacarídeo por *L. lactis* (LOOIJESTEIJN et al., 2000).

Sob limitação de nitrogênio, algumas bactérias lácticas parecem favorecer a síntese de polímeros intracelulares armazenados (NEIJSSSEL; SNOEP; TEIXEIRA DE MATOS, 1997). Já para exopolissacarídeo de *S. zooepidemicus*, houve menor produção de ácido hialurônico por biomassa em culturas limitadas por glutamina (BLANK; MCLAUGHLIN; NIELSEN, 2005).

Outro ponto importante na produção de polissacarídeos por bactérias lácticas é a estabilidade das células e do fenótipo produtor. Em ensaios de cultivo contínuo operados a $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ de *S. pneumoniae* para os sorotipos 14, 6B e 23F, foram observadas oscilações na densidade celular, sendo estas cíclicas a cada 2 tempos de residência. Este perfil oscilatório não ocorreu para cepas nocauteadas para *LytA*, assim o perfil oscilatório foi relacionado à expressão e atividade de autolisinas ou expressão de uma toxina (CORNEJO et al., 2009). Para *S. zooepidemicus* foi observado que, de acordo com a vazão específica de alimentação empregada em cultura contínua e do tipo de limitação imposta, ocorre queda na quantidade de células capazes de produzir ácido hialurônico.

À exemplo dos casos citados acima, para o estudo da produção de polissacarídeo capsular por *S. pneumoniae* serão levados em conta os fatores: vazão específica de alimentação, a limitação de carbono, limitação do fator de crescimento colina, e a limitação do doador amino, glutamina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTUDO DO MÉTODO DE DOSAGEM DE PS14 EM AMOSTRAS DE CULTIVO

Cinco métodos foram selecionados para análise de PS14 em sobrenadante de amostras de cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 14:

4.1.1 Fenol-Sulfúrico

Seguindo sugestões de Cuesta et al. (2003) para dosagem de PS14 por fenol-sulfúrico, foi estudado o tempo ótimo de incubação da reação a 90 °C para definir em que ponto ocorre sua hidrólise total. Para tanto, foi utilizado PS14 ATCC (American Type Culture Collection™, Manassas, Virginia, USA) a 100 µg/mL como referência e tempos de incubação de 0 a 20 minutos.

Em relação ao método original do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), algumas modificações no protocolo foram realizadas, visando maior sensibilidade e homogeneidade do método para quantificação de polissacarídeos, que seguem: 200 µL da solução de padrão ou amostra foram pipetados para tubo de rosca e mantidos em banho de gelo. 200 µL de solução de fenol 5% foram adicionados e o tubo foi agitado. Adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico, rapidamente e diretamente contra a superfície de líquido, tampou-se o tubo e este foi agitado imediatamente por 5 segundos, retornando depois ao banho de gelo. Passados 10 minutos, o tubo foi levado ao banho a 90 °C e, depois de 10 minutos, foi resfriado em banho de gelo e mantido a temperatura ambiente por 20 minutos antes da leitura a 490 nm.

Para remoção de açúcares do meio de cultura, os sobrenadantes das amostras do cultivo e o meio de cultura virgem foram dialisados contra água destilada em membrana de corte 10 a 12 kDa por 48 h. Cada amostra foi analisada em duplicada e deste foi descontado o valor da interferência do meio de cultura virgem. Para calcular a concentração de PS14 nas amostras, fez-se a relação direta com a curva padrão de PS14 ATCC.

4.1.2 High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC)

Para os testes em HPSEC, foram utilizadas 2 colunas TSKGel[®] GMPW_{XL} (Tosoh Bioscience LLC, Minato-Ku, Tokyo, Japan), de 0,78 x 30 cm acopladas em série (60 cm de altura total). Como fase móvel foi utilizado tampão fosfato (Na₂HPO₄ 10 mM e NaCl 0,15 M, pH 7,5), com uma vazão de 0,4 mL/min. O volume injetado de amostra foi de 50 µL e o tempo de corrida foi de 80 minutos a 25 °C. Foram avaliadas amostras do sobrenadante do cultivo dialisadas e não dialisadas e o padrão PS14 ATCC de 1 a 2 mg/mL. O índice de refração (RID) foi utilizado para a detecção. Os cromatogramas foram analisados pelo software Class VP versão 6.14 SP2 (Shimadzu, Nakagyo-ku, Kyoto, Japan).

4.1.3 Rocket Imunoelektroforese

Foi utilizada uma adaptação do protocolo sugerido por Szu e Oravec (1982) que, resumidamente, altera os tampões de corrida e do gel para pH 5,0. Dois tipos de tampão foram testados para o gel de agarose 1%: tampão acetato forte (acetato de sódio 1,31 M, Tris 0,65 M e EDTA 1,1%) e tampão acetato de sódio fraco (acetato de sódio 0,025 M), ambos com pH 5,0. Foram estudadas proporções de soro antiPS14 obtido de uma cabra imunizada com a PCV7 (Prevenar[®]), variando de 1:200 a 1:2.400 no gel de agarose.

Através da migração do polissacarídeo capsular ao longo do gel (migração catodal, 210 V, 24 mA, 5 W, sob placa refrigerada a 10 °C), há formação do precipitado antígeno-anticorpo (Figura 4.1), que após lavagens (4 lavagens com salina e 4 lavagens com água, seguida de secagem à temperatura ambiente), é evidenciado em revelação com Comassie Blue. Como tampão de corrida foram utilizadas soluções de acetato de sódio forte (acetato de sódio 2,62 M, Tris 1,3 M e EDTA 2,2%) ou acetato de sódio fraco (acetato de sódio 0,05 M), ambos com pH 5,0 e o volume de amostra/PS14 ATCC por poço foi de 5 µL.

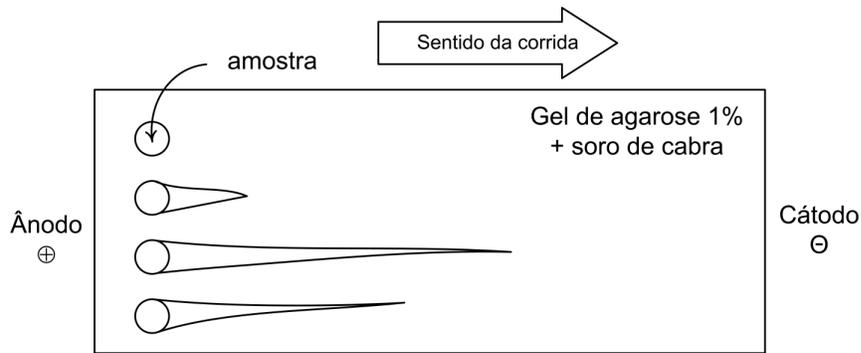


Figura 4.1: Esquema de formação de precipitado antígeno-anticorpo em *rocket* imunoeletroforese

Antes de ser utilizado na detecção do PS14 por *rocket* imunoeletroforese, o soro da cabra foi titulado através de um ELISA indireto: placas de 96 poços (MaxiSorp™ - Nunc, Rochester, New York, USA), de fundo chato, foram sensibilizadas com 5 µg de PS14 ATCC por 48 horas a 4 °C. Depois da adsorção do antígeno, as placas foram lavadas três vezes com Tween 20 a 0,05% em solução salina tamponada com fosfato (PBS-T) e bloqueadas com 200 µL de leite em pó desnatado a 10% em PBS (PBS-L10%). Após 1 hora de incubação a 37 °C, as placas foram lavadas com PBS-T e 100 µL de soro de cabra foram diluídos seriadamente em PBS-L-10% ao longo da placa a uma razão 1:2. O branco do soro consistiu de 100 µL de PBS-L10% no lugar da amostra. Após 2 horas de incubação a 37 °C, as placas foram lavadas com PBS-T e incubadas com anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a 1:1.000 em PBS, por 2 horas a 37 °C. As placas foram lavadas com PBS-T e reveladas com 100 µL de solução de Orto-Fenilenodiamina (OPD) a 0,27% em tampão citrato (citrato trissódico dihidratado 0,1 M e fosfato de sódio monobásico monohidratado 0,27 M, pH 5,4) com H₂O₂ a 0,5%. Após 15 minutos de incubação no escuro, a reação foi cessada com 50 µL H₂SO₄ 4 M. As placas foram lidas a 492 nm.

Através da porção linear da curva absorbância a 492 nm (DO_{492}) versus log diluição do soro, é determinado o título do soro, que corresponde à diluição necessária para atingir uma DO_{492} de 0,1.

4.1.4 ELISA Competitivo Indireto

Placas de 96 poços (MaxiSorp™), de fundo chato, foram sensibilizadas com 5 µg de PS14 ATCC por 48 horas a 4 °C. Depois da adsorção do antígeno, as placas foram lavadas três vezes com Tween PBS-T e bloqueadas com 200 µL de PBS-L10%. Após 1 hora de incubação a 37 °C, as placas foram lavadas com PBS-T e 50 µL de amostra/padrão foram diluídos seriadamente em PBS ao longo da placa. O padrão consistiu de PS14 ATCC com concentração inicial de 100 µg/mL, diluído até 0,78 µg/mL. Em seguida, foi misturado à amostra/padrão 100 µL de soro de cabra (mesmo soro utilizado no item 4.1.3) a 1:10.000 em PBS. O branco do PS14 e o branco do soro consistiram de 50 µL de PBS no lugar da amostra e 150 µL de PBS no lugar da amostra e do soro, respectivamente. Após 2 horas de incubação a 37 °C, as placas foram lavadas com PBS-T e incubadas com anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a 1:1.000 em PBS, por 2 horas a 37 °C. As placas foram lavadas com PBS-T e reveladas conforme descrito no ELISA indireto do item 4.1.3. Um esquema do ELISA competitivo é ilustrado a seguir (Figura 4.2).

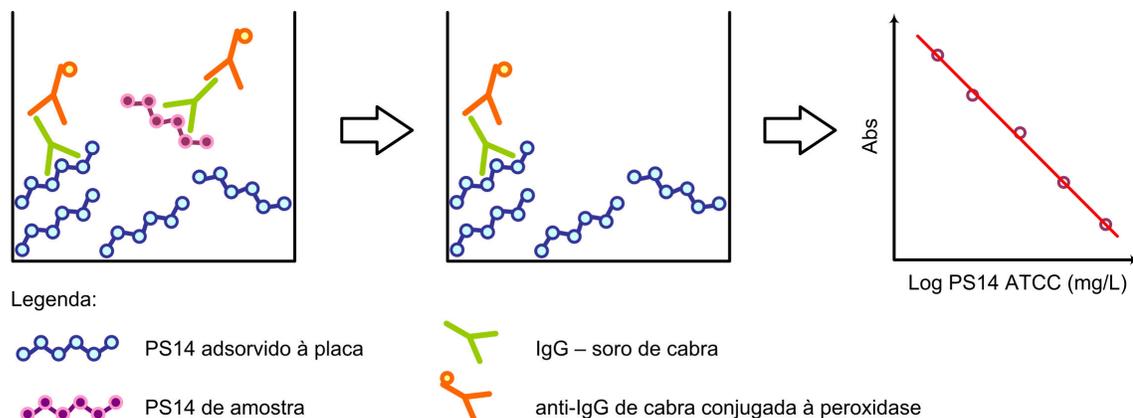


Figura 4.2: Esquema para quantificação de PS14 através de ELISA competitivo

As amostras foram analisadas em duplicata e o padrão em triplicata. Para calcular a concentração de PS14 nas amostras, primeiramente calculou-se a porcentagem de inibição de cada concentração do padrão pela equação:

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{\text{Abs soro sem inibidor} - \text{Abs soro com inibidor}}{\text{Abs soro sem inibidor}} \right) \cdot 100, \text{ onde 'Abs soro sem inibidor'}$$

refere-se à absorbância do branco do PS14. Assim, pela porção linear de % inibição *versus* concentração de PS14 ATCC, determinou-se a concentração de PS14 ATCC requerida para inibir a ligação do soro em 50% (IC₅₀). O valor de absorbância correspondente a IC₅₀ (Abs IC₅₀) foi encontrado através da relação DO₄₉₂ e concentração de PS14 ATCC. Por conseguinte, a partir da relação linear DO₄₉₂ x diluição da amostra, calculou-se a diluição da amostra na qual se atingiria a Abs IC₅₀. Portanto, a concentração de PS14 na amostra foi obtida pela multiplicação da diluição encontrada pela IC₅₀.

4.1.5 ELISA de Captura

Para estabelecer este protocolo, foram estudadas variações da concentração de anticorpo de captura, anticorpo secundário e anticorpo conjugado, soluções de bloqueio e tempos de incubação, chegando-se ao protocolo definitivo:

Placas de 96 poços (MaxiSorp™), de fundo chato, foram sensibilizadas com soro comercial de coelho contra PS14 (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) a 1:1.000 em tampão carbonato (NaHCO₃ 50 mM e Na₂CO₃ 50 mM, pH 9,6) por 14 horas a 4 °C ou 2 horas a 37 °C. As placas foram lavadas 5 vezes com PBS-T e bloqueadas com 200 µL de PBS-L10% por 1 hora a 37 °C. As placas foram então lavadas com PBS-T e incubadas com 100 µL de amostra/padrão diluídos em PBS. O padrão consistiu de PS14 ATCC com concentração inicial de 1 µg/mL a 1 ng/mL. Após 3 horas de incubação a 37 °C ou *overnight* a 4 °C, as placas foram lavadas com PBS-T e incubadas com soro de cabra (mesmo soro utilizado no item 4.1.3), a uma diluição 1:200 em PBS-T com albumina a 0,5% (PBS-T-BSA). Após incubação de 2 horas a 37 °C, as placas foram novamente lavadas com PBS-T e incubadas com anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase a 1:5.000 em PBS-T-BSA, por 2 horas a 37 °C. As placas foram lavadas com PBS-T e reveladas conforme descrito no ELISA indireto do item 4.1.3. Um esquema do ELISA de captura é ilustrado a seguir (Figura 4.3).

As amostras e o padrão foram analisados em duplicata. Para calcular a concentração de PS14 nas amostras, fez-se a relação direta com a curva padrão de PS14 ATCC.

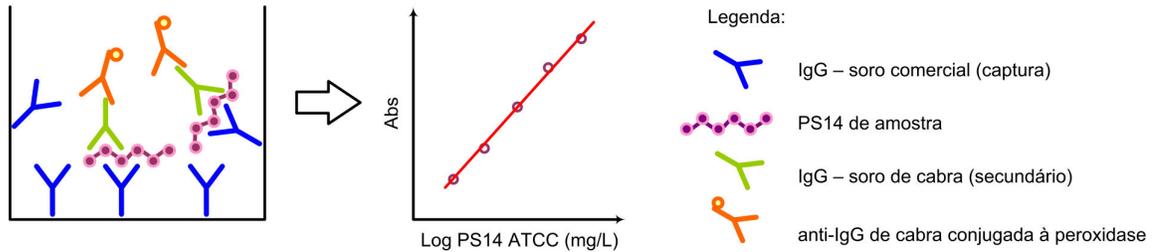


Figura 4.3: Esquema para quantificação de PS14 através de ELISA de captura

4.2 CULTIVOS

4.2.1 Meios de Cultura

As composições dos meios de cultura utilizados estão nas tabelas que seguem. Para plaqueamento e semeadura foi utilizado meio Ágar-BHI Sangue (Tabela 4.1). Para confecção do lote semente e do lote trabalho foi utilizado o meio Todd-Hewitt com extrato de levedura (Tabela 4.2). Nos cultivos tanto em frascos como em reator, dois meios foram utilizados: o meio complexo (Tabela 4.3) e o meio quimicamente definido - CDM - suplementado com colina a 10 mg/L (Tabela 4.4).

Tabela 4.1 - Composição de Meio Ágar-BHI Sangue

Reagente	por litro
Sangue de Carneiro	50 mL
Infusão de cérebro e coração (BHI, BD-Difco™)	37 g
Ágar (BD-Bacto™)	20 g

BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Tabela 4.2 - Composição de Meio Todd-Hewitt com Extrato de Levedura - THY

Reagente	por litro
Meio Todd-Hewitt (BD-Bacto™) ^a	30 g
Extrato de Levedura (BD,Difco™)	5 g

^a Composição aproximada (em 30 g): infusão de coração 3,1 g, neopeptona 20 g, glicose 2 g, NaCl 2 g, Na₂HPO₄ 0,4 g, Na₂CO₃ 2,5 g

Tabela 4.3 - Composição de Meio Complexo

Reagente	por litro
Hidrolisado ácido de caseína (BD-Bacto™)	30 g
Glicose	20 g
Extrato de levedura ^a (BD-Difco™)	20 g
Fosfato Bipotássico	5 g
Bicarbonato de sódio	1 g
L-glutamina	0,625 g
Asparagina	0,1 g
Colina	0,01 g
Solução de Sais ^b	2,0 mL
Ácido Tioglicólico 10%	1,0 mL

^a Extrato de Levedura ultrafiltrado, com corte de 5000 Da

^b Composição da solução de sais (por litro): MgSO₄.7H₂O 250 g; FeSO₄.7H₂O 2,5 g; ZnSO₄.7H₂O 0,4 g; MnSO₄.H₂O 0,18 g; HCl 10 mL.

FONTE: Gonçalves et al., 2002.

Tabela 4.4 - Composição do Meio Quimicamente Definido (CDM) suplementado com colina

Reagente	por litro	Reagente	por litro	Reagente	por litro
L-Ácido Aspártico	0,1 g	L-Prolina	0,2 g	Adenina Sulfato	38,3 mg
L- Ácido Glutâmico	0,102 g	L-Serina	0,1 g	Guanina HCl H ₂ O	27,3 mg
DL-Alanina	0,1 g	L-Tirosina	0,1 g	Uracil	22 mg
L-Arginina HCl	0,121 g	L-Treonina	0,2 g	Acetato de Sódio	4,5 g
Asparagina	0,1 g	L-Triptofano	0,1 g	CaCl ₂ .2H ₂ O	6,7 mg
Cisteína	0,5 g	L-Valina	0,1 g	Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	1 mg
L-Cistina	0,05 g	Ácido Fólico	0,8 mg	FeSO ₄ .7H ₂ O	5 mg
L-Fenilalanina	0,1 g	Ácido p-Aminobenzóico	0,4 mg	KH ₂ PO ₄	0,2 g
Glicina	0,2 g	Ácido Pantoteico	4 mg	K ₂ HPO ₄	1 g
L-Glutamina	0,2 g	Biotina	0,2 mg	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,7 g
L-Histidina HCl H ₂ O	0,135 g	β-NAD	2,5 mg	MnSO ₄ .H ₂ O	5,6 mg
L-Hidroxiprolina	0,2 g	Nicotinamida	10 mg	NaHCO ₃	2,5 g
L-Isoleucina	0,1 g	Piridoxal HCl	1 mg	Na ₂ HPO ₄	7,35 g
L-Leucina	0,2 g	Piridoxamina 2HCl	1,4 mg	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	3,195 g
L-Lisina	0,138 g	Riboflavina	2 mg	Glicose	10 g
L-Metionina	0,1 g	Tiamina HCl	2 mg	Colina	10 mg

FONTE: Adaptado de: van de Rijn & Kessler, 1980

O meio ágar-BHI sangue foi preparado pela solubilização do ágar e do BHI em água, seguido por esterilização por 20 minutos a 121 °C. O sangue foi então acrescentado de forma estéril à temperatura de 50 °C, de maneira que as hemácias não sofressem lise (coloração vermelha intensa).

O meio THY foi preparado pela solubilização dos componentes em água, seguida de esterilização por filtração a 0,22 µm.

Para o preparo do meio complexo cada componente foi solubilizado individualmente, seguido pela reunião dos componentes, homogeneização, ajuste de pH para 7,4, aferição do volume e esterilização por filtração a 0,22 µm.

Já para o CDM, dado o grande número de componentes, foram preparadas 25 soluções estoque (ver ANEXO) - baseadas nas propriedades físico-químicas de seus componentes (solubilidade, estabilidade e saturação) - as quais foram filtradas a 0,22 µm e mantidas a 4 °C até seu uso. Para o preparo do CDM, adicionou-se o volume previamente estabelecido de cada solução estoque, seguida pela adição e solubilização direta de glicose, fosfatos de sódio dibásico e monobásico monohidratado, acetato de sódio, piridoxal, β-NAD e colina. O volume então foi aferido, o pH ajustado para 7,0 e o meio foi esterilizado por filtração a 0,22 µm. Imediatamente antes da inoculação, bicarbonato de sódio e cisteína foram dissolvidos em água, filtrados a 0,22 µm e adicionados de forma estéril ao meio.

4.2.2 Seleção da Cepa Produtora

Inicialmente foram avaliadas 8 cepas, que foram isoladas e identificadas como *S. pneumoniae* sorotipo 14 pelo Instituto Adolfo Lutz. As cepas foram cedidas na forma liofilizada por este instituto e apresentam a seguinte nomeação: ST731/03, ST322/08, ST 334/08, ST366/08, ST941/00, 1871, 2721 e 5287.

4.2.2.1 Lote Semente

As ampolas liofilizadas foram semeadas em meio Agar-BHI Sangue em tubos inclinados por 48 horas a 36,5 °C em latas com velas acesas, para reduzir a concentração de oxigênio atmosférico (ambiente microaerofílico). Após verificação da pureza das culturas por coloração de Gram, estas foram ressuspensas com NaCl 0,85% estéril e inoculadas em 50 mL de meio THY. Quando a densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) dos cultivos ficou próxima a 1,0, as culturas foram centrifugadas a 3.210 g por 15 minutos a 4 °C e depois foram ressuspensas em 1/10 do volume com meio THY novo e glicerol (40% em concentração final). Os estoques foram mantidos em nitrogênio líquido.

4.2.2.2 Inóculo

A partir do lote semente, as cepas foram avaliadas com relação à melhor fração do estoque congelado a ser inoculada em 50 mL de meio complexo, a fim de que a cultura do inóculo se encontrasse em fase exponencial de crescimento (DO_{600} entre 1 e 1,5) com 12 horas de incubação, ponto onde esta seria repassada para frascos de maior volume ou para o biorreator. Foram estudadas frações de 0,002 a 0,2% (v/v), de acordo com a concentração de células viáveis do lote semente, determinada após o congelamento do estoque. A incubação foi estática, a 36,5 °C e em ambiente microaerofílico.

4.2.2.3 Produção de Polissacarídeo Capsular

Com base nas melhores frações do estoque congelado de cada cepa a serem empregadas para o preparo da cultura do inóculo, identificadas no item anterior, ensaios em 500 mL de meio complexo foram realizados para comparar a produção de polissacarídeo entre as cepas. O volume de inóculo utilizado para semear 500

mL de meio foi calculado pela seguinte equação: $V_{\text{inoculo}} = \frac{V_{\text{meio}} \cdot 0,1}{(DO_{600 \text{ inoculo}} - 0,1)}$, onde o número 0,1 se refere à DO_{600} inicial desejada. Esta equação foi utilizada em todos os ensaios em frasco e em biorreator.

A incubação foi estática, a 36,5 °C e em ambiente microaerofílico. O crescimento celular foi monitorado e alíquotas de 10 mL foram retiradas para dosagem de PS14 no sobrenadante após centrifugação a 12.857 g.

4.2.3 Lote Trabalho

Um lote trabalho foi produzido para a cepa identificada como a melhor produtora. 70 µL do lote semente foram transferidos para 450 mL THY. Incubou-se a 36,5 °C, estaticamente e em ambiente microaerofílico. Quando a cultura atingiu DO_{600} de aproximadamente 1,0, esta foi centrifugada a 3.210 g por 15 minutos a 4 °C e depois ressuspensa em 1/10 do volume com meio THY novo e glicerol (40% em concentração final). Os estoques foram colocados em criotubos e mantidos em nitrogênio líquido.

4.2.4 Comparação entre Cultivos Descontínuos utilizando CDM e Meio Complexo

4.2.4.1 Inóculo

A mesma composição do meio do biorreator foi utilizada para o meio de inóculo e 250 mL de meio foram utilizados para os dois meios testados. Para determinação do tempo de incubação antes do repasse para o biorreator e da melhor fração de lote trabalho a ser utilizada para atingir DO_{600} de 1,0 a 1,5 com 12 horas de incubação, experimentos prévios de cinética de inóculo foram executados para cada meio. Para o meio complexo foi necessária uma fração do lote trabalho de 0,004% (v/v), o que correspondeu a 10 µL do estoque congelado pra 250 mL de

meio de inóculo; enquanto que para CDM a fração do estoque congelado necessária para preparo do inóculo foi de 0,012%. A incubação seguiu o item 4.2.2.2.

4.2.4.2 Cultivo Descontínuo

No cultivo com meio complexo foi utilizado biorreator com 5 L de volume de trabalho (BioFlo® 2000 - New Brunswick (NBS), Edison, New Jersey, USA), esterilizado com água a 121 °C por 30 minutos, que foi retirada antes do meio ser filtrado para dentro do reator. O cultivo se deu com controle automático de pH (7,0 com NaOH 5M), temperatura (36 °C), agitação (200 rpm) e vazão de nitrogênio (0,1 vvm, ambiente anaeróbio), através da interface do reator com o software LabView/UFSCar versão 7.1 (National Instruments, Austin, Texas, USA). A adição do antiespumante polipropilenoglicol ocorreu manualmente conforme a necessidade.

No cultivo com CDM foi utilizado biorreator com 1,5 L de volume de trabalho (BioFlo® 3000, NBS), esterilizado com água a 121°C por 30 minutos, utilizada no ajuste do volume de meio concentrado. O cultivo se deu com controle de parâmetros pelo software BioCommand (NBS, versão 2.61) e estes foram os mesmos do cultivo de 5 L, exceto pela agitação, que para manter a homogeneidade do reator e reduzir estresse celular por cisalhamento, foi reduzida a 100 rpm.

Em ambos os cultivos, amostras de 5 mL foram retiradas no decorrer do tempo para análise de crescimento pela DO_{600} e destes, 2 a 4 mL foram centrifugados a 20.000 g, por 15 minutos a 4 °C para análise de consumo de glicose, produção de ácidos, concentração de PS14 no sobrenadante e, eventualmente, concentração de aminoácidos (aminograma). Os sobrenadantes foram armazenados a -20 °C, assim como os *pellets* celulares, dos quais foi determinada a concentração de PS14 associado às células.

4.2.5 Análise de Vitaminas Essenciais para Crescimento

Esta análise foi realizada com a cepa selecionada, em 50 mL de CDM com a omissão de uma ou mais vitamina(s)/cofator(es) presentes no CDM completo. Para evitar o arraste de micronutrientes do inóculo preparado em meio complexo, este foi centrifugado a 6000 g, a 4 °C por 10 minutos, lavado com NaCl 0,85% estéril e semeado para uma mesma DO₆₀₀ inicial de 0,1 em todos os frascos. A incubação foi estática, a 36,5 °C, em ambiente microaerofílico. O crescimento foi comparado ao CDM completo, que contém 10 vitaminas, nomeado como CDMv10.

Uma vez identificadas as vitaminas que não podem ser omitidas do meio (essenciais), estas foram contra-provadas em uma comparação de crescimento com CDMv10. Esta comparação foi feita tanto em frascos, seguindo as mesmas condições descritas de microaerofilia, quanto em cultivos descontínuos em biorreator, nas mesmas condições para biorreator de 1,5 L do item 4.2.4.2. Para o inóculo do biorreator foram testados tanto inóculo preparado em meio complexo e lavado para evitar arraste de micronutrientes quanto inóculo preparado em meio quimicamente definido contendo somente as vitaminas ditas como essenciais. A preparação do inóculo seguiu a mesma descrição do item 4.2.4.1. A partir dos resultados de requerimento de vitaminas, foi estabelecido um meio quimicamente definido modificado na composição de vitaminas para cultivos em biorreator, nomeado CDMv6 (Tabela 4.5):

Tabela 4.5 - Composição em vitaminas de CDM completo (CDMv10) e CDM modificado para vitaminas (CDMv6)

Componente	mg/L em CDMv10	mg/L em CDMv6
Ácido Fólico	0,8	-
Ácido p-aminobenzóico	0,4	-
Ácido Pantotênico	4,0	4,0
Biotina	0,2	0,2
β-NAD	2,5	-
Nicotinamida	10,0	10,0
Piridoxal	1,0	1,0
Piridoxamina	1,4	-
Riboflavina	2,0	2,0
Tiamina	2,0	2,0

4.2.6 Cultivos Contínuos

Para os cultivos contínuos foi utilizado o biorreator BioFlo[®] 3000, com controle automático de pH (7,0 com NaOH 5M), temperatura (36 °C), agitação (100 rpm) e vazão de nitrogênio (0,1 vvm), através da interface com o software BioCommand. O volume do reator foi mantido constante em 1 L através de um pescador e de uma bomba peristáltica (Watson Marlow Inc., Wilmington, Massachusetts, USA) para retirada do caldo fermentado, operada a uma vazão 5 vezes maior que a vazão de entrada. Para controle da vazão de entrada foi utilizada uma bomba peristáltica (Watson Marlow Inc.) com vazão controlada pelo software LabView. As vazões de entrada de meio foram verificadas por variação de peso das balanças onde ficaram apoiados os recipientes com os meios de alimentação e também por meio de uma pipeta localizada na linha de alimentação, acionada por um by-pass, conforme ilustrado na Figura 4.4.

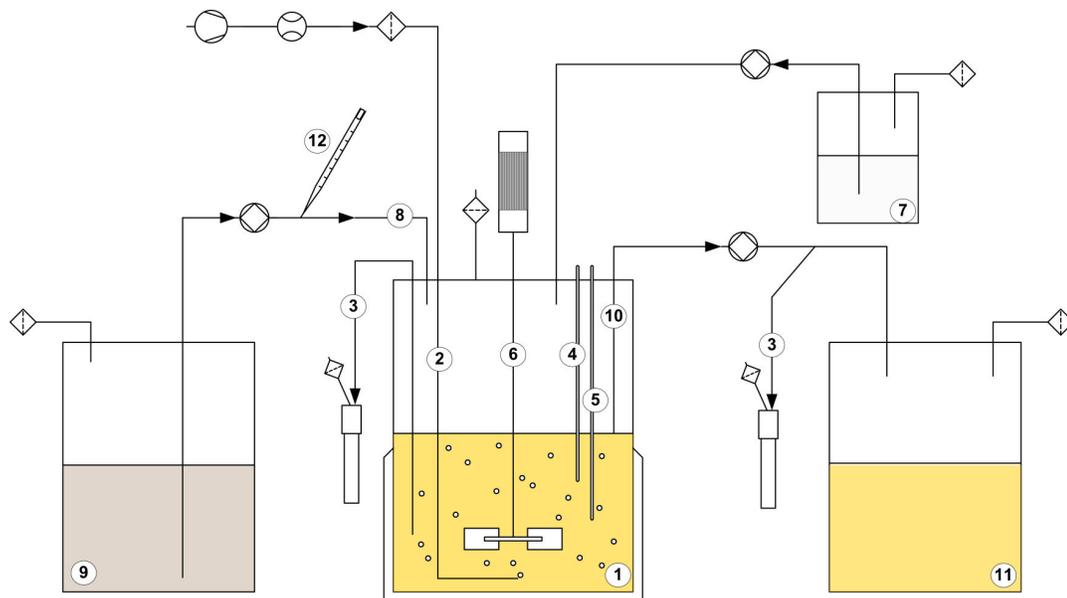


Figura 4.4: Disposição de linhas de entrada e saída entre biorreator e reservatórios utilizados em cultivo contínuo

1 – biorreator, 2 – sistema de borbulhamento de nitrogênio, 3 – amostragem, 4 – sensor de temperatura, 5 – sonda de pH, 6 – sistema de agitação, 7 – reservatório de NaOH 5M para controle de pH, 8 – linha de entrada de meio de alimentação, 9 – reservatório de meio de alimentação, 10 – linha de saída de meio fermentado, realizada através de um pescador, 11 – reservatório de caldo fermentado, 12 – pipeta para aferição da vazão de alimentação.

Os cultivos contínuos iniciaram-se com cultivos descontínuos (conforme item 4.2.4.2). Com o crescimento ainda em fase exponencial, deu-se início à adição de meio fresco e à retirada de meio fermentado. A amostragem ocorreu ao longo do tempo, sendo considerado como atingido o estado estacionário quando três amostras obtidas em diferentes intervalos de tempo apresentaram leituras de DO_{600} com desvio inferior a 10%. Como o volume de caldo no fermentador é pequeno e sua manutenção é realizada por meio de um pescador, a amostragem foi realizada na linha de saída de caldo fermentado.

Além dos parâmetros de análise de amostras empregadas nos cultivos descontínuos, também foram feitas microscopia para observações da morfologia celular e plaqueamentos periódicos das amostras em ágar sangue-BHI para avaliação de presença de contaminantes, mudanças fenotípicas das colônias e contagem de células viáveis.

4.2.6.1 Cultivo Contínuo com Meio Complexo

Para análise de produção de células e PS14 em diferentes velocidades de crescimento, foi conduzido um cultivo contínuo com meio complexo para meio do reator e da alimentação. Foram estudadas 4 vazões específicas de alimentação (D): 0,4, 0,8, 0,9 e 1,5 h^{-1} , sendo que em 1,5 h^{-1} , através de dados de cultivo descontínuo, estava prevista a lavagem do reator, através da qual foi feita a determinação de μ_{max} pelo método dinâmico (ver item 3.5.1.1). As vazões específicas de alimentação foram controladas através da vazão da bomba de alimentação.

4.2.6.2 Cultivo Contínuo com Meio Quimicamente Definido

A fim de determinar o efeito da glicose sobre crescimento e produção de PS14 em excesso/limitação de carbono, um cultivo contínuo com CDMv6 foi conduzido com $D = 0,5 h^{-1}$ e com concentração de glicose variável na alimentação

(2,5 a 30 g/L). Neste caso, foram utilizadas 2 linhas de alimentação: uma para alimentação de CDMv6 sem glicose em sua composição, concentrado em 1,25 vezes e vazão de alimentação de 400 mL/h; e outra para alimentação de soluções de glicose concentradas em 5 vezes para o desejado dentro do reator e vazão de alimentação de 100 mL/h.

Em um experimento similar para determinação da concentração não limitante de colina e seu efeito sobre o metabolismo do pneumococo, utilizou-se o mesmo D de $0,5 \text{ h}^{-1}$, porém o CDMv6 foi adaptado para glicose a 20 g/L e concentração de colina variável na alimentação (5 a 500 mg/L).

E, por fim, para a determinação da influência da glutamina, utilizou-se CDMv6 adaptado para glicose 20 g/L e colina 25 mg/L, a mesma vazão específica de alimentação dos casos anteriores e concentração de glutamina variável na alimentação de (0,05 a 1 g/L).

4.2.7 Determinação de Variáveis de Cultivo

Concentração Celular: Para determinação da concentração celular durante o cultivo, procedeu-se a uma leitura direta da absorbância do caldo fermentado a 600 nm (DO_{600}) em espectrofotômetro U-1800 (Hitachi Ltd, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan). Quando necessário, para obter uma leitura de DO_{600} entre 0,1 e 0,5, a amostra foi diluída em solução NaCl 0,85%.

Relação massa seca e DO_{600} : de um cultivo descontínuo em fase exponencial de crescimento foram retirados 200 mL e a estes foi adicionado formol para 0,74% em concentração. Após 24 horas em repouso, a cultura fixada foi centrifugada a 12.857 g a 4 °C por 30 minutos, lavada com NaCl 0,85% e novamente centrifugada. O pellet foi ressuspendido para 1/20 do volume inicial com NaCl 0,85% e a partir deste foram feitas diversas diluições em NaCl 0,85%, com uma faixa de DO_{600} de 0,1 a 10, em tubos previamente secos e de massa conhecida. Cada tubo com 10 mL de suspensão foi centrifugado a 12.857 g por 15 minutos a 4 °C e, após o descarte do sobrenadante, foi seco em estufa de 60 °C por 72 horas antes de ser pesado. Após a determinação do peso e, por conseguinte, da concentração celular de cada

tubo, esta foi relacionada à respectiva DO_{600} , obtendo assim a curva de calibração utilizada em todas as fermentações.

Concentração de Células Viáveis: alíquotas do cultivo foram diluídas em série (fator de diluição de 10^1 a 10^8) e 20 μ L de cada diluição foram plaqueados em duplicata em meio Ágar-BHI Sangue. As placas foram então incubadas a 36,5 °C, em ambiente microaeróbio. Após 24 horas foi contado o número de unidades formadoras de colônia em pelo menos 2 diluições. A média do número de unidades formadoras de colônia (CFU) em 20 μ L foi então extrapolada para concentração de células viáveis por mL (CFU/mL).

Concentração de Glicose: quantificada por HPLC, no qual os sobrenadantes das amostras do cultivo foram diluídos a 1:10 em H_2SO_4 25 mM e 20 μ L de cada amostra foram injetados em coluna Aminex[®] HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, California, USA), com fase móvel H_2SO_4 5 mM, vazão de 0,6 mL/min e temperatura do forno 60 °C. A detecção se deu por índice de refração (RID) e os cromatogramas foram analisados pelo software Class VP versão 6.14 SP2 (Shimadzu).

Concentração de ácidos orgânicos: os sobrenadantes das amostras de cultivos foram quantificados por análise em HPLC, nas mesmas condições descritas para a glicose, porém tendo o UV (210 nm) como sistema de detecção.

Concentração de Aminoácidos (Aminograma): os sobrenadantes das amostras de cultivo foram analisados por HPLC pelo LADABio, UFSCar.

Concentração de PS14 livre (PS14_L): os sobrenadantes das amostras de cultivo foram analisados por ELISA de captura, conforme descrito no item 4.1.5.

Concentração de PS14 ligado às células (PS14_C): os *pellets* dos cultivos foram ressuspensos em 1/10 do volume original com tampão de lise (sacarose 20%, $MgSO_4$ 50 mM e Tris Base 50 mM, pH 7,4), aos quais foram adicionados 40 unidades de lisozima de clara de ovo (USB). Após incubação *overnight* a 37 °C sob agitação de extremo a extremo, centrifugou-se a 20.000 g por 20 minutos a 4 °C e os sobrenadantes da lise foram utilizados para quantificação de PS14 por ELISA de captura, conforme descrito no item 4.1.5. No caso, o valor de concentração de PS14_C determinado foi dividido por 10.

4.2.8 Determinação de Parâmetros

As equações para determinação dos parâmetros em cultivos descontínuos e contínuos estão no quadro que segue (Quadro 4.1).

Quadro 4.1: Equações para cálculo de parâmetros de cultivos descontínuo e contínuo

Parâmetro	Cultivo Descontínuo	Cultivo Contínuo
Fator de conversão glicose a células	$Y_{x/s} = \frac{X - X_o}{S_o - S} \text{ [g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}]$	$Y_{x/s} = \frac{X}{S_a - S} \text{ [g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}]$
Fator de conversão glicose a PS14	$Y_{ps/s} = \frac{PS - PS_o}{S_o - S} \text{ [mg}_{\text{PS14}}/\text{g}_{\text{glicose}}]$	$Y_{ps/s} = \frac{PS}{S_a - S} \text{ [mg}_{\text{PS14}}/\text{g}_{\text{glicose}}]$
Fator de conversão glicose a lactato	$Y_{l/s} = \frac{L - L_o}{S_o - S} \text{ [g}_{\text{lactato}}/\text{g}_{\text{glicose}}]$	$Y_{l/s} = \frac{L}{S_a - S} \text{ [g}_{\text{lactato}}/\text{g}_{\text{glicose}}]$
Fator de conversão glicose a acetato	$Y_{a/s} = \frac{A - A_o}{S_o - S} \text{ [g}_{\text{acetato}}/\text{g}_{\text{glicose}}]$	$Y_{a/s} = \frac{A}{S_a - S} \text{ [g}_{\text{acetato}}/\text{g}_{\text{glicose}}]$
Produtividade em células	$Q_x = \frac{X - X_o}{t - t_o} \text{ [g}_{\text{célula}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$	$Q_x = D \cdot X \text{ [g}_{\text{célula}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
Produtividade em PS14	$Q_{ps} = \frac{PS - PS_o}{t - t_o} \text{ [mg}_{\text{PS14}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$	$Q_{ps} = D \cdot PS \text{ [mg}_{\text{PS14}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
Produtividade em lactato	$Q_l = \frac{L - L_o}{t - t_o} \text{ [g}_{\text{lactato}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$	$Q_l = D \cdot L \text{ [g}_{\text{lactato}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
Produtividade em acetato	$Q_a = \frac{A - A_o}{t - t_o} \text{ [g}_{\text{acetato}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$	$Q_a = D \cdot A \text{ [g}_{\text{acetato}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
Fator de Conversão de PS14 sobre células	$Y_{ps/x} = \frac{PS - PS_o}{X - X_o} \text{ [mg}_{\text{PS14}}/\text{g}_{\text{célula}}]$	$Y_{ps/x} = \frac{PS}{X} \text{ [mg}_{\text{PS14}}/\text{g}_{\text{célula}}]$
Fator de Conversão de lactato sobre células	$Y_{l/x} = \frac{L - L_o}{X - X_o} \text{ [g}_{\text{lactato}}/\text{g}_{\text{célula}}]$	$Y_{l/x} = \frac{L}{X} \text{ [g}_{\text{lactato}}/\text{g}_{\text{célula}}]$
Fator de Conversão de acetato sobre células	$Y_{a/x} = \frac{A - A_o}{X - X_o} \text{ [g}_{\text{acetato}}/\text{g}_{\text{célula}}]$	$Y_{a/x} = \frac{A}{X} \text{ [g}_{\text{acetato}}/\text{g}_{\text{célula}}]$
Velocidade específica de formação de PS14	-	$\mu_{ps} = \frac{PS \cdot D}{X} \text{ [mg}_{\text{PS14}} \cdot \text{g}_{\text{célula}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
Velocidade específica de formação de lactato	-	$\mu_l = \frac{L \cdot D}{X} \text{ [g}_{\text{lactato}} \cdot \text{g}_{\text{célula}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
Velocidade específica de formação de acetato	-	$\mu_a = \frac{A \cdot D}{X} \text{ [g}_{\text{acetato}} \cdot \text{g}_{\text{célula}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
Velocidade específica de consumo de glicose	-	$\mu_s = \frac{D}{Y_{x/s}} \text{ [g}_{\text{glicose}} \cdot \text{g}_{\text{célula}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
Consumo de glicose	$\% \text{ consumo} = \frac{S_o - S}{S_o} \cdot 100$	$\% \text{ consumo} = \frac{S_a - S}{S_a} \cdot 100$

NOTA: o indicador “o” refere-se a concentração da variável no início do cultivo, enquanto que o indicador “a” é a concentração da variável no meio de alimentação.

Para efeitos de cálculo em cultivo descontínuo levou-se em consideração o intervalo de tempo imediatamente antes da fase estacionária de crescimento ou da lise celular. Para este tipo de cultivo ainda foram calculados:

- *Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max})*: plotando-se $\ln(X/X_0)$ versus tempo (h), onde X é a DO_{600} em um dado tempo t e X_0 a DO_{600} no instante inicial do cultivo (t_0), o coeficiente angular é igual a μ_{max} .

Para o cultivo contínuo foi utilizado o valor médio da variável desejada em ao menos 3 pontos de coleta em estado estacionário. Para este tipo de cultivo ainda foram calculados:

- *Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max})*: através do método dinâmico de determinação de μ_{max} (ver item 3.5.1.1).
- *Constante de formação associada ao crescimento (α) constante de formação e não associada ao crescimento (β)*: calculadas pela relação de Luedeking e Piret (1959). plotando-se μ_p do produto em questão versus D, o coeficiente angular será igual a α e o linear será β .
- *Coeficiente de manutenção (m_s) e fator de conversão verdadeiro (Y_G)*: calculados pela relação de Pirt (1965). Plotando-se μ_s versus D, o coeficiente angular será igual a $1/Y_G$ e o linear será m_s .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTABELECIMENTO DO MÉTODO E PROTOCOLO DE QUANTIFICAÇÃO DE PS14

5.1.1 Fenol-Sulfúrico

O método fenol-sulfúrico foi adaptado de forma a melhorar sua reprodutibilidade: ao invés de banho de água fervente foi usado um banho de temperatura controlada para que não houvesse variação na taxa de hidrólise do PS14. O tempo de incubação a 90 °C foi fixado em 10 minutos, com base nos dados de hidrólise de PS14 ATCC a 100 µg/mL (Figura 5.1).

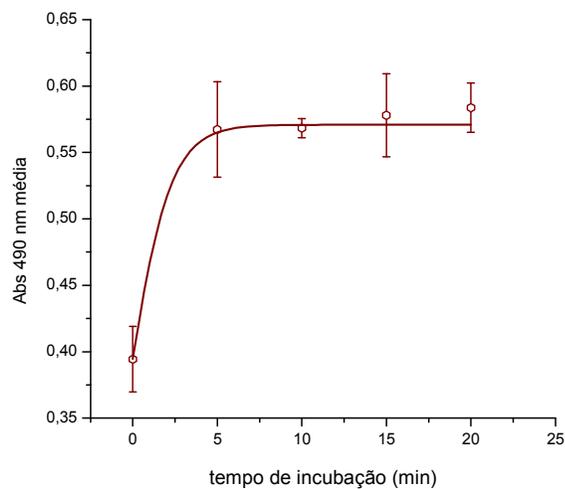


Figura 5.1: Efeito do tempo de incubação a 90 °C na detecção de PS14 ATCC a 100 µg/mL pelo método de fenol-sulfúrico

Dada a falta de reações colorimétricas simples e mais específicas, o método do fenol-sulfúrico ainda permanece como uma primeira opção para quantificação do PS14, carboidrato complexo. Entretanto, autores reportaram que este método é

altamente dependente de detalhes de manipulação e que a técnica é pouco reprodutível entre manipuladores (CUESTA et al., 2003).

A inadequação do método do fenol-sulfúrico foi observada na quantificação de PS14 de amostras dialisadas de cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 com meio complexo: baixa reprodutibilidade para as mesmas amostras quantificadas por um mesmo operador (Figura 5.2-A) e necessidade de extremo cuidado metodológico durante a manipulação para obter melhores resultados.

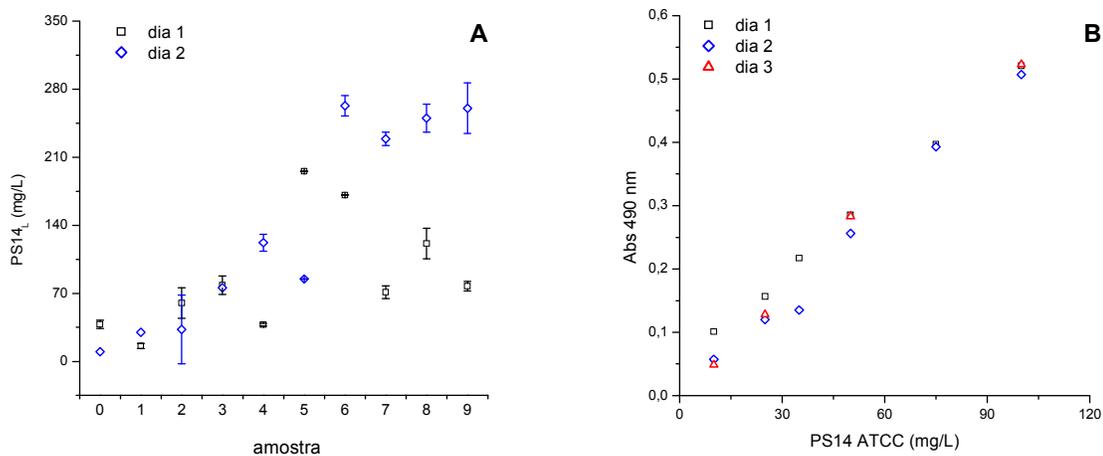


Figura 5.2: Variação diária em análise por fenol-sulfúrico na (A) quantificação de PS14 livre no sobrenadante (PS14_L) de amostras de cultura de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 2721, (B) curva padrão de PS14 ATCC

A baixa reprodutibilidade observada é relacionada à baixa especificidade do método, que detecta açúcares totais. Para o PS14, a N-acetil-glucosamina contribui minimamente para o desenvolvimento da cor no método do fenol-sulfúrico (SAHA e BREWER, 1994*, apud CUESTA et al., 2003), restando apenas glicose e galactose como compostos reativos. Estes açúcares são facilmente encontrados em várias estruturas e produtos celulares, além de estarem presentes no próprio meio.

* SAHA, S. K.; BREWER, C. F. Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr. Res.*, v. 254, p. 157-167, 1994.

Embora não-reprodutível para amostras de cultivo, o método do fenol-sulfúrico mostrou-se reprodutível para as curvas padrão de PS14 ATCC (Figura 5.2-B), sendo, portanto, melhor aplicado para amostras mais puras, como as do processo de purificação e, ainda assim para os últimos estágios, onde os contaminantes foram substancialmente reduzidos.

5.1.2 HPSEC

A cromatografia analítica de exclusão molecular em HPLC apresentou baixa sensibilidade, sendo possível detectar o PS14 apenas em quantidade igual ou superior a 1000 mg/L, concentração fora da faixa normalmente encontrada nos cultivos, que é de 1 a 300 mg/L. A amostra de PS14 ATCC a 2000 mg/L teve seu pico de eluição aos 34 minutos, o equivalente a 640 kDa em peso molecular e tempo de eluição total de quase 10 minutos (Figura 5.3).

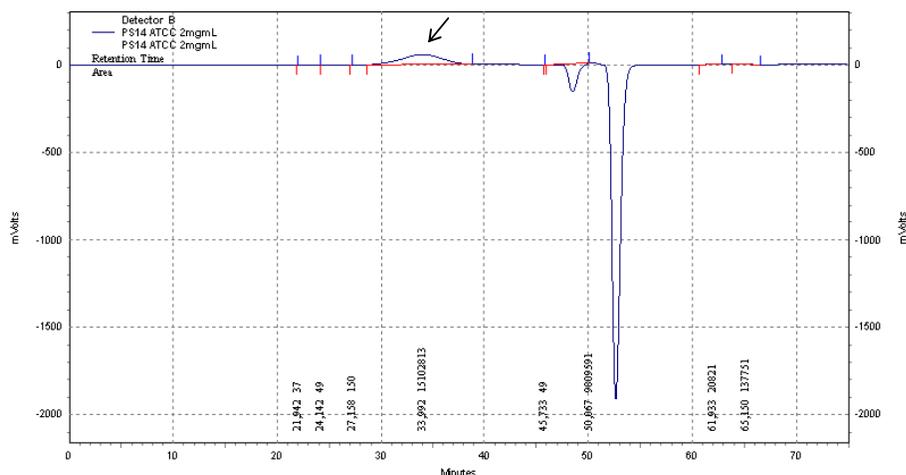


Figura 5.3: Perfil de eluição de PS14 ATCC a 2 mg/mL em colunas TSKGel GMPW_{XL} com detecção por índice de refração e solução de fosfato de sódio dibásico 10 mM e cloreto de sódio 0,15 M pH 7,2 como fase móvel

Para o sistema de HPSEC utilizado, o peso molecular do PS14 ATCC correspondeu a 640 kDa, similar ao observado por Bednar e Hennessey (1993), 753 kDa; o que indica que a coluna está apropriada para a faixa molecular do PS14.

Embora adequada para o peso molecular, houve baixa sensibilidade na detecção do PS14 por HPSEC e a cromatografia foi ainda pouco eficiente, com pico disperso. No trabalho de Bednar e Hennessey (1993), o PS14 foi detectado por índice de refração/viscosidade específica/*light scattering* em concentrações de até 200 mg/L, com tempo de eluição de cerca de 4 minutos; entretanto, outro tipo de coluna e fase móvel foram utilizadas. A eficiência do HPSEC poderia ser melhorada com alterações na composição da fase móvel, no fluxo e na temperatura, porém dificilmente alcançaria a sensibilidade necessária para quantificar o PS14 nas primeiras amostras de cultivo, que podem ter concentrações inferiores a 1 mg/L.

5.1.3 *Rocket* Imunoeletroforese

Não foi possível determinar a concentração de PS14 pela técnica de *rocket* imunoeletroforese descrita por Szu e Oravec (1982), pois não foi verificada a formação de precipitado antígeno-anticorpo, tampouco migração de PS14 no sentido do cátodo para as condições de tampão e concentração de soro testadas.

A técnica de *rocket* imunoeletroforese é muito utilizada para a quantificação de tipos individuais de polissacarídeos capsulares contidos na vacina polissacarídica. Normalmente é conduzida a pH 8,6 e ocorre migração do polissacarídeo capsular carregado negativamente no sentido do ânodo. Contudo, para polissacarídeos neutros, como o PS14, a técnica precisa ser adaptada para promover a reação de precipitação do polissacarídeo capsular com o anticorpo e sua migração. Algumas adaptações sugeridas na literatura são: uso de um derivado sulfonado do ácido fenilborônico como tampão de gel (ANHALT e YU, 1975) ou digestão parcial enzimática do PS14 com galactose oxidase (LEE e LIN, 1981), processos que geram carga negativa no polissacarídeo. Outra alternativa consiste na mudança no pH dos tampões de corrida e do gel (SZU e ORAVEC, 1982), que quando próximos a 5,0 promovem a migração do polissacarídeo para o cátodo.

A alternativa de mudança de pH dos tampões não foi bem sucedida para o sistema utilizado e as outras alternativas listadas não foram exploradas. Isto porque dada a ausência de formação de precipitado visível, o soro utilizado poderia estar com baixo título contra o PS14, visto que o PS14 é pouco imunogênico comparativamente a outros polissacarídeos capsulares (SCHNEERSON et al., 1992). Em um ELISA indireto para titulação do soro utilizado, foi verificado um título de apenas 900 contra PS14, razão que pode justificar a ausência de formação de precipitado para as concentrações testadas na *rocket* imunoeletroforese, inviabilizando o desenvolvimento da técnica com tal soro.

Adicionalmente, com o tratamento enzimático sugerido, é bastante provável que a especificidade de ligação do anticorpo ao PS14 hidrolisado seja menor do que ao PS14 nativo.

5.1.4 ELISA de Competição

O ELISA de competição se mostrou uma boa alternativa, porém susceptível à variações intralotes de PS14 ATCC (Figura 5.4). Dependendo das condições do lote, foi necessária a readequação das proporções de soro, antígeno na sensibilização e antígeno livre utilizadas, o que inviabilizou o método.

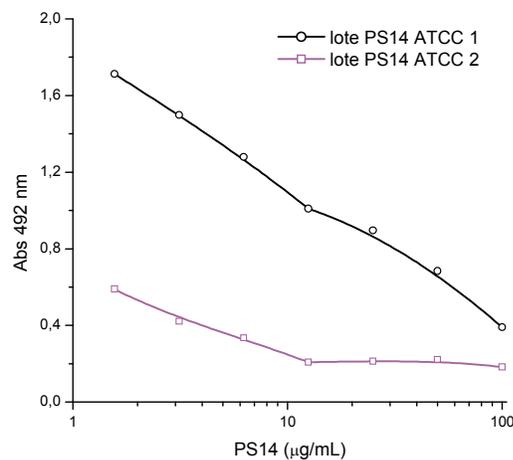


Figura 5.4: Diferenças na curva padrão de ELISA de Competição utilizando diferentes lotes de PS14 ATCC para etapas de sensibilização e de amostra

Ao contrário dos outros métodos citados, existem poucos trabalhos sobre o ELISA de competição com aplicação para a quantificação de polissacarídeos. Isto porque, segundo Howard e Kaser (2006), o ELISA competitivo é indicado para detecção de antígenos pequenos, pois é baseado em uma proporção muito definida entre antígeno e anticorpo. Isto pode explicar a variação observada na quantificação de PS14 entre os lotes de PS14 ATCC utilizados: se o lote apresenta um peso molecular maior em relação ao anterior (isto é, maior número de epítomos), é preciso adicionar mais anticorpo para equilibrar a relação antígeno:anticorpo. Isso também poderia refletir na quantificação de PS14 nas amostras de cultivo, que pode possuir peso molecular variável.

5.1.5 ELISA de Captura

O ELISA de captura, ao contrário do ELISA de competição, é bastante utilizado na quantificação de polissacarídeos capsulares. Entretanto, a maioria dos trabalhos foca na sua detecção como ferramenta de diagnóstico, através da análise de materiais corporais, como soro, urina e fluido espinhal (HARDING et al., 1979).

Dada sua alta sensibilidade, é um dos métodos em que o PS14 pode ser detectado em menores concentrações e com menor interferência, o que resulta em uma menor porcentagem de falsos positivos/negativos quando utilizado para fins de diagnóstico.

No ELISA de Captura, o soro com maior título contra o antígeno a ser quantificado é escolhido como anticorpo de captura, enquanto que o soro com menor título é selecionado como anticorpo secundário. Dentre os soros disponíveis, o soro comercial de coelho antiPS14 (título de 30.000, determinado de forma semelhante ao soro da cabra, no item 4.1.3) foi escolhido como anticorpo de captura e o soro da cabra (título de 900) foi escolhido como anticorpo secundário.

Para o melhoramento do protocolo de ELISA de captura com o objetivo de obter a máxima sensibilidade na quantificação de PS14 de amostras de cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 com o menor uso de reagentes, foi adotada a técnica de titulação em tabuleiro de xadrez (*chessboard titration* – CBT). (CROWTHER, 2009). Esta técnica consiste em variar um dos reagentes que se deseja analisar entre as

linhas da placa de ELISA e outro reagente entre as colunas. No caso, variou-se a concentração do anticorpo de captura entre as colunas e a concentração do anticorpo secundário entre as linhas, mantendo a concentração de PS14 ATCC excedente em 100 µg/mL e de anticorpo conjugado em 1:5.000. Os tempos de incubação foram respeitados conforme descrito no item 4.1.5. O anticorpo de captura foi diluído em tampão carbonato, os anticorpos secundário e conjugado foram diluídos em leite desnatado em pó a 10% em PBS (PBS-L10%) - solução bloqueadora para evitar ligações inespecíficas - e o PS14 foi diluído em PBS. O resultado do CBT é ilustrado na Figura 5.5.

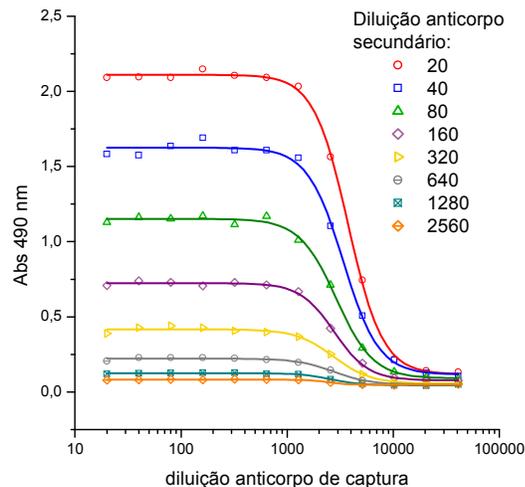


Figura 5.5: Curvas de titulação do anticorpo secundário (soro de cabra) em diferentes diluições, com relação ao anticorpo de captura (soro de coelho), com concentrações do antígeno (PS14 ATCC) e anticorpo conjugado constantes

A partir do CBT foi verificado que a concentração mínima de anticorpo de captura em que há saturação da placa foi de 1:1.000, e que a concentração de anticorpo secundário com boa leitura em absorvância ficou entre 1:40 e 1:80. Como esta concentração de anticorpo secundário é inviável para a realização de um grande número de ELISAs, e levando-se em conta o alto poder bloqueador de PBS-L10%, outras soluções de diluição de anticorpo secundário e conjugado foram testadas: leite desnatado em pó a 5% em PBS-T (PBS-T-L5%), albumina a 0,5% em PBS-T (PBS-T-BSA) e PBS-T. Para cada solução foi elaborada uma curva padrão de PS14 ATCC de 1 ng/mL a 100 µg/mL e as concentrações de anticorpo de

captura, secundário e conjugado foram fixadas em 1:1.000, 1:80 e 1:5.000, respectivamente.

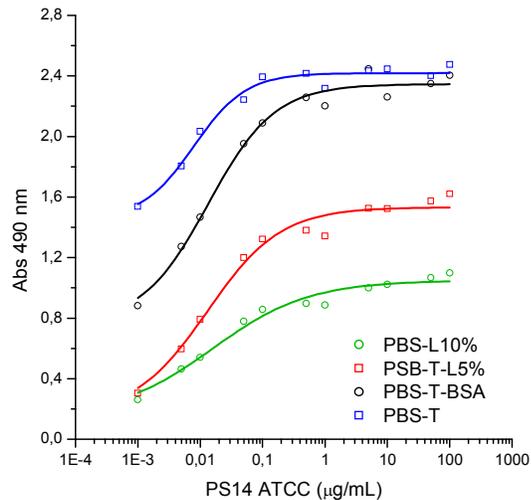


Figura 5.6: Efeito da solução de diluição de anticorpo secundário e anticorpo conjugado em ELISA de captura para quantificação de PS14

Pela Figura 5.6, é possível observar que o leite desnatado teve um grande efeito sobre a ligação dos anticorpos secundário e conjugado e que a solução de PBS-T-BSA foi a que apresentou melhores resultados para a quantificação de PS14. No entanto, a solução de PBS-T-BSA apresentou um elevado *background*⁷, provavelmente devido à alta concentração de anticorpo secundário (1:80).

Portanto, um novo ensaio foi conduzido para ajuste da concentração de anticorpo secundário diluído em PBS-T-BSA, tomando as concentrações de anticorpo de captura e conjugado em 1:1.000 e 1:5.000, respectivamente, e PS14 ATCC de 0,1 ng/mL a 10 µg/mL (Figura 5.7).

⁷ *background*: representa a parcela de reação inespecífica do método

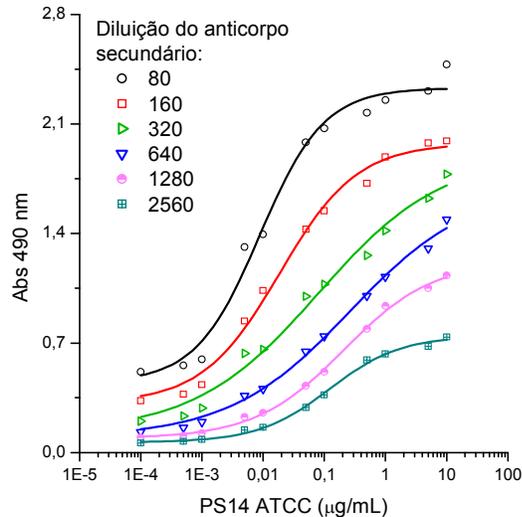


Figura 5.7: Curvas de titulação de PS14 ATCC para variadas concentrações de anticorpo secundário diluído em PBS-T-BSA em ELISA de captura

Dentre as diluições de anticorpo de secundário testadas, tomou-se a diluição de 1:200 como ideal, pois apresentaria *background* de aproximadamente 0,3 e titulação linear de PS14 de 1 ng/mL a 1 µg/mL. Deste modo foi definida a condição de maior sensibilidade e menor inespecificidade do ELISA de captura para quantificação de PS14: anticorpo de captura a 1:1.000 em tampão carbonato, PS14 em PBS, anticorpo secundário a 1:200 em PBS-T-BSA e anticorpo conjugado em 1:5.000 em PBS-T-BSA. Nestas condições, o método apresentou sensibilidade de 1 ng/mL de PS14, similar à observada na literatura: 1 a 1,56 ng/mL (HARDING et al., 1979; SCHAFFNER; MICHEL-HARDER; YEGINSOY, 1991).

O ELISA de captura desenvolvido foi o método mais adequado para quantificação de PS14, pois apresentou boa reprodutibilidade tanto para amostras analisadas em dias diferentes quanto para a curva padrão (Figura 5.8), além de apresentar boa faixa de detecção e sensibilidade.

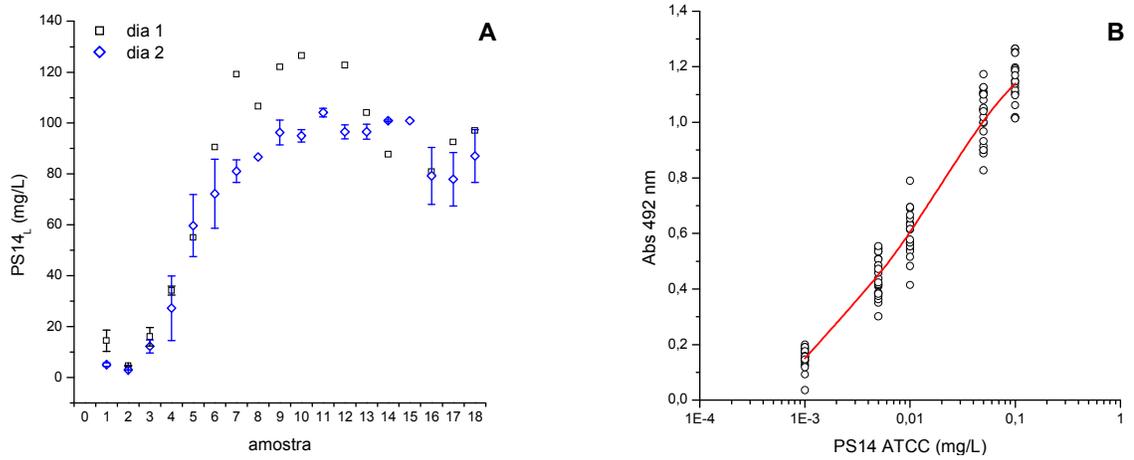


Figura 5.8: Variação diária em análise por ELISA de captura na (A) quantificação de PS14 livre no sobrenadante (PS14_L) de amostras de cultura de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287, (B) linearidade de 22 curvas padrão de PS14 ATCC

As dificuldades e limitações dos outros métodos não foram observadas no ELISA de captura, o que o tornou de melhor aplicabilidade na quantificação do PS14 em amostras de cultivo, conforme ilustra a Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Comparação entre cinco métodos testados para quantificação de PS14 em amostras de cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 14

	Fenol - Sulfúrico	HPSEC	Rocket Imunoelctroforese	ELISA de Competição	ELISA de Captura
Faixa de Leitura (µg/mL)	10 - 200	> 1000	nd	0,8 - 50	0,001 - 1
Interferentes	polissacarídeo C, riboses de DNA, açúcares do meio de cultura	nd	nenhum	nenhum	nenhum
Reprodutibilidade do padrão	sim	sim	nd	sim ^b	sim
Reprodutibilidade da amostra	não	nd	nd	sim	sim
Preparo da Amostra	diálise	filtração	nenhum	nenhum	nenhum
Volume mínimo necessário de amostra	1 mL	1 mL	5 µL	400 µL	50 µL
Tempo total de análise estimado por amostra^a	4 h	1,5 h	5 h	2 h	1 h
Vantagens	pouco custo, ideal para amostras puras	rapidez, informação do peso molecular e sua dispersão	especificidade	especificidade	especificidade, sensibilidade
Desvantagens	volume de amostra, diálise prévia da amostra, pouco específico, geração de resíduos	volume de amostra, sensibilidade	laborioso	custoso, número de etapas, geração de resíduos, necessidade de muita atenção e padronização	custoso, número de etapas, geração de resíduos, necessidade de muita atenção e padronização

^a referente ao tempo necessário para preparo de equipamento, soluções e amostras somado ao tempo reacional propriamente dito, dividido pelo número de amostras possíveis de análise por corrida

^b reprodutível para curvas feitas com um mesmo lote do padrão PS14 ATCC

* nd: não determinado

5.2 SELEÇÃO DA CEPA PRODUTORA

Na seleção da cepa produtora, quanto à produção de inóculo, os resultados de produção máxima em células, medida pela DO_{600} , μ_{max} e tempo de adaptação para variadas taxas de inoculação são apresentados na Tabela 5.2. O tempo de adaptação foi considerado como o tempo necessário para atingir DO_{600} de 0,1.

Tabela 5.2 - Produção de inóculo de 8 cepas de *S. pneumoniae* sorotipo 14 a partir do estoque congelado

Cepa	concentração de células viáveis do estoque (CFU/mL)	fração estoque congelado/meio inóculo (v/v)	fração estoque congelado/meio inóculo (CFU/mL)	tempo de adaptação (h)	DO_{600} máxima	μ_{max} (h^{-1})
1871	$6,25 \cdot 10^7$	0,01%	$6,25 \cdot 10^3$	>16	nd	nd
		0,02%	$1,25 \cdot 10^4$	>16	nd	nd
		0,04%	$2,50 \cdot 10^4$	11	3,13	0,84
2721	$2,38 \cdot 10^7$	0,01%	$2,38 \cdot 10^3$	13	nd	nd
		0,02%	$4,75 \cdot 10^3$	11	3,17	0,87
		0,04%	$9,50 \cdot 10^3$	10	3,28	0,9
ST941/00	$1,00 \cdot 10^{10}$	0,002%	$2,00 \cdot 10^5$	> 14	nd	nd
		0,005%	$5,00 \cdot 10^5$	9	2,72	0,85
		0,010%	$1,00 \cdot 10^6$	6	2,88	0,8
ST731/03	$1,35 \cdot 10^8$	0,02%	$2,70 \cdot 10^4$	> 14	nd	nd
		0,04%	$5,40 \cdot 10^4$	> 14	nd	nd
		0,10%	$1,35 \cdot 10^5$	7	1,53	0,51
		0,20%	$2,70 \cdot 10^5$	6	1,75	0,58
ST322/08	$4,70 \cdot 10^9$	0,02%	$9,40 \cdot 10^5$	>13	nd	nd
		0,10%	$4,70 \cdot 10^6$	11	nd	nd
		0,20%	$9,40 \cdot 10^6$	3	2,12	0,57
ST334/08	$3,20 \cdot 10^{10}$	0,005%	$1,60 \cdot 10^6$	>13	nd	nd
		0,010%	$3,20 \cdot 10^6$	>13	nd	nd
		0,020%	$6,40 \cdot 10^6$	9	2,61	0,85
ST366/08	$2,93 \cdot 10^9$	0,02%	$5,85 \cdot 10^5$	> 14	nd	nd
		0,04%	$1,17 \cdot 10^6$	> 14	nd	nd
		0,10%	$2,93 \cdot 10^6$	> 14	nd	nd
		0,20%	$5,85 \cdot 10^6$	10	2,26	0,7
		0,40%	$1,17 \cdot 10^7$	9	2,19	0,79
5287	$3,50 \cdot 10^9$	0,010%	$3,50 \cdot 10^5$	7	1,8	0,7
		0,020%	$7,00 \cdot 10^5$	4	1,86	0,66
		0,040%	$1,40 \cdot 10^6$	3	1,51	0,7
		0,100%	$3,50 \cdot 10^6$	2	1,7	0,59
		0,200%	$7,00 \cdot 10^6$	1	1,66	0,62

* nd: não determinado

As cepas diferiram muito com relação ao tempo de adaptação para as variadas taxas de inóculo testadas. Até mesmo cepas com baixa concentração de células viáveis no lote congelado, como no caso de 1871 e 2721, apresentaram tempos de adaptação inferiores a cepas com maior concentração de células viáveis no lote congelado, como ST332/08, ST334/08 e ST366/08. A capacidade adaptativa ao meio imposto foi então a principal característica discriminante entre as cepas.

Recentemente foi verificado que os sorotipos pneumocócicos diferem com relação à duração de sua fase lag durante crescimento *in vitro* (BÄTTIG et al., 2006). Foi também visto que fases adaptativas mais longas são vistas preferencialmente em sorotipos com potencial para doenças invasivas (BÄTTIG et al., 2006); ou seja, onde a expressão da cápsula é maior. Em tese, cepas com maior fase lag devem possuir maior quantidade de polissacarídeo capsular associado às células.

Duas cepas em particular apresentaram baixo desempenho na produção de inóculo: ST731/03 e ST322/08. Estas apresentaram menor μ_{\max} no meio de inóculo e perfil instável de crescimento. Deste modo, somente as cepas ST334/08, ST366/08, ST941/00, 1871, 2721 e 5287, cujo desempenho foi considerado satisfatório para a produção de inóculo, foram testadas para produção de PS14 livre no sobrenadante (PS14_L) em frascos com 500 mL de meio complexo (Figura 5.9). A produção de PS14_L foi escolhida como parâmetro de comparação entre as cepas porque do ponto de vista de produção de PS14 como antígeno vacinal, é desejável que a maior produção de PS14 esteja concentrada no sobrenadante da cultura, a fim de facilitar seu processo de purificação e, assim, reduzir o custo da vacina.

Com relação à cinética de crescimento em frascos de 500 mL, exceto pela cepa ST366/08, todas apresentaram DO₆₀₀ máxima comparável, em torno de 3,1, e μ_{\max} próximos: de 0,76 a 0,86 h⁻¹. Somente as cepas 5287 e 2721 apresentaram uma fase estacionária de longa duração e com fraca lise para o período observado (Figura 5.9), o que é desejável para uma boa cepa produtora e para o cultivo contínuo.

Assim como relatado por MacLeod e Krauss (1950), foi observada uma produção diversificada de PS14_L entre as cepas testadas. A maior produtora foi a cepa 5287, alcançando 75 mg/L ao final do cultivo. A cepa 2721 foi a segunda melhor produtora (55 mg/L) enquanto que a cepa 941 foi a pior produtora, com concentração de PS14 menor que 1 mg/L. As demais cepas ficaram entre 5 e 15 mg/L, conforme mostra a Figura 5.9. Esta diferença pode ser embasada em alguns

conceitos: número de cópias dos genes da cápsula; virulência - que determina a quantidade de polissacarídeo capsular livre no meio; e idade do lote, entre outros.

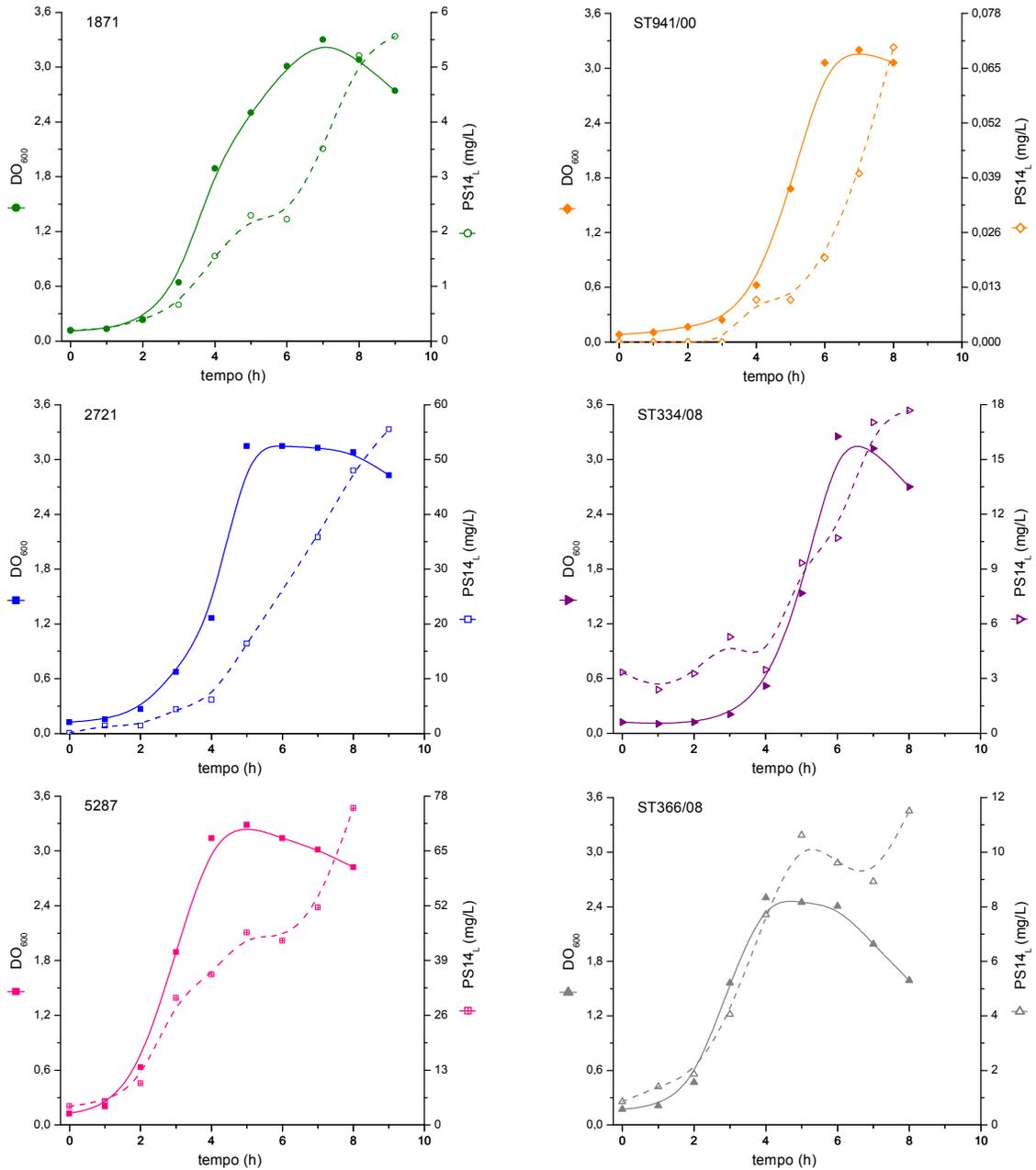


Figura 5.9: Curvas de crescimento e de produção de ($PS14_L$) de 6 cepas de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cultivadas em frascos com meio complexo

Foi também observado que a maior concentração de PS14_L ocorre a partir do ponto máximo de concentração celular, onde o cultivo avança para o estado estacionário ou de lise. Isto também foi observado por Massaldi et al. (2010) para *S. pneumoniae* 14 em meio semissintético e por Gonçalves et al. (2002) para o sorotipo 23F em meio complexo. É de conhecimento que quando a cultura de pneumococo atinge o estado estacionário a atuação de enzimas autolíticas aumenta e, uma vez atuando na hidrólise da peptidoglicana, ocorre liberação do polissacarídeo capsular para o meio de cultura.

Dado que na maioria das cepas houve aumento na concentração de PS14_L a partir do ponto em que se atingiu a DO₆₀₀ máxima (Figura 5.9), as cepas foram então comparadas quanto à produção de PS14 por unidade de DO₆₀₀ imediatamente antes da fase estacionária ou de lise (Figura 5.10).

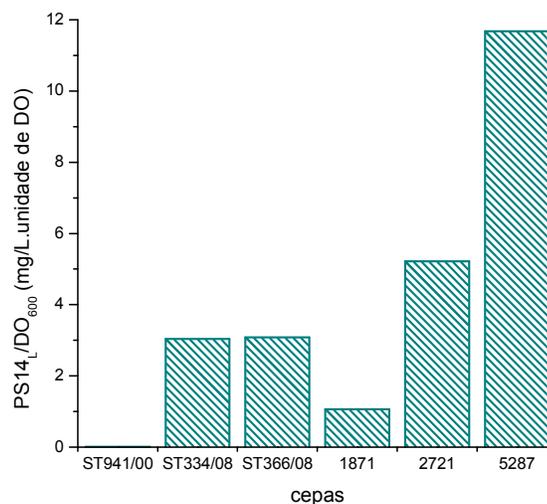


Figura 5.10: Relação PS14_L por unidade de DO₆₀₀ no ponto máximo de crescimento celular de 6 cepas de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cultivadas em frasco com meio complexo

Dentre as cepas testadas, as três melhores produtoras foram respectivamente: 5287, 2721 e ST334/08 (Figura 5.9). Um resultado semelhante foi obtido por Massaldi et al. (2010), onde a quantificação do PS14 livre no sobrenadante foi realizada em titulação por látex (5287 com título de 1/128 a 1/256, seguida de 2721 com título de 1/64 e de 1871, com título de 1/32).

Logo, baseando-se nos resultados apresentados neste item, pode-se inferir que a melhor cepa produtora, 5287, escolhida para os estudos seguintes de metabolismo e cinética de produção de PS14 em biorreator, é uma cepa pouco virulenta e invasiva, por possuir menor fase lag e alta produção de PS14_L.

5.3 COMPARAÇÃO ENTRE CULTIVOS DESCONTÍNUOS COM CDMV10 E MEIO COMPLEXO

As curvas de crescimento, de consumo de glicose e de formação de produtos em cultivo descontínuo com meio complexo são apresentadas na Figura 5.11 e na Figura 5.12.

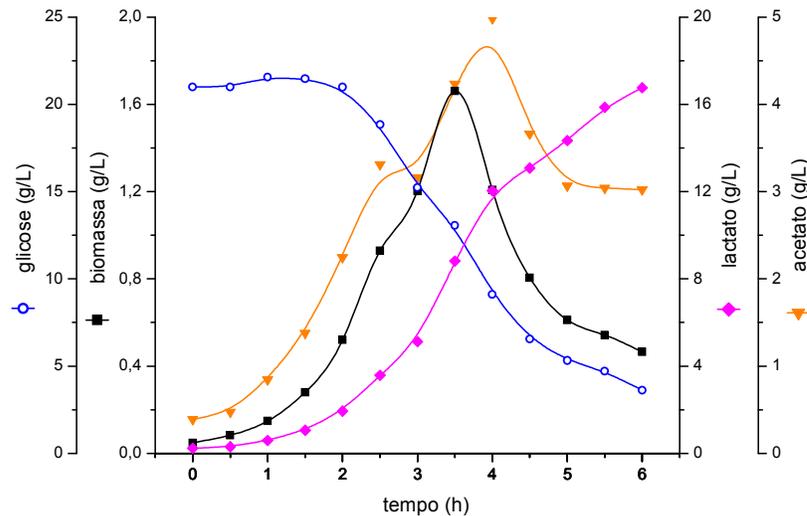


Figura 5.11: Perfis de crescimento celular, concentração de glicose e ácidos orgânicos por *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em cultivo descontínuo com meio complexo

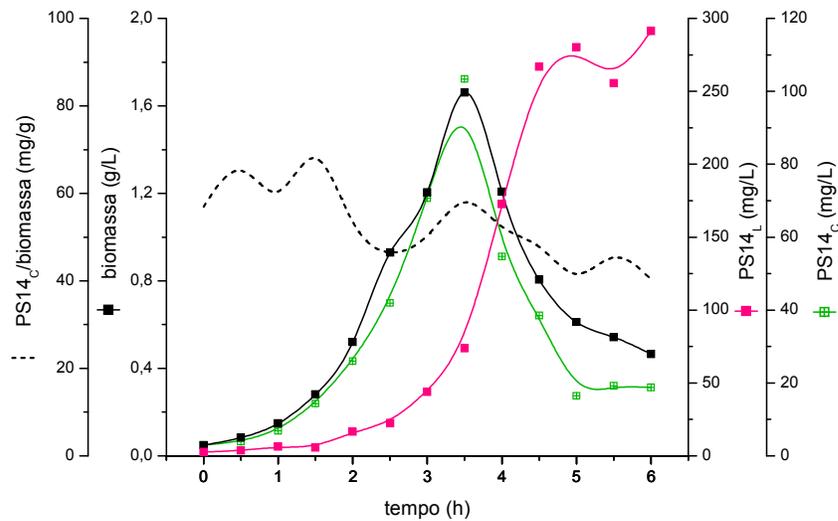


Figura 5.12: Perfis de crescimento celular, concentração de PS14_L e PS14_C e da relação PS14_C por biomassa de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em cultivo descontínuo com meio complexo

Para o meio complexo, o crescimento celular ocorreu em fase exponencial entre 0 e 2,5 horas, com um valor de μ_{\max} correspondente de $1,19 \text{ h}^{-1}$. Com 3,5 horas de cultivo foi obtido o ponto máximo de concentração celular: DO₆₀₀ de 4,5, correspondente a 1,66 g/L em massa seca (ver equação na Figura 5.13). Logo após ocorreu uma forte lise celular, o que reduziu a concentração de células em 72%.

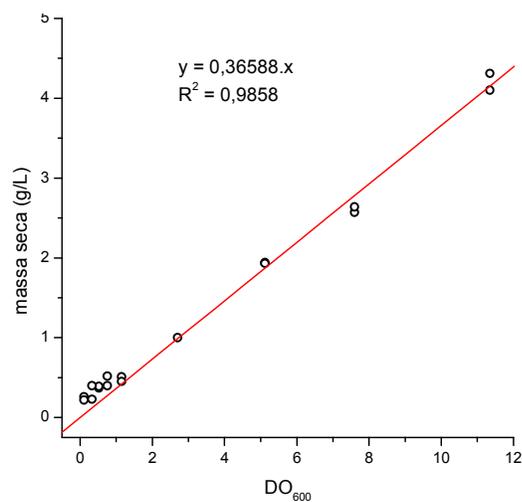


Figura 5.13: Curva de relação entre massa seca e DO₆₀₀ para *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 obtida de massa celular em crescimento exponencial em cultivo descontínuo com meio complexo

Este fato não foi observado em cultivos em frascos (ver Figura 5.9), onde a DO_{600} se manteve aproximadamente estável por até 3 horas após a máxima concentração celular ser atingida.

Como acontece com outras bactérias lácticas, houve produção majoritária de lactato com presença secundária de acetato. A produção de acetato acompanhou de certa forma o crescimento celular, enquanto que o lactato teve sua produção parcialmente associada ao crescimento celular, havendo formação do mesmo na fase de lise. Ao fim do cultivo, mais de 80% da glicose foi consumida.

Para PS14_L e PS14_C, atingiram-se as respectivas concentrações de 73,67 mg/L e 103,04 mg/L no ponto de máxima concentração celular. O perfil produção de PS14_C seguiu a concentração celular, o que sugere que o PS14_C seja um produto associado ao crescimento. Já o PS14_L obteve um perfil de produção que acompanhou o crescimento para o período anterior à lise celular. Com o início da lise foi observado um aumento em 134,21% da concentração de PS14_L, chegando a 295,49% ao final do cultivo. Esta quantidade é proveniente das células, pois após a fase de lise houve diminuição em 81,80% da concentração de PS14_C. A produção de PS14 em relação às células foi de 44,08 mg/g para PS14_L e 62,18 mg/g para PS14_C.

Para o cultivo descontínuo com CDMv10, as curvas de crescimento, consumo de glicose e formação de produtos estão na Figura 5.14 e na Figura 5.15.

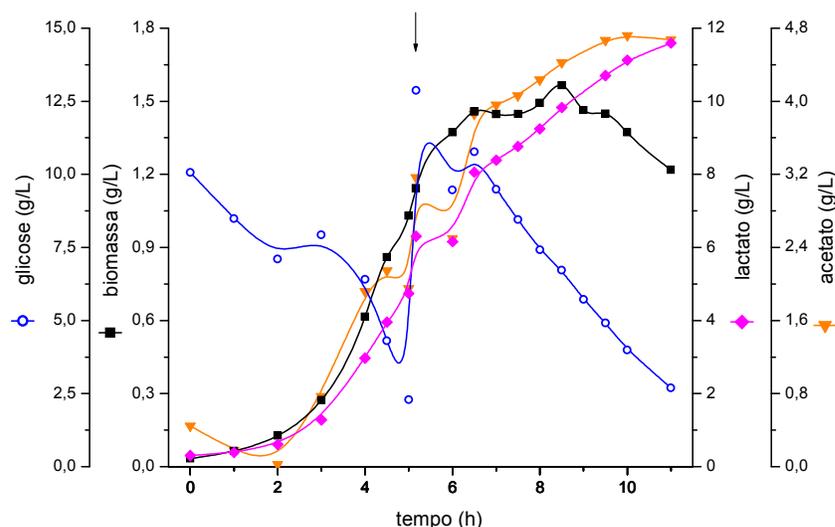


Figura 5.14: Perfis de crescimento celular, concentração de glicose e ácidos orgânicos de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em cultivo descontínuo com CDMv10. A seta indica o momento da adição de 15 g de glicose.

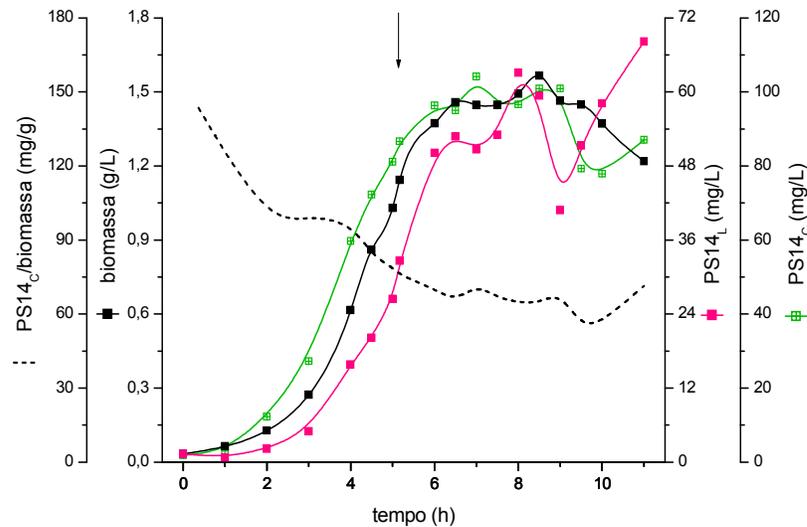


Figura 5.15: Perfis de crescimento celular, concentração de PS14_L e PS14_C e da relação PS14_C por biomassa de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em cultivo descontínuo com CDMv10
A seta indica o momento da adição de 15 g de glicose.

Para CDMv10, o crescimento celular ocorreu em fase exponencial entre 0 e 4,5 horas, com um valor de μ_{\max} de $0,73 \text{ h}^{-1}$. Com 6,5 horas de cultivo foi obtido o ponto máximo de concentração celular: DO_{600} de 3,98, correspondente a 1,45 g/L em massa seca (ver equação da Figura 5.13). Ao contrário do observado para o meio complexo, não ocorreu lise após a concentração máxima de células ser alcançada, e a densidade óptica se manteve estável por mais 3 horas.

Novamente houve produção majoritária de lactato e secundária de acetato, mantendo os perfis de produção descritos para o meio complexo. Ambos os meios apresentaram constantes de formação de lactato e acetato muito semelhantes. Como a concentração inicial de glicose no CDMv10 foi de 10 g/L, 2 vezes menor que no meio complexo, foi necessário um pulso de glicose (para alcançar novamente 10 g/L) para que o crescimento pudesse prosseguir. Ao final do cultivo 78,24% da glicose disponibilizada foi consumida.

A produção de PS14_L e de PS14_C em CDMv10 acompanharam a concentração de células ao longo de todo o cultivo, alcançando a concentração de 52,77 mg/L e 94,99 mg/L, respectivamente, no início da fase estacionária de crescimento. A produção de PS14_C em relação às células foi de 63,09 mg/g e de 36,09 mg/g para PS14_L.

É de conhecimento que a composição do meio pode afetar significativamente a concentração de produto, o rendimento, a produtividade volumétrica e a facilidade e o custo da operação de purificação do produto (KENNEDY e KROUSE, 1999). Com o meio complexo e CDMv10 foram observadas algumas diferenças com relação a estes itens, explicadas a seguir.

A lise celular foi o fator que marcadamente diferenciou o crescimento de *S. pneumoniae* sorotipo 14 nos meios complexo e CDMv10. A forte autólise do sorotipo 14 já foi observada por alguns autores em meio BHI suplementado (KANCLERSKI e MÖLLBY, 1987) e sob tratamento com penicilina e vancomicina, comparativamente a outros sorotipos (FERNEBRO et al., 2004).

A autólise após a máxima concentração celular ser atingida não foi observada nos experimentos preliminares em frascos com meio complexo, onde não há controle de pH. Este fenômeno também foi observado por Massaldi et al. (2010) no cultivo *S. pneumoniae* sorotipo 14 em meio semissintético: nos frascos onde o pH foi mantido em torno de 6,0 ocorreu autólise da cultura, enquanto que nos frascos onde não houve controle de pH a cultura se manteve estável e sem lise. No cultivo em frascos sem controle de pH é comumente observada uma produção menor de ácidos orgânicos, enquanto que com controle de pH há maior produção de ácidos. Acredita-se que a grande formação de ácidos orgânicos da cultura colabore para o início do processo de autólise (MORRISON, 2000), o que pode explicar a lise celular observada quando há controle de pH e não observada quando a cultura cresce sem o controle de pH para o meio complexo.

A formação de ácidos orgânicos, entretanto, parece não ter sido determinante de autólise no cultivo com CDMv10. Com este meio, ocorreu formação de ácidos na cultura em biorreator com controle de pH, mas a autólise não foi observada. Isto indica que, além da formação de ácidos na cultura, outro fator deve estar envolvido no desencadeamento da cascata de autólise.

O fenômeno autolítico decorre principalmente da atividade da LytA – uma amidase envolvida no processo de divisão celular – que é expressa constitutivamente. A atuação de autolisinas por sua vez está ligada ao *quorum sensing* (QS), que quando desencadeado promove grande queda na concentração de células da cultura de pneumococo.

Sugere-se que a presença do polissacarídeo capsular ligado à parede celular possa bloquear ou desacelerar a translocação da LytA para a parede celular, através

de um "bloqueio estérico" que impede que esta enzima tenha acesso ao seu substrato na peptidoglicana ou a resíduos de colina na parede celular, o que é essencial para o ataque hidrolítico de tal enzima (FERNEBRO et al., 2004).

Em uma análise mais profunda, no cultivo com CDMv10 foi observado que a razão PS14_C por biomassa ao longo do cultivo (no início com cerca de 150 mg/g e manutenção em torno de 60 mg/g ao final do cultivo) foi maior que em meio complexo (no início com aproximadamente 60 mg/g, atingindo cerca de 40 mg/g ao final do cultivo). No cultivo com CDMv10, no qual as células apresentaram maior quantidade de PS14 associado às células (Figura 5.15), por tal hipótese, haveria menor atividade autolítica causada pelo menor acesso da LytA à parede celular.

Já com meio complexo foi observada uma menor razão de PS14_C por biomassa desde o início do cultivo (Figura 5.12), o que significa que existiu menor quantidade de polissacarídeo capsular por célula e, por hipótese, maior possibilidade de acesso da LytA à parede celular.

O bloqueio da atividade autolítica em CDMv10 ou sua promoção em meio complexo foram também constatados na diferença nos arranjos celulares para estes dois meios, ainda em fase exponencial. Por microscopia foi observado que com meio complexo houve maior quantidade de células arranjadas em pares ou em pequenas cadeias, indicando a ação de autolisinas, enquanto que com CDMv10 houve predominância de grandes cadeias, ou seja, pouca atividade de autolisinas (Figura 5.16).

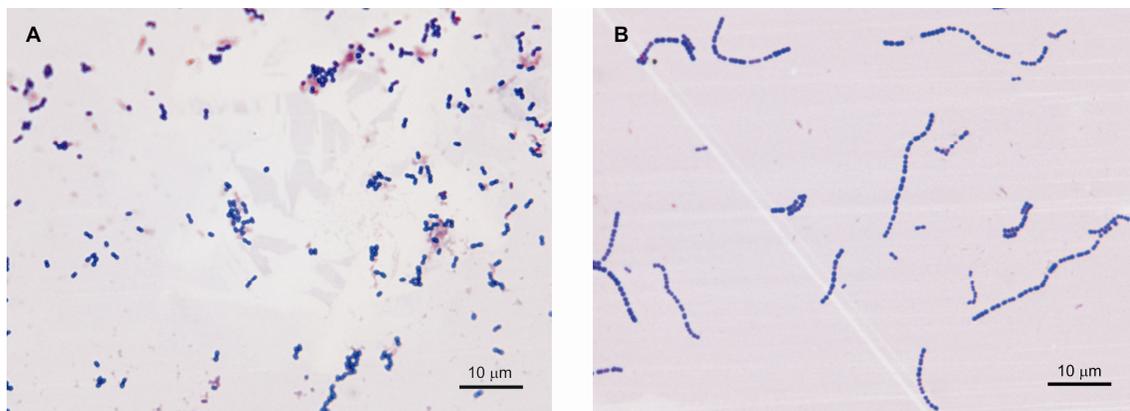


Figura 5.16: Microscopia óptica (aumento de 1000x) de células em fase exponencial de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em cultivo descontínuo com meios (A) complexo (B) CDMv10

Em ambos os cultivos, a hipótese de que o polissacarídeo capsular associado às células pode bloquear a atividade da autolisina, se adequou: em CDM onde houve maior razão PS14_C/biomassa não foi observada autólise e arranjos celulares de longas cadeias; enquanto que, com meio complexo, onde razão PS14_C/biomassa foi menor, notou-se forte autólise e arranjos celulares com poucas células.

Portanto, pode-se sugerir que a autólise da cultura dependeu tanto da formação de ácidos orgânicos na cultura quanto da quantidade de polissacarídeo capsular ligado às células, que resultam na atividade de autolisinas ligadas ao QS.

A formação de ácidos orgânicos na cultura, para cultivo em ambos os meios, foi atribuída principalmente à produção de lactato e secundariamente de acetato. A produção do lactato continuou mesmo quando as culturas alcançaram o estado estacionário/lise, o que reforça que a produção de lactato é a principal via de reciclo do NADH (ver Figura 3.6).

Os fatores de conversão de lactato e acetato sobre células e o consumo de glicose foram similares entre os dois cultivos, entretanto, no cultivo com meio complexo foram observados maiores valores de fator de conversão de glicose para a produção de células, lactato, acetato e PS14 (Tabela 5.3). Acredita-se que, neste meio, outras fontes possam entrar no metabolismo energético e de carbono, mascarando assim o rendimento real de produção de células e produtos sobre a glicose. No meio complexo há oligossacarídeos provenientes do extrato de levedura e há cerca de 7 vezes mais aminoácidos que o CDMv10, e estes, uma vez presentes em excesso, poderiam ser convertidos a moléculas do metabolismo central. A alanina e serina, por exemplo, podem ser degradadas diretamente à piruvato (KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES - KEGG, 2009).

Além disso, o fator de conversão de lactato sobre a glicose com meio complexo é de 1,02, muito próximo ao máximo teórico que é de 1 - para cada 1 mol de glicose (180 g/mol) consumida são produzidos 2 mols de lactato (90 g/mol) - o que indica que, para a formação da biomassa e de produtos, outras fontes além da glicose estão sendo utilizadas como fonte de carbono e energia.

Tabela 5.3 - Comparação entre cultivos descontínuos de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em meio complexo e CDMv10

Parâmetro	Meio Complexo ^a	CDMv10 ^b
Duração da fase exponencial (h)	2,5	4,5
μ_{\max} (h ⁻¹) ^c	1,19	0,73
X_{\max} (g/L)	1,66	1,45
PS14 _L max (mg/L)	73,67	52,77
PS14 _C max (mg/L)	103,04	94,99
$Y_{x/s}$ (g _{célula} /g _{glicose})	0,19	0,14
$Y_{ps_L/s}$ (mg _{PS14L} /g _{glicose})	8,43	5,21
$Y_{ps_C/s}$ (mg _{PS14C} /g _{glicose})	11,89	9,11
$Y_{l/s}$ (g _{lactato} /g _{glicose})	1,02	0,78
$Y_{a/s}$ (g _{acetato} /g _{glicose})	0,45	0,35
$Y_{ps_L/x}$ (mg _{PS14L} /g _{célula})	44,08	36,09
$Y_{ps_C/x}$ (mg _{PS14C} /g _{célula})	62,18	63,09
$Y_{l/x}$ (g _{lactato} /g _{célula})	5,32	5,44
$Y_{a/x}$ (g _{acetato} /g _{célula})	2,38	2,39
Q_x (g _{células} .L ⁻¹ .h ⁻¹)	1,26	0,60
Q_{ps_L} (mg _{PS14L} .L ⁻¹ .h ⁻¹)	20,31	7,91
Q_{ps_C} (mg _{PS14C} .L ⁻¹ .h ⁻¹)	28,65	13,83
Q_l (g _{lactato} .L ⁻¹ .h ⁻¹)	2,45	1,19
Q_a (g _{acetato} .L ⁻¹ .h ⁻¹)	1,10	0,52
% consumo de glicose	39,23	43,03

^a intervalo considerado: 0 a 3,5 h, antes da lise celular

^b intervalo considerado: 0 a 6,5 h, antes da fase estacionária de crescimento

^c intervalo considerado: duração da fase exponencial (descrita no texto)

Ambos os meios obtiveram máximos de concentração celular similares: 1,66 g/L para meio complexo e 1,45 g/L para CDMv10. Entretanto, este apresentou um valor inferior de μ_{\max} (0,73 h⁻¹ contra 1,19 h⁻¹), o que era esperado, já que neste meio há menor concentração de aminoácidos, que podem ser fonte extra de carbono e energia, como explicado anteriormente.

Conforme ilustrado na Figura 3.5, a produção da unidade repetitiva do PS14 é dependente da disponibilidade de precursores do metabolismo central. Portanto, faz sentido que seu perfil de produção antes do evento de lise, tanto para PS14_C e PS14_L, acompanhem o crescimento celular, observado tanto para meio complexo quanto para meio definido.

Para ambos os meios os fatores de conversão de PS14_C por biomassa foram similares, que indica que o CDMv10 e o meio complexo possuem potencial equivalente na produção do PS14. A produção de PS14 livre no sobrenadante para ambos os meios foi menor do que a observada por Gonçalves et al. (2002) e Carmo (2010), que são 240 mg/L de PS do sorotipo 23F e 400 mg/L de PS do sorotipo 6B, respectivamente, em cultivos descontínuos com pulso de glicose e amônio.

De modo geral, o meio complexo apresentou maior produção de PS14 e células em menor tempo do que o CDMv10. É um meio mais barato e de fácil preparo, todavia a variação entre lotes de reagentes pode alterar a produtividade. Já no cultivo com CDMv10 não houve lise bacteriana e os componentes do meio são de menor complexidade, o que daria maior vantagem ao CDMv10 em termos de processos de purificação de PS14. Como desvantagem, é um meio de preparo laborioso e é muito custoso.

Apesar da cinética diferente, o CDMv10 apresentou formação de células e PS14 comparável ao meio complexo, possuindo assim aplicabilidade para os estudos de metabolismo em cultivo contínuo.

5.4 ANÁLISE DE VITAMINAS ESSENCIAIS PARA CRESCIMENTO

Um dos cuidados no experimento de determinação de vitaminas essenciais foi o preparo do inóculo, a fim de evitar o carreamento de micronutrientes. Como foi observado que na ausência individual de ácido pantotênico o crescimento celular em comparação com o controle foi afetado em 62,67% (Figura 5.17 - omissão 3/controlado 11), pode-se concluir que a centrifugação da cultura do inóculo e sua lavagem foi suficiente para remover as vitaminas residuais presentes no meio complexo antes de semear para o CDMv10 ou CDM com omissão de uma ou mais vitaminas. A omissão individual da nicotinamida teve um menor impacto sobre o crescimento (24,88%, Figura 5.17 - omissão 2/controlado 11) provavelmente devido à presença do β -NAD, já que este tem nicotinamida em sua composição (Figura 5.17).

Também foi testada a omissão simultânea de piridoxamina e piridoxal, porque estas formas se interconvertem, e de ácido p-aminobenzóico e ácido fólico, já que o ácido p-aminobenzóico é precursor do ácido fólico. Não foi observada a necessidade

de nenhum destes cofatores para o crescimento celular (Figura 5.17 - omissões 12 e 13/controlre 14).

Portanto, somente nicotinamida e ácido pantotênico seriam essenciais para o crescimento em frascos, definindo então um novo meio, no qual apenas nicotinamida e ácido pantotênico seriam fonte de vitaminas, chamado então de CDMv2. A necessidade de somente 2 vitaminas nos cultivos em frasco foi comprovada quando o CDMv2 foi comparado ao CDMv10 (Figura 5.17 - omissão 15/controlre 16).

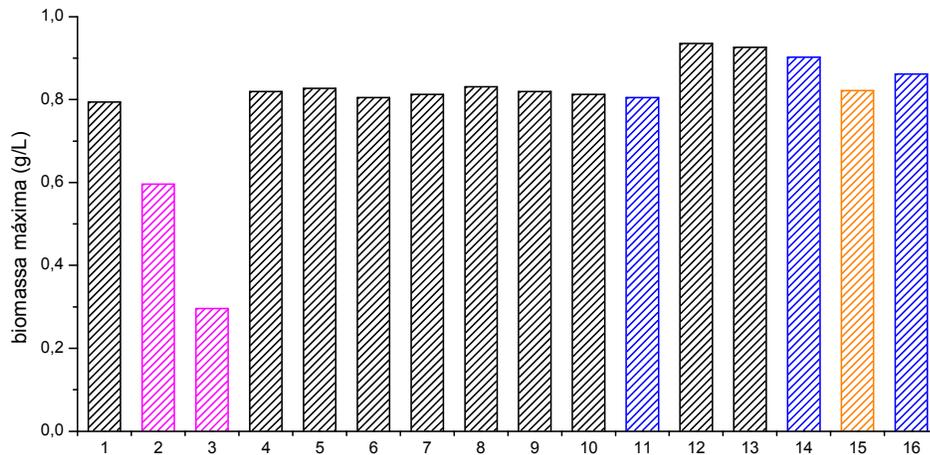


Figura 5.17: Influência da omissão de vitaminas/cofatores sob o crescimento celular máximo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em frascos com CDM
 Omissões: **1** - Riboflavina; **2** - Nicotinamida; **3** - Ácido pantotênico; **4** - Tiamina; **5** - Ácido p-aminobenzóico; **6** - Biotina; **7** - Ácido fólico; **8** - Piridoxamina; **9** - Piridoxal; **10** - β -NAD; **11** - Nenhuma, controle 1 (CDMv10); **12** - Piridoxamina e piridoxal; **13** - Ácido p-Aminobenzóico e ácido fólico; **14** - Nenhuma, controle 2 (CDMv10); **15** - Todas as vitaminas, exceto nicotinamida e ácido pantotênico (CDMv2); **16** - Nenhuma, controle 3 (CDMv10).

Apesar de a presença de nicotinamida e ácido pantotênico ser suficiente para obter crescimento celular semelhante ao meio com 10 vitaminas em frascos, em biorreator, através do pulso das vitaminas omitidas, ficou comprovado que são necessárias mais do que 2 vitaminas/cofatores para assegurar bom crescimento celular (Figura 5.18).

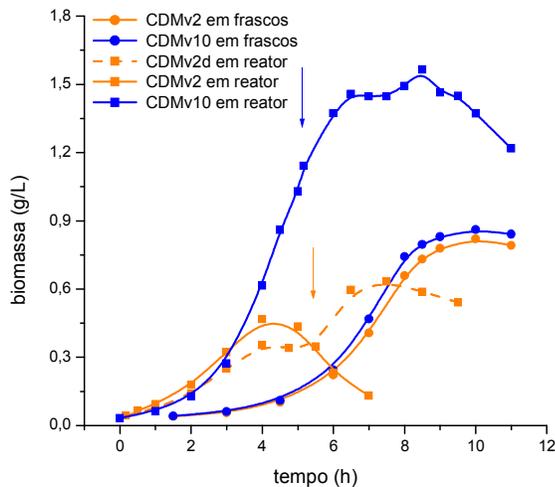


Figura 5.18: Crescimento de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em frascos (●) e em biorreator (■). Laranja: CDMv2, azul: CDMv10

A seta laranja indica o momento do pulso contendo as vitaminas/cofatores omitidos enquanto que a seta azul indica o momento do pulso de 15 g de glicose.

O desempenho para crescimento celular em CDMv2 em biorreator foi nitidamente inferior ao obtido em frascos, contrário ao comumente observado para cepas de *S. pneumoniae* cultivadas em nosso laboratório, onde cultivos em biorreator promovem maior crescimento que cultivos em frascos. Esta baixa concentração celular foi observada mesmo quando o meio foi dobrado para nicotinamida e ácido pantotênico (CDMv2d) e aumentou somente quando foi dado um pulso contendo as oito vitaminas omitidas, a fim de obter a mesma concentração de vitaminas de CDMv10. Comparativamente, uma fase de adaptação foi observada nos ensaios em frascos, mas não nos ensaios em biorreator. Além disso, a concentração celular máxima alcançada em biorreator com meio CDMv10 foi aproximadamente 2 vezes maior que a obtida em frascos (Figura 5.18).

Com relação à produção de PS14_L, esta não foi favorecida nos cultivos com limitação de vitaminas (CDMv2), mantendo seu rendimento em aproximadamente 30 mg/g_{célula}.

Em uma análise cuidadosa das vias metabólicas do *S. pneumoniae* (KEGG, 2009), foi verificado que as vitaminas mais comumente requeridas pelo pneumococo como cofatores enzimáticos são: nicotinamida, ácido pantotênico, tiamina, riboflavina, biotina e piridoxal. Em um cultivo em biorreator com estas seis vitaminas (meio denominado de CDMv6), foi observado um comportamento semelhante ao CDMv10 para a maioria dos parâmetros avaliados (Figura 5.19 e Tabela 5.4).

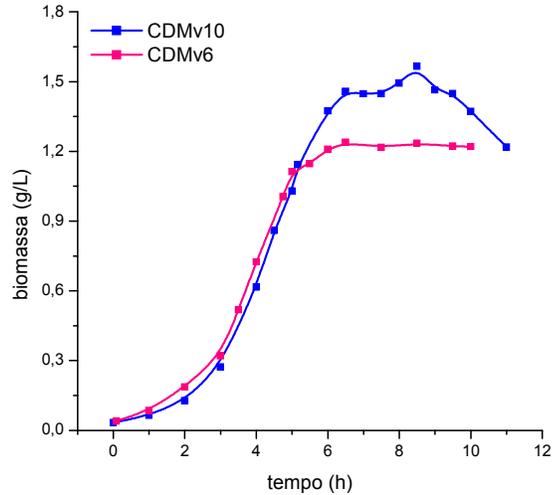


Figura 5.19: Comparação do crescimento celular de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator com meio quimicamente definido contendo 10 vitaminas (CDMv10) e 6 vitaminas (CDMv6)

Tabela 5.4 - Comparação entre cultivos descontínuos de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em CDMv10 e CDMv6

Parâmetro	CDMv10*	CDMv6*
Duração da fase exponencial (h)	4,5	4,5
μ_{\max} (h^{-1}) ^a	0,73	0,73
X_{\max} (g/L)	1,45	1,24
PS14 _L max (mg/L)	52,77	45,00
PS14 _C max (mg/L)	94,99	84,22
$Y_{x/s}$ (g células/g glicose)	0,14	0,14
$Y_{\text{ps}_L/s}$ (mg PS14L/g glicose)	5,21	5,11
$Y_{\text{ps}_C/s}$ (mg PS14C/g glicose)	9,11	8,42
$Y_{l/s}$ (g lactato/g glicose)	0,78	0,86
$Y_{a/s}$ (g acetato/g glicose)	0,35	0,13
$Y_{\text{ps}_L/x}$ (mg PS14L/g célula)	36,09	36,94
$Y_{\text{ps}_C/x}$ (mg PS14C/g célula)	63,09	65,45
$Y_{l/x}$ (g lactato/g célula)	5,44	6,24
$Y_{a/x}$ (g acetato/g célula)	2,39	0,86
Q_x (g célula ⁻¹ .h ⁻¹)	0,60	0,51
Q_{ps_L} (mg PS14L.L ⁻¹ .h ⁻¹)	7,91	6,90
Q_{ps_C} (mg PS14C.L ⁻¹ .h ⁻¹)	13,83	12,22
Q_l (g lactato.L ⁻¹ .h ⁻¹)	1,19	1,27
Q_a (g acetato.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,52	0,15
% consumo de glicose	43,03	27,99

* intervalo considerado para ambos: 0 a 6,5 h, antes da fase estacionária de crescimento

^a intervalo considerado: duração da fase exponencial: 0 a 4,5 h

O cultivo em biorreator com CDMv6 em relação ao CDMv10 obteve o mesmo valor de μ_{\max} e valores de produtividade muito próximos. Os fatores de conversão de biomassa, lactato, PS14_L e PS14_C sobre glicose e os fatores de conversão de PS14_L e PS14_C sobre biomassa também foram semelhantes. Houve divergência somente no consumo de glicose, que foi 34,95% menor, nos fatores de conversão de acetato sobre biomassa e acetato sobre glicose e na produtividade de acetato, que foram 3 vezes menores que no cultivo com CDMv10. Ainda não está claro se essas diferenças estariam relacionadas à composição do meio ou a problemas na análise da concentração de acetato e/ou na amostragem.

O mesmo fenômeno de diferença de requerimento de vitaminas entre frasco e biorreator foi observado por Costantino et al. (2009) para estreptococo do grupo B, mas permaneceu sem justificativa. O metabolismo do pneumococo tem a capacidade ser alterado de homolático restrito para heterolático de acordo com a disponibilidade de oxigênio (TANIAI et al., 2008). Analogamente, uma pequena quantidade de oxigênio dissolvido remanescente nos frascos, além da presença de CO₂, poderia alterar toda a rede de biossíntese de vitaminas e conseqüentemente seus requerimentos. Na via de biossíntese de riboflavina, por exemplo, há formação de formiato, que reforça o metabolismo heterolático, e necessidade da própria riboflavina como cofator enzimático. Na rota metabólica do piridoxal, há dependência de intermediários da via das pentoses fosfato e de glutamina. Além disso, a interconversão de piridoxal a piridoxamina é dependente de oxigênio. Já na biossíntese da biotina e da tiamina, reações de carboxilação estão presentes para a formação de intermediários. No frasco, como não há controle de pH, há maior tendência de o bicarbonato do meio se manter na forma de HCO₃⁻; ao contrário do que é observado no reator, em que se apresenta na forma de CO₂ que é retirado pelo borbulhamento com nitrogênio gasoso. Adicionalmente, tiamina e piridoxal são cofatores enzimáticos recíprocos em suas rotas biossintéticas (KEGG, 2009).

Em cultivo em frascos, embora incitado um ambiente de anaerobiose, permanece ainda uma concentração de oxigênio residual, o que poderia diferenciar toda a rota de síntese de vitaminas e cofatores em relação ao cultivo em biorreator, ambiente de total anaerobiose. Portanto, embora trabalhoso, é aconselhável que estudos de metabolismo e requerimentos nutricionais para *S. pneumoniae* sejam realizados em biorreator.

5.5 CULTIVOS CONTÍNUOS

5.5.1 Efeito da Vazão Específica de Alimentação

Nos cultivos descontínuos verificou-se que a produção de PS14 parece ser associada ao crescimento. O cultivo contínuo fornece, através da variação da vazão específica de alimentação (D), uma noção exata sobre a cinética de formação de produto. Em um cultivo contínuo com meio complexo, de limitação indefinida, no qual foi variada a vazão específica de alimentação, os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.20 e na Figura 5.21 e sumarizados na Tabela 5.5.

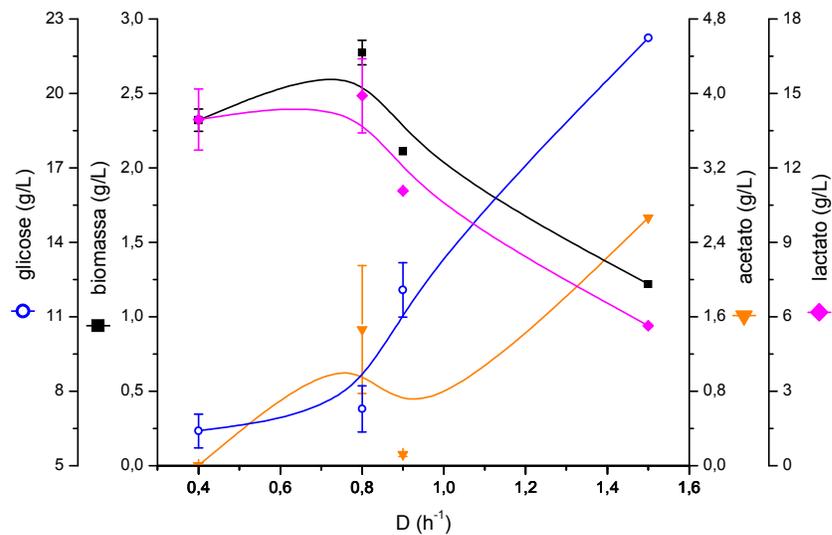


Figura 5.20: Efeito da vazão específica de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de lactato, acetato e glicose residual em cultivo contínuo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 com meio complexo

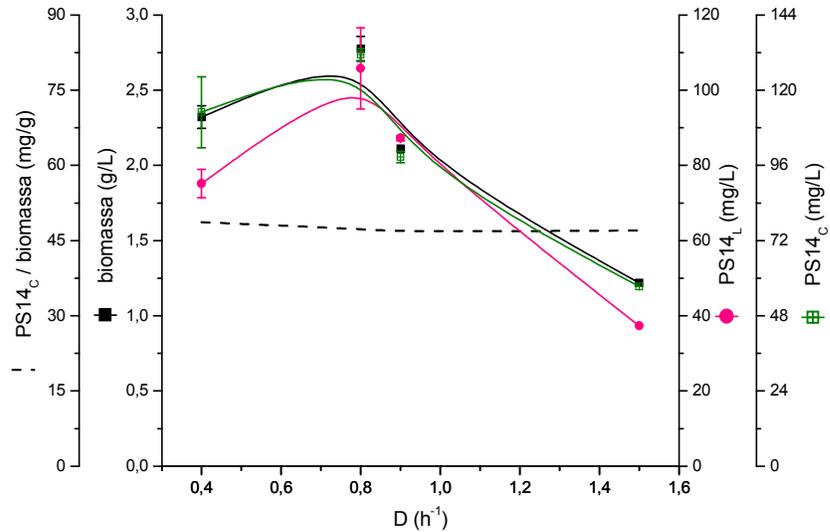


Figura 5.21: Efeito da vazão específica de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de PS14_L e PS14_C e relação PS14_C por biomassa em cultivo contínuo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 com meio complexo

A formação de biomassa não se manteve constante entre os valores de D testados, havendo uma pequena oscilação em $D = 0,8 \text{ h}^{-1}$. Foi observado que em $D = 0,4 \text{ h}^{-1}$ houve necessidade de mais tempos de residência para se atingir o estado estacionário. Além disso, dada a alta densidade celular, as medidas de DO_{600} são mais susceptíveis a erros. Em $D = 0,9 \text{ h}^{-1}$, o sistema estava operando próximo ao D_c , e em $D = 1,5 \text{ h}^{-1}$ houve lavagem do biorreator, através do qual foi determinado o valor de μ_{\max} pelo método dinâmico. Pela Figura 5.22 e segundo a Eq. 1.11 (pág. 55), na qual o coeficiente angular é correspondente à $\mu_{\max} - D$, o valor de μ_{\max} encontrado foi de $1,22 \text{ h}^{-1}$, muito próximo ao encontrado em cultivo descontínuo com meio complexo (item 5.3): $1,19 \text{ h}^{-1}$.

Tabela 5.5 - Parâmetros de cultivo contínuo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em meio complexo para as velocidades específicas de alimentação testadas

Parâmetro	D (h ⁻¹)		
	0,4	0,8	0,9
biomassa (g/L)	2,32	2,77	2,11
glicose residual (g/L)	6,40	7,28	12,08
PS14 _L (mg/L)	75,19	105,82	87,25
PS14 _C (mg/L)	112,99	131,41	98,69
lactato (g/L)	13,96	14,91	11,08
acetato (g/L)	0,002	1,46	0,120
Y _{x/s} (g _{célula} /g _{glicose})	0,14	0,17	0,19
Y _{ps_L/s} (mg _{PS14L} /g _{glicose})	4,53	6,73	7,99
Y _{ps_C/s} (mg _{PS14C} /g _{glicose})	6,81	8,36	9,04
Y _{l/s} (g _{lactato} /g _{glicose})	0,84	0,95	1,01
Y _{a/s} (g _{acetato} /g _{glicose})	0,00	0,09	0,011
Y _{ps_L/x} (mg _{PS14L} /g _{célula})	32,39	38,13	41,33
Y _{ps_C/x} (mg _{PS14C} /g _{célula})	48,67	47,35	46,75
Y _{l/x} (g _{lactato} /g _{célula})	6,01	5,37	5,25
Y _{a/x} (g _{acetato} /g _{célula})	0,001	0,53	0,057
% consumo de glicose	72,18	68,31	47,46
Q _x (g _{células} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,93	2,22	1,90
Q _{ps_L} (mg _{PS14L} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	30,07	84,66	78,53
Q _{ps_C} (mg _{PS14C} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	45,2	105,1	88,8
Q _l (g _{lactato} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	5,58	11,93	9,97
Q _a (g _{acetato} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,00	1,17	0,11
μ _{ps_L} (mg _{PS14L} ·g _{célula} ⁻¹ ·h ⁻¹)	12,96	30,50	37,20
μ _{ps_C} (mg _{PS14C} ·g _{célula} ⁻¹ ·h ⁻¹)	19,47	37,88	42,07
μ _l (g _{lactato} ·g _{célula} ⁻¹ ·h ⁻¹)	2,40	4,30	4,72
μ _a (g _{acetato} ·g _{célula} ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,00	0,42	0,05
μ _s (g _{glicose} ·g _{célula} ⁻¹ ·h ⁻¹)	2,86	4,53	4,65

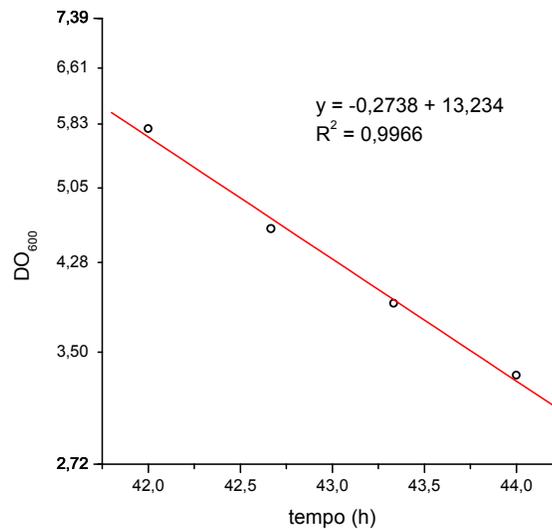


Figura 5.22: Determinação dinâmica de μ_{\max} de cultivo contínuo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em $D = 1,5 \text{ h}^{-1}$ com meio complexo

O consumo da glicose diminuiu com o aumento de D , mas os fatores de conversão de células, $PS14_L$, $PS14_C$, lactato e acetato sobre glicose aumentaram, indicando maior eficiência na destinação da glicose para os produtos de interesse quando a velocidade específica de crescimento é maior. Através da relação de μ_s com μ (Figura 5.23) foram determinados os valores de coeficiente de manutenção (m_s) e fator de conversão verdadeiro (Y_G) para *S. pneumoniae* sorotipo 14 em meio complexo: $1,39 \text{ g}_{\text{glicose}} \cdot \text{g}_{\text{célula}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $0,27 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}$, respectivamente.

De acordo com Sinclair e Kristiansen (1987)* apud Don e Shoparwe (2010) o coeficiente de manutenção representa o gasto energético para repor componentes celulares, transferir nutrientes e produtos para dentro/fora da célula, promover mobilidade e ajuste das osmolaridade das células. O valor de m_s pode variar de 0,02 a $4 \text{ g}_{\text{substrato}} \cdot \text{g}_{\text{célula}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ dependendo das condições ambientais da célula e de sua taxa de crescimento. Em cultivos descontínuos de *S. zooepidemicus*, por exemplo, foram encontrados valores de m_s e de Y_G de $0,51 \text{ g}_{\text{glicose}} \cdot \text{g}_{\text{célula}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $0,22 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ para glicose inicial de 20 g/L, e de $1,56 \text{ g}_{\text{glicose}} \cdot \text{g}_{\text{célula}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $0,37 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ para glicose inicial de 40 g/L (DON e SHOPARWE, 2010).

*SINCLAIR, C. G.; KRISTIANSEN, B. **Fermentation Kinetics and Modeling**. Milton Keynes, Inglaterra: Open University Press, 1987. 156 p.

O alto valor de m_s encontrado para *S. pneumoniae* pode explicar o crescimento relativamente baixo deste micro-organismo quando cultivado com baixa concentração de glicose, como será mostrado adiante.

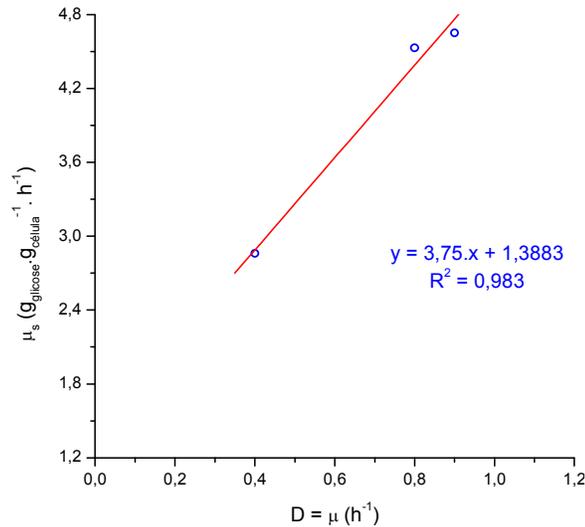


Figura 5.23: Relação de μ_s com as vazões específicas de alimentações testadas em cultivo contínuo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 com meio complexo

Do mesmo modo que observado nos cultivos descontínuos, as produções de PS14_L e PS14_C seguiram a concentração de células, característica cinética de produto associado ao crescimento, o que faz sentido já que tanto para a síntese de biomassa quanto para PS14 há utilização de precursores do metabolismo central. As relações entre μ e μ_p (Figura 5.24-A), nas quais o melhor ajuste linear eliminou o coeficiente linear, β , que representa a parcela de produção independente do crescimento, confirmou então que a produção de PS14_L e PS14_C é associada ao crescimento. Desta relação se obtêm os valores de α_{ps_L} e α_{ps_C} , que foram de 38,17 e 47,18 mg/g_{célula}, respectivamente.

Para o lactato (Figura 5.24-B), o perfil verificado foi de produto parcialmente associado ao metabolismo com α_l de 4,67 g_{lactato}/g_{célula} e β_l de 0,54 g_{lactato} · g_{célula}⁻¹ · h⁻¹. O mesmo perfil de produto parcialmente associado foi observado para a formação de lactato por *Lactobacillus delbrueckii* em cultivo descontínuo, com α_l de 2,16 g_{lactato}/g_{célula} e β_l de 0,53 g_{lactato} · g_{célula}⁻¹ · h⁻¹. (LUEDEKING e PIRET, 1959).

Não foi possível encontrar uma relação linear de μ e μ_p para a produção de acetato.

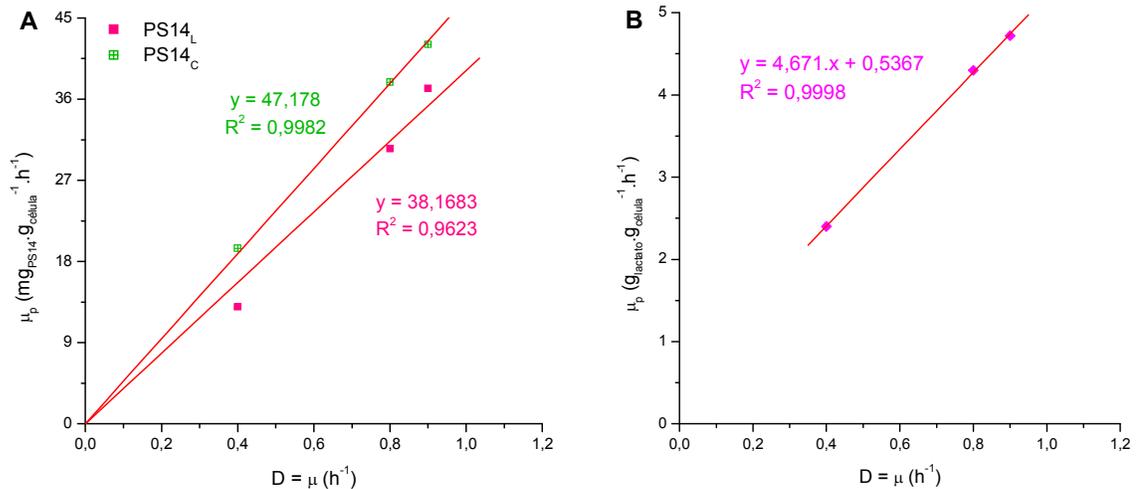


Figura 5.24: Relação de μ_p com as vazões específicas de alimentações testadas em cultivo contínuo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 com meio complexo para (A) PS14_L, PS14_C e (B) lactato

Os maiores valores de fator de conversão de PS14_L sobre biomassa foram obtidos para maiores valores de D ; enquanto que para PS14_C, o fator de conversão sobre biomassa manteve-se praticamente constante. Em contrapartida, tanto os valores de velocidade específica de produção de PS14_L quanto de PS14_C aumentaram com a velocidade específica de crescimento imposta.

Hipoteticamente, a produção de PS14_L poderia estar ligada ao evento de divisão celular. Havendo clivagem da peptidoglicana da célula mãe para a geração das células filhas, haveria liberação do polissacarídeo capsular para o sobrenadante. Assim, quanto maior fosse a velocidade de divisão celular, maior seria a quantidade de polissacarídeo capsular livre por unidade de massa celular crescente, o que explicaria o observado tanto no cultivo descontínuo como no contínuo.

Segundo a literatura (PAOLETTI; ROSS; JOHNSON, 1996; ROSS; MADOFF; PAOLETTI, 1999; SWENNEN, 2007), os maiores fatores de conversão de polissacarídeos capsulares por *S. agalactiae* (cerca de 100 mg/g_{célula}) são alcançados quando o quimiostato é operado em altos valores de D (faixa de 0,7 a 1,3 h⁻¹), independentemente do meio utilizado. Para o pneumococo do sorotipo 14, o

efeito da velocidade de crescimento na razão polissacarídeo capsular/biomassa foi observado apenas para PS14_L. Este evento não foi observado para PS14_C, mas não ficou claro se esta é uma característica do pneumococo que não alteraria sua constante de formação ou se haveria diferença significativa para D menores que 0,4 h⁻¹.

Em D = 0,8 h⁻¹ foram encontrados os maiores valores de produtividade em biomassa (2,22 g.L⁻¹.h⁻¹), PS14_L (84,66 mg.L⁻¹.h⁻¹) e PS14_C (105,1 mg.L⁻¹.h⁻¹), a maior vazão específica de alimentação operável sem alcançar D_c. Em termos de produção industrial, esta vazão específica de alimentação seria interessante, não apenas em termos de produtividade, mas também porque foi verificado que em taxas maiores D o estado estacionário é alcançado mais facilmente.

5.5.2 Estudos de Limitação em Cultivo Contínuo

5.5.2.1 Efeito da Concentração de Glicose

Para avaliar a influência da glicose sobre o crescimento e a produção de PS14, foi realizado um cultivo contínuo com meio quimicamente definido (CDMv6) no qual foi variada a concentração de glicose na alimentação. Os resultados são apresentados na Figura 5.25 e na Figura 5.26 e sumarizados na Tabela 5.6.

Como explicado no item 5.5.1, a maior produtividade em cultivo contínuo com meio complexo foi observada em D = 0,8 h⁻¹, o correspondente a aproximadamente 70% do valor de μ_{\max} neste mesmo meio (1,22 h⁻¹). Similarmente, a vazão específica de alimentação de 0,5 h⁻¹ foi escolhida para o cultivo contínuo em CDMv6 por ser cerca de 70% do valor de μ_{\max} neste meio (0,73 h⁻¹).

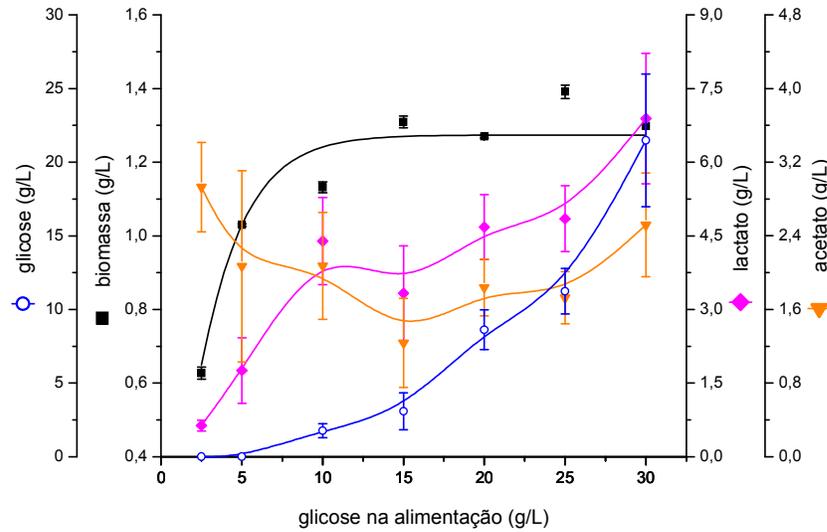


Figura 5.25: Efeito da concentração de glicose no meio de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de lactato, acetato e glicose residual em cultivo contínuo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6

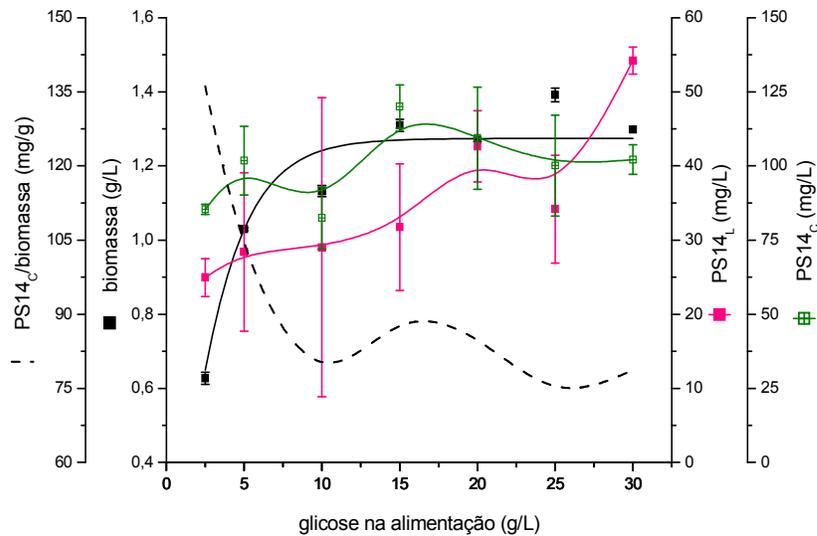


Figura 5.26: Efeito da concentração de glicose no meio de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de PS14_L e PS14_C e relação PS14_C por biomassa em cultivo contínuo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6

Tabela 5.6 - Efeito da concentração de glicose no meio de alimentação em cultura contínua de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6

Parâmetro	Concentração de glicose na alimentação (g/L)						
	2,5	5	10	15	20	25	30
biomassa (g/L)	0,63	1,03	1,13	1,31	1,27	1,39	1,30
glicose residual (g/L)	0,00	0,00	1,76	3,08	8,62	11,24	21,49
PS14 _L (mg/L)	24,95	28,39	29,03	31,75	42,65	34,18	54,21
PS14 _C (mg/L)	85,35	101,78	82,43	120,01	109,40	100,13	102,16
lactato (g/L)	0,63	1,76	4,34	3,33	4,68	4,85	6,89
acetato (g/L)	2,93	2,07	2,07	1,24	1,84	1,73	2,52
$Y_{x/s}$ (g célula/g glicose)	0,25	0,21	0,14	0,11	0,112	0,10	0,15
$Y_{ps_L/s}$ (mg PS14L/g glicose)	9,98	5,67	3,52	2,66	3,74	2,48	6,36
$Y_{ps_C/s}$ (mg PS14C/g glicose)	34,14	20,36	10,01	10,07	9,61	7,27	12,00
$Y_{l/s}$ (g lactato/g glicose)	0,25	0,35	0,53	0,28	0,41	0,35	0,81
$Y_{a/s}$ (g acetato/g glicose)	1,17	0,41	0,25	0,10	0,16	0,12	0,29
$Y_{ps_L/x}$ (mg PS14L/g célula)	39,79	27,59	25,64	24,25	33,59	24,56	41,76
$Y_{ps_C/x}$ (mg PS14C/g célula)	136,15	98,90	72,81	91,65	86,15	71,95	78,69
$Y_{l/x}$ (g lactato/g célula)	1,01	1,71	3,88	2,54	3,68	3,48	5,31
$Y_{a/x}$ (g acetato/g célula)	4,67	2,01	1,83	0,94	1,44	1,24	1,93
% consumo de glicose	100,00	100,00	82,35	79,44	56,92	55,05	28,38
Q_x (g célula·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,31	0,51	0,57	0,65	0,63	0,70	0,65
Q_{ps_L} (mg PS14L·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	12,47	14,20	14,51	15,88	21,32	17,09	27,11
Q_{ps_C} (mg PS14C·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	42,68	50,89	41,21	60,01	54,70	50,06	51,08
Q_l (g lactato·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,32	0,88	2,20	1,67	2,34	2,43	3,44
Q_a (g acetato·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	1,46	1,03	1,04	0,62	0,92	0,86	1,26
μ_{ps_L} (mg PS14L·g célula ⁻¹ ·h ⁻¹)	19,90	13,80	12,82	12,13	16,80	12,28	20,88
μ_{ps_C} (mg PS14C·g célula ⁻¹ ·h ⁻¹)	68,07	49,45	36,40	45,82	43,08	35,97	39,35
μ_l (g lactato·g célula ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,51	0,85	1,94	1,27	1,84	1,74	2,65
μ_a (g acetato·g célula ⁻¹ ·h ⁻¹)	2,34	1,01	0,92	0,47	0,72	0,62	0,97
μ_s (g glicose·g célula ⁻¹ ·h ⁻¹)	1,99	2,43	3,64	4,55	4,48	4,94	3,28

Em concentrações de glicose no meio de alimentação iguais ou acima de 15 g/L, a glicose deixou de ser substrato limitante de crescimento, mantendo a concentração celular em torno de 1,3 g/L. Portanto, a partir deste ponto, outro(s) componente(s) do meio tornaram-se limitantes. Em um aminograma, foi verificado que a partir de 5 g/L de glicose na alimentação, a glutamina foi esgotada, enquanto que, para asparagina e arginina, os respectivos esgotamentos ocorreram em 10 e 15

g/L. O pneumococo é incapaz de sintetizar glutamina e asparagina, mas pode sintetizar arginina a partir da glutamina (HOSKINS et al., 2001).

Assim como observado para outras bactérias lácticas (NEIJSEL; SNOEP; TEIXEIRA DE MATOS, 1997; LOOIJESTEIJN et al., 2000), em condição de excesso de glicose foi observado menor fator de conversão de glicose para biomassa e o aumento na produção de ácido láctico. Conforme proposto por Garrigues et al. (1997) para *L. lactis*, em excesso de glicose a elevada razão NADH/NAD⁺ ativa a LDH e inibe a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e a PFL, resultando no desvio do fluxo glicolítico principalmente para a LDH, onde há formação de lactato.

Em limitação de glicose, a produção de lactato foi menor, devido em parte à menor concentração de células, mas também devido à baixa razão NADH/NAD⁺, que inibe fortemente a LDH e fracamente a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, de modo que a PFL não é mais inibida, resultando em metabolismo misto, como observado. Além disso, nessas condições, onde há necessidade de maior geração de ATP por glicose consumida, o metabolismo misto é uma via de reoxidação do NADH energeticamente mais favorável.

Nesta condição de limitação, o aproveitamento da glicose foi mais eficiente, representado pelo seu consumo total e pelos maiores valores de fatores de conversão de glicose em biomassa, PS14_L e PS14_C. Os maiores valores de produtividade em células e PS14_L e PS14_C, por sua vez, foram alcançados com concentração de glicose na alimentação entre 15 e 25 g/L.

O mesmo foi observado para μ_p , que foi maior para PS14_L e PS14_C e acetato em condição de limitação de glicose, enquanto que o inverso foi observado para o lactato. Indicando, então, que a condição de pouca glicose na alimentação é mais favorável em termos de eficiência de conversão da glicose e de produtividade sobre células.

A exemplo de outras bactérias que produzem exopolissacarídeos e polissacarídeos intracelulares (NEIJSEL; SNOEP; TEIXEIRA DE MATOS, 1997), supõe-se que sob limitação de nitrogênio e excesso de carbono haveria favorecimento da síntese de PS14, condição que seria alcançada a partir de 15 g/L de glicose no meio de alimentação. De fato, a produção de PS14_L parece ter sido favorecida pelo excesso de glicose, aumentando 70% entre as concentrações de glicose na alimentação de 15 e 30 g/L, momento em que esta deixou de ser substrato limitante de crescimento. Como se pode observar na Figura 5.26, os

desvios entre as medidas de PS14 foram relativamente grandes, o que pode estar enviesando esta constatação. Esses desvios possivelmente foram devidos a diferenças no tempo de processamento das amostras. Para a produção de PS14_C não houve mudança significativa em sua concentração para as concentrações de glicose testadas.

Além disso, a formação de PS14_L sobre a biomassa manteve-se em torno de 30 mg/g_{célula}, tal como na cultivo descontínuo (item 5.3), enquanto que a formação de PS14_C sobre biomassa foi nitidamente favorecida na condição de limitação de glicose ($Y_{psC/x}$ 73% superior na condição de glicose na alimentação de 2,5g/L em relação a 30 g/L). O efeito negativo em $Y_{psC/x}$ sob excesso de glicose foi também observado para a produção de polissacarídeo capsular de *S. agalactiae* (ROSS; MADOFF; PAOLETTI, 1999) e para a produção de exopolissacarídeo por *L. lactis* (LOOIJESTEIJN et al., 2000). O último autor sugere que este efeito seja decorrente de um desacoplamento da geração de ácidos orgânicos da produção de biomassa, que por sua vez está ligada à formação de polissacarídeo. Assim, uma maior quantidade de glicose seria destinada à formação de ácidos orgânicos e uma menor quantidade à formação da biomassa e do polissacarídeo a ela ligado.

5.5.2.2 Efeito da Concentração de Colina

Para avaliar a influência da colina - um importante fator de crescimento para o pneumococo - sobre o crescimento e a produção de PS14, foi realizado um cultivo contínuo com meio quimicamente definido (CDMv6) similar ao desenvolvido para a glicose (item 5.5.2.1) no qual foi variada a concentração de colina na alimentação. Neste experimento, a concentração de glicose no meio CDMv6 foi aumentada de 10 g/L para 20 g/L, de forma a torná-lo não limitante em glicose e ainda, mantê-lo nas melhores condições de produtividade observadas no item 5.5.2.1.

Os resultados são apresentados na Figura 5.27 e na Figura 5.28 e sumarizados na Tabela 5.7.

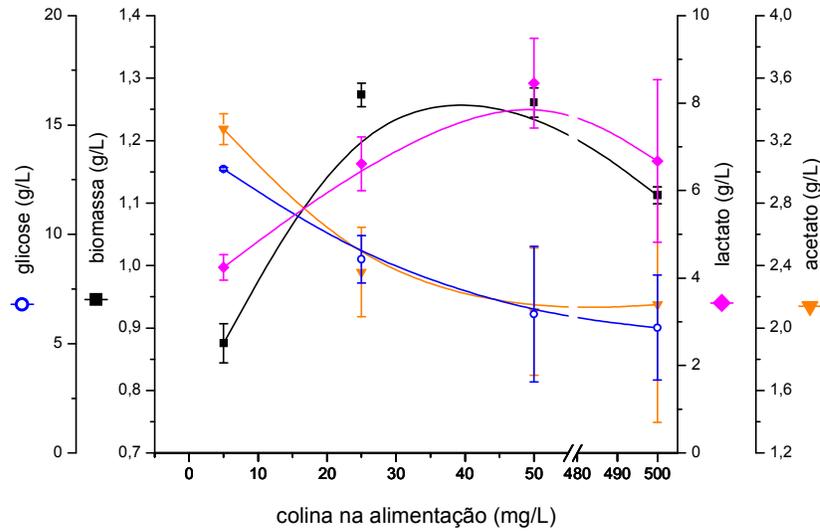


Figura 5.27: Efeito da concentração de colina no meio de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de lactato, acetato e glicose residual em cultivo contínuo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6 e glicose a 20 g/L

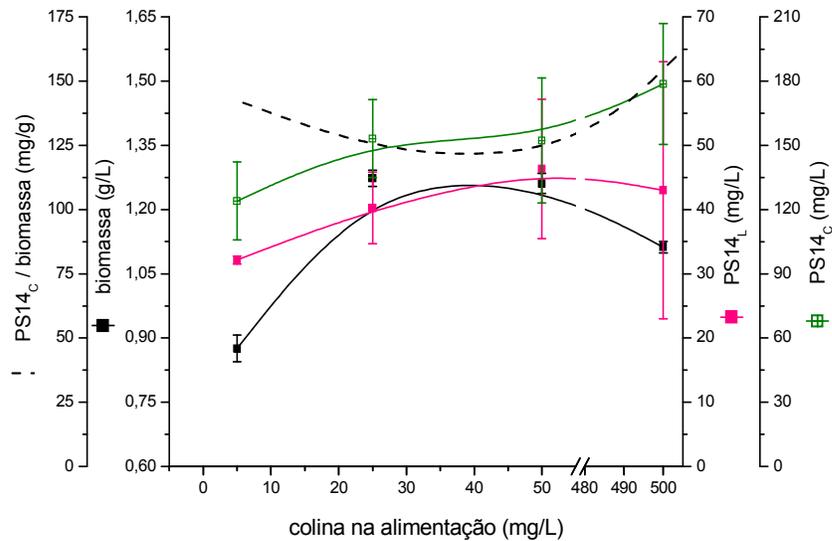


Figura 5.28: Efeito da concentração de colina no meio de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de PS14_L e PS14_C e relação PS14_C por biomassa em cultivo contínuo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6 e glicose a 20 g/L

Tabela 5.7 - Efeito da concentração de colina no meio de alimentação em cultura contínua de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6 e glicose a 20 g/L

Parâmetro	Concentração de Colina na Alimentação (mg/L)			
	5	25	50	500
biomassa (g/L)	0,87	1,27	1,26	1,11
glicose residual (g/L)	12,99	8,86	6,35	5,73
PS14 _L (mg/L)	32,13	40,26	46,35	43,01
PS14 _C (mg/L)	124,02	153,18	152,31	178,66
lactato (g/L)	4,24	6,61	8,45	6,68
acetato (g/L)	3,27	2,36	2,10	2,15
$Y_{x/s}$ (g _{célula} /g _{glicose})	0,12	0,11	0,09	0,078
$Y_{ps_L/s}$ (mg _{PS14L} /g _{glicose})	4,58	3,61	3,39	3,01
$Y_{ps_C/s}$ (mg _{PS14C} /g _{glicose})	17,69	13,75	11,16	12,52
$Y_{l/s}$ (g _{lactato} /g _{glicose})	0,61	0,59	0,62	0,47
$Y_{a/s}$ (g _{acetato} /g _{glicose})	0,46	0,21	0,15	0,15
$Y_{ps_L/x}$ (mg _{PS14L} /g _{célula})	36,70	31,62	36,75	38,66
$Y_{ps_C/x}$ (mg _{PS14C} /g _{célula})	141,64	120,31	120,79	160,61
$Y_{l/x}$ (g _{lactato} /g _{célula})	4,84	5,19	4,71	6,00
$Y_{a/x}$ (g _{acetato} /g _{célula})	3,74	1,85	1,67	1,93
% consumo de glicose	35,04	55,72	68,27	71,34
Q_x (g _{célula} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,44	0,64	0,63	0,56
Q_{ps_L} (mg _{PS14L} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	16,07	20,13	23,17	21,50
Q_{ps_C} (mg _{PS14C} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	62,01	76,59	76,16	89,33
Q_l (g _{lactato} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	2,12	3,31	2,97	3,34
Q_a (g _{acetato} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	1,64	1,18	1,05	1,07
μ_{ps_L} (mg _{PS14L} ·g _{célula} ⁻¹ ·h ⁻¹)	18,35	15,81	18,38	19,33
μ_{ps_C} (mg _{PS14C} ·g _{célula} ⁻¹ ·h ⁻¹)	70,82	60,15	60,39	80,31
μ_l (g _{lactato} ·g _{célula} ⁻¹ ·h ⁻¹)	2,42	2,60	2,35	3,00
μ_a (g _{acetato} ·g _{célula} ⁻¹ ·h ⁻¹)	1,87	0,93	0,83	0,97
μ_s (g _{glicose} ·g _{célula} ⁻¹ ·h ⁻¹)	4,00	4,38	5,41	6,41

Para a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$, a colina deixou de ser limitante de crescimento em concentração igual ou acima de 25 mg/L no meio de alimentação. Imagina-se que a glutamina, asparagina e arginina poderiam estar novamente limitando o crescimento.

Foi verificado que, quanto maior a concentração de colina no meio de alimentação, maior foi consumo de glicose, chegando a dobrar entre as

concentrações de 5 mg/L e 500 mg/L de colina na alimentação. Este consumo elevado foi refletido nos menores valores de fator de conversão de biomassa e produtos sobre glicose. Portanto, trabalhar em condições de excesso de colina é desfavorável em termos de eficiência de conversão da fonte de carbono para biomassa, ácidos orgânicos e polissacarídeo.

Não foi possível encontrar uma justificativa para o aumento no consumo de glicose observado para maiores valores de colina no meio de alimentação com os parâmetros obtidos. Porém, acredita-se que o excesso de colina possa ter promovido a síntese dos ácidos teicóico e lipoteicóico - que possuem fosforilcolina em sua composição - uma vez que a síntese destes ácidos compete com a síntese da peptideoglicana e do polissacarídeo capsular (YOTHER; BENTLEY; HENNESSEY, 2008); o que poderia provocar o aumento do consumo de glicose para alimentar esta rota metabólica.

A relação NADH/NAD^+ novamente conduziu o metabolismo energético: em maiores concentrações de colina, onde foi observado maior consumo de glicose e, portanto, fluxo glicolítico elevado, ocorreu maior produção de lactato e menor de acetato. Já em concentrações de colina menores, onde ocorreu menor consumo de glicose, houve então menor fluxo glicolítico, que promoveu maior produção de acetato e menor de lactato, representados pelos valores de μ_p .

A produção de PS14_C e PS14_L não parece ter sido favorecida em termos significativos pelo aumento da concentração de colina, porém os desvios das medidas de PS14_C e PS14_L dificultam a análise. Além disso, os parâmetros de rendimento de PS14_C e PS14_L sobre biomassa e os valores de μ_p foram pouco variáveis, o que indica que o excesso de colina tem pouco efeito sobre a produção de polissacarídeo capsular.

No trabalho de Storaï (2008), foi verificado que a mudança na concentração de colina de 10 mg/L para 5 g/L aumentou as concentrações celulares e de polissacarídeo capsular associado às células do pneumococo para os sorotipos 4, 5, 8, 20 e 33F em cultivo descontínuo. Os aumentos na produção de polissacarídeo capsular foram diferentes entre os sorotipos, chegando a triplicar para o sorotipo 33F, sem aumento significativo na concentração de ácidos teicóicos.

Acredita-se que com uma maior concentração de colina haveria uma tendência de provocar *in vitro* uma liberação parcial de proteínas dependentes de ligação com colina, como a LytA, o que diminuiria a atividade autolítica global do

pneumococo (MOSCOSO; GARCÍA; LOPEZ, 2006). Segundo Giudicelli e Tomasz (1984)* apud Yother e White (1994), a concentração de colina capaz de inibir as autolisinas e prevenir a lise celular seria de 10 g/L, e segundo Bieser e Hakenbeck (1985), tal concentração seria de 20 g/L.

Entretanto, neste trabalho, nenhum incremento quanto ao aumento de viabilidade ou concentração celular foi obtido em cultura contínua para as concentrações de colina testadas, mantendo-se em torno de 2.10^9 células viáveis/mL.

5.5.2.3 Efeito da Concentração de Glutamina

Para avaliar a influência da glutamina - doador do grupo amino em várias reações do anabolismo do pneumococo - sobre o crescimento e a produção de PS14, foi realizado um cultivo contínuo com meio quimicamente definido (CDMv6) similar ao desenvolvido para a glicose e colina (itens 5.5.2.1 e 5.5.2.2) no qual foi variada a concentração de glutamina no meio de alimentação e que, baseado nos resultados anteriores, teve o meio de alimentação adaptado para 20 g/L de glicose e 25 mg/L de colina, de forma que estes componentes não fossem mais limitantes de crescimento.

Os resultados são apresentados na Figura 5.29 e na Figura 5.30 e sumarizados na Tabela 5.8.

*GIUDICELLI, S.; TOMASZ, A. Inhibition of the in vitro and in vivo activity of the pneumococcal autolytic enzyme by choline and phosphorylcholine. In: NOMBELA, C. **Microbial cell wall synthesis and autolysis**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984. p. 207-212.

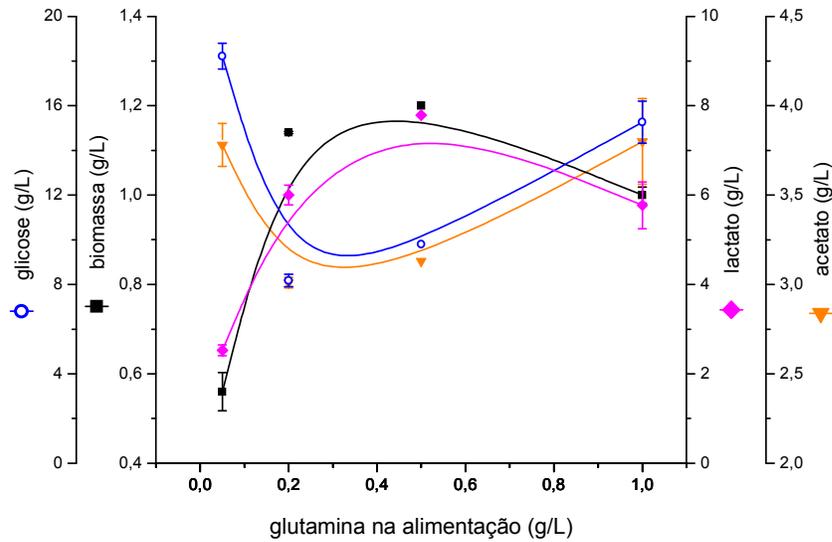


Figura 5.29: Efeito da concentração de glutamina no meio de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de PS14_L e PS14_C e relação PS14_C por biomassa em cultivo contínuo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6, glicose a 20 g/L e colina a 25 mg/L

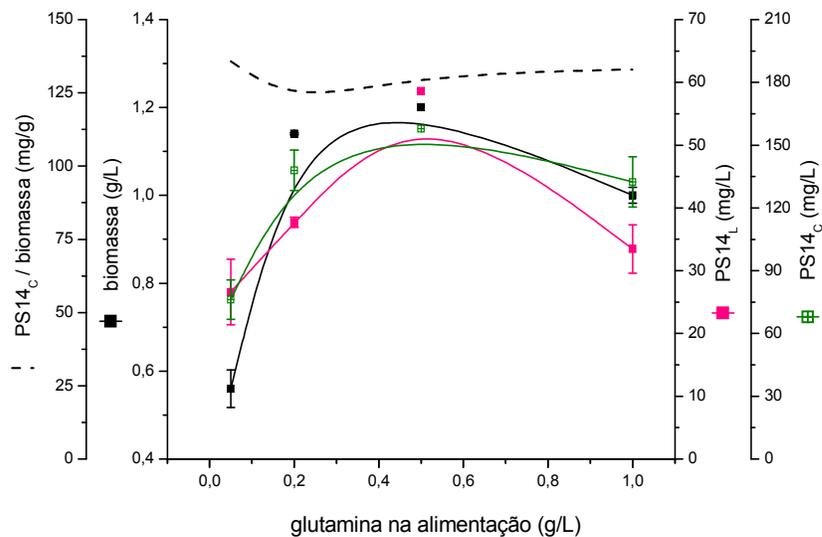


Figura 5.30: Efeito da concentração de glutamina no meio de alimentação sobre o crescimento celular, concentração de PS14_L e PS14_C e relação PS14_C por biomassa em cultivo contínuo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6, glicose a 20 g/L e colina a 25 mg/L

Tabela 5.8 - Efeito da concentração de glutamina no meio de alimentação em cultura contínua de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 5287 em biorreator operado a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ com CDMv6, glicose a 20 g/L e colina a 25 mg/L

Parâmetro	Concentração de Glutamina na Alimentação (g/L)			
	0,05	0,2	0,5	1
biomassa (g/L)	0,56	1,14	1,20	1,00
glicose residual (g/L)	18,22	13,40	9,81	15,27
PS14 _L (mg/L)	26,60	37,72	59,83	33,46
PS14 _C (mg/L)	76,18	137,94	157,80	132,43
lactato (g/L)	2,53	6,00	7,79	5,77
acetato (g/L)	3,78	3,01	3,13	3,80
$Y_{x/s}$ (g _{célula} /g _{glicose})	0,32	0,17	0,12	0,21
$Y_{ps_L/s}$ (mg _{PS14L} /g _{glicose})	14,98	5,71	5,87	7,07
$Y_{ps_C/s}$ (mg _{PS14C} /g _{glicose})	42,90	20,9	15,48	27,97
$Y_{l/s}$ (g _{lactato} /g _{glicose})	1,43	0,91	0,76	1,22
$Y_{a/s}$ (g _{acetato} /g _{glicose})	2,13	0,46	0,31	0,80
$Y_{ps_L/x}$ (mg _{PS14L} /g _{célula})	47,41	33,14	49,72	33,59
$Y_{ps_C/x}$ (mg _{PS14C} /g _{célula})	135,80	121,20	131,14	132,95
$Y_{l/x}$ (g _{lactato} /g _{célula})	4,51	5,27	6,47	5,79
$Y_{a/x}$ (g _{acetato} /g _{célula})	6,74	2,64	2,60	3,82
% consumo de glicose	8,88	33,01	50,97	23,67
Q_x (g _{células} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,28	0,57	0,60	0,50
Q_{ps_L} (mg _{PS14L} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	13,30	18,86	29,91	16,73
Q_{ps_C} (mg _{PS14C} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	38,09	68,97	78,90	66,21
Q_l (g _{lactato} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	1,27	3,00	3,89	2,88
Q_a (g _{acetato} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	1,89	1,50	1,56	1,90
μ_{ps_L} (mg _{PS14L} ·g _{célula} ⁻¹ ·h ⁻¹)	23,71	16,57	24,86	16,80
μ_{ps_C} (mg _{PS14C} ·g _{célula} ⁻¹ ·h ⁻¹)	67,90	60,60	65,57	66,48
μ_l (g _{lactato} ·g _{célula} ⁻¹ ·h ⁻¹)	2,26	2,64	3,24	2,90
μ_a (g _{acetato} ·g _{célula} ⁻¹ ·h ⁻¹)	3,37	1,32	1,30	1,91
μ_s (g _{glicose} ·g _{célula} ⁻¹ ·h ⁻¹)	1,58	2,9	4,24	2,38

Para a vazão específica de alimentação de $0,5 \text{ h}^{-1}$, em concentrações de glutamina iguais ou acima de 0,2 g/L no meio de alimentação, a glutamina deixou de ser substrato limitante de crescimento, mantendo a concentração celular em torno de 1,2 g/L. Provavelmente asparagina e arginina limitaram o crescimento a partir deste ponto.

A exemplo do observado para a colina, a relação NADH/NAD⁺ conduziu o metabolismo energético: quando a glutamina limitava o crescimento, onde foi observado menor consumo de glicose e, portanto baixo fluxo glicolítico, ocorreu menor produção de lactato e maior de acetato. Já em concentrações de glutamina de 0,2 a 0,5 g/L, onde ocorreu maior consumo de glicose, houve então maior fluxo glicolítico, que promoveu menor produção de acetato e maior de lactato, representados pelos valores de μ_p .

Para a glutamina, da mesma forma que observado para a glicose e para a colina, em condição de limitação de crescimento, a glicose foi visivelmente melhor aproveitada para a síntese de biomassa, PS14_L e PS14_C, representada assim pelos maiores valores de fatores de conversão de glicose nos respectivos produtos. Esta situação é inversa à descrita para *S. zooepidemicus*, onde a limitação de glutamina reduziu a produção de ácido hialurônico por biomassa, e a conversão de ácido hialurônico e biomassa sobre a glicose (BLANK; McLAUGHLIN; NIELSEN, 2004).

Acreditava-se que sendo a glutamina precursora de UTP utilizado na síntese do PS14, haveria favorecimento da síntese do mesmo na condição de excesso de tal precursor. De fato, a produção de PS14_C e PS14_L foi favorecida pelo aumento da concentração de glutamina, dobrando em concentração entre as concentrações de glutamina de 0,05 e 0,5 g/L, porém, em termos de fator de conversão sobre células, permaneceu praticamente constante, o que significa que este acréscimo foi relativo somente ao aumento da concentração celular entre as condições em questão.

Os maiores valores de produtividade em células e PS14_L e PS14_C foram alcançados com concentração de glutamina na alimentação esteve em 0,5 g/L.

5.5.3 Considerações Gerais

Para os quatro cultivos contínuos desenvolvidos, não foi observada oscilação cíclica na concentração celular ou de concentração de células viáveis em quimiostato. Cornejo et al. (2009) observaram oscilações cíclicas em cultivos contínuos de *S. pneumoniae* de vários sorotipos, realizados em tubos de 20 mL a $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$, sem controle de pH e com agitação promovida pelo borbulhamento com ar. Estes autores sugeriram que a oscilação teria sido resultado da produção de uma

toxina. Em nenhum dos três cultivos contínuos desenvolvidos foi observada oscilação cíclica na concentração de células viáveis, mantendo-se em média em 10^9 células/mL.

Para os quatro cultivos contínuos desenvolvidos o estado estacionário foi atingido para diferentes D e composição de meio de alimentação, indicando a robustez do sistema. Nos experimentos de limitação, o sistema operou por mais de 90 horas sem problemas clássicos desta operação, como: contaminação da cultura, mutação com perda de produtividade e dificuldade na manutenção do volume constante.

No cultivo contínuo com meio complexo, atingiu-se alta concentração celular: 2,32 g/L em $D = 0,4 \text{ h}^{-1}$ (item 5.5.2) contra 1,45 g/L atingido com cultivo descontínuo com o mesmo meio (item 5.3) e 1,27 g/L com CDMv6 alimentado com glicose 20 g/L e $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ (item 5.5.2.1). Duas possibilidades são elencadas: (i) conforme discutido no cultivo descontínuo com meio complexo (item 5.3), neste meio hipoteticamente haveria maior produção/atividade de autolisinas, que em um cultivo contínuo seriam lavadas do reator, impedindo seu acúmulo e consequente atividade; adicionalmente, haveria lavagem também de outros compostos inibitórios, como os ácidos orgânicos, que inibem o crescimento celular além de estarem envolvidos no processo de autólise; e (ii) em cultivo com CDMv6 haveria limitações nutricionais, outras que glicose, colina e glutamina (como reportado no item 5.3, o meio quimicamente definido tem 7 vezes menos aminoácidos que o meio complexo), o que impediria que altas densidades celulares fossem atingidas com tal meio.

Para as condições de cultivo contínuo testadas, o pneumococo apresentou resultados coerentes com as rotas metabólicas propostas com base na análise do seu genoma e similares a certas bactérias lácticas. Com base no conjunto de resultados obtidos foi possível observar que para obter alta produção de polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 14 é preciso enfoque em técnicas que: (i) visem produção de alta densidade celular, uma vez que a produção do PS14 é associada ao crescimento, (ii) evitem o acúmulo de produtos inibitórios como o lactato e as autolisinas e, (iii) promovam a liberação do PS14 para o sobrenadante da cultura. Um modo de operação que pode prover duas dessas metas é o cultivo contínuo com reciclo de células. O terceiro item que diz respeito à liberação do PS14 para o sobrenadante ainda é um objetivo difícil de ser alcançado,

uma vez que não são conhecidos os mecanismos envolvidos na ejeção do polissacarídeo capsular.

Como segunda alternativa, poderiam ser feitos cultivos descontínuos alimentados de forma que: no estágio inicial, sem alimentação, utilizar meio rico em glicose e aminoácidos. Ao final da fase exponencial de crescimento, iniciar a fase de alimentação de modo a manter um μ alto, de forma a atingir os maiores níveis de produtividade em células e em PS14. Uma vez alcançada uma alta densidade celular, o meio de alimentação seria mudado de modo a haver excesso de glicose e limitação de outros componentes, condição na qual é observado o maior rendimento na conversão do substrato para o produto de interesse.

6 CONCLUSÕES

Em relação às metas preliminares para o estudo do metabolismo de *S. pneumoniae* sorotipo 14, foi determinado que:

- Dentre as técnicas consideradas para a detecção de PS14 - Fenol-Sulfúrico, HPSEC, *rocket* Imunoelektroforese, ELISA de competição e de captura - a de ELISA de captura demonstrou-se como alternativa viável, de boa reprodutibilidade e especificidade, com sensibilidade de 1 ng/mL de PS14 para as condições de trabalho desenvolvidas.
- Das 8 cepas de *S. pneumoniae* sorotipo 14 inicialmente avaliadas, a cepa 5287 foi a que apresentou melhor desempenho na produção de PS14 em relação a seu crescimento, com boa fase estacionária e produção de células em frascos, sendo então escolhida como cepa de trabalho para todos os experimentos em frascos e em biorreator.
- O meio complexo, em comparação ao CDMv10, obteve melhor desempenho em termos de produtividade para produção de PS14 em cultivo descontínuo, porém apresentou forte lise celular. De outro lado, em cultivo descontínuo com CDMv10, o crescimento celular se deu de forma mais lenta, porém alcançou um máximo de concentração celular similar àquele e sem lise ao final do cultivo. Para ambos os meios foi observado que a produção de PS14 ligado ou não às células seguiu o crescimento celular. Admitiu-se que a ausência da lise celular observada em meio quimicamente definido foi devida a um efeito combinado da menor produção de ácidos orgânicos e do bloqueio estérico à atuação de autolisinas pelo polissacarídeo capsular associado às células.
- Nos experimentos para determinação das vitaminas essenciais para o crescimento, foi verificado que o comportamento observado em frasco nem sempre é reproduzido em biorreator: foi possível omitir somente 4 das 10 vitaminas iniciais para cultivo em biorreator, enquanto que em frascos, 8 vitaminas foram omitidas. Em cultivo em frascos, embora incitado um ambiente de anaerobiose, permanece ainda uma concentração de oxigênio residual, o que pode diferenciar toda a rota de síntese de vitaminas e cofatores em relação ao cultivo em biorreator, ambiente de total anaerobiose.

Portanto, embora trabalhoso, é aconselhável que estudos de metabolismo e requerimentos nutricionais para *S. pneumoniae* sejam realizados em biorreator, onde a atmosfera e o pH podem ser controlados.

No estudo do metabolismo de produção de polissacarídeo capsular por *S. pneumoniae* do sorotipo 14 em cultivo contínuo, foi constatado:

- Nos cultivos contínuos confirmou-se que a produção de PS14 ligado ou não às células é associada ao crescimento celular, com produtividade máxima em células e em PS14 em vazão específica de alimentação próxima à $0,8 \text{ h}^{-1}$ quando empregado meio complexo. Verificou-se que, assim como para outras bactérias lácticas, a produção de lactato é parcialmente associada ao crescimento. Devido ao alto valor de coeficiente de manutenção, ficou comprovado que, para obter bom crescimento, o pneumococo precisa de grande disponibilidade de glicose.
- Observou-se que a $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$, o substrato com maior impacto sobre a produção de PS14 foi a glicose, sendo que, quando a mesma esteve em excesso, um efeito positivo sobre a produção de PS14_L em CDMv6 foi observado, e que, quando sua concentração foi limitante, as células conseguiram utilizá-la de forma mais eficiente para conversão à biomassa e PS14.
- De acordo com a concentração de glicose, colina e glutamina testadas, foi também relatada a mudança do metabolismo energético, variando entre homolático e misto; o que possui grande influência sobre a produção de células, aproveitamento da fonte de carbono e, conseqüentemente, na produção do PS14.
- Acima de 15 g/L a glicose deixou de ser substrato limitante, enquanto que, para a colina, esta concentração foi de 25 mg/L e para a glutamina 0,2 g/L. Não foi verificado efeito significativo da colina sobre a produção de PS14 para as concentrações de testadas, porém o consumo da glicose aumentou quando colina estava em excesso, provavelmente destinado a produção de ácidos teicóicos e lipoteicóicos da parede celular. Também não foi verificado favorecimento da síntese de PS14 e do crescimento celular para a condição de excesso de glutamina.

Em resumo, pode-se concluir que as estratégias de produção de PS14 devem em um primeiro momento focar na alta densidade celular e, uma vez atingida esta condição, na limitação de nutrientes de forma a aumentar a eficiência da conversão de substrato e células a produto.

REFERÊNCIAS *

ALONSODEVELASCO, E.; VERHEUL, A. F. M.; VERHOEF, J.; SNIPPE, H. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 4, p. 591-603, 1995.

ANHALT, J. P.; YU, P. K. Counterimmunoelectrophoresis of pneumococcal antigens: improved sensitivity for the detection of types VII and XIV. **J. Clin. Microbiol.**, v. 2, n. 6, p. 510-515, 1975.

AVERY, O. T.; MacLEOD, C. M.; McCARTY, M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. **J. Exp. Med.**, v. 79, n. 2, p. 137-158, 1944.

AUSTRIAN, R. Some Observations on the Pneumococcus and on the Current Status of Pneumococcal Disease and Its Prevention. **Rev. Infect. Dis.**, v. 3, p. S1-S17, 1981. Supplement.

BADGER, E. The Nutritional Requirements of a Strain of Type III Pneumococcus. **J. Bacteriol.**, v. 47, n. 6, p. 509-518, 1944.

BÄTTIG, P.; HATHAWAY, L. J.; HOFER, S.; MÜHLEMANN, K. Serotype-specific invasiveness and colonization prevalence in *Streptococcus pneumoniae* correlate with the lag phase during in vitro growth. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 11, p. 2612-2617, 2007. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2007.00246.x.

BEDNAR, B.; HENNESSEY Jr, J. P. Molecular size analysis of capsular polysaccharide preparations from *Streptococcus pneumoniae*. **Carbohydr. Res.**, v. 243, n. 1, p. 115-130, 1993.

BENDER, M. H.; CARTEE, R. T.; YOTHER, J. Positive correlation between tyrosine phosphorylation of CpsD and capsular polysaccharide production in *Streptococcus pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 185, n. 20, p. 6057-6066, 2003.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

- BENTLEY, S. D.; AANENSEN, D. M.; MAVROIDI, A.; SAUNDERS, D.; RABBINOWITSCH, E.; COLLINS, M.; DONOHOE, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; QUAIL, M. A.; SAMUEL, G.; SKOVSTED, I. C.; KALTOFT, M. S.; BARRELL, B.; REEVES, P. R.; PARKHILL, J.; SPRATT, B. G. Genetic Analysis of the Capsular Biosynthetic Locus from All 90 Pneumococcal Serotypes. **PLoS Genet.**, v. 2, n. 3, p. 262-269, 2006. DOI:10.1371/journal.pgen.0020031.
- BLANK, L. M.; McLAUGHLIN, R. L.; NIELSEN, L. K. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 90, n. 6, p. 685-693, 2005. DOI: 10.1002/bit.20466.
- BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. M. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect Dis**, v. 4, p. 144-154, 2004a.
- BOGAERT, D.; HERMANS, P. W. M.; ADRIAN, P.; RÜMKE, H. C.; DE GROOT, R. Pneumococcal vaccines - an update on current strategies. **Vaccine**, v. 22, p. 2209-2220, 2004b. DOI: 10.1016/j.vaccine.2003.11.038.
- BRICKS, L. F.; BEREZIN, E. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on the prevention of invasive pneumococcal diseases. **J. Pediatr. (Rio J)** v. 82, p. S67-S74, 2006. Supplement 3. DOI:10.2223/JPED.1475.
- BRIESE, T.; HAKENBECK, R. Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. **Eur. J. Biochem.**, v. 146, n. 2, p. 417-427, 1985.
- CARMO, T. S. **Otimização da produção de polissacarídeo capsular do *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 6B em biorreator.** 2010. 121 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- CLOSING the GAPP on pneumonia. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, n. 12, p. 838, 2009. Editorial.
- CORNEJO, O. E.; ROZEN, D. E.; MAY, R. M.; LEVIN, B. R. Oscillations in continuous culture populations of *Streptococcus pneumoniae*: population dynamics and the evolution of clonal suicide. **Proc. Bio. Sci.**, v. 276, p. 999-1008, 2009.
- COSTANTINO, P.; NORELLI, F.; BERTI, F.; CICALA, C. M.; BAZZOCCHI, G.; FONTANI, S.; OLIVIERI, R. **Fermentation Processes for Cultivating Streptococci and Purification Processes for Obtaining CPS Therefrom.** 2009. Patent number: WO 2009/081276. 159 p.

CROWTHER, J. R. (Ed.). **The ELISA Guidebook**. 2nd ed. New York: Humana Press, 2009. v. 516. Methods in Molecular Biology Series.

CUESTA, G.; SUAREZ, N.; BESSIO, M. I.; FERREIRA, F.; MASSALDI, H. Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 using a modification of phenol-sulfuric acid method. **J. Microbiol. Methods**, v. 52, n. 1, p. 69-73, 2003.

DON, M. M.; SHOPARWE, N. F. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. **Biochem. Eng. J.**, v. 49, n. 1, p. 95-103, 2010. DOI: 10.1016/j.bej.2009.12.001.

DORAN, P. M. **Principios de Ingeniería de los Bioprocesos**. Zaragoza, Espanha: Acribia, 1998. 482 p.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Anal. Chem.**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EVEN, S.; LINDLEY, N. D.; LOUBIÈRE, P.; COCAIGN-BOUSQUET, M. Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints. **Mol. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 1143-1152, 2002.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. Cap 12, p. 223-246.

FEAVERS, I.; KNEZEVIC, I.; POWELL, M.; GRIFFITHS, E.; WHO CONSULTATION ON SEROLOGICAL CRITERIA FOR EVALUATION AND LICENSING OF NEW PNEUMOCOCCAL VACCINES. Challenges in the evaluation and licensing of new pneumococcal vaccines, 7-8 July 2008, Ottawa, Canada. **Vaccine**, v. 27, n. 28, p. 3681-3688, 2009. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.03.087.

FERNEBRO, J.; ANDERSSON, I.; SUBLETT, J.; MORFELDT, E.; NOVAK, R.; TUOMANEN, E.; NORMARK, S.; NORMARK, B. H. Capsular expression in *Streptococcus pneumoniae* negatively affects spontaneous and antibiotic-induced lysis and contributes to antibiotic tolerance. **J. Infect. Dis.**, v. 189, n. 2, p. 328-338, 2004.

FISCHER, W. Phosphocholine of pneumococcal teichoic acids: role in bacterial physiology and pneumococcal infection. **Res. Microbiol.**, v. 151, n. 6, p. 421-427, 2000.

GARAU, J.; CALBO, E. Capsular Types and Predicting Patient Outcomes in Pneumococcal Bacteremia. **Clin. Infect. Dis.**, v. 45, p. 52-54, 2007. DOI: 10.1086/518576.

GARCÍA, E.; LLULL, D.; MUÑOZ, R.; MOLLERACH, M.; LÓPEZ, R. Current trend in capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae*. **Res. Microbiol.**, v. 151, n. 6, p. 429-435, 2000.

GARRIGUES, C.; LOUBIÈRE, P.; LINDLEY, N. D.; COCAIGN-BOUSQUET, M. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 17, p. 5282-5287, 1997.

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. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, n. 6, p. 713-717, 2002. DOI: 10.1007/s00253-002-1075-8.

GONÇALVES, V. M.; TAKAGI, M.; CARNEIRO, S. M.; GIORDANO, R. C.; TANIZAKI, M. M. Introduction of air in the anaerobic culture of *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F induces the release of capsular polysaccharide from bacterial surface into the cultivation medium. **J. Appl. Microbiol.**, v. 101, n. 5, p. 1009-1014, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03012.x.

GRIFFITH, F. The Significance of Pneumococcal Types. **J Hyg (London)**, v. 27, n. 2, p. 113-159, 1928.

GROOT, M. N. N.; GODEFROOIJ, J.; KLEEREBEZEM, M. Heterologous expression of the pneumococcal serotype14 polysaccharide in *Lactococcus lactis* requires the lactococcal epsABC regulatory genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 3, p. 912-915, 2008. DOI:10.1128/AEM.01655-07.

GUIDOLIN, A.; MORONA, J. K.; MORONA, R.; HANSMAN, D.; PATON, J. C. Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 19F. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 12, p. 5384-5396, 1994.

HAMMERSCHMIDT, S.; WOLFF, S.; HOCKE, A.; ROSSEAU, S.; MUELLER, E.; ROHDE, M. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 8, p. 4653-4667, 2005. DOI: 10.1128/IAI.73.8.4653-4667.2005.

HARDING, S. A.; SCHELD, W. M.; MCGOWAN, M. D.; SANDE, M. A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen. **J. Clin. Microbiol.**, v. 10, n. 3, p. 339-342, 1979.

HAUSDORFF, W. P.; BRYANT, J.; PARADISO, P. R.; SIBER, G. R. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 100-121, 2000.

HOSKINS, J.; ALBORN, W. E. Jr.; ARNOLD, J.; BLASZCZAK, L. C.; BURGETT, S.; DeHOFF, B. S.; ESTREM, S. T.; FRITZ, L.; FU, D. J.; FULLER, W.; GERINGER, C.; GILMOUR, R.; GLASS, J. S.; KHOJA, H.; KRAFT, A. R.; LAGACE, R. E.; LeBLANC, D. J.; LEE, L. N.; LEFKOWITZ, E.J.; LU, J.; MATSUSHIMA, P.; McAHREN, S. M.; McHENNEY, M., McLEASTER, K., MUNDY, C. W., NICAS, T. I., NORRIS, F. H., O'GARA, M.; PEERY, R. B.; ROBERTSON, G. T.; ROCKEY, P.; SUN, P. M.; WINKLER, M. E.; YANG, Y.; YOUNG-BELLIDO, M.; ZHAO, G.; ZOOK, C.A.; BALTZ, R. H.; JASKUNAS, S. R.; ROSTECK, P. R. Jr.; SKATRUD, P. L.; GLASS, J. I. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 19, p. 5709-5717, 2001. DOI: 10.1128/JB.183.19.5709-5717.2001

HOSKISSON, P. A.; HOBBS, G. Continuous culture – making a comeback? **Microbiology**, v. 151, p. 3153-3159, 2005. DOI 10.1099/mic.0.27924-0

HOWARD, G. C.; KASER, M. R. **Making and Using Antibodies: A Practical Handbook**. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 2006. 411 p.

JOHNSTON Jr, R. B. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. S509-S517, 1991. Supplement 6.

KADIOGLU, A.; WEISER, J. N.; PATON, J. C.; ANDREW, P. W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, n. 4, p. 288-301, 2008. DOI: 10.1038/nrmicro1871.

KAIJALAINEN, T. **The Identification of *Streptococcus pneumoniae***. 2006. 75 f. Master thesis - Faculty of Medicine, University of Oulu, Oulu, Finland, 2006.

KANCLERSKI, K.; MÖLLBY, R. Production and purification of *Streptococcus pneumoniae* hemolysin (pneumolysin). **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, n. 2, p. 222-225, 1987.

KENNEDY, M.; KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 23, p. 456-475, 1999.

KIM, J. O.; WEISER, J. N. Association of Intrastrain Phase Variation in Quantity of Capsular Polysaccharide and Teichoic Acid with the Virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 368-377, 1998.

KIM, S. N.; MIN, K. K.; CHOI, I. H.; KIM, S. W.; PYO, S. N.; RHEE, D. K. Optimization of culture conditions for production of pneumococcal capsular polysaccharide type IV. **Arch. Pharm. Res.**, v. 19, n. 3, p. 173-177, 1996.

KOEDEL, U.; SCHELD, W. M.; PFISTER, H. W. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. **Lancet Infect Dis**, v. 2, p. 721-736, 2002.

KOLKMAN, M. A. B.; WAKARCHUK, W.; NUJITEN, P. J. M.; Van der ZEJIST, B. A. M. Capsular polysaccharide synthesis in *Streptococcus pneumoniae* serotype 14: molecular analysis of the complete cps locus and identification of genes encoding glycosyltransferases required for the biosynthesis of the tetrasaccharide subunit. **Mol. Microbiol.**, v. 26, n. 1, p. 197-208, 1997.

KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES - KEGG. Disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg>> Acesso em: 03 ago. 2009.

LEE, C.; LIN, K. Studies on Vaccine Control and Immunogenicity of Polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 3, p. S51-S60, 1981. Supplement.

LIBERMAN, C.; TAKAGI, M.; CABRERA-CRESPO, J.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; DIAS, W. O.; LEITE, L. C.; GONÇALVES, V. M. Pneumococcal whole-cell vaccine: optimization of cell growth of unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* in bioreactor using animal-free medium. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 35, p. 1441-1445, 2008. DOI: 10.1007/s10295-008-0445-3.

LINDBERG, B.; LÖNNINGREN, J.; POWELL, D. A. Structural studies on the specific type-14 pneumococcal polysaccharide. **Carbohydr. Res.**, v. 58, p. 177-186, 1977.

LOOIJESTEIJN, P. J.; Van CASTEREN, W. H.; TUINIER, R.; DOESWIJK-VORAGEN, C. H.; HUGENHOLTZ, J. Influence of different substrate limitations on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in continuous cultures. **J. Appl. Microbiol.**, v. 89, p. 116-122, 2000.

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A. Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. Batch Process at Controlled pH. **J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.**, v. 1, n. 4, p. 393-412, 1959.

MacLEOD, C. M.; KRAUSS, M. R. Relation of virulence of pneumococcal strains for mice to the quantity of capsular polysaccharide formed in vitro. **J. Exp. Med.**, v. 92, n. 1, p. 1-9, 1950.

MASSALDI, H.; BESSIO, M. I.; SUÁREZ, N.; TEXEIRA, E.; ROSSI, S.; FERREIRA, F. Features of bacterial growth and polysaccharide production of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 55, p. 37-43, 2010. DOI: 10.1042/BA20090218.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum Sensing in Bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 55, p. 165-199, 2001.

MORRISON, D. Streptococcal competence for genetic transformation: regulation by peptide pheromones. In: TOMASZ, A. **Streptococcus pneumoniae: molecular biology & Mechanisms of Disease**. New York: Mary Ann Liebert, 2000. Part II, p. 45-53.

MOSCOSO, M.; GARCÍA, E.; LÓPEZ, R. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 22, p. 7785-7795, 2006. DOI: 10.1128/JB.00673-06.

MOSIER, D. E.; ZALDIVAR, N. M.; GOLDINGS, E.; MOND, J.; SCHER, I.; PAUL, W. E. Formation of Antibody in the Newborn Mouse: Study of T-Cell-Independent Antibody Response. **J. Infect. Dis.**, v. 136, p. S14-S19, 1977. Supplement.

MUÑOZ-ALMAGRO, C.; SELVA, L.; PALLARES, R. Influence of pneumococcal vaccine on the incidence of empyema. **Curr Opin Pulm Med**, v. 16, p. 394-398, 2010. DOI: 10.1097/MCP.0b013e328338c19f.

NEIJSSSEL, O. M.; SNOEP, J. L. TEIXEIRA DE MATOS, M.J. Regulation of energy source metabolism in Streptococci. **J. Appl. Microbiol.**, v. 83, p. 12S-19S, 1997. Symposium Supplement.

OBARO, S. K. The new pneumococcal vaccine. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 8, n. 10, p. 623-633, 2002.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE - OPAS. **Informe Regional de Sireva II, 2009: datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores.** Washington, D.C., OPAS, 2010. 306 p.

PAOLETTI, L. C.; ROSS, R. A.; JOHNSON, K. D. Cell growth rate regulates expression of group B Streptococcus type III capsular polysaccharide. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 4, p. 1220-1226, 1996.

PEETERS, C. C.; LAGERMAN, P. R.; DE WEERS, O.; OOMEN, L. A.; HOOGERHOUT, P.; BEURRET, M.; POOLMAN, J. T.; REDDIN, K. M. Preparation of polysaccharide-conjugate vaccines. In: ROBINSON, A.; HUDSON, M. J.; CRANAGE, M. P. **Methods in Molecular Medicine**, v. 87: Vaccine Protocols. 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2003. Cap 10, p.153-174.

PIRT, S. J. The Maintenance Energy of Bacteria in Growing Cultures. **Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.**, v. 163, n. 991, p. 224-231, 1965.

READING, N. C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 254, p. 1-11, 2005. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2005.00001.x.

RESTREPO, A. V.; SALAZAR, B. E.; AGUDELO, M.; RODRIGUEZ, C. A.; ZULUAGA, A. F.; VESGA, O. Optimization of culture conditions to obtain maximal growth of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **BMC Microbiol.**, v. 5, n. 34, 2005. DOI: 10.1186/1471-2180-5-34.

ROBERTS, I. S. The Biochemistry and Genetics of Capsular Polysaccharide production in Bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 50, p. 285-315, 1996.

ROSS, R. A.; MADOFF, L. C.; PAOLETTI, L. C. Regulation of cell component production by growth rate in the group B Streptococcus. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 17, p. 5389-5394, 1999.

STRATEGIC ADVISORY GROUP OF EXPERTS - SAGE. **Detailed Review Paper on Pneumococcal Conjugate Vaccine** - presented to the WHO Strategic Advisory Group of Experts (SAGE) on Immunization. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/SAGE_wg_detailedreview_pneumoVaccine.pdf>. Acesso em: 31 jul. 2007.

SCHAFFNER, A.; MICHEL-HARDER, C.; YEGINSOY, S. Detection of Capsular Polysaccharide in Serum for the Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia: Clinical and Experimental Evaluation. **J. Infect. Dis.**, v. 163, p. 1094-1102, 1991.

SCHNEERSON, R.; LEVI, L.; ROBBINS, J. B.; BRYLA, D. M.; SCHIFFMAN, G.; LAGERGARD, T. Synthesis of a conjugate vaccine composed of pneumococcus type 14 capsular polysaccharide bound to pertussis toxin. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 9, p. 3528-3532, 1992.

SØRENSEN, U. B. S.; HENRICHSEN, J.; CHEN, H. C.; SZU, S. C. Covalent linkage between the capsular polysaccharide and the cell wall peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae* revealed by immunochemical methods. **Microb. Pathog.**, v. 8, p. 325-334, 1990.

STORAÏ, J. **Analyse métabolique et transcriptomique de *Streptococcus pneumoniae* en lien avec la production de polysaccharide capsulaire**. 2008. 264 f. Ph.D Thesis (Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries) - Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Université de Toulouse, 2008.

SZU, S. C.; ORAVEC, L. S. Detection of "Neutral" Type 7F and Type 14 Pneumococcal Capsular Polysaccharides by Immunoelectrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 15, n. 6, p. 1172-1175, 1982.

SWENNEN, E. F. **Fed Batch Culture Methods for Streptococci**. WIPO Patent Application WHO 2007/052168, 2007. 43 p.

TANIAI, H.; IIDA, K.; SEKI, M.; SAITO, M.; SHIOTA, S.; NAKAYAMA, H.; YOSHIDA, S. Concerted action of lactate oxidase and pyruvate oxidase in aerobic growth of *Streptococcus pneumoniae*: role of lactate as an energy source. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 10, p. 3572-3579, 2008. DOI: 10.1128/JB.01882-07.

TILLET, W. S.; CAMBIER, M. J.; McCORMACK, J. E. The Treatment of Lobar Pneumonia and Pneumococcal Empyema with Penicillin. **J Urban Health**, v. 20, n.3, p. 142-178, 1944.

TODA, K. Theoretical and methodological studies of continuous microbial bioreactors. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 49, p. 219-233, 2003.

TOMASZ, A. Surface Components of *Streptococcus pneumoniae*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 3, n. 2, p. 190-211, 1981.

van der RIJN, I.; KESSLER, R. E. Growth characteristics of group A streptococci in a new chemically defined medium. **Infect. Immun.**, v. 27, n. 2, p. 444-448, 1980.

VENTURA, C. L.; CARTEE, R. T.; FORSEE, W. T.; YOTHER, J. Control of capsular polysaccharide chain length by UDP-sugar substrate concentrations in *Streptococcus pneumoniae*. **Mol. Microbiol.**, v. 61, n. 3, p. 723-733, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05259.x.

WARE, D.; WATT, J.; SWIATLO, E. Utilization of putrescine by *Streptococcus pneumoniae* during growth in choline-limited medium. **J. Microbiol.**, v. 43, n. 5, p. 398-405, 2005.

WATSON, D. A.; MUSER, D. M. Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 9, p. 3135-3138, 1990.

WEISER, J. N.; BAE, D.; EPINO, H.; GORDON, S. B.; KAPOOR, M.; ZENEWICZ, L. A.; SHCHEPETOV, M. Changes in availability of oxygen accentuate differences in capsular polysaccharide expression by phenotypic variants and clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 9, p. 5430-5439, 2001. DOI: 10.1128/IAI.69.9.5430-5439.2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Recommendations for the production and control of pneumococcal conjugate vaccines. **World Health Organ Tech Rep Ser**, n. 927, Annex 2, p. 64-98, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, v. 82, n. 12, p. 93-104, 2007.

YOTHER, J.; WHITE, J. M. Novel Surface Attachment Mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* Protein PspA. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 10, p. 2976-2985, 1994.

YOTHER, J. Capsule. In: TUOMANEN, E. I. **The pneumococcus**. Washington, EUA: ASM Press, 2004. Cap 3, p. 30-48.

YOTHER, J.; BENTLEY, S. D.; HENNESSEY, J. P. Jr. Genetics, Biosynthesis, and Chemistry of Pneumococcal Capsular Polysaccharides. In: SIBER, G. R.; KLUGMAN, K. P.; MÄKELÄ, P. H. **Pneumococcal Vaccines**. Washington, EUA: ASM Press, 2008. Cap 3, p. 33-46.

ANEXO - SOLUÇÕES ESTOQUE PARA PREPARO DE CDM

solução estoque	componente	massa (g)	solvente	volume solução estoque (mL)	mL solução estoque/ 1 L CDM
1	KH ₂ PO ₄	1	H ₂ O	50	10
	K ₂ HPO ₄	5			
2	Asparagina	0,25	H ₂ O	50	20
3	L-Ácido Aspártico	0,25	primeiramente dissolver em 0,8 mL de NaOH 2,5 N, então completar o volume com H ₂ O a 54 °C	50	20
	L-Fenilalanina	0,25			
	L-Serina	0,25			
	L-Prolina	0,5			
	L-Hidroxiprolina	0,5			
	Glicina	0,5			
4	L-Leucina	0,5	H ₂ O a 54 °C	50	20
5	Ácido L-Glutâmico	1,5	dissolver em 4,8 mL de NaOH 2,5 N, então completar com H ₂ O a 54 °C	50	3,4
6	L-Alanina	1	H ₂ O	50	5
7	L-Isoleucina	0,5	H ₂ O a 54 °C	50	10
8	L-Metionina	0,5	H ₂ O a 54 °C	50	10
9	L-Treonina	1	H ₂ O a 54 °C	50	10
10	L-Arginina HCl	1,21	H ₂ O	50	5
11	L-Histidina HCl H ₂ O	1,35	H ₂ O	50	5
12	L-Triptofano	1	dissolver em 5 mL de HCl 2 N, depois completar com H ₂ O	50	5
13	L-Valina	1	H ₂ O	50	5
14	L-Lisina	1,38	H ₂ O	50	5
15 ^a	Riboflavina (LS)	0,004	dissolver em 0,05 mL de ácido acético, então completar com H ₂ O	50	25
16 ^a	Nicotinamida	0,08	H ₂ O	200	25
	Ácido Pantoteico	0,032			
	Tiamina HCl (LS)	0,016			
	Ácido p-Aminobenzóico	0,0032			
17 ^a	Biotina (LS)	0,005	primeiramente dissolver em 1 mL de etanol 95%. Adicionar 49 mL de HCl 0,01 N a 54 °C. Descartar 30 mL e aos 20 mL restantes adicionar 180 mL de HCl 0,01 N	200	20
18 ^a	Ácido Fólico (LS)	0,004	dissolver em 0,08 mL de NaOH 2,5 N, então completar com H ₂ O	200	40
19	Piridoxamina 2HCl	0,0115	H ₂ O	50	6,25
20	L-Glutamina	1	H ₂ O	50	10
21	L-Cistina	0,5	dissolver em 10 mL de HCl 2 N, então completar com H ₂ O	50	5
22	L-Tirosina	0,5	dissolver em 2 mL de NaOH 2,5 N, então completar com H ₂ O	50	10
23	Adenina Sulfato	0,174	dissolver em 20 mL de HCl 2 N, então completar com H ₂ O a 54 °C	200	44
	Guanina HCl H ₂ O	0,124			
	Uracil	0,1			
24	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7	H ₂ O	50	5
25	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,05	dissolver em 0,6 mL de HCl 2 N, então completar com H ₂ O	50	5
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,06712			
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,056			
	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,01			

^a armazenados em local escuro