

BEATRIZ ISVA GONÇALVES

Cinética do cultivo de *Neisseria lactamica* em biorreator

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

São Paulo
2012

BEATRIZ ISVA GONÇALVES

Cinética do cultivo de *Neisseria lactamica* em biorreator

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. Rocilda Perazzini
Furtado Schenkman

Versão original

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Gonçalves, Beatriz Isva.

Cinética do cultivo de *Neisseria lactamica* em biorreator / Beatriz Isva Gonçalves. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Rocilda Perazzini Furtado Schenkman.

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: Desenvolvimento de bioprocessos.

Versão do título para o inglês: Bioreactor cultivation kinetics of *Neisseria lactamica*.

1. *Neisseria lactamica* 2. Vesícula de membrana externa 3. OMV
4. Cinética em biorreator 5. Vacina meningocócica I. Schenkman,
Profa. Dra. Rocilda Perazzini Furtado II. Universidade de São Paulo.
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/IPT/Instituto Butantan. Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB0132/2012

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

Candidato(a): Beatriz Isva Gonçalves.

Título da Dissertação: Cinética do cultivo de *Neisseria lactamica* em biorreator.

Orientador(a): Profa. Dra. Rocilda Perazzini Furtado Schenkman.

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:

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre olhando por mim.

Aos meus pais Abel e Myrian e ao meu irmão Pedro por estarem sempre ao meu lado e acompanharem de perto toda a minha trajetória.

À Dra Rocilda por me orientar desde 2006, quando ainda era aluna de iniciação científica. Agradeço a amizade, o apoio e todos seus ensinamentos.

À Dra Mickie que me ajudou com todas as fermentações e me ensinou a utilizar vários programas de computador, além de suas sugestões e sua disponibilidade, que foram essenciais para a realização deste trabalho. E aos seus alunos Felipe e Juliano que me ajudaram com as amostras de HPLC.

Às companheiras de laboratório Giovanna e Mariana por estarem ao meu lado no dia-a-dia do laboratório, pela ajuda durante os experimentos e pelas boas conversas.

À amiga Claudia pelas caminhadas, pela companhia e por todo o apoio que foram fundamentais para mim, tanto como pessoa, quanto como profissional.

Aos amigos Erika, Laís, Dani, Roberta, Juliano, Paulo Wolf, Paulo Vinícius e Lud, pelos maravilhosos momentos de almoço, festinhas e muitas risadas. Que mesmo não sendo do laboratório deles, me acolheram de uma maneira que eu só tenho a agradecer.

À Dra Viviane pela ajuda das análises estatísticas do experimento fatorial. E agradeço também aos seus alunos, Bruno e Anne, que foram meus companheiros das disciplinas do mestrado e também foram pessoas que pude contar sempre que precisei.

Aos funcionários do Laboratório de Fermentação do Instituto Butantan: Sr Lourivaldo, Ana, Máximo e Hélio, pelo preparo de todo o material utilizado durante todos os ensaios realizados.

À Dra Célia e à Dra Vera, pela companhia e pelas conversas durante todo o tempo em que estive no Instituto Butantan.

Ao Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan que me acolheu como estagiária e proporcionou meu crescimento profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo apoio financeiro.

“Conheço muitos que não puderam quando queriam,
porque não fizeram quando podiam.”

François Rabelais

RESUMO

GONÇALVES, B. I. **Cinética do cultivo de *Neisseria lactamica* em biorreator.** 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Neisseria lactamica é uma das primeiras bactérias a colonizar a nasofaringe de neonatos e está envolvida na aquisição da imunidade natural contra *Neisseria meningitidis*. Vesículas de membrana externa (OMV) de *N. lactamica* são antígenos potenciais contra *N. meningitidis*, patógeno causador da doença meningocócica. Diferentemente de *N. meningitidis*, não é possível cultivar *N. lactamica* no meio líquido definido de Catlin (MC), sendo necessária a adição do extrato de levedura (YE). O objetivo deste trabalho foi estudar a cinética de crescimento bacteriano, de produção de OMV, da fonte de carbono (lactato), e dos produtos do metabolismo, para melhorar condições de cultivo e de produção de OMV (antígeno vacinal). Foram realizados ensaios em biorreator de 5 L, a 36 °C, pressão de 0,2 bar, vazão de ar de 1 L/min, agitação entre 250-850 rpm, com 8 grupos: A, B, C, D, E, F em cultivos descontínuos por 12h, grupos G e H descontínuos, por 14 h, alimentados com lactato, e grupo H com pulsos de aminoácidos e YE. Previamente foram testadas concentrações de oxigênio dissolvido em 10% ou 30% e foi padronizada em 30%. Foi utilizado MC como meio mínimo e foram analisados os efeitos das concentrações do lactato, aminoácidos e YE. Nas bateladas simples, o consumo de lactato ocorreu até a 6^a-8^a hora e, decorrente do metabolismo microbiano, houve aumento das concentrações de citrato e acetato no meio. Quando o lactato atingia concentração mínima, o citrato e acetato começavam a decair, sugerindo serem consumidos pelo micro-organismo. Nas bateladas simples, os melhores resultados foram no grupo F, com adição de 2 g/L de YE no meio e concentrações dobradas de lactato e cinco aminoácidos constitutivos do MC. Neste grupo, a biomassa máxima foi cerca de 6,0 de DO₅₄₀, 175 mg/L de rendimento de OMV, produtividade em biomassa (Prod X) de 0,27 g/L.h, produtividade de OMV (Prod P) de 15,83 mg/L.h e fator de conversão OMV/ biomassa ($Y_{p/x}$) de 68,69 mg/g. O mesmo meio do grupo F foi utilizado nos grupos G e H e ambos foram alimentados com lactato. No grupo H foi dado pulso de aminoácidos e de YE. No grupo G a biomassa máxima foi 7,3 de DO₅₄₀, 298 mg/L de rendimento de OMV, Prod X de 0,26 g/L.h, Prod P de 24,64 mg/L.h e $Y_{p/x}$ de 93,63 mg/g. No grupo H a biomassa máxima foi 9,9 de DO₅₄₀, 401 mg/L de rendimento de OMV, Prod X de 0,33 g/L.h, Prod P de 36,12 mg/L.h e $Y_{p/x}$ de 92,25 mg/g. O maior $\mu_{x\text{máx}}$, em torno de 0,70, foi observado nos grupos F, G e H. O aumento da concentração de lactato apresentou efeito positivo sobre o rendimento de OMV e o YE sobre o aumento da biomassa. Mesmo com adição do YE a presença dos 5 aminoácidos constitutivos do MC são necessários para a obtenção de biomassa e principalmente rendimento de OMV. Neste trabalho foram apresentadas imagens inéditas de microscopia eletrônica de *N. lactamica* e suas OMV.

Palavras-chave: *Neisseria lactamica*. Vesícula de membrana externa. OMV. Cinética em biorreator. Vacina meningocócica.

ABSTRACT

GONÇALVES, B. I. **Bioreactor cultivation kinetics of *Neisseria lactamica***. 2012. 107 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Neisseria lactamica is one of the first bacteria to colonize the nasopharynx of neonates and it is involved with the acquisition of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *N. lactamica* outer membrane vesicles (OMV) are potential antigens against *N. meningitidis*, the pathogen of meningococcal disease. *N. meningitidis* grows in Catlin medium (MC) but *N. lactamica* requires addition of yeast extract (YE). The objective of this work was to analyze the kinetics of bacterial growth, OMV production, the carbon source (lactate), and products of metabolism, to improve growing conditions and OMV production. Process conditions comprised: 5L bioreactor, 36 °C, 0.2 bar, overlay air flow rate of 1 L/min, agitation varying from 250 to 850 rpm. Eight groups were studied: A, B, C, D, E, F in batch cultures for 12h, and groups G and H, for 14h in fed-batch process with lactate, and group H with pulses of amino acids and YE. Dissolved oxygen was standardized at 30% after tests. MC was considered as minimal medium and it was analyzed the concentration effect of lactate, amino acids and YE. In batch process, lactate was consumed until the 6th-8th hour, and the concentrations of citrate and acetate from metabolism increased. When lactate concentration was minimum, citrate and acetate began to decline, suggesting to be consumed by micro-organism. In batch process, the best results were in group F at MC with the double concentrations of lactate and amino acids, added with 2 g/L of YE. In this group maximum biomass was about 6.0 at DO₅₄₀, OMV yield 175 mg/L, productivity in biomass (Prod X) 0.27 g/L.h, productivity of OMV (Prod P) 15.83 mg/L.h and conversion factor OMV/biomass ($Y_{p/x}$) 68.69 mg/g. In groups G and H the culture medium was the same as in the group F but G and H were fed with lactate. In group H pulse of amino acids and YE were done. The group G maximum biomass was 7.3 at DO₅₄₀, yield OMV 298 mg/L, Prod X 0.26 g/L.h, Prod P 24.64 mg/L.h and $Y_{p/x}$ 93.63 mg/g. The group H maximum biomass was 9.9 at DO₅₄₀, yield OMV 401 mg/L, Prod X 0.33 g/L.h, Prod P 36.12 mg/L.h and $Y_{p/x}$ 92.25 mg/g. The $\mu_{x\max}$ was about 0.70 in the groups F, G and H. The lactate had a positive effect over OMV yield and YE had a positive effect over biomass. 5 amino acids of MC were necessary to obtain biomass and OMV yield even with addition of YE. Electron microscopy of *N. lactamica* and their OMV morphology diversity were shown.

Keywords: *Neisseria lactamica*. Outer membrane vesicle. OMV. Bioreactor kinetics. Meningococcal vaccine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema dos componentes da membrana externa do meningococo encapsulado.....	21
Figura 2 – Fluxograma do processo de cultivo de <i>N. lactamica</i>	29
Figura 3 – Curva da biomassa (DO ₅₄₀) de <i>N. lactamica</i> em agitador rotativo em MC com 1 g/L YE em pH 7,0 e em pH 8,0.....	44
Figura 4 - Rendimento de OMV de <i>N. lactamica</i> , em mg/L, na oitava hora de cultivo, em MC com 1 g/L de YE com pH iniciais de 7,0 e 8,0.....	44
Figura 5 – Curva da biomassa (DO ₅₄₀) de <i>N. lactamica</i> em agitador rotativo em MC com 1 g/L YE e em MC com o acréscimo de aminoácidos e vitaminas.....	46
Figura 6 – Curva da biomassa (DO ₅₄₀) de <i>N. lactamica</i> em agitador rotativo em experimento fatorial de dois níveis, o de maior e de menor concentração.....	48
Figura 7 – Curvas de biomassa (DO ₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L) acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com 1g/L YE, com 10% de oxigênio dissolvido. Grupo A , ensaio 1.....	53
Figura 8 – Curvas de biomassa (DO ₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L) acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com 1g/L YE, com 10% de oxigênio dissolvido. Grupo A , ensaio 2.....	54
Figura 9 – Curvas de biomassa (DO ₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com 1g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. Grupo B , ensaio 3.....	57
Figura 10 – Curvas de biomassa (DO ₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com 1g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. Grupo B , ensaio 4.....	58
Figura 11 – Curvas de biomassa (DO ₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC sem seus cinco aminoácidos constitutivos, com 1g/L YE, com 10% de oxigênio dissolvido. Grupo C , ensaio 5.....	60
Figura 12 – Curvas de biomassa (DO ₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC sem seus cinco aminoácidos constitutivos, com 1g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. Grupo D , ensaio 6.....	62
Figura 13 – Curvas de biomassa (DO ₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC sem seus cinco aminoácidos constitutivos, com 1g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. Grupo D , ensaio 7.....	63
Figura 14 – Curvas de biomassa (DO ₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com o dobro das concentrações de lactato, dos seus cinco	

aminoácidos constitutivos, com adição apenas dos aminoácidos do YE, com 30% de oxigênio dissolvido. Grupo E , ensaio 8.....	66
Figura 15 – Curvas de biomassa (DO ₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com o dobro das concentrações de lactato, dos seus cinco aminoácidos constitutivos, com adição apenas dos aminoácidos do YE, com 30% de oxigênio dissolvido. Grupo E , ensaio 9.....	67
Figura 16 – Curvas de biomassa (DO ₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com o dobro das concentrações de lactato, dos seus cinco aminoácidos constitutivos, com 2g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. Grupo F , ensaio 10.....	69
Figura 17 – Curvas de biomassa (DO ₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com o dobro das concentrações de lactato, dos seus cinco aminoácidos constitutivos, com 2 g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. Grupo F , ensaio 11.....	71
Figura 18 – Curvas de biomassa (DO ₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com o dobro das concentrações de lactato, dos seus cinco aminoácidos constitutivos, com 2g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. Grupo G , ensaio 12.....	74
Figura 19 – Curvas de biomassa (DO ₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com o dobro das concentrações de lactato, dos seus cinco aminoácidos constitutivos, com 2g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. Grupo H , ensaio 13.....	77
Figura 20 – Cinética do glicerol durante o cultivo de <i>N. lactamica</i> em biorreator em MC + 1 g/L YE.....	83
Figura 21 – Valores dosados de amônia dos cultivos realizados em biorreator.....	84
Figura 22 – Ciclo de Krebs e outras reações.....	87
Figura 23 – Micrografias eletrônicas de <i>N. lactamica</i>	90
Figura 24 – SDS-PAGE 12,5% das amostras de OMV obtidas na 1 ^a , 3 ^a , 5 ^a , 7 ^a , 9 ^a e 11 ^a hora de cultivo em biorreator.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Doença meningocócica: casos e porcentagem por sorogrupo. Estado de São Paulo. 1998 a 02/mar/2012.....	19
Tabela 2 – Propriedades das principais proteínas de membrana externa de <i>N. meningitidis</i>	22
Tabela 3 – Ensaio preliminares realizados em agitador rotativo.....	33
Tabela 4 – Ensaio realizados em biorreator.....	36
Tabela 5 – Valores da biomassa (DO_{540}) de <i>N. lactamica</i> cultivada em agitador rotativo em MC, com 1 g/L YE, em pH 7,0 e em pH 8,0 e respectivos valores de pH durante o cultivo.....	43
Tabela 6 – Valores da biomassa (DO_{540}) de <i>N. lactamica</i> em MC + 1 g/L YE e em MC com o acréscimo de aminoácidos e vitaminas.....	45
Tabela 7 – Valores de biomassa (OD_{540}) obtidos no planejamento fatorial de <i>N. lactamica</i> em experimento de 3 variáveis (X1, X2 e X3).....	47
Tabela 8 – Resultados das análises do planejamento fatorial.....	49
Tabela 9 - Valores obtidos no ensaio do ponto central.....	50
Tabela 10 – Análise de significância estatística dos efeitos das variáveis independentes sobre a biomassa, OMV e OMV/biomassa.....	51
Tabela 11 – Coeficientes de concentração celular dos ensaios e seus respectivos coeficientes de correlação (R^2).....	52
Tabela 12 – Resultados experimentais do grupo A , ensaio 1.....	53
Tabela 13 – Resultados experimentais do grupo A , ensaio 2.....	54
Tabela 14 – Resultados experimentais do grupo B , ensaio 3.....	56
Tabela 15 – Resultados experimentais do grupo B , ensaio 4.....	57
Tabela 16 – Resultados experimentais do grupo C , ensaio 5.....	60
Tabela 17 – Resultados experimentais do grupo D , ensaio 6.....	62
Tabela 18 – Resultados experimentais do grupo D , ensaio 7.....	63
Tabela 19 – Resultados experimentais do grupo E , ensaio 8.....	65
Tabela 20 – Resultados experimentais do grupo E , ensaio 9.....	67

Tabela 21 – Resultados experimentais do grupo F , ensaio 10.....	69
Tabela 22 – Resultados experimentais do grupo F , ensaio 11.....	70
Tabela 23 – Resultados experimentais do grupo G , ensaio 12.....	73
Tabela 24 – Resultados experimentais do grupo H , ensaio 13.....	76
Tabela 25 – Máximos valores de DO ₅₄₀ , de massa seca (g/L) e de OMV (mg/L).....	79
Tabela 26 – Concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$), concentração de OMV máxima ($P_{m\acute{a}x}$), produtividade em biomassa (Prod X) e de OMV (Prod P); fatores de conversão OMV/lactato ($Y_{p/s}$), biomassa/lactato ($Y_{x/s}$) e OMV/biomassa ($Y_{p/x}$); e velocidade específica máxima de geração em biomassa ($\mu_{xm\acute{a}x}$).....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – micrograma

µL – microlitro

AA – aminoácidos

BSA – albumina de soro bovino

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – densidade óptica

DO₅₄₀ – densidade óptica com comprimento de onda de 540 nm

FrpB – ferric enterobactin receptor

g – grama

h – hora

HBsAg – antígeno de superfície da hepatite B

HPLC – Cromatografia Líquida de alta eficiência

kDa – Kilodalton

L – litro

LOS – lipooligossacarídeo

m – massa

M – Molar

MC – Meio de Catlin

MCDA – Meningococcal Defined Agar

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

mM – milimolar

NEDA – meio definido de ágar para *Neisseria*

NIPH – Instituto Norueguês de Saúde Pública

nm – nanômetros

O₂D – oxigênio dissolvido

OMV – vesícula de membrana externa

Opa/c – proteínas de opacidade

PBS – solução salina tamponada com fosfato

p/v – peso/volume

pH – potencial hidrogeniônico

PorA – proteína porina tipo A

PorB – proteína porina tipo B

Rmp – Proteína de redução modificável

rpm – rotação por minuto

RPMI 1640 – Meio de cultura criado pelo Instituto Roswell Park Memorial

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

UF – ultrafiltrado

YE – Extrato de levedura ultrafiltrado

UV – Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

$\mu_{x\text{máx}}$ – velocidade específica de geração de biomassa (h^{-1})

μ_x – velocidade específica de formação de biomassa (h^{-1})

dX – biomassa formada no intervalo de tempo dt (g)

dX/dt – derivada dos valores de concentração celular [$\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$]

P_i – concentração de produto inicial (mg/L)

$P_{\text{máx}}$ – concentração máxima de produto (mg/L)

Prod P – produtividade em produto (g/L.h)

Prod X – produtividade em biomassa (g/L.h)

S_i - concentração de substrato inicial (g/L)

$S_{p\text{máx}}$ – concentração de substrato quando a concentração do produto é máxima (g/L)

$S_{x\text{máx}}$ – concentração de substrato quando a concentração celular é máxima (g/L)

t – tempo (h)

t_{fp} – tempo de cultivo correspondente a $P_{\text{máx}}$ (h)

t_{fx} – tempo de cultivo correspondente a $X_{\text{máx}}$ (h)

t_i – tempo inicial (h)

v – volume (L)

X – concentração celular (g/L);

X_i – concentração celular inicial (g/L)

$X_{\text{máx}}$ – concentração máxima celular (g/L)

$Y_{P/S}$ – fator de conversão substrato/produto (g produto/g substrato)

$Y_{P/X}$ – fator de conversão célula/produto (g produto/g biomassa)

$Y_{X/S}$ – fator de conversão substrato/célula (g biomassa/g substrato)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Objetivos	17
1.2 Revisão de literatura	18
1.2.1 <i>Doença meningocócica</i>	18
1.2.2 <i>Neisseria meningitidis e Neisseria lactamica</i>	19
1.2.3 <i>Vesículas de membrana externa – OMV</i>	20
1.2.4 <i>Vacina</i>	23
1.2.5 <i>Metabolismo de N. lactamica</i>	27
2 MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1 Micro-organismo	30
2.2 Lote semente e lote trabalho	30
2.3 Meios de cultura	30
2.4 Ensaios preliminares em agitador rotativo	32
2.5 Ensaios em biorreator	33
2.5.1 <i>Descongelamento</i>	33
2.5.2 <i>Preparo do inóculo</i>	34
2.5.3 <i>Cultivo em biorreator</i>	34
2.5.4 <i>Determinação da concentração celular</i>	37
2.6 Purificação e análise das OMV	37
2.6.1 <i>Dosagem de proteínas</i>	37
2.6.2 <i>Eletroforese</i>	38
2.6.3 <i>Microscopia eletrônica</i>	38
2.7 Análise do sobrenadante do cultivo das amostras do biorreator	39
2.8 Determinação dos parâmetros cinéticos	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 Ensaios em agitador rotativo	43
3.1.1 <i>Ensaio A – Efeito do pH inicial do meio</i>	43
3.1.2 <i>Ensaio B – Efeito de vitaminas e aminoácidos</i>	43
3.1.3 <i>Ensaio C – Efeito das fontes de carbono e de nitrogênio (planejamento fatorial)</i>	46
3.2 Ensaios em biorreator	51
3.2.1 <i>Coeficiente de concentração celular entre massa seca e DO₅₄₀</i>	51

3.2.2 Ensaio do grupo A.....	52
3.2.3 Ensaio do grupo B.....	55
3.2.4 Ensaio do grupo C.....	59
3.2.5 Ensaio do grupo D.....	61
3.2.6 Ensaio do grupo E.....	64
3.2.7 Ensaio do grupo F.....	68
3.2.8 Ensaio do grupo G.....	72
3.2.9 Ensaio do grupo H.....	75
3.3 Análises da produtividade e fatores de conversão dos ensaios realizados em biorreator.....	78
3.4 Glicerol.....	82
3.5 Amônia.....	83
3.6 Discussão geral dos resultados obtidos em biorreator.....	85
3.7 Microscopia eletrônica das amostras de biorreator.....	89
3.8 Perfil eletroforético das OMV do ensaio realizado em biorreator.....	91
4 CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS.....	95
APÊNDICES.....	101
APÊNDICE A – Composição dos Meios de Cultura (g/L).....	101
APÊNDICE B – Curvas de DO₅₄₀ X Massa Seca (g/L).....	104
APÊNDICE C – Dados obtidos em tempo real dos cultivos em biorreator.....	105
APÊNDICE D – Valores da concentração de amônia (mg/L).....	106
APÊNDICE E – Géis de Eletroforese.....	107

1 INTRODUÇÃO

A doença meningocócica é causada pela bactéria *Neisseria meningitidis*, também conhecida como meningococo. Esta bactéria pode atravessar a barreira hematoencefálica e provocar uma inflamação das meninges do cérebro, ou seja, meningite.

O Laboratório de Bioprocessos do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, vem trabalhando na adequação de um meio de cultura para cultivar a bactéria comensal *Neisseria lactamica*. Este micro-organismo, assim como *N. meningitidis*, libera durante o cultivo as vesículas de membrana externa (OMV). Estas vesículas são compostas pelas mesmas proteínas da membrana externa da bactéria e possuem algumas propriedades imunogênicas. Muitos estudos verificaram reatividade cruzada entre as OMV de ambas as espécies, o que é um aspecto positivo, pois *N. lactamica* não é uma espécie patogênica. As OMV também podem ser utilizadas como adjuvante quando administradas com outros antígenos.

No processo de produção as OMV são liberadas para o meio de cultivo, o que facilita na sua extração e purificação, pois praticamente não ocorre lise bacteriana durante o cultivo e conseqüentemente não ocorre contaminação por material intracelular como proteínas e ácidos nucleicos.

No Brasil 3,2 milhões de crianças nascem a cada ano e, por isso, o país demanda grandes quantidades de doses de vacinas. Seria altamente vulnerável ao sistema de saúde do país ser dependente de importação desses insumos. Isso porque o mercado internacional, muitas vezes, é afetado por situações políticas e econômicas, o que torna muito difícil a aquisição imediata de imunobiológicos, sobretudo em grandes quantidades como a que o país necessita.

Uma vacina composta por OMV de *N. lactamica* seria promissora sob o aspecto de biossegurança, pois diferentemente das vacinas contra meningite B que estão sendo estudadas, o micro-organismo, a ser cultivado, não é patogênico.

1.1 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi analisar a cinética de crescimento, de produção de OMV, da fonte de carbono (lactato), de citrato, de acetato e de amônia, visando

determinar melhores condições para o cultivo e maximizar a produção de OMV (antígeno vacinal).

1.2 Revisão de literatura

1.2.1 Doença meningocócica

A doença meningocócica, tanto da forma endêmica quanto na epidêmica, tem sido uma importante causa de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento e também em países desenvolvidos (MAIDEN; CAUGANT, 2006). A incidência anual é de 1 caso por 100.000 habitantes em países desenvolvidos, com letalidade de 8% e é de 1.000 casos por 100.000 habitantes com letalidade de 10 a 15% no norte da África, considerado o “cinturão da meningite” (HARRISON; TROTTER; RAMSAY, 2009).

É uma doença exclusivamente humana, que pode ocasionar sequelas neurológicas permanentes, danos nos tecidos, e perda de membros do indivíduo (MAIDEN; CAUGANT, 2006). Os sintomas são: febre, rigidez ou dor na nuca, dor de cabeça, náuseas e vômitos (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - CVE, 2012). A progressão da doença é rápida, podendo levar a óbito poucas horas após o aparecimento dos primeiros sintomas (MAIDEN; CAUGANT, 2006).

O agente causador da doença meningocócica é a bactéria *Neisseria meningitidis*. Esta bactéria vive em associação comensal com humanos, porém, em alguns casos pode entrar na corrente sanguínea e causar septicemia ou ainda atravessar a barreira hematoencefálica e causar meningite meningocócica (MAIDEN; CAUGANT, 2006).

Ao menos uma vez na vida, a nasofaringe da maioria das pessoas será colonizada assintomaticamente por *Neisseria meningitidis*. Cerca de 20% da população humana saudável tem a nasofaringe colonizada por esta bactéria. (DAVIDSEN; TONJUM, 2006).

Devido à gravidade do quadro clínico, rápida evolução e pela possibilidade de causar surtos ou epidemias, a doença meningocócica é uma doença de notificação obrigatória no Brasil, desde a década de 70.

Os principais sorogrupos de *Neisseria meningitidis*, no que diz respeito à incidência da doença meningocócica, são A, B, C, Y e W135. No entanto, em São

Paulo, os sorogrupos de maior incidência nas últimas décadas são os sorogrupos B e C de acordo com os dados do CVE (2012), Tabela 1.

Tabela 1 – Doença meningocócica: casos e porcentagem por sorogrupo. Estado de São Paulo. 1998 a 02/mar/2012

ANO	SOROG B		C		W135		Y		OUTROS		TOTAL	
	casos	%	casos	%	casos	%	casos	%	casos	%	casos	%
1998	367	63,4	197	34,0	12	2,1	0	0,0	3	0,5	579	100,0
1999	370	64,1	185	32,1	14	2,4	1	0,2	7	1,2	577	100,0
2000	369	60,0	221	35,9	22	3,6	0	0,0	3	0,5	615	100,0
2001	246	54,5	177	39,2	22	4,9	1	0,2	5	1,1	451	100,0
2002	228	50,9	197	44,0	15	3,3	2	0,4	6	1,3	448	100,0
2003	164	37,6	252	57,8	14	3,2	3	0,7	3	0,7	436	100,0
2004	187	35,8	303	58,0	24	4,6	1	0,2	7	1,3	522	100,0
2005	154	30,2	328	64,3	16	3,1	7	1,4	5	1,0	510	100,0
2006	125	24,3	352	68,3	26	5,0	2	0,4	10	1,9	515	100,0
2007	89	16,3	419	76,6	31	5,7	4	0,7	4	0,7	547	100,0
2008	99	14,5	510	74,8	58	8,5	8	1,2	7	1,0	682	100,0
2009	85	12,0	556	78,6	52	7,4	13	1,8	1	0,1	707	100,0
2010	90	10,8	683	81,8	47	5,6	9	1,1	6	0,7	835	100,0
2011	103	12,6	648	79,2	43	5,3	21	2,6	3	0,4	818	100,0
2012	4	10,5	31	81,6	1	2,6	1	2,6	1	2,6	38	100,0

FONTE: (CVE, 2012)

Na Tabela 1, é possível observar que até 2002, a maioria dos casos de doença meningocócica do estado de São Paulo era provocada pelo sorogrupo B. A partir de 2003, o sorogrupo C passou a ser prevalente chegando, no ano de 2011, a 79,2% dos casos, enquanto que 12,6% eram do sorogrupo B (CVE, 2012).

1.2.2 *Neisseria meningitidis* e *Neisseria lactamica*

Neisseria meningitidis e *Neisseria lactamica* são bactérias em forma de diplococos, Gram-negativas e habitantes comensais obrigatórios da nasofaringe humana (HOLLIS; WIGGINS; WEAVER, 1969). Não são encontradas em nenhum outro lugar da natureza (MAIDEN; CAUGANT, 2006). Diferentemente de *N. meningitidis*, *N. lactamica* não possui cápsula, e não possui a porina de membrana externa PorA, (GORRINGE et al., 2005; TRONCOSO et al., 2002). Ambas são transmitidas de indivíduo para indivíduo por meio de secreções da nasofaringe em forma de aerossol.

Neisseria lactamica é uma das primeiras espécies de *Neisseria* a colonizar a nasofaringe de neonatos (KIM; MANDRELL; GRIFFISS, 1989). São poucos os

trabalhos que estudaram a colonização da população por *N. lactamica*. Em um trabalho do ano de 1978, Gold et al. verificou que cerca de 60% das crianças analisadas por eles, foram portadoras de *N. lactamica* pelo menos uma vez durante os primeiros quatro anos de vida, com uma duração média de colonização em torno de 4 meses. Aproximadamente 3,8% das crianças estudadas, menores de três meses, já possuíam a nasofaringe colonizada por *N. lactamica*. Havia um pico de colonização em torno dos 2 anos de idade, quando aproximadamente 20% das crianças eram portadoras, e depois voltando a cair, chegando a quase 2% de colonização entre os 14 e 17 anos de idade. Em contraste, a colonização da nasofaringe de crianças por *N. meningitidis* foi menor que 1% durante os primeiros 2 anos de vida da criança, e aumentou progressivamente com a idade, chegando a 5,4% em jovens com idade entre 14 e 17 anos (GOLD et al., 1978).

1.2.3 Vesículas de membrana externa – OMV

Devoe e Gilchrist (1973) foram os primeiros a observar, por microscopia eletrônica de transmissão e análise bioquímica, que as vesículas de membrana externa são resultantes de evaginações da membrana externa de *N. meningitidis* e são liberadas no meio de cultura durante seu crescimento. Posteriormente, Santos (2007) verificou que esta liberação ocorria principalmente no início da fase estacionária de crescimento.

As vesículas da membrana externa, conhecidas pela sigla OMV, são capazes de iniciar a ativação do sistema complemento e, desta maneira, redirecionar a ativação do complemento longe de meningococos na circulação, impedindo os efeitos bactericidas (SCHNEIDER et al., 2007).

Essas vesículas apresentam interesse imunogênico porque são constituídas por todos os componentes presentes na superfície da membrana externa da bactéria, isto é, polissacarídeos, fosfolipídios, lipooligossacarídeos e principalmente proteínas de membranas (JOHNSTON; GOTSCHLICH, 1974; POOLMAN, 1995).

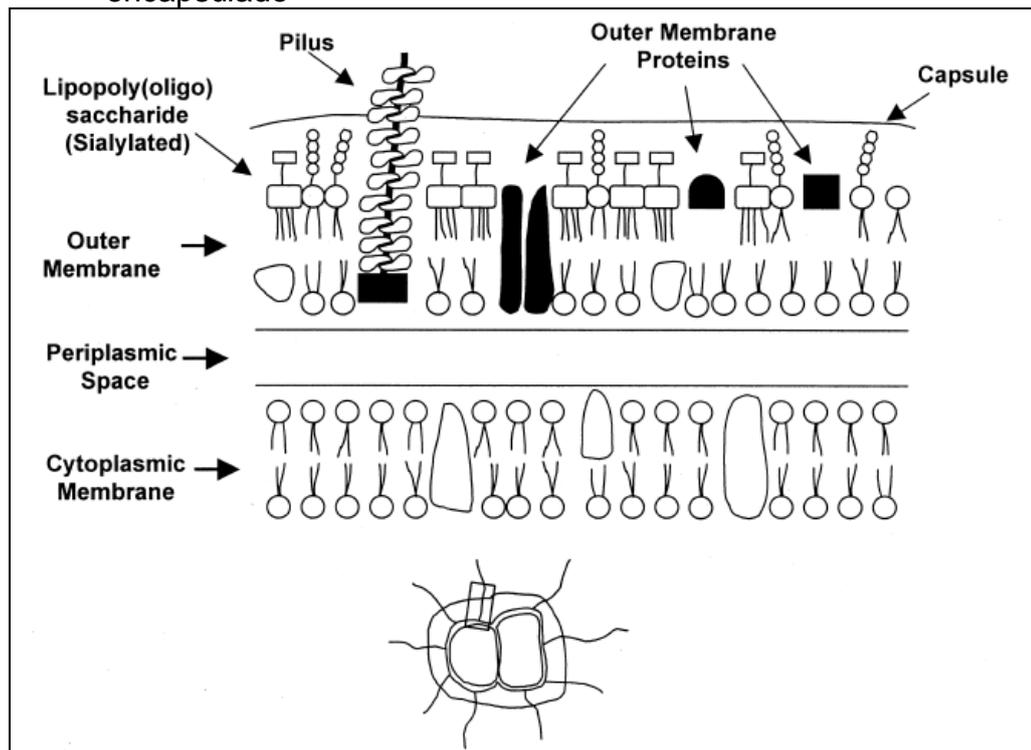
A imunidade induzida por *N. lactamica* não é sorogrupo específica, uma vez que esta espécie não possui cápsula polissacarídica, pois o tipo de polissacarídeo é determinante do sorogrupo (GOLD et al., 1978). Tal fato fornece a evidência de que antígenos não capsulares são importantes e sugere que esses antígenos possam ser compartilhados com *N. meningitidis* (KIM; MANDRELL; GRIFFISS, 1989).

Alguns epítomos dos lipooligosacarídeos são comuns entre *N. meningitidis* e *N. lactamica*. Inclusive, em *N. lactamica*, ele é estruturalmente tão complexo quanto os encontrados em neissérias patogênicas (KIM; MANDRELL; GRIFFISS, 1989).

Vaughan et al. (2006), realizaram uma análise comparativa das proteínas das OMV de *N. meningitidis* do sorogrupo B e das OMV de *N. lactamica*. Verificaram que as OMV possuem um grande repertório de antígenos que têm potencial protetor, e muitas proteínas são comuns entre estas duas espécies de *Neisseria*. Isto confirma o alto grau de homologia entre as estruturas de superfície de *N. meningitidis* e de *N. lactamica*.

Na Figura 1 abaixo, é possível observar com mais detalhe a membrana externa de *N. meningitidis*.

Figura 1 – Esquema dos componentes da membrana externa do meningococo encapsulado



FONTE: (TZENG; STEPHENS, 2000)

A Tabela 2 lista as principais proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* (MUKHOPADHYAY et al., 2005). A porina B, PorB, é um antígeno comum para *N. meningitidis* e *N. lactamica*, que induz resposta em humanos 'in vivo'. Os anticorpos contra a PorB de *N. lactamica* oferecem uma resposta bactericida relativamente boa contra *N. meningitidis* nos modelos experimentais, o

que demonstra que a colonização por *N. lactamica* pode contribuir para a aquisição da imunidade natural contra *N. meningitidis* (TRONCOSO et al., 2002).

Tabela 2 – Propriedades das principais proteínas de membrana externa de *N. meningitidis*

Principais proteínas	Propriedades	Massa molecular (kDa)
PorA	Porina A, apresenta diversidade limitada, e induz anticorpos monoclonais bactericidas e protetores	44-47
PorB	Porina B, apresenta diversidade limitada, e induz anticorpos monoclonais bactericidas e protetores	37-42
Rmp	Proteína de redução modificável, conservada	32-34
Opa/c	Proteínas de opacidade, apresenta expressão altamente variável	25-30
FrpB	Receptor férrico, apresenta expressão variável	70

FONTE: (FRASCH et al., 2001; MUKHOPADHYAY et al., 2005; POOLMAN, 1995)

Mukhopadhyay et al. (2005) cultivaram *N. lactamica* em dois meios de cultura e demonstraram, por meio da técnica de eletroforese, que a expressão das proteínas de membrana externa pode depender tanto da linhagem bacteriana quanto do meio de cultura utilizado para o seu crescimento. Proteínas comuns entre *N. lactamica* e *N. meningitidis* podem ter massas moleculares diferentes (ABEL et al., 2007).

Além da possibilidade de utilização de OMV como antígeno vacinal, há também a possibilidade de seu uso como adjuvante. Sardiñas et al. (2006), chamaram a atenção para o uso de OMV como adjuvante de mucosas. Os autores imunizaram camundongos com OMV de *N. lactamica* e OMV de *N. meningitidis* juntamente com a proteína HBsAg de hepatite por vias intranasal, subcutânea e intraperitoneal. Demonstraram que quando a administração foi pela via intranasal, houve um aumento significativo de anticorpos para a proteína HBsAg quando comparados com as demais vias, e quando comparado com a inoculação intranasal da proteína isolada. De acordo com os autores, além de apresentar alta resposta adjuvante para a proteína coadministrada, OMV de *N. lactamica* administrada intranasalmente, foi capaz de induzir reatividade cruzada com antígenos de *N. meningitidis* (SARDIÑAS et al., 2006).

O uso de vesículas de membrana externa para a indução de anticorpos bactericidas contra antígenos de superfície foi uma abordagem promissora para a meningite B (FRASCH et al., 2001). A conformação nativa das proteínas nas OMV parece ser crucial para uma resposta imune efetiva (FRASCH et al., 2001). A utilização de OMV de *N. lactamica* dentro desta abordagem vacinal também merece ser estudada.

1.2.4 Vacina

Devido aos grandes problemas de saúde pública causados por *N. meningitidis*, algumas vacinas foram desenvolvidas. Um histórico sobre o desenvolvimento das vacinas contra meningite meningocócica desde seus primórdios, por volta de 1912, pode ser visto no artigo de Frasch (1995).

Resumidamente, Frasch (1995) comenta que inicialmente foram testadas vacinas de células inteiras, depois de “exotoxinas” que com os conhecimentos atuais, infere-se que eram constituídas de polissacarídeo capsular, OMV e LOS (lipooligossacarídeo). Posteriormente foram testados candidatos vacinais tais como polissacarídeos capsulares, proteínas de membrana externa (OMP), vesículas de membrana externa (OMV) e lipooligossacarídeos (LOS). As pesquisas com vacinas preparadas com polissacarídeo capsular tiveram continuidade, foram aperfeiçoadas, e até hoje são utilizadas para *N. meningitidis* dos sorogrupos A, C, Y e W135 (FRASCH, 1995). Atualmente, são encontradas no mercado vacinas meningocócicas C conjugadas, vacinas tetravalente conjugadas (sorogrupos A, C, Y e W-135) e vacina meningocócica A conjugada (PANATTO et al., 2011).

As vacinas de polissacarídeos têm certas desvantagens: não são adequadamente imunogênicas em crianças menores de dois anos de idade; a proteção é de curta duração, aproximadamente de três a cinco anos; repetidas imunizações podem ter o efeito de reduzir a resposta imune, ou seja, levar a uma hiporresponsividade (BRÖKER, 2003¹ apud TUNES, 2006).

Além disso, *N. meningitidis* é naturalmente competente ao processo de transformação e recombinação entre os sorogrupos. É frequente a ocorrência de

¹ BROKER, M. Development of new vaccines against meningococcal disease. *Arzneimittelforschung*, v. 53, n. 12, p. 805-813, 2003.

trocas horizontais de DNA entre linhagens, alterando o fenótipo da cápsula e consequentemente, o sorogrupo da linhagem (LANCELLOTTI et al., 2006).

Vacinas polissacarídicas para o sorogrupo B falham na indução de anticorpos bactericidas. A baixa indução de anticorpos é decorrente da similaridade entre o polissacarídeo capsular do sorogrupo B e o polissacarídeo de células neuronais humanas, ambos têm como monômero o ácido siálico (FRASCH, 1995; ZOLLINGER; MORAN, 1991). Tal característica abre discussão sobre efeitos de tolerância imunológica, ou possíveis reações autoimunes, induzidas por uma vacina composta pelo polissacarídeo B (FINNE et al., 1987).

Abordagens alternativas de modificações químicas no polissacarídeo, através de conjugação a proteínas carreadoras, também não mostraram funcionalidade para o polissacarídeo do sorogrupo B (FRASCH, 1995).

No caso de vacinas que utilizam antígenos de superfície, não é claro se o que confere proteção é o anticorpo contra um único antígeno ou se são necessários vários antígenos, isto é, as várias proteínas da membrana externa, para que haja proteção. A vacina holandesa, que é constituída por seis tipos diferentes da proteína PorA, não se mostrou altamente imunogênica como se esperava (POLLARD; FRASCH, 2001).

Vários candidatos a vacinas de OMV foram desenvolvidos, testados em larga escala e tiveram estudos de eficácia na Noruega, Cuba, Brasil, Chile e Nova Zelândia. Os testes com a vacina norueguesa foram conduzidos em 1988, em 171.800 estudantes, e a média de proteção foi de 57,2%. Apesar de conferir proteção contra a doença meningocócica do sorogrupo B, o efeito foi insuficiente para justificar um programa de vacinação pública (BJUNE et al., 1991).

Com a vacina cubana, foi estudada a eficácia das vesículas de membrana externa de *N. meningitidis* sorogrupo B, entre os anos de 1987 a 1989, em 106.000 estudantes de 10 a 14 anos. A eficácia deste estudo foi de 83%. Estes resultados foram confirmados em outro estudo, comparando a população vacinada e a não vacinada em que 133.600 voluntários de 5 meses a 24 anos. O Ministério Cubano de Saúde Pública resolveu vacinar todas as crianças com idade entre 3 meses e 6 anos nas províncias mais afetadas. A eficácia da vacinação variou de 83 a 94%. Após três anos, não houve reações graves, e a doença foi praticamente erradicada (SIERRA et al., 1991).

No Brasil, a vacina cubana foi administrada em São Paulo, na tentativa de controlar a epidemia da doença meningocócica sorogrupo B que ocorreu entre 1989 e 1990. Cerca de 2,4 milhões de crianças com idade entre 3 meses a 6 anos receberam a vacina. A eficácia desta variou com a idade: nas crianças com 4 anos ou mais a eficácia foi de 74%, nas de 2 a 4 anos foi de 47%, e não houve proteção nas menores de 2 anos. Os autores verificaram que 44% dos meningococos do sorogrupo B isolados eram da mesma cepa utilizada no preparo na vacina, o que possivelmente contribuiu para a diferença na proteção, quando comparado aos valores obtidos pelos cubanos (DE MORAES et al., 1992).

Boslego et al. testaram no Chile, em 1995, uma vacina de proteínas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B. Foram 40.811 voluntários, com idades de 1 a 21 anos. Tanto a vacina experimental como a vacina controle (Menomune, A, C, Y e W135 vacina meningocócica de polissacarídeo) foram bem toleradas e causaram poucos efeitos colaterais. Não foi observada proteção em crianças com idade de 1 a 4 anos, mas em voluntários com idade entre 5-21 anos a eficácia da vacina foi de 70% (BOSLEGO et al., 1995).

Desde 1991, a Nova Zelândia estava passando por uma epidemia da doença meningocócica sorogrupo B. Em 2000, o NIPH / Chiron Vaccines prepararam uma vacina de OMV baseada em uma linhagem que estava entre as prevalentes da epidemia. Esta vacina meningocócica sorogrupo B específica foi denominada MeNZB e foi administrada em julho de 2004, o estudo utilizou dados de janeiro de 2001 a junho de 2006. O grupo observou que a taxa da doença era 3,7 vezes maior no grupo não vacinado que no grupo vacinado com uma eficácia vacinal de 73% (KELLY et al., 2007).

Recentemente foi realizada no Chile, a fase 2/3 da vacina 4CMenB da Novartis (SANTOLAYA et al., 2012), que foi desenvolvida utilizando uma abordagem conhecida como "vacinologia reversa" (GIULIANI et al., 2006; RAPPUOLI, 2001), onde proteínas foram selecionadas por meio do genoma para serem candidatas vacinais. A vacina 4CmenB é recombinante, multivalente contra o sorogrupo B, e composta por três proteínas de *N. meningitidis*. Porém, estes antígenos ainda precisam ser administrados juntamente com as OMV para uma resposta imunológica mais abrangente, para várias cepas de *N. meningitidis* B.

A imunidade natural contra *N. meningitidis* é adquirida na infância e juventude através de colonizações sucessivas por espécies comensais de *Neisseria*, como por

exemplo *N. lactamica*, ou outros gêneros de bactérias, que compartilham reatividade cruzada com antígenos de *N. meningitidis* (SÁNCHEZ et al., 2002). Por esta razão, têm surgido na literatura muitos trabalhos com o objetivo de estudar diferentes aspectos do uso de *N. lactamica*, principalmente o uso de suas vesículas de membrana externa, como vacina para meningite meningocócica (SÁNCHEZ et al., 2002; TRONCOSO et al., 2002).

Portadores de *N. lactamica* estão associados com altos títulos de anticorpos contra *N. meningitidis* (POLLARD; FRASCH, 2001). Modelos matemáticos confirmam que a prevalência da colonização por *N. lactamica* está associada com a redução da incidência da doença meningocócica (COEN; CARTWRIGHT; STUART, 2000). Estudos mostram que 66% dos portadores de *N. lactamica* com idade entre três meses e oito anos produziram anticorpos IgG para *N. meningitidis* dos sorogrupos A, B e/ou C (GOLD et al., 1978). Desta forma, pode-se pensar no uso potencial de OMV de *N. lactamica* como antígeno para as meningites meningocócicas.

Para a eficácia de novas preparações vacinais contra meningites, são necessários vários requisitos: a vacina deve oferecer proteção contra todos os sorogrupos de *N. meningitidis* patogênicos; ser efetiva para crianças menores de dois anos de idade; induzir proteção imune de longa duração; ser capaz de induzir respostas com altos títulos de anticorpos bactericidas; ser capaz de ter uma boa segurança e tolerância (BRÖKER, 2003² apud TUNES, 2006).

A doença meningocócica invasiva não será controlada até que vacinas eficazes e seguras contra o meningococo B estejam disponíveis e amplamente utilizadas (PANATTO et al., 2011).

Na década de 90, o Instituto Butantan, juntamente com o Instituto Adolfo Lutz, e a Fundação Oswaldo Cruz, criou o Projeto Meningite, com o objetivo de desenvolver e produzir uma vacina contra a doença meningocócica B e C. Foram estudados o crescimento e melhores condições para a obtenção do polissacarídeo de *N. meningitidis* C (BARUQUE-RAMOS, 2000; BARUQUE-RAMOS; HISS; CONVERTI, 2006; PAZ, 1997; PAZ; BARUQUE-RAMOS; HISS et al., 2003) e a cinética de cultivo em biorreator para a obtenção de OMV de *N. meningitidis* B (SANTOS, 2007; SANTOS; BARUQUE-RAMOS; TANIZAKI et al., 2006). Além

² BROKER, M. Development of new vaccines against meningococcal disease. *Arzneimittelforschung*, v. 53, n. 12, p. 805-813, 2003.

disso, foram realizados estudos imunológicos da vacina conjugada anti-meningocócica sorogrupos B e C (FUKASAWA, 2002; FUKASAWA; GORLA; LEMOS et al., 2003), bem como a formulação desta vacina (CORRÊA, 2002), e foi estudado o desenvolvimento de uma vacina conjugada antimeningocócica sorogrupos B/C (FUKASAWA, 2004; FUKASAWA et al., 2006).

Para cultivar *Neisseria meningitidis*, Santos (2007) testou várias composições do meio de Catlin, sendo que o meio que apresentou melhores resultados de biomassa e de concentração de OMV foi o meio de Catlin com o dobro da concentração de lactato e de aminoácidos, onde a biomassa chegou a aproximadamente 1,7 g/L na 10^a hora de cultivo; e a concentração de OMV chegou a cerca de 160 mg/L na 20^a hora.

No presente trabalho, foram obtidos resultados inéditos em literatura sobre os quais foi realizada discussão original. Entretanto, cabe notar que este se baseou no trabalho anterior de Santos (2007) em parte de metodologia, forma de obtenção e análise de resultados em virtude dos protocolos desenvolvidos no mesmo laboratório em que ambos os trabalhos foram realizados.

1.2.5 Metabolismo de *N. lactamica*

Com exceção do trabalho de Catlin (1973), não foram encontrados trabalhos que estudaram as exigências nutricionais para o cultivo de *Neisseria lactamica*. Catlin (1973) estudou 15 linhagens desta espécie e verificou que diferentemente de *N. meningitidis*, *N. lactamica* não cresceu bem no meio MCDA, constituído por sais, lactato e alguns aminoácidos, ver APÊNDICE A. A biotina e outros componentes tiveram que ser adicionados ao meio para que as 15 linhagens crescessem. Todas as linhagens cresceram bem no meio definido com mais de 50 componentes - meio NEDA, ver APÊNDICE A. A omissão da cisteína reduziu o crescimento de 9 das 15 linhagens estudadas (CATLIN, 1973). Os meios desenvolvidos por Catlin tinham por finalidade identificar o perfil nutricional para separar espécies de *Neisseria*: *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* e *N. lactamica* e não era de seu interesse a obtenção de biomassa destas espécies, por isso, desenvolveu meios sólidos, isto é, com ágar em sua composição, não adequado para obtenção de biomassa.

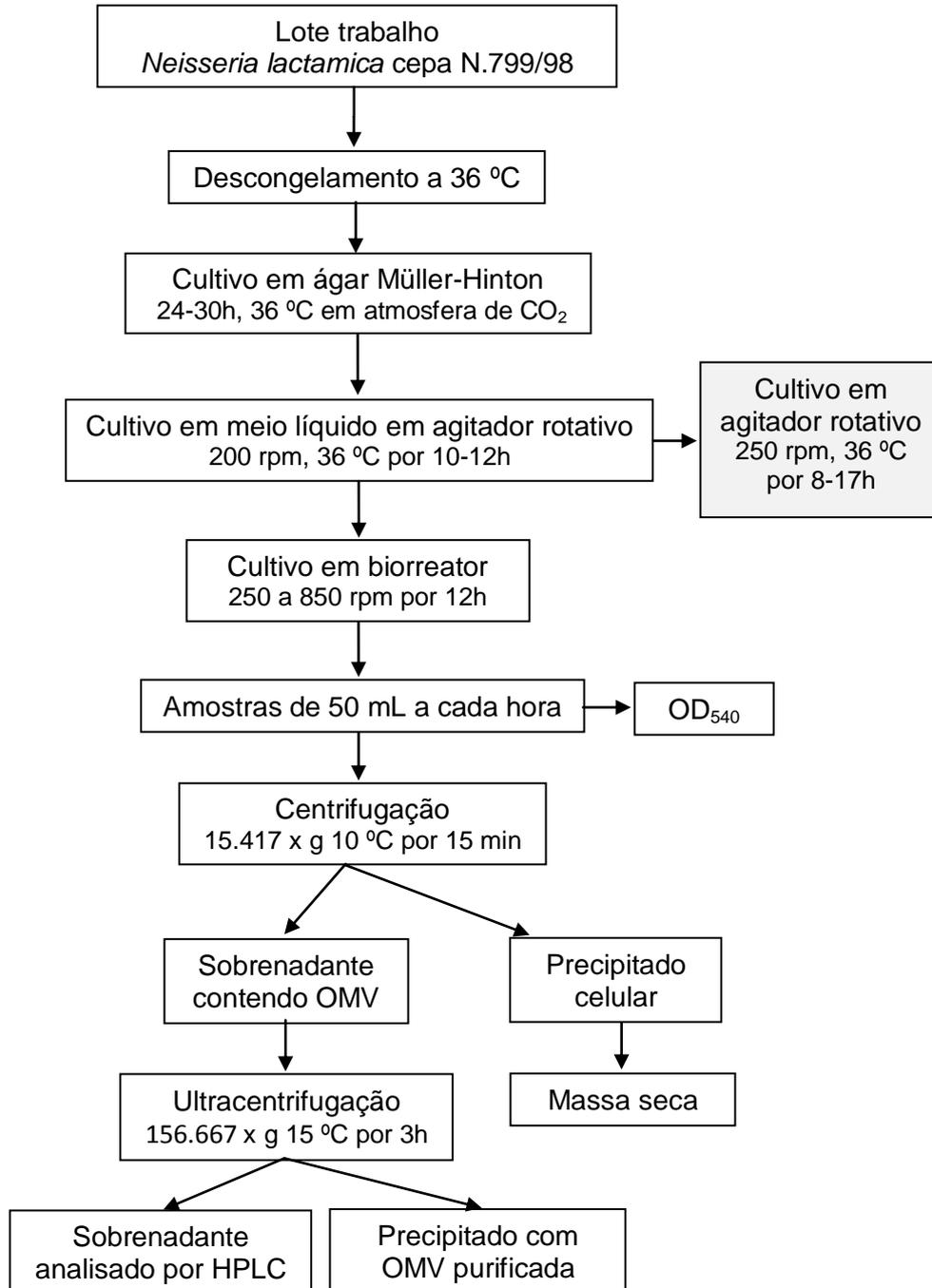
N. lactamica, assim como *N. meningitidis*, é capaz de converter L-lactato e D-lactato em piruvato, pois sintetiza a enzima lactato desidrogenase para os dois

isômeros da molécula (ERWIN; GOTSCHLICH, 1993; KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES – KEGG, 2012).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma da Figura 2 apresenta as várias etapas do processo de cultivo de *N. lactamica* dos ensaios realizados em biorreator.

Figura 2 – Fluxograma do processo de cultivo de *N. lactamica*



FONTE: Adaptado de (SANTOS, 2007)

2.1 Micro-organismo

Foi utilizada a cepa N.799/98 de *Neisseria lactamica* liofilizada em ampolas, proveniente do banco de cultura da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

2.2 Lote semente e lote trabalho

Para o preparo do lote semente, foi ressuscitado o conteúdo de uma ampola com material liofilizado e inoculado em placa de Petri com meio ágar Müller-Hinton (MÜLLER; HINTON, 1941) com 1% de soro equino, ver APÊNDICE A. A placa foi incubada sob atmosfera de 6-8% de CO₂, a 36 °C por cerca de 20 horas. Ao final deste período as colônias que cresceram foram ressuscitadas em meio Bacto triptose fosfato, marca BD (Franklin Lakes, New Jersey, EUA) onde foi adicionado 30% do volume de glicerol, como crioprotetor. O material foi alíquotado em 11 criotubos com cerca de 1 mL e preservado em tanque de nitrogênio líquido.

O lote trabalho foi preparado a partir de um criotubo do lote semente com duas passagens em meio semissólido de ágar Müller-Hinton (MÜLLER; HINTON, 1941) com 1% de soro equino. Ao final do cultivo foi ressuscitado em meio de Catlin, MC, contendo 1 g/L YE, e 30% de glicerol na concentração final. A composição deste meio está no APÊNDICE A. O lote trabalho foi alíquotado em criotubos, conservado em nitrogênio líquido e utilizado durante este estudo.

2.3 Meios de cultura

O meio de ágar Müller-Hinton (MÜLLER; HINTON, 1941) com 1% de soro equino foi utilizado para descongelamento da cepa. Esta etapa é fundamental para ativação da cepa de *N. lactamica*. Para *N. meningitidis*, era utilizado 2% de soro equino, porém, o valor de 1% foi suficiente para o crescimento de *N. lactamica*. A composição deste meio e de outros meios de cultura citados e utilizados neste trabalho estão no APÊNDICE A.

Para o cultivo em meio líquido foi utilizado o meio MCDA (CATLIN, 1973) sem ferro, que durante o trabalho será chamado de MC, com modificações de acordo com cada ensaio. Este meio foi utilizado como meio líquido base para todos os ensaios, e foi utilizado sem ferro porque foi demonstrado que, para *N. meningitidis*,

somente na ausência deste íon foi possível a obtenção de OMV que apresentem proteínas reguladas pelo ferro em sua superfície (SANTOS, 2007).

O meio de Catlin é um meio líquido e definido, ver APÊNDICE A. Em sua composição entram alguns sais, cinco aminoácidos, glicerol, lactato e sais de fosfato. O pH do meio foi acertado para 7,0 e posteriormente esterilizado por filtração em membranas com porosidade de 0,22 µm.

Anteriormente foi relatado que *N. lactamica* não cresce no meio de Catlin (GONÇALVES, 2008). Portanto, em muitos ensaios, foi adicionado o extrato de levedura ultrafiltrado (YE), marca BD, Franklin Lakes, New Jersey, EUA. A quantidade de aminoácidos livres presente em 1 g do extrato de levedura está no APÊNDICE A.

Em um dos ensaios realizados em agitador rotativo, ensaio B, o extrato de levedura não foi adicionado ao meio de Catlin, mas foram acrescentados outros nove aminoácidos além dos cinco aminoácidos constitutivos do MC e também foram adicionadas dez vitaminas do complexo B. Os nove aminoácidos escolhidos foram os que são essenciais para humanos, e as vitaminas do complexo B foram escolhidas porque o extrato de levedura possui grande quantidade delas na sua composição. As concentrações dos aminoácidos e vitaminas utilizados foram as mesmas utilizadas no meio RPMI 1640, ver APÊNDICE A, que é um meio utilizado em culturas de células animais. Estes valores foram utilizados por se tratar da quantidade ideal para cultivo das células humanas, encontradas pela bactéria ao entrar no organismo humano.

Para estabelecer as condições de alimentação com lactato nas bateladas alimentadas, foi utilizado o programa AnaBio versão 1.2 (SILVA; MOURA; BADINO, 2004). Nestes ensaios, a alimentação com 500 g/L lactato foi realizada quatro horas e meia após o início do cultivo com vazão de 0,06 L/h na bomba peristáltica.

No ensaio de batelada alimentada com pulsos, o primeiro pulso foi de aproximadamente 35 mL de aminoácidos do meio de Catlin (com o dobro da concentração original do MC na concentração final na dorna) quatro horas e meia após o início do cultivo, e o segundo pulso foi de 35 mL de extrato de levedura (8 g/L), oito horas e meia após o início do cultivo.

2.4 Ensaios preliminares em agitador rotativo

Para os ensaios realizados em agitador rotativo, criotubos do lote trabalho, cada um contendo 1 mL de *Neisseria lactamica* cepa N.799/98, foram retirados do nitrogênio líquido e descongelados a 36 °C. Alíquotas de 200 µL foram inoculadas em cada um dos 5 tubos de tampa rosqueada, contendo meio inclinado de ágar Müller-Hinton com 1% de soro equino. Esses tubos foram incubados por 24 h a 36 °C, em câmara úmida sob atmosfera de 6-8% de CO₂.

Os tubos foram ressuspensos com aproximadamente 3 mL do meio de cultura mínimo de cada experimento. O material de todos os tubos foi transferido para um tubo de polipropileno com capacidade de 50 mL, de fundo cônico, e foi realizada a primeira passagem em meio líquido: distribuído em 2 erlenmeyers com capacidade de 500 mL, contendo 100 mL do meio de cultura mínimo de cada ensaio. Esta etapa é importante, pois quando as bactérias são transferidas do meio sólido, para o meio líquido diferente, há uma fase lag de aproximadamente quatro horas (GONÇALVES, 2008). Os frascos, então, foram mantidos em agitador rotativo a 200 rpm, a 36 °C, por cerca de 12 horas.

Após este período, foi realizada uma segunda passagem em meio líquido, onde foi calculado um volume de inóculo que promovesse uma densidade óptica (DO₅₄₀) inicial de 0,15 a 540 nm, em erlenmeyers contendo 100 mL de meio.

O meio de cultura utilizado na primeira passagem foi o meio com as menores concentrações dos nutrientes do meio da segunda passagem. A segunda passagem em meio líquido foi realizada para evitar a fase lag durante a cinética do cultivo.

Os ensaios em agitador rotativo foram realizados a 36 °C, a 250 rpm, em meio de Catlin com as modificações apresentadas na Tabela 3.

A DO₅₄₀ foi medida de hora em hora e a concentração de OMV foi determinada ao final dos cultivos, como descrito posteriormente nas seções 2.5.4 e 2.6.

Tabela 3 – Ensaio preliminares realizados em agitador rotativo

Ensaio	Efeito de variáveis	Tempo de cultivo	Meios de cultura
A	Efeito do pH inicial do meio	8 horas	MC com 1 g/L YE pH inicial de 7,0 MC com 1 g/L YE pH inicial de 8,0
B	Efeito das vitaminas e aminoácidos	8 horas	MC com 1 g/L YE (controle) MC com vitaminas do complexo B e de outros 9 aminoácidos não presentes no meio original
C	Efeito das fontes de carbono e nitrogênio (planejamento fatorial)	12 horas	Experimento fatorial utilizando as menores e maiores concentrações dos cinco aminoácidos e do lactato de sódio do MC, e do YE

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

No planejamento fatorial, ensaio C, as variáveis utilizadas foram os cinco aminoácidos do MC, o lactato de sódio e o extrato de levedura ultrafiltrado. Os dois níveis considerados foram o de maior concentração e o de menor concentração de cada uma das variáveis. Estes valores são apresentados, na Tabela 7. Ainda para o ensaio C, foi realizado o experimento com o ponto central, onde o meio de cultura utilizado apresentava concentrações intermediárias (0) entre os níveis de maior (+) e menor (-) concentração de lactato (11,27 g/L), aminoácidos do meio de Catlin (2,20 g/L), e de extrato de levedura (1,5 g/L). Os resultados foram analisados pelo programa STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc., 2004).

2.5 Ensaio em biorreator

2.5.1 Descongelamento

Dois criotubos, cada um contendo 1 mL de *N. lactamica* cepa N.799/98, foram retirados do nitrogênio líquido e descongelados a 36 °C. Após o descongelamento, alíquota de 250 µL da suspensão bacteriana do criotubo foi inoculada em cada um dos 8 tubos de tampa rosqueada, contendo meio inclinado de ágar Müller-Hinton

com 1% de soro equino normal. Esses tubos foram incubados por aproximadamente 30 h a 36 °C, em câmara úmida sob atmosfera de 6-8% de CO₂.

2.5.2 Preparo do inóculo

Para ressuspender o tapete celular formado na superfície do meio de ágar Müller-Hinton dos 8 tubos, foram utilizados aproximadamente 3 mL de MC com 1 g/L YE por tubo.

O material de todos os tubos foi transferido para um único tubo de polipropileno com capacidade de 50 mL, de fundo cônico, e 4 mL foram inoculados em cada um dos 5 erlenmeyers de 500 mL, contendo 100 mL do MC com 1 g/L YE. Esses frascos foram mantidos em agitador rotativo, com frequência rotativa de 200 rpm, a 36 °C, por 10 a 12 horas. Este intervalo de tempo foi determinado a partir do trabalho de Salustiano (2010), pois neste período não há morte bacteriana e é um intervalo de tempo adequado para a rotina de trabalho.

Foi realizada coloração de Gram para verificar a morfologia e a pureza do cultivo. Constatando-se que não havia contaminação, o conteúdo de todos os erlenmeyers foi reunido em um único frasco e foi feita a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro a 540 nm.

2.5.3 Cultivo em biorreator

Após a leitura da densidade óptica, o inóculo foi transferido ao biorreator em volume que promovesse uma DO₅₄₀ inicial de 0,15.

Foi utilizado biorreator de 5L de volume de trabalho (Bioflo[®] 2000, New Brunswick Scientific (NBS), Edison, New Jersey, USA) esterilizado com tampão fosfato (PBS) a 121 °C por 30 minutos, que foi retirado antes da adição do meio ao biorreator. O meio foi filtrado para o interior da dorna pelo sistema de filtração esterilizante Opticap da Millipore, com membrana de porosidade de 0,22 µm.

O eletrodo de pH, autoclavável, foi calibrado por meio da solução tampão de pH 7,0 e tampão de pH 4,0. A calibração do eletrodo foi realizada antes da dorna ser autoclavada para que ambos fossem esterilizados em conjunto (dorna e eletrodo de pH).

A sonda de oxigênio foi calibrada imediatamente antes do início de cada cultivo em zero e 100%. A calibração da sonda foi feita pelo ajuste do zero eletrônico, com a desconexão do cabo do eletrodo até atingir zero. A calibração da sonda em 100% foi realizada sob a agitação de 400 rpm até que o valor de oxigênio dissolvido ficasse constante e, quando necessário, o ajuste em 100% foi realizado manualmente.

A agitação foi controlada automaticamente (de 250 a 850 rpm), de forma a manter a concentração de oxigênio dissolvido estabelecida no 'setpoint' (10% ou 30%).

Os cultivos foram realizados em batelada e batelada alimentada, e foram realizados nas seguintes condições:

- Temperatura: 36 °C;
- Duração: 12 h nas bateladas simples e 14 horas nas bateladas alimentadas;
- Vazão de ar: 1 L/min (aeração superficial);
- Volume inicial do meio sem inóculo: 4,2 L;
- Volume do inóculo: ~0,35 L;
- pH inicial do meio de cultura: 7,0;
- Pressão no biorreator: 0,2 bar;
- Agitação mínima: 250 rpm;
- Agitação máxima: 850 rpm;
- Oxigênio dissolvido: 10% ou 30% da saturação aos 400 rpm.

Os cultivos em batelada simples foram realizados por 12 horas, pois na maioria dos ensaios já havia morte celular ao final deste período. Os cultivos com alimentação de lactato foram realizados por 14 horas para ter mais dados da cinética, com o objetivo de verificar o efeito da alimentação no crescimento bacteriano e no rendimento de OMV.

Em alguns ensaios foi possível coletar os dados obtidos em tempo real de pH, de agitação e/ou de oxigênio dissolvido, ver APÊNDICE C. Esses parâmetros foram adquiridos a cada 3 ou 10 segundos (dependendo do cultivo) pelo aplicativo LabView versão 7.1, programa desenvolvido pela uma equipe do Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LaDABio) da Universidade Federal de São Carlos.

Para os ensaios em biorreator, o meio considerado padrão foi o MC com 1 g/L de extrato de levedura ultrafiltrado. Foram realizadas alterações na composição do meio como, por exemplo, a retirada ou adição de aminoácidos, ou aumento das concentrações dos componentes como o lactato ou extrato de levedura. Os grupos, ensaios, e as variações do meio de cultivos em biorreator estão listados na Tabela 4.

Apenas no grupo F não foi acrescentado o extrato de levedura, porém foram adicionados aminoácidos em concentrações equivalentes às concentrações dos aminoácidos presentes em 2 g do extrato de levedura, ver APÊNDICE A.

Tabela 4 – Ensaios realizados em biorreator

Grupos	Ensaio	Meios de cultura	Oxigênio dissolvido
A	1 2	MC + 1 g/L YE	10%
B	3 4	MC + 1 g/L YE	30%
C	5	MC sem os 5 aminoácidos + 1 g/L YE	10%
D	6 7	MC sem os 5 aminoácidos + 1 g/L YE	30%
E	8 9	MC com o dobro das concentrações de lactato, de aminoácidos, com adição apenas dos aminoácidos do YE	30%
F	10 11	MC com o dobro das concentrações de lactato, de aminoácidos e com 2 g/L YE	30%
G	12	MC com o dobro das concentrações de lactato, de aminoácidos e com 2 g/L YE - <u>alimentação com lactato</u>	30%
H	13	MC com o dobro das concentrações de lactato, de aminoácidos e com 2 g/L YE - <u>alimentação com lactato e pulsos de aminoácidos e de extrato de levedura</u>	30%

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

2.5.4 Determinação da concentração celular

Densidade óptica: A determinação da concentração celular por densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro U-1800 (Hitachi Ltd, Chiyoda-ku, Tokyo, Japão) com comprimento de onda de 540 nm (DO_{540}) nas amostras retiradas de hora em hora. Quando necessário, as amostras foram diluídas no mesmo meio de cultura utilizado no biorreator para que a leitura DO_{540} ficasse entre 0,1 e 0,8.

Massa seca: Para obtenção da massa seca, tubos de polipropileno vazios, com 50 mL de capacidade, foram secos em estufa a 60 °C por 24 h. Após este período, os tubos foram pesados e os valores registrados. Amostras de 50 mL retiradas do biorreator de hora em hora, foram divididas em duplicatas de 25 mL, colocadas nestes tubos previamente pesados e centrifugadas a 10.000 rpm (15.417 x g), 10 °C por 15 minutos. Após a centrifugação, os tubos contendo precipitado úmido foram colocados na estufa a 60 °C por 48 h. Após este período, os tubos foram novamente pesados e a massa seca foi calculada com base na diferença entre o peso dos tubos contendo o precipitado seco e os tubos vazios.

2.6 Purificação e análise das OMV

Para obtenção das OMV, as amostras do sobrenadante da centrifugação que foram armazenadas a 4 °C com solução de azida 0,02% foram ultracentrifugadas a 30.000 rpm (156.667 x g) 14 °C por 3 h. O precipitado da ultracentrifugação contendo as OMV purificadas foi ressuscitado em 0,02% de azida. O sobrenadante da ultracentrifugação foi aliquotado e armazenado para determinação e análises posteriores do substrato fonte de carbono (lactato), do citrato, do acetato e amônia.

Nos ensaios em agitador rotativo, a análise de rendimento de OMV só foi realizada na última hora de cultivo. Nos ensaios em biorreator, as análises foram feitas nas amostras coletadas de hora em hora.

2.6.1 Dosagem de proteínas

A quantificação das OMV foi determinada pela concentração de proteínas totais por meio do método de Lowry (LOWRY, 1951), no precipitado da

ultracentrifugação. Nestes ensaios foram utilizados 20-200 µL da suspensão de OMV e completados com água destilada para um volume final de 1 mL em tubos de ensaio. Posteriormente adicionaram-se 3 mL do reagente, constituído de 1 mL de tartarato de sódio 2% (p/v) e 1 mL de sulfato de cobre 1% (p/v) diluídos 1:100 em solução de carbonato de sódio 2 % (p/v) e hidróxido de sódio 0,1 M, que foram incubados durante 10 minutos a temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados 300 µL do reagente fenol de Folin-Ciocalteu 2 N, diluído para 1 M, e deixou-se em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. O conteúdo foi transferido para uma cubeta de vidro e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 750 nm.

Para determinação da curva padrão, utilizou-se solução de albumina de soro bovino (BSA) em concentrações variando de 25 a 250 µg onde foram lidas as absorbâncias a 750 nm. Com base nesses dados foram calculadas a regressão linear e a equação da reta. A concentração de proteína nas amostras foi calculada por meio da leitura da absorbância e do fator encontrado na equação da reta. Os valores da concentração de proteína total, isto é, das OMV, foram expressos em mg de OMV por litro de cultivo, levando-se em consideração as respectivas diluições.

2.6.2 Eletroforese

Com base na quantificação de proteína, foi feito gel de SDS-PAGE para identificação do perfil eletroforético das proteínas presentes nas OMV de *Neisseria lactamica*. Foram utilizadas amostras de OMV da 1^a, 3^a, 5^a, 7^a, 9^a, 11^a e, em alguns ensaios, também da 13^a hora de cultivo em biorreator.

Foi utilizado em cada linha do gel cerca de 30 µg de OMV em 10 µl de tampão de amostra. O tampão de amostra é composto por 5% de mercaptoetanol e 4M de uréia. Após a corrida das amostras, o gel foi corado em azul de Coomassie. A eletroforese foi realizada em gel 12,5% de acrilamida/bisacrilamida.

2.6.3 Microscopia eletrônica

Para microscopia eletrônica foi utilizada a técnica de contrastação negativa. Estes estudos foram realizados com a colaboração da Dra Sylvia Mendes Carneiro do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

N. lactamica cultivada em MC com o dobro de lactato, de aminoácidos e com 2 g/L de extrato de levedura foram coletadas na 2^a e na 9^a horas de cultivo para análise da morfologia bacteriana e das OMV.

Um volume de 7 µl da suspensão bacteriana em PBS pH 7,2 foi aplicada sobre grades de cobre de 300 meshes recobertas por película de parlódio / carbono, e deixada por cerca de 3 minutos, para a adsorção das partículas sobre a película. Em seguida, o excesso de líquido foi retirado com auxílio de papel de filtro e imediatamente foi adicionado 7 µl de ácido fosfotúngstico 2%, pH 7,2 durante 10 segundos. Todo o líquido foi retirado com papel de filtro e a amostra foi totalmente seca. As grades foram examinadas no microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E (Zeiss, Alemanha), operando a 80kV. As imagens foram capturadas por uma câmera de CCD Mega View III através do programa iTEM – Universal TEM Imaging Platform (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Germany), e foram salvas em extensão TIF.

2.7 Análise do sobrenadante do cultivo das amostras do biorreator

O sobrenadante da ultracentrifugação foi aliquotado e armazenado a -20 °C. Posteriormente foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação das concentrações do lactato (substrato fonte de carbono), citrato e acetato.

Foi utilizado HPLC Shimadzu, modelo 10ADvp. As amostras obtidas durante o cultivo foram diluídas cinco vezes com ácido sulfúrico 25 mM e filtradas em membrana com porosidade de 0,22 µm antes de serem injetadas na coluna Aminex[®] HPX-87H (BioRad, Hercules, California, EUA). Durante a corrida a temperatura foi de 60 °C, o ácido sulfúrico na concentração de 5 mM foi utilizado como fase móvel e o fluxo foi de 0,6 mL/min. O sistema de detecção utilizado foi UV 210 nm. As concentrações do lactato, citrato e acetato foram calculadas através do software Class VP, versão 6.2 utilizando um padrão de ácidos orgânicos.

As concentrações de amônia foram determinadas por meio do kit de dosagem de amônia da HANNA (Hanna Instruments Srl, Ronchi di Villafranca, Itália) em comprimento de onda de 470 nm, com leitura de 0,00-3,00 mg/L e resolução de 0,01 mg/L.

2.8 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os fatores globais de conversão são definidos pelas seguintes expressões:

$$Y_{P/S} = \frac{P_{\text{máx}} - P_i}{S_i - S_{\text{pmáx}}} \quad (1)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_{\text{máx}} - X_i}{S_i - S_{\text{xmáx}}} \quad (2)$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_{\text{máx}} - P_i}{X_{\text{máx}} - X_i} \quad (3)$$

Onde:

$X_{\text{máx}}$: concentração celular máxima (g/L);

X_i : concentração celular inicial (g/L);

S_i : concentração de substrato inicial (g/L);

$S_{\text{pmáx}}$: concentração de substrato quando a concentração do produto é máxima (g/L);

$S_{\text{xmáx}}$: concentração de substrato quando a concentração celular é máxima (g/L);

$P_{\text{máx}}$: concentração de produto máxima (mg/L);

P_i : concentração de produto inicial (mg/L).

A produtividade em biomassa e produtividade em produto foram calculadas segundo as expressões:

$$\text{Prod X} = \frac{X_{\text{máx}} - X_i}{t_{\text{fx}} - t_i} \quad (4)$$

$$\text{Prod P} = \frac{P_{\text{máx}} - P_i}{t_{\text{fp}} - t_i} \quad (5)$$

Onde:

$X_{m\acute{a}x}$: concentração celular máxima (g/L);

X_i : concentração celular inicial (g/L);

$P_{m\acute{a}x}$: concentração de produto máxima (mg/L);

P_i : concentração de produto inicial (mg/L);

t_{fx} : tempo de cultivo correspondente a $X_{m\acute{a}x}$ (h);

t_{fp} : tempo de cultivo correspondente a $P_{m\acute{a}x}$ (h);

t_i : tempo inicial igual a zero (h).

A velocidade específica de crescimento microbiano foi determinada a partir das curvas de concentração celular, de acordo com equação:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

Onde:

μ_x : velocidade específica de formação de biomassa (h^{-1});

X : concentração celular (g/L);

dX : biomassa formada no intervalo de tempo "dt" (g);

dX/dt : derivada dos valores de concentração celular [g/(L.h)].

Foi calculado o logaritmo neperiano $\ln(X / X_0)$ cujos valores foram plotados em gráficos em função do tempo. Foi obtida uma fase em que a velocidade específica era constante (crescimento exponencial), onde a distribuição dos pontos pôde ser ajustada por uma reta. O coeficiente angular da reta ajustada correspondeu à velocidade específica de crescimento da fase exponencial, a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{xm\acute{a}x}$).

Nos ensaios de batelada alimentada foram estimados os valores do volume no biorreator e calculados os valores de lactato consumido a partir da fórmula a seguir:

$$L_c = \frac{D \cdot C_{lac} \cdot t}{V - V_{am}} - L_r \quad (7)$$

Onde:

L_c : lactato consumido (g/L);

D : vazão de alimentação (L.h);

C_{lac} : concentração de lactato no meio de alimentação (g/L);

t : tempo de alimentação (h);

L_r : lactato residual (g/L);

V : volume do reator (L);

V_{am} : volume amostrado (L).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio em agitador rotativo

3.1.1 Ensaio A – Efeito do pH inicial do meio

Santos (2007) observou que, no cultivo de *Neisseria meningitidis*, o pH do meio de cultura aumentava, chegando geralmente até 8,5. A autora concluiu que a elevação do pH do meio de cultura era atribuída à formação de amônia, pois a formação deste íon aumentou quantitativamente no decorrer dos cultivos.

Para verificar se a variação do pH afetaria diretamente os valores de biomassa durante o cultivo de *N. lactamica*, foi realizado cultivo em agitador rotativo, em MC com 1 g/L YE em pH 7,0, que é o valor de pH original do meio de cultura, e em pH 8,0. O pH foi acertado no meio fresco, antes de inocular as bactérias, para verificar se o crescimento seria influenciado pelo pH mais básico.

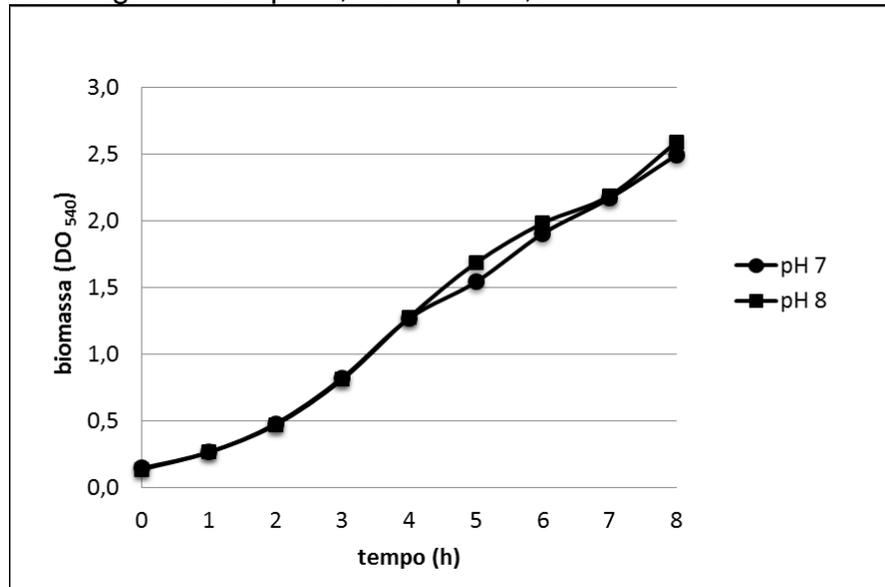
Os valores de DO₅₄₀ estão apresentados na Tabela 5 e Figura 3 a seguir. Os valores do pH durante o cultivo também foram mensurados e estão apresentados na Tabela 5 juntamente com os valores da cinética.

Tabela 5 – Valores da biomassa (DO₅₄₀) de *N. lactamica* cultivada em agitador rotativo em MC, com 1 g/L YE, em pH 7,0 e em pH 8,0 e respectivos valores de pH durante o cultivo

Tempo (h)	Meio com pH 7,0		Meio com pH 8,0	
	DO ₅₄₀	pH	DO ₅₄₀	pH
0	0,15	7,0	0,14	8,0
1	0,27	7,0	0,27	8,0
2	0,48	7,0	0,47	8,0
3	0,83	7,0	0,81	7,5
4	1,27	7,0	1,28	8,0
5	1,54	7,0	1,69	8,0
6	1,91	7,5	1,98	8,0
7	2,17	8,0	2,19	8,5
8	2,49	8,0	2,59	8,5

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Figura 3 – Curva da biomassa (DO_{540}) de *N. lactamica* em agitador rotativo em MC com 1 g/L YE em pH 7,0 e em pH 8,0

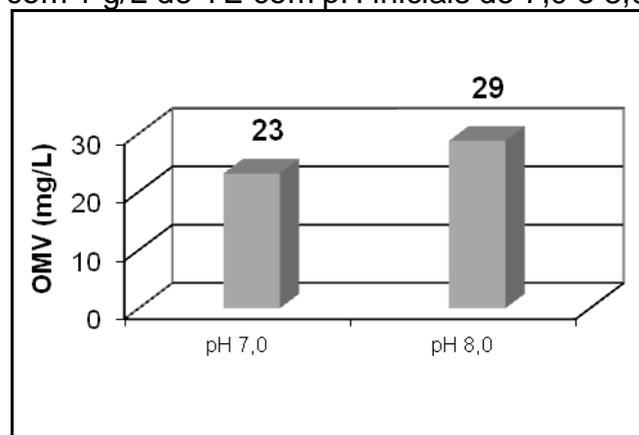


FONTE: (GONÇALVES, 2012)

A partir da observação da Tabela 5 e da Figura 3, pode-se dizer que o crescimento da bactéria não foi influenciado pelo pH inicial do meio de cultura. O pH do MC com 1 g/L YE aumenta durante o cultivo de *N. lactamica*, semelhante ao relatado para *N. meningitidis* (SANTOS, 2007).

O rendimento das OMV também foi analisado para verificar se a alteração do pH influencia diretamente na quantidade de OMV purificada (Figura 4).

Figura 4 - Rendimento de OMV de *N. lactamica*, em mg/L, na oitava hora de cultivo, em MC com 1 g/L de YE com pH iniciais de 7,0 e 8,0



FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Os valores de rendimento de OMV foram semelhantes, indicando que o pH inicial do meio não pareceu interferir na produção destas vesículas.

3.1.2 Ensaio B – Efeito de vitaminas e aminoácidos

Este cultivo foi realizado por 8 horas, em MC com 1 g/L YE e em MC com adição de vitaminas do complexo B e de outros 9 aminoácidos não presentes no meio original, sem extrato de levedura. Os aminoácidos utilizados foram: L-histidina.HCl.H₂O, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina.HCl, L-metionina, L-fenilalanina, L-triptofano, L-valina, L-treonina. As vitaminas utilizadas foram: biotina (B7), pantotenato de cálcio (B5), cloreto de colina (B8), ácido fólico (B9), nicotinamida (B3), ácido p-aminobenzóico (B10), piridoxina.HCL (B6), riboflavina (B2), tiamina. HCl (B1), cobalamina (B12). As concentrações destes componentes foram as mesmas do meio RPMI 1640, ver APÊNDICE A.

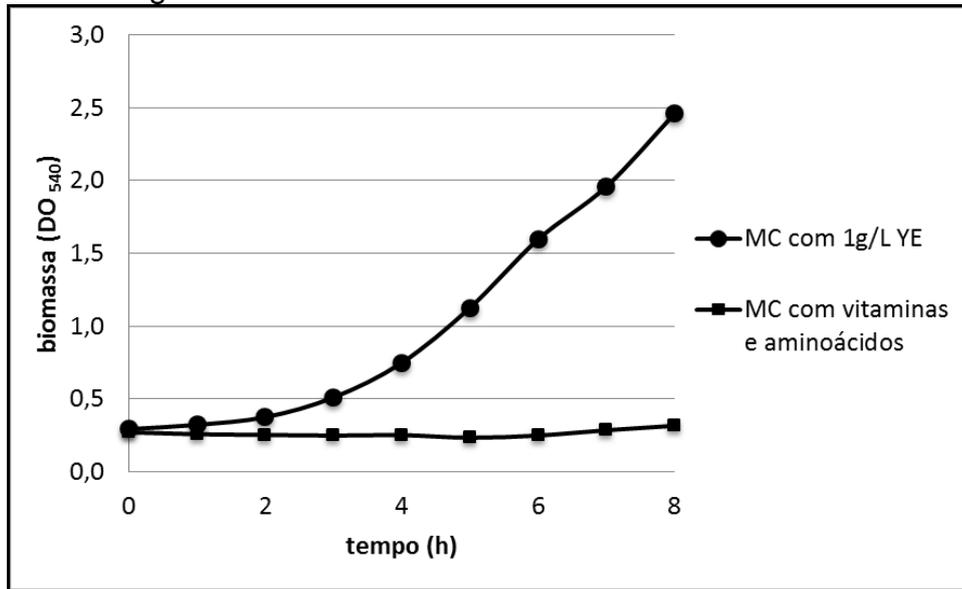
Os resultados do ensaio B estão na Tabela 6 e Figura 5.

Tabela 6 – Valores da biomassa (DO₅₄₀) de *N. lactamica* em MC + 1 g/L YE e em MC com o acréscimo de aminoácidos e vitaminas

Tempo	MC + 1g/L YE	MC + aminoácidos e vitaminas
	DO ₅₄₀	DO ₅₄₀
0	0,29	0,27
1	0,32	0,26
2	0,38	0,25
3	0,51	0,25
4	0,75	0,25
5	1,13	0,23
6	1,60	0,25
7	1,96	0,29
8	2,46	0,32

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Figura 5 – Curva da biomassa (DO_{540}) de *N. lactamica* em agitador rotativo em MC com 1 g/L YE e em MC com o acréscimo de aminoácidos e vitaminas



FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Na Tabela 6 e Figura 5 pode ser observado que o cultivo de *N. lactamica* ainda estava na fase exponencial, e atingiu DO_{540} próxima a 2,5 no MC + 1 g/L YE, na 8ª hora. Enquanto que no outro meio de cultivo utilizado, sem o extrato de levedura, com adição dos 9 aminoácidos e das vitaminas do complexo B, não houve crescimento bacteriano até a 8ª hora.

Com este experimento pode-se concluir que, nesta condição de cultivo testada, a adição dos nove aminoácidos e das vitaminas do complexo B não foram suficientes para promover o crescimento de *N. lactamica*.

3.1.3 Ensaio C – Efeito das fontes de carbono e de nitrogênio (planejamento fatorial)

No ensaio C foi realizado planejamento fatorial com 3 variáveis, lactato de sódio, aminoácidos (constituintes do MC) e extrato de levedura, em dois níveis, onde foram analisadas a importância de duas concentrações de cada um desses nutrientes. Os valores adotados para as concentrações iniciais dos cinco aminoácidos do meio de Catlin, do lactato de sódio e do extrato de levedura ultrafiltrado estão listados na Tabela 8 mais adiante. Os resultados de crescimento do ensaio C estão apresentados na Tabela 7 e Figura 6. Também foram calculadas as velocidades específicas máximas de cada condição deste ensaio, Tabela 7.

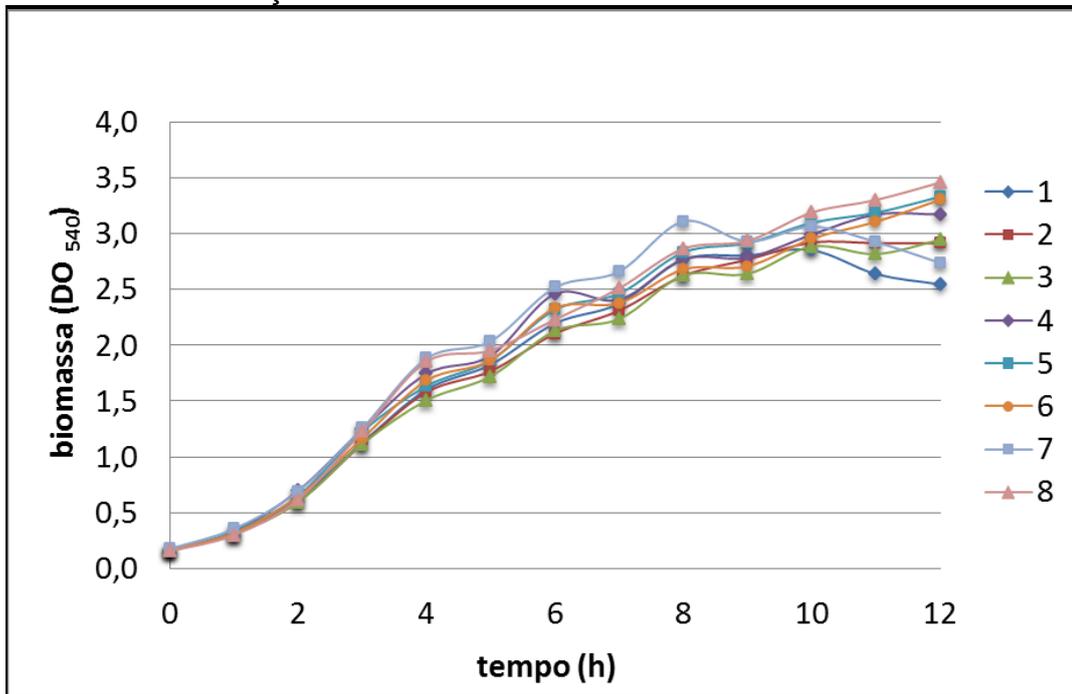
Tabela 7 – Valores de biomassa (OD₅₄₀) obtidos no planejamento fatorial de *N. lactamica* em experimento de 3 variáveis (X1, X2 e X3)

(X1) Cinco aminoácidos do meio de Catlin (g/L): 1,47 (-) / 2,94 (+)
 (X2) Lactato de sódio (g/L): 7,51 (-) / 15,02 (+)
 (X3) Extrato de levedura ultrafiltrado (g/L): 1,0 (-) / 2,0 (+)

Tempo (h)	1	2	3	4	5	6	7	8
	- - - (X1)(X2)(X3)	+ - - (X1)(X2)(X3)	+ + - (X1)(X2)(X3)	- + + (X1)(X2)(X3)	+ - + (X1)(X2)(X3)	- + - (X1)(X2)(X3)	- - + (X1)(X2)(X3)	+ + + (X1)(X2)(X3)
0	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,17	0,17	0,15
1	0,31	0,31	0,31	0,33	0,33	0,32	0,35	0,30
2	0,62	0,60	0,59	0,70	0,65	0,64	0,69	0,62
3	1,13	1,12	1,12	1,25	1,23	1,17	1,26	1,23
4	1,60	1,58	1,51	1,75	1,64	1,69	1,88	1,86
5	1,83	1,77	1,72	1,91	1,87	1,87	2,04	1,96
6	2,20	2,11	2,13	2,46	2,32	2,34	2,52	2,23
7	2,38	2,31	2,24	2,41	2,47	2,38	2,66	2,51
8	2,77	2,63	2,63	2,77	2,84	2,68	3,11*	2,87
9	2,81	2,77	2,64	2,79	2,92	2,71	2,93	2,94
10	2,86*	2,92*	2,89	3,00	3,10	2,96	3,07	3,19
11	2,64	2,92	2,82	3,18*	3,19	3,11	2,93	3,31
12	2,55	2,92	2,95*	3,18*	3,34*	3,31*	2,74	3,46*
$\mu_{x\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0,66	0,65	0,65	0,69	0,68	0,65	0,67	0,70

*Valores máximos de DO₅₄₀ obtidos em cada meio.
 FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Figura 6 – Curva da biomassa (DO_{540}) de *N. lactamica* em agitador rotativo em experimento fatorial de dois níveis, o de maior e de menor concentração



FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Os valores do rendimento de OMV da 12^a hora de cultivo também foram mensurados e estão na Tabela 8.

Observa-se que os meios de cultura 3, 4, 5, 6 e 8 foram os que apresentaram maiores valores de crescimento e de rendimento de OMV. Quatro deles, os meios 3, 4, 6 e 8 possuíam o lactato com a concentração dobrada (15,02 g/L). O lactato é a principal fonte de carbono para o crescimento de *N. lactamica*, e o resultado sugere que estava sendo utilizado em concentrações limitantes pois nas condições onde sua concentração foi dobrada, o crescimento bacteriano foi maior.

O meio 5, que continha 7,51 g/L de lactato de sódio na sua composição, apresentou valores de crescimento e de rendimento de OMV comparáveis aos obtidos nos meios 3, 4, 6 e 8, que possuíam 15,02 g/L de lactato de sódio. Tal fato pode ter ocorrido, possivelmente, pela importância da proporção entre aminoácidos do MC e do extrato de levedura para o crescimento bacteriano e para o rendimento de OMV.

Os menores valores de $\mu_{x\text{máx}}$ obtidos foram nos meios de cultura 2, 3 e 6. Estes meios eram os que não continham o extrato de levedura na sua composição. Então, pode-se dizer que como a velocidade de crescimento bacteriano já se inicia

mais baixa nos meios de cultura sem o extrato de levedura, este componente é importante na formação de biomassa desde o início do cultivo.

Para os cálculos de efeitos principais e interação efeito, na análise da DO_{540} , foram considerados os maiores valores obtidos de cada condição, Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados das análises do planejamento fatorial

(X1) Cinco aminoácidos do meio de Catlin (g/L): 1,47 (-) / 2,94 (+)

(X2) Lactato de sódio (g/L): 7,51 (-) / 15,02 (+)

(X3) Extrato de levedura ultrafiltrado (g/L): 1,0 (-) / 2,0 (+)

Número do Erlenmeyer	Efeitos principais			Interação efeito				DO_{540}	OMV (mg/L)
	X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3		
1	-	-	-	+	+	+	-	2,86	69
2	+	-	-	-	-	+	+	2,92	80
3	+	+	-	+	-	-	-	2,95	90
4	-	+	+	-	-	+	-	3,18	98
5	+	-	+	-	+	-	-	3,34	90
6	-	+	-	-	+	-	+	3,31	115
7	-	-	+	+	-	-	+	3,11	60
8	+	+	+	+	+	+	+	3,46	112
Média=								3,14	89
Efeito de (X1)=								0,05	8
Efeito de (X2)=								0,17	29
Efeito de (X3)=								0,26	2
Interação efeito (X1X2)=								-0,09	-13
Interação efeito (X1X3)=								0,20	15
Interação efeito (X2X3)=								-0,07	1
Interação efeito (X1X2X3)=								0,12	5

*Concentração original de aminoácidos e lactato de sódio no meio Catlin sem ferro: 1,180; 0,105; 0,151; 0,021; 0,011 e 7,510 g/L de ácido L-glutâmico, L-arginina.HCl, Glicina, L-serina, L-cisteína e lactato de sódio, respectivamente.

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

De acordo com os resultados da Tabela 8, o efeito isolado de cada componente testado foi positivo tanto para o aumento da biomassa, Quanto para o rendimento de OMV. Para biomassa o maior valor obtido foi do extrato de levedura ultrafiltrado ($X_3 = 0,26$) e para o rendimento de OMV o maior valor foi do lactato ($X_2 = 29$).

Considerando-se a DO_{540} , o efeito de interação dos três componentes foi positivo ($X_1X_2X_3 = 0,12$) e também foi positivo o efeito da interação dos cinco

aminoácidos com o extrato de levedura ($X1X3 = 0,20$). O efeito foi negativo para a interação do lactato de sódio com o YE ($X2X3 = -0,07$).

Para o rendimento de OMV, o efeito de interação foi negativo apenas para os cinco aminoácidos com o lactato de sódio ($X1X2 = -13$). O maior valor foi da interação dos cinco aminoácidos com o YE ($X1X3 = 15$).

De uma maneira geral, pode-se dizer que o extrato de levedura, quando adicionado ao MC, é um componente importante na formação de biomassa. Para o rendimento de OMV o efeito isolado do lactato foi maior ($X2 = 29$), porém, a interação dos cinco aminoácidos com o extrato de levedura também provocou um efeito positivo no rendimento de OMV ($X1X3 = 15$).

Para a análise estatística, foi realizado o ensaio do ponto central. A Tabela 9 apresenta os valores obtidos neste ensaio, realizado em triplicata.

Tabela 9 - Valores obtidos no ensaio do ponto central

Réplicas	DO ₅₄₀	OMV (mg/L)
1	3,45	121
2	3,36	113
3	3,25	116

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Os cálculos foram realizados pelo programa STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc., 2004) a partir dos valores de biomassa, em g/L. Para isso, os valores de DO₅₄₀ foram multiplicados por 0,4445 como será mostrado abaixo, na Tabela 11. As variáveis independentes foram os aminoácidos, o lactato do meio de Catlin, e o extrato de levedura. As variáveis dependentes foram a biomassa (g/L), o rendimento de OMV (mg/L) e a relação OMV/biomassa.

Os efeitos, erro padrão e p-valor ($p < 0,1$) estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Análise de significância estatística dos efeitos das variáveis independentes sobre a biomassa, OMV e OMV/biomassa

Variáveis independentes	Variáveis dependentes	Efeitos	Erro padrão	p-valor (p<0,1)
Aminoácidos	biomassa	0,03	0,06	0,687
	OMV	7,50	13,41	0,593
	OMV/biomassa	4,56	7,05	0,539
Lactato	biomassa	0,08	0,06	0,248
	OMV	29,25	13,41	0,066
	OMV/biomassa	17,43	7,05	0,043
Extrato de levedura	biomassa	0,12	0,06	0,095
	OMV	1,38	13,41	0,921
	OMV/biomassa	-4,16	7,05	0,574

Os valores em negrito são os valores positivos estatisticamente significativos
 FONTE: (GONÇALVES, 2012)

A partir destes resultados, foi observado que os aminoácidos do meio de Catlin não influenciaram estatisticamente ($p < 0,1$) na formação de biomassa, nem a produção de OMV e nem interferiu na relação OMV/biomassa.

O extrato de levedura teve um efeito positivo ($p < 0,1$) de 0,12 na formação de biomassa. O lactato também teve um efeito significativamente positivo ($p < 0,1$) sobre OMV (29,25) e sobre OMV/biomassa (19,43).

3.2 Ensaio em biorreator

3.2.1 Coeficiente de concentração celular entre massa seca e DO_{540}

A medida da concentração celular normalmente é realizada por meio de determinação da massa seca. No entanto, nos ensaios realizados em biorreator, com objetivo de melhorar os efeitos da variabilidade que ocorrem nas medidas de massa seca ao longo dos processos, foram feitos gráficos correlacionando a densidade óptica a 540 nm e massa seca, e foram traçadas as linhas de tendência (ver APÊNDICE B). Foi assumida a interseção no ponto zero e calculadas a equação da reta e valor do coeficiente de correlação, R^2 (Tabela 11), utilizando o programa Microsoft Excel 2010.

Para estes cálculos foram utilizados os dados dos grupos A, B, C, D, E e F.

Tabela 11 – Coeficientes de concentração celular dos ensaios e seus respectivos coeficientes de correlação (R^2)

Grupos	Ensaio	Coeficiente de massa seca X DO ₅₄₀ (g/L)	R ²
A	1	0,4181	0,9167
	2	0,4497	0,9263
B	3	0,4553	0,9028
	4	0,4601	0,9455
C	5	0,4259	0,8228
D	6	0,3902	0,8972
	7	0,3955	0,9326
E	8	0,4992	0,8705
	9	0,5000	0,8834
F	10	0,4471	0,9736
	11	0,4486	0,9870
Média		0,4445 ± 0,0342	

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Na Tabela 11, dentre os valores de coeficiente de concentração, o menor valor de coeficiente de correlação (R^2) obtido foi o de 0,8228 do ensaio 5, grupo C; portanto todos os valores de coeficiente de concentração foram considerados para o cálculo da média, uma vez que todos foram superiores a 0,8. A média dos valores do coeficiente de concentração foi de 0,4445 (g/L) e o desvio padrão de 0,0342. Este coeficiente foi utilizado para estimar valores de massa seca a partir de valores de DO₅₄₀ e para todos os cálculos envolvendo a biomassa (g/L).

O valor de 0,4445 também pode ser obtido quando todos os pontos são colocados em um único gráfico.

3.2.2 Ensaio do grupo A

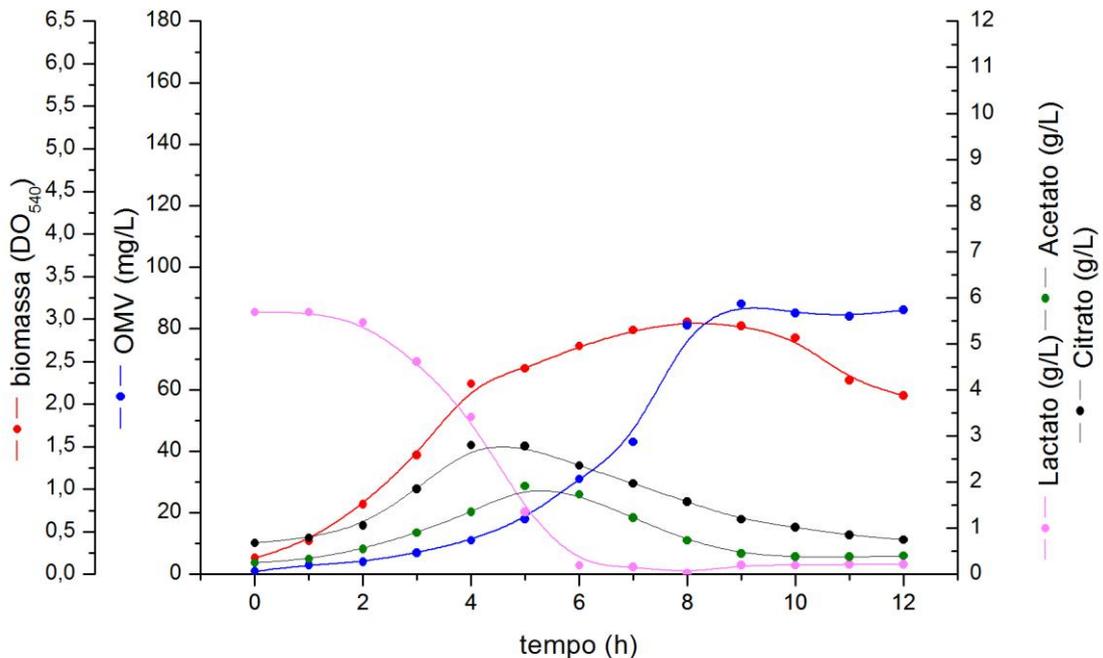
Os ensaios do grupo A foram realizados em cultivo descontínuo em MC com 1 g/L YE, com 10% de oxigênio dissolvido.

A Tabela 12 e Figura 7 apresentam os resultados do ensaio 1, e a Tabela 13 e Figura 8, do ensaio 2. Os ensaios 1 e 2 são réplicas.

Tabela 12 – Resultados experimentais do grupo A, ensaio 1

Tempo	pH	O ₂ D (%)	rpm	DO ₅₄₀	Massa seca (g/L)	OMV (mg/L)	lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)
00	7,41	20,2	250	0,19	0,08	1	5,69	0,25	0,68
01	7,33	8,0	314	0,39	0,17	3	5,47	0,33	0,79
02	7,39	8,1	446	0,82	0,36	4	4,61	0,55	1,06
03	7,42	11,0	509	1,40	0,62	7	3,41	0,90	1,85
04	7,24	1,0	848	2,24	1,00	11	1,35	1,35	2,80
05	7,51	11,2	580	2,42	1,08	18	0,20	1,91	2,78
06	8,02	9,6	617	2,68	1,19	31	0,16	1,73	2,36
07	8,25	10,0	635	2,87	1,28	43	0,02	1,23	1,97
08	8,45	10,3	616	2,97	1,32	81	0,20	0,73	1,57
09	8,62	11,6	552	2,92	1,30	88	0,19	0,45	1,19
10	8,72	12,8	377	2,78	1,23	85	0,21	0,38	1,02
11	8,77	12,2	289	2,28	1,01	84	0,21	0,38	0,85
12	8,29	10,3	262	2,10	0,93	86	0,21	0,40	0,75

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

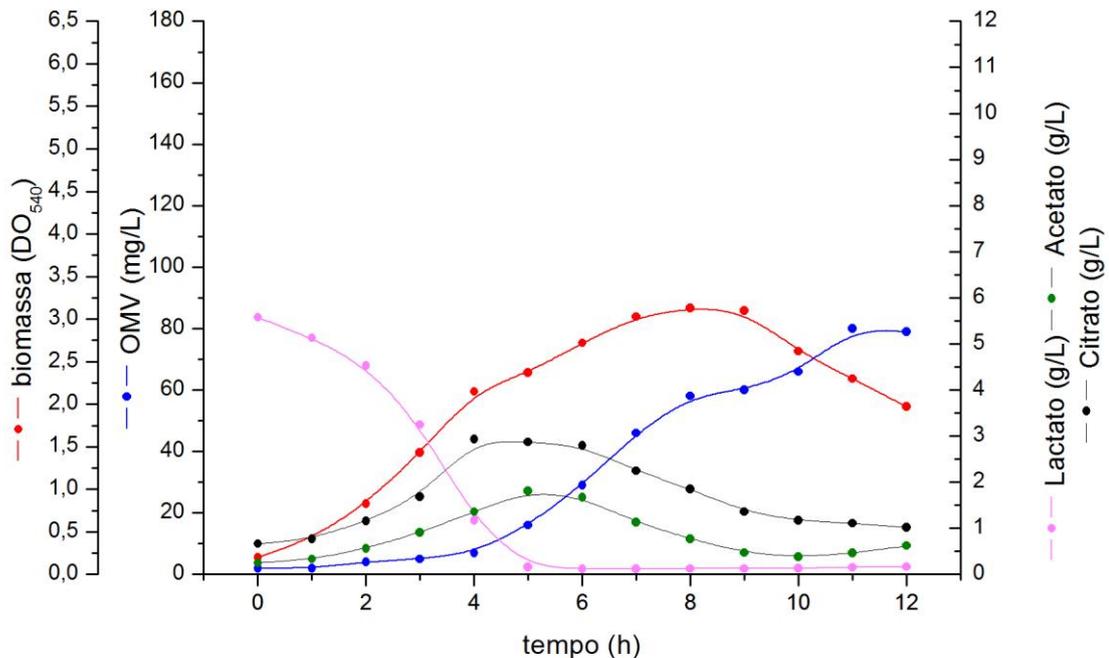
Figura 7 – Curvas de biomassa (DO₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L) acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com 1g/L YE, com 10% de oxigênio dissolvido. Grupo A, ensaio 1

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Tabela 13 – Resultados experimentais do **grupo A**, ensaio 2

Tempo	pH	O ₂ D (%)	rpm	DO ₅₄₀	Massa seca (g/L)	OMV (mg/L)	lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)
00	7,50	10,6	250	0,20	0,09	2	5,57	0,25	0,66
01	7,69	9,3	326	0,42	0,19	2	5,13	0,33	0,77
02	7,73	11,8	434	0,83	0,37	4	4,53	0,56	1,16
03	7,75	3,4	565	1,43	0,64	5	3,24	0,91	1,68
04	7,54	13,6	747	2,15	0,96	7	1,17	1,36	2,93
05	7,72	4,1	596	2,37	1,05	16	0,16	1,81	2,87
06	7,79	6,9	590	2,72	1,21	29	0,12	1,67	2,79
07	7,80	10,0	714	3,03	1,34	46	0,12	1,13	2,25
08	8,28	16,0	576	3,13	1,39	58	0,13	0,77	1,85
09	8,40	3,3	548	3,10	1,38	60	0,13	0,47	1,36
10	8,49	16,8	377	2,62	1,16	66	0,13	0,38	1,17
11	8,58	26,3	250	2,30	1,02	80	0,15	0,46	1,11
12	8,65	24,1	250	1,97	0,88	79	0,16	0,62	1,02

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Figura 8 – Curvas de biomassa (DO₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L) acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com 1g/L YE, com 10% de oxigênio dissolvido. **Grupo A**, ensaio 2

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

No grupo A, houve crescimento bacteriano até 8ª hora onde a DO_{540} foi de 2,97 no ensaio 1, e de 3,13 no ensaio 2. A massa seca foi de 1,32 e 1,39 g/L, respectivamente. A fase de declínio nos dois ensaios (réplicas) começou em torno da 9ª hora.

O lactato foi consumido desde o início do cultivo, atingiu sua concentração mínima na 6ª-7ª hora com valores de 0,02 g/L no ensaio 1 e 0,12 g/L no ensaio 2.

Ao mesmo tempo em que havia a queda da concentração do lactato foi possível observar um aumento das concentrações de acetato e citrato, decorrente do metabolismo bacteriano. Os perfis de produção de acetato e de citrato foram semelhantes, sendo que a concentração do acetato no meio foi aumentando até a 5ª hora, e a concentração do citrato foi aumentando até a 4ª hora. Depois, a concentração de ambos começou a decair, coincidindo com o esgotamento do lactato do meio, sugerindo que, neste momento, *N. lactamica* utilizou citrato e acetato como fonte de carbono para continuar o crescimento. Observa-se que na 4ª hora quando quase todo o lactato foi consumido e iniciou o consumo de citrato e acetato, há um ponto de inflexão na curva da biomassa sugerindo uma alteração de via metabólica.

A concentração de OMV foi aumentando até a 8ª hora e depois se manteve estável no ensaio 1, atingindo um valor máximo de 88 mg/L na 9ª hora. No ensaio 2 a concentração de OMV máxima foi de 80 mg/L na 11ª hora.

Neste grupo, o pH aumentou do início para o fim do cultivo. Variou de 7,41 a 8,29 no ensaio 1 e de 7,50 a 8,65 no ensaio 2. A agitação máxima foi observada na 4ª hora, com 848 rpm no ensaio 1 e com 747 rpm no ensaio 2. Após estes valores máximos de agitação, houve um declínio e posteriormente voltou a aumentar na 7ª hora, em ambos os ensaios. Os dados obtidos em tempo real estão no APÊNDICE C.

3.2.3 Ensaio do grupo B

Os ensaios do grupo B foram realizados em cultivo descontínuo em MC com 1 g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido.

A Tabela 14 e Figura 9 apresentam os resultados do ensaio 3 e Tabela 15 e Figura 10, do ensaio 4.

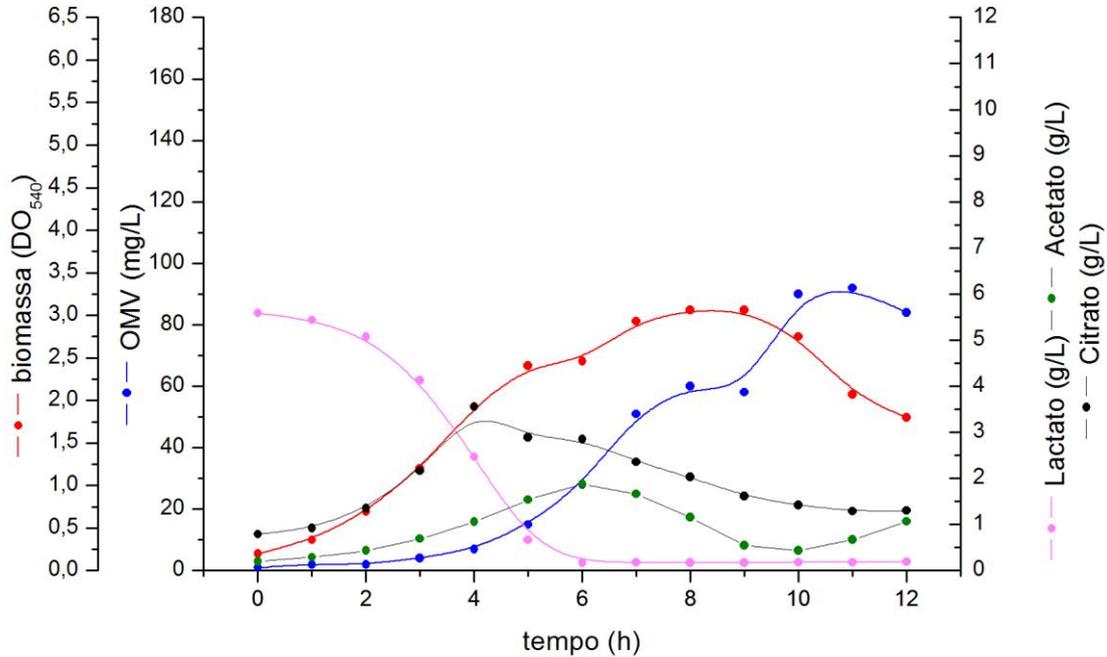
Os valores de oxigênio dissolvido do ensaio 3 não estão na Tabela 14 pois houve um problema com a sonda de oxigênio. Os valores de agitação obtidos foram os reais obtidos durante o ensaio, porém, a agitação não estava sendo regulada em função do oxigênio dissolvido real dentro do biorreator.

Tabela 14 – Resultados experimentais do grupo B, ensaio 3

Tempo	pH	O ₂ D (%)	rpm	DO ₅₄₀	Massa seca (g/L)	OMV (mg/L)	lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)
00	7,06	-	250	0,20	0,09	1	5,59	0,20	0,79
01	7,08	-	393	0,36	0,16	2	5,44	0,29	0,92
02	7,11	-	459	0,69	0,30	2	5,07	0,43	1,35
03	7,10	-	569	1,20	0,53	4	4,13	0,69	2,16
04	7,10	-	852	1,93	0,86	7	2,47	1,06	3,55
05	7,15	-	848	2,41	1,07	15	0,66	1,54	2,89
06	7,56	-	850	2,46	1,09	28	0,18	1,88	2,85
07	7,85	-	851	2,93	1,30	51	0,18	1,66	2,36
08	8,11	-	851	3,06	1,36	60	0,17	1,16	2,03
09	8,27	-	851	3,06	1,36	58	0,18	0,55	1,61
10	8,45	-	850	2,75	1,22	90	0,18	0,44	1,42
11	8,65	-	850	2,07	0,92	92	0,18	0,67	1,29
12	8,62	-	250	1,80	0,80	84	0,19	1,07	1,30

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Figura 9 – Curvas de biomassa (DO_{540}), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com 1g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. **Grupo B**, ensaio 3



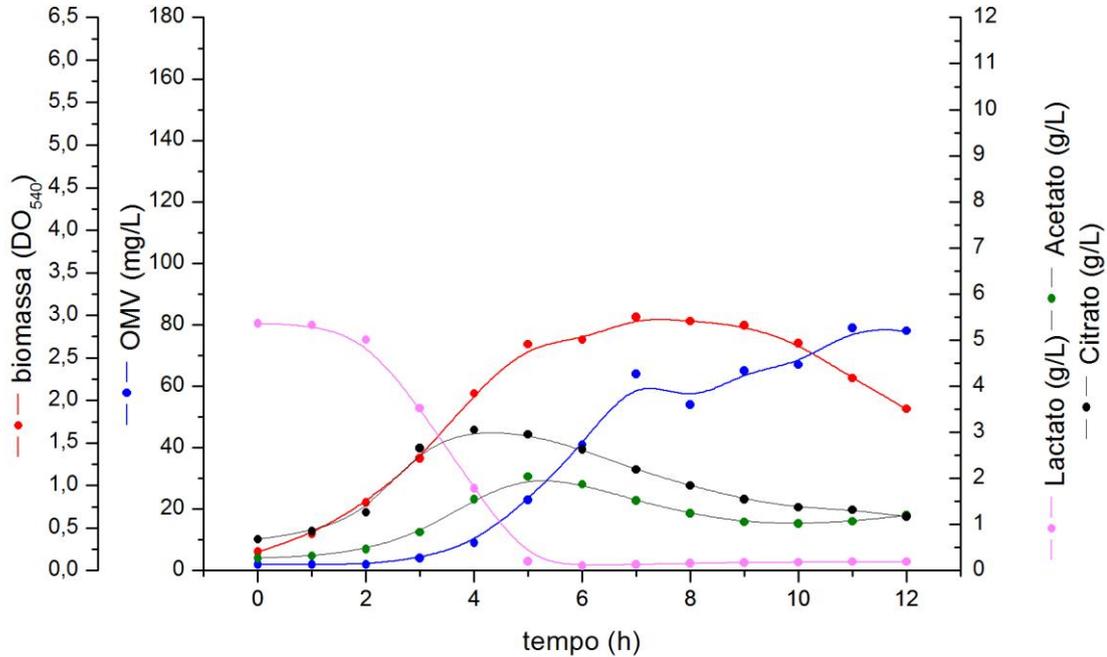
FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Tabela 15 – Resultados experimentais do **grupo B**, ensaio 4

Tempo	pH	O ₂ D (%)	rpm	DO ₅₄₀	Massa seca (g/L)	OMV (mg/L)	lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)
00	7,06	25,7	293	0,22	0,10	2	5,36	0,27	0,68
01	7,06	28,1	349	0,43	0,19	2	5,33	0,32	0,85
02	7,10	28,7	445	0,80	0,35	2	5,01	0,46	1,26
03	7,21	27,6	543	1,32	0,59	4	3,53	0,83	2,66
04	7,08	0,9	850	2,08	0,92	9	1,78	1,55	3,05
05	7,21	34,8	593	2,66	1,18	23	0,20	2,04	2,95
06	7,86	29,4	638	2,71	1,20	41	0,11	1,87	2,63
07	8,07	30,0	597	2,98	1,32	64	0,13	1,52	2,19
08	8,17	30,7	551	2,93	1,30	54	0,16	1,24	1,84
09	8,16	31,9	429	2,88	1,28	65	0,17	1,05	1,55
10	8,24	31,8	316	2,67	1,19	67	0,18	1,02	1,37
11	8,18	30,6	279	2,26	1,00	79	0,19	1,07	1,32
12	8,22	39,8	250	1,90	0,84	78	0,19	1,20	1,17

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Figura 10 – Curvas de biomassa (DO_{540}), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com 1g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. **Grupo B**, ensaio 4



FONTE: (GONÇALVES, 2012)

No grupo B, houve crescimento até 8ª hora no ensaio 3, com valores máximos de 3,06 de DO_{540} , e de 1,36 g/L de massa seca. No ensaio 4, houve crescimento até 7ª hora com valores máximos de 2,98 de DO_{540} e de 1,32 g/L de massa seca. A fase de declínio nos dois ensaios (réplicas) começou aproximadamente na 9ª hora.

O lactato foi consumido desde o início do cultivo até a 6ª hora aproximadamente, quando atingiu concentrações iguais ou abaixo de 0,18 g/L.

Ao mesmo tempo em que havia a queda do lactato foi possível observar um aumento das concentrações de acetato e citrato. Os perfis de produção de acetato e de citrato foram semelhantes entre si, sendo que no ensaio 3 a concentração máxima de acetato foi de 1,88 g/L na 6ª hora e a concentração máxima de citrato foi de 3,55 g/L na 5ª hora. No ensaio 4, a concentração máxima de acetato foi de 2,04 g/L na 5ª hora e a concentração máxima de citrato foi de 3,05 g/L na 4ª hora. Posteriormente, a concentração destes começou a decair, coincidindo com o esgotamento do lactato do meio. Observa-se que na 6ª hora quando todo o lactato foi consumido, se inicia o consumo de citrato e acetato, e houve um ponto de

inflexão na curva da biomassa sugerindo uma alteração de via metabólica. O citrato começou a ser produzido e consumido pouco antes do acetato.

A concentração de OMV aumentou até a 10^a hora e depois se manteve estável no ensaio 3, com valor máximo em torno de 90 mg/L. No ensaio 4, a concentração de OMV aumentou até a 11^a hora e atingiu o valor de 79 mg/L.

No grupo D, o pH aumentou do do início para o final do cultivo. Variou de 7,06 a 8,62 no ensaio 3, e de 7,06 a 8,22 no ensaio 4. No ensaio 4, a agitação máxima foi na 4^a hora, de 850 rpm e, após este ponto máximo, há uma queda nos valores depois volta a aumentar na 6^a hora. Os valores de agitação apresentados para o ensaio 3 mantiveram-se no máximo da 4^a hora até o final do cultivo quando foi verificado que a sonda de oxigênio dissolvido estava com problema. No entanto, tal evento não afetou o resultado do experimento em nenhuma das variáveis analisadas, quando comparado ao ensaio 4. Os dados obtidos em tempo real estão no APÊNDICE C.

Não foi observada diferença quanto à modificação da porcentagem de oxigênio dissolvido para 30%, em relação aos 10% utilizados no ensaio A.

3.2.4 Ensaio do grupo C

O ensaio do grupo C foi realizado em cultivo descontínuo em MC sem seus cinco aminoácidos constitutivos, com 1 g/L YE, com 10% de oxigênio dissolvido.

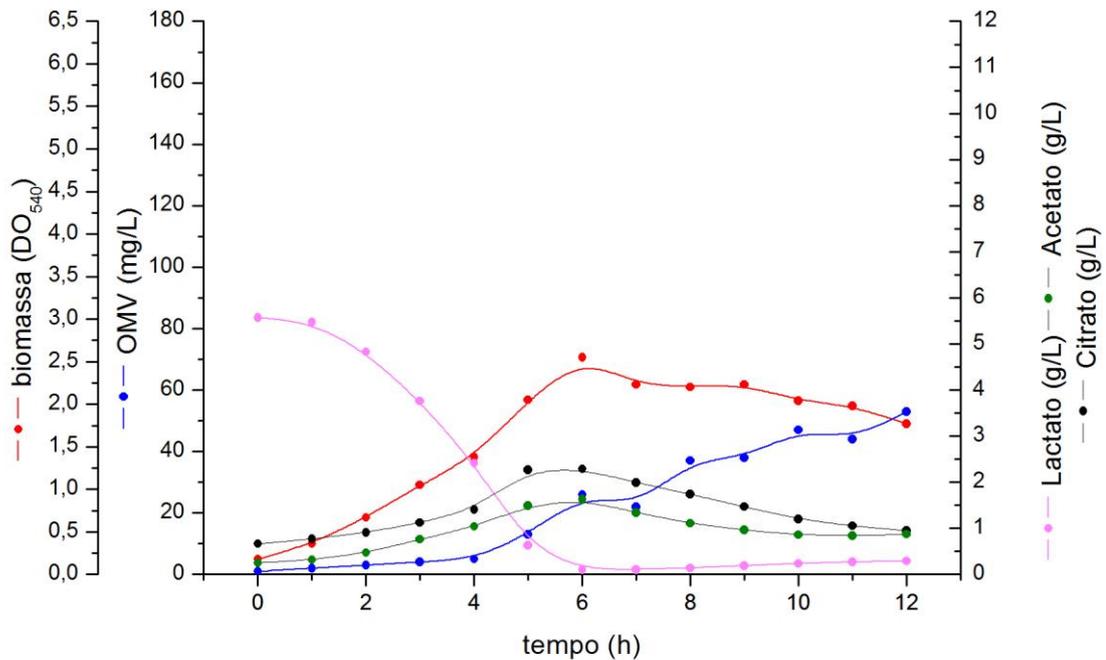
A Tabela 16 e Figura 11 apresentam os resultados do ensaio 5. Não houve réplica para este ensaio.

Tabela 16 – Resultados experimentais do **grupo C**, ensaio 5

Tempo	pH	O ₂ D (%)	rpm	DO ₅₄₀	Massa seca (g/L)	OMV (mg/L)	lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)
00	7,05	72,1	250	0,18	0,08	1	5,57	0,25	0,66
01	7,03	8,5	286	0,36	0,16	2	5,47	0,32	0,77
02	7,06	9,5	404	0,67	0,30	3	4,83	0,47	0,91
03	7,20	9,6	456	1,05	0,47	4	3,76	0,76	1,12
04	7,26	9,3	504	1,38	0,61	5	2,42	1,04	1,41
05	7,29	8,6	650	2,05	0,91	13	0,63	1,49	2,27
06	7,54	10,1	526	2,55	1,13	26	0,10	1,63	2,29
07	7,85	10,2	533	2,23	0,99	22	0,10	1,34	1,99
08	7,93	10,1	521	2,20	0,98	37	0,14	1,11	1,74
09	7,98	10,7	436	2,23	0,99	38	0,19	0,96	1,47
10	8,05	8,9	417	2,04	0,90	47	0,24	0,86	1,20
11	8,18	11,2	355	1,98	0,88	44	0,27	0,84	1,05
12	8,24	10,1	290	1,77	0,78	53	0,29	0,87	0,95

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Figura 11 – Curvas de biomassa (DO₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC sem seus cinco aminoácidos constitutivos, com 1g/L YE, com 10% de oxigênio dissolvido. **Grupo C**, ensaio 5



FONTE: (GONÇALVES, 2012)

No grupo C, houve crescimento até a 6^a hora, onde a DO₅₄₀ foi de 2,55 e a massa seca foi de 1,13 g/L. A fase de declínio da curva de crescimento começou por volta da 10^a hora.

O lactato foi consumido desde o início do cultivo até a 6^a hora quando atingiu sua concentração mínima de 0,10 g/L.

Ao mesmo tempo em que houve a queda do lactato foi possível observar um aumento das concentrações de acetato e citrato que atingiram seus valores máximos na 6^a hora sendo de 1,63 g/L de acetato, e 2,29 g/L de citrato. Os perfis de produção de acetato e de citrato foram semelhantes entre si, e atingiram seus valores máximos quando a concentração de lactato atingiu seu valor mínimo. A partir deste ponto, os valores de citrato e de acetato começaram a decair, coincidindo com o esgotamento do lactato do meio. Neste ensaio não ficou evidenciado o ponto de inflexão na curva de biomassa, que pôde ser observada nos grupos A e B.

A concentração de OMV foi aumentando até o final do ensaio atingindo sua máxima concentração de 53 mg/L na 12^a hora.

Neste grupo, o pH aumentou do início para o final do cultivo. Variou de 7,05 a 8,24. A agitação máxima observada foi de 650 rpm na 5^a hora. Os dados obtidos em tempo real estão no APÊNDICE C.

3.2.5 *Ensaio do grupo D*

Os ensaios do grupo D foram realizados em cultivo descontínuo em MC sem seus cinco aminoácidos constitutivos, com 1 g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido.

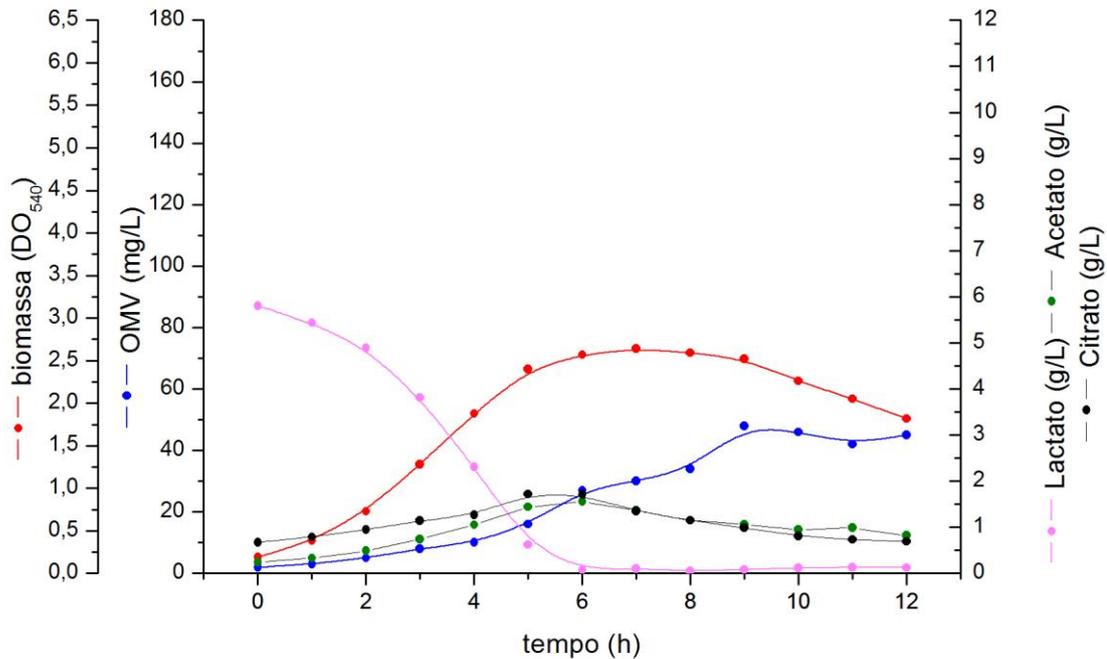
A Tabela 17 e Figura 12 apresentam os resultados do ensaio 6 e Tabela 18 e Figura 13 do ensaio 7.

Tabela 17 – Resultados experimentais do grupo D, ensaio 6

Tempo	pH	O ₂ D (%)	rpm	DO ₅₄₀	Massa seca (g/L)	OMV (mg/L)	lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)
00	7,13	16,3	340	0,19	0,08	2	5,80	0,24	0,67
01	7,12	27,3	385	0,38	0,17	3	5,44	0,33	0,79
02	7,12	28,9	462	0,73	0,32	5	4,89	0,49	0,95
03	7,27	29,3	543	1,28	0,57	8	3,81	0,74	1,14
04	7,39	29,1	582	1,88	0,83	10	2,31	1,05	1,27
05	7,42	30,2	777	2,40	1,07	16	0,62	1,44	1,72
06	7,83	30,0	588	2,57	1,14	27	0,08	1,56	1,71
07	8,06	29,9	597	2,64	1,17	30	0,10	1,37	1,35
08	8,17	31,3	555	2,59	1,15	34	0,05	1,15	1,15
09	8,26	31,0	529	2,52	1,12	48	0,08	1,06	0,99
10	8,30	30,3	469	2,26	1,00	46	0,12	0,95	0,81
11	8,37	31,4	389	2,05	0,91	42	0,13	0,99	0,73
12	8,41	29,8	310	1,82	0,81	45	0,13	0,82	0,69

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Figura 12 – Curvas de biomassa (DO₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC sem seus cinco aminoácidos constitutivos, com 1g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. **Grupo D, ensaio 6**

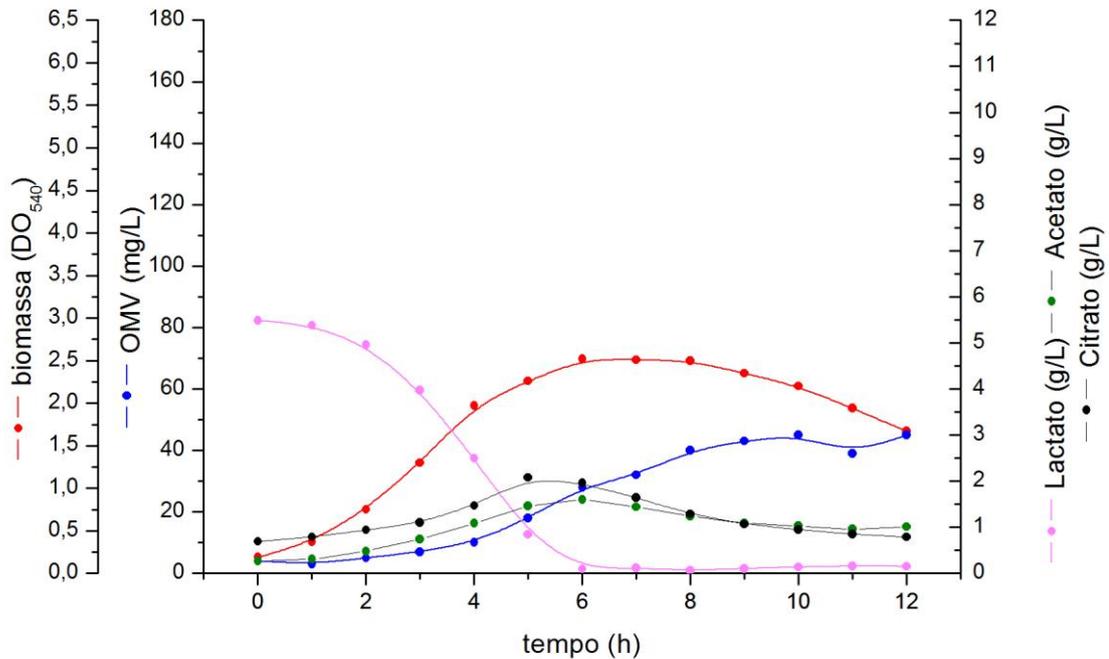


FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Tabela 18 – Resultados experimentais do **grupo D**, ensaio 7

Tempo	pH	O ₂ D (%)	rpm	DO ₅₄₀	Massa seca (g/L)	OMV (mg/L)	lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)
00	7,16	22,1	250	0,19	0,08	4	5,49	0,27	0,69
01	7,12	26,6	379	0,37	0,16	3	5,38	0,31	0,79
02	7,14	27,3	472	0,75	0,33	5	4,96	0,48	0,94
03	7,33	31,3	548	1,30	0,58	7	3,98	0,74	1,10
04	7,42	29,5	624	1,97	0,88	10	2,50	1,09	1,47
05	7,47	27,8	662	2,26	1,00	18	0,85	1,46	2,08
06	7,87	29,6	562	2,52	1,12	28	0,10	1,60	1,96
07	8,06	29,6	553	2,51	1,11	32	0,12	1,44	1,64
08	8,01	31,3	463	2,50	1,11	40	0,06	1,24	1,29
09	8,15	29,4	450	2,35	1,04	43	0,11	1,09	1,07
10	8,26	29,9	400	2,20	0,98	45	0,14	1,03	0,95
11	8,35	28,5	323	1,94	0,86	39	0,16	0,96	0,85
12	8,41	31,3	348	1,67	0,74	45	0,15	1,01	0,79

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Figura 13 – Curvas de biomassa (DO₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC sem seus cinco aminoácidos constitutivos, com 1g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. **Grupo D**, ensaio 7

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

No grupo D houve crescimento até a 7ª hora no ensaio 6, onde a DO_{540} máxima foi de 2,64 e a massa seca de 1,17 g/L. No ensaio 7, houve crescimento até a 6ª hora, onde a DO_{540} máxima foi de 2,52 e a massa seca foi de 1,12 g/L. A fase de declínio nos dois ensaios (réplicas) começou em torno da 9ª hora.

O lactato foi rapidamente consumido desde o início do cultivo até aproximadamente a 6ª hora com valores de 0,08 g/L no ensaio 6 e de 0,10 g/L no ensaio 7.

Ao mesmo tempo em que havia a queda do lactato houve um aumento nas concentrações de acetato e de citrato. Os perfis de produção de acetato e de citrato foram semelhantes entre si, sendo que a concentração destes foi aumentando até a 6ª hora no caso do acetato, chegando a 1,56 g/L no ensaio 6 e a 1,60 g/L no ensaio 7; e a concentração de citrato aumentou até a 5ª hora, chegando a 1,72 g/L no ensaio 6 e a 2,08 g/L no ensaio 7. Depois começaram a decair, coincidindo com o esgotamento do lactato do meio. Observa-se que na 6ª hora, quando todo o lactato foi consumido, se inicia o consumo de acetato e citrato. Neste grupo não ficou evidenciado o ponto de inflexão na curva de biomassa que pôde ser observada nos grupos A e B.

A concentração de OMV, no ensaio 6, atingiu o valor máximo de 48 mg/L na 9ª hora e manteve-se estável até o final do processo. No ensaio 7, o valor máximo de OMV foi de 45 mg/L na 10ª hora e também manteve-se estável até o final do processo.

No grupo D, o pH variou de 7,13 a 8,41 no ensaio 6, e de 7,16 a 8,41 no ensaio 7, aumentando do início para o final do cultivo. A agitação máxima foi observada na 5ª hora, com valor máximo de 777 rpm no ensaio 6, e de 662 rpm no ensaio 7. Os dados obtidos em tempo real estão no APÊNDICE C.

A ausência dos cinco aminoácidos constitutivos do MC afetou principalmente a produção de OMV, quando se compara este grupo D, ao grupo B. Entretanto a alteração da porcentagem de oxigênio dissolvido de 10% (grupo C) para 30% (grupo D) não afetou o rendimento em OMV.

3.2.6 Ensaio do grupo E

Os ensaios do grupo E foram realizados em cultivo descontínuo em MC com o dobro das concentrações de lactato e dos seus cinco aminoácidos constitutivos, e

com adição apenas dos aminoácidos presentes em 2 g/L de YE, ver APÊNDICE C. Foi utilizado 30% de oxigênio dissolvido.

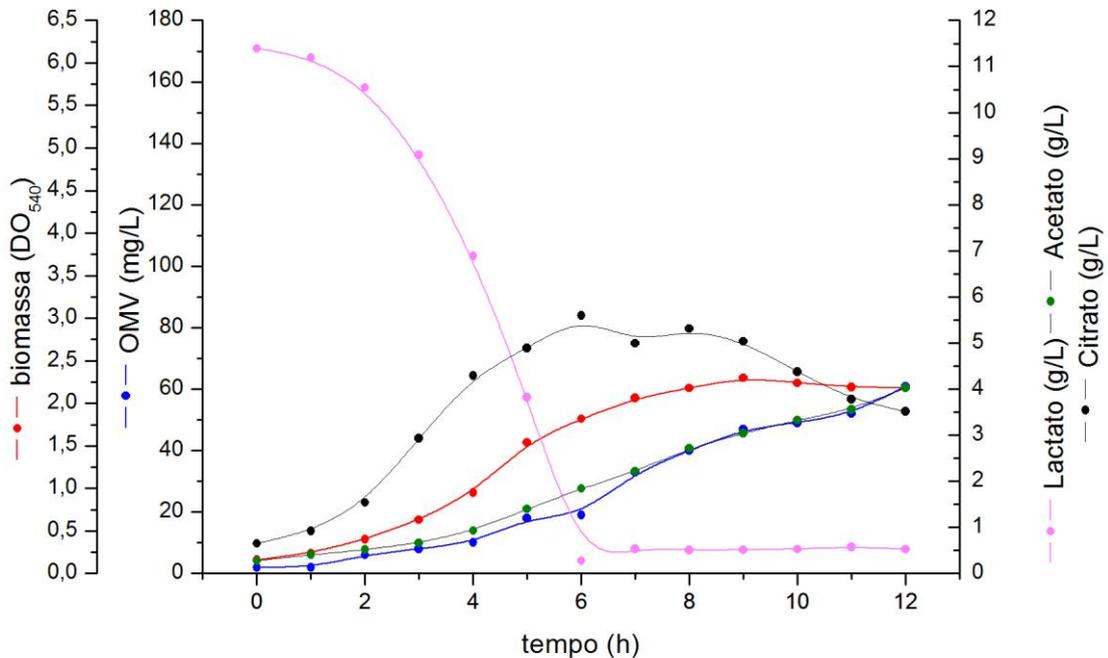
A Tabela 19 e Figura 14 apresentam os resultados do ensaio 8 e a Tabela 20 e Figura 15 do ensaio 9.

Tabela 19 – Resultados experimentais do grupo E, ensaio 8

Tempo	pH	O ₂ D (%)	rpm	DO ₅₄₀	Massa seca (g/L)	OMV (mg/L)	lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)
00	7,14	11,4	250	0,16	0,07	2	11,39	0,28	0,65
01	7,13	30,0	323	0,24	0,11	2	11,19	0,41	0,92
02	7,15	30,3	384	0,40	0,18	6	10,55	0,52	1,54
03	7,18	30,9	467	0,63	0,28	8	9,08	0,66	2,94
04	7,16	30,4	517	0,95	0,42	10	6,89	0,93	4,29
05	7,23	29,6	570	1,54	0,68	18	3,82	1,40	4,89
06	7,37	29,9	672	1,82	0,81	19	0,28	1,84	5,60
07	7,56	30,7	638	2,06	0,92	33	0,54	2,22	5,00
08	7,61	29,6	633	2,18	0,97	40	0,51	2,72	5,31
09	7,66	29,6	638	2,30	1,02	47	0,51	3,05	5,04
10	7,52	30,0	521	2,24	0,99	49	0,53	3,33	4,38
11	7,54	31,0	492	2,19	0,97	52	0,57	3,56	3,78
12	7,62	29,8	462	2,18	0,97	61	0,53	4,03	3,52

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Figura 14 – Curvas de biomassa (DO_{540}), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com o dobro das concentrações de lactato, dos seus cinco aminoácidos constitutivos, com adição apenas dos aminoácidos do YE, com 30% de oxigênio dissolvido. **Grupo E**, ensaio 8



FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Os valores de oxigênio dissolvido do ensaio 9 não estão apresentados na Tabela 20, pois houve um problema com a sonda de oxigênio. O oxigênio dissolvido foi mantido em 30%, controlando-se manualmente a agitação no biorreator, conforme a réplica deste ensaio, o ensaio 8.

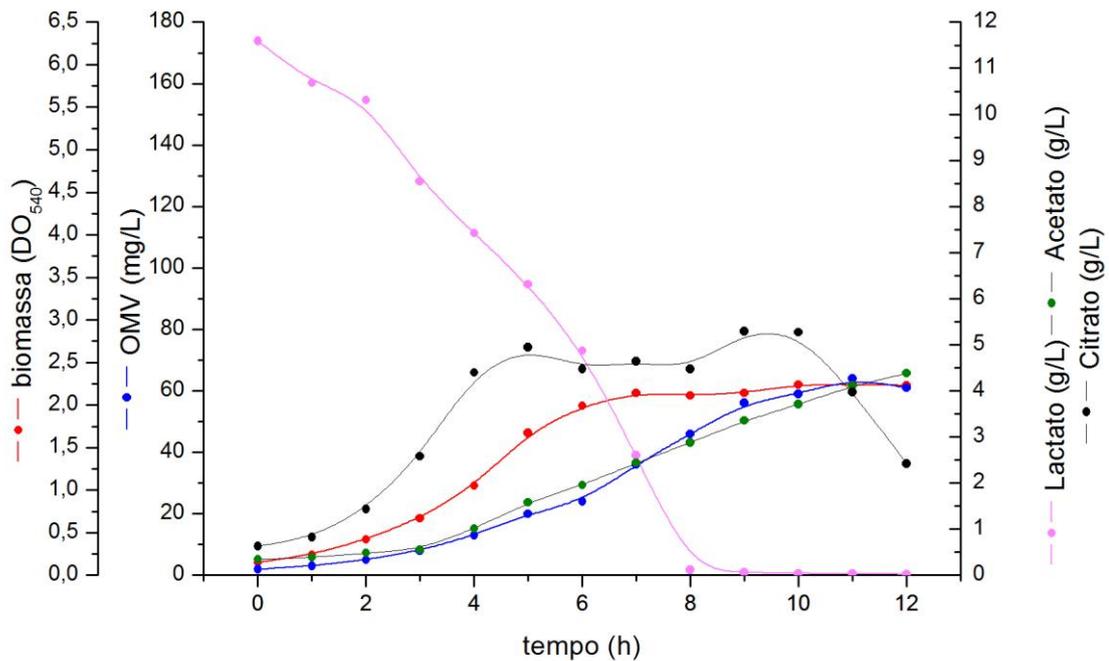
Tabela 20 – Resultados experimentais do **grupo E**, ensaio 9

Tempo	pH	O ₂ D (%)	rpm*	DO ₅₄₀	Massa seca (g/L)	OMV (mg/L)	lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)
00	7,09	-	-	0,15	0,07	2	11,59	0,35	0,63
01	7,07	-	376	0,24	0,11	3	10,69	0,39	0,82
02	7,10	-	463	0,42	0,19	5	10,31	0,49	1,44
03	7,11	-	511	0,67	0,30	8	8,55	0,56	2,58
04	7,12	-	541	1,05	0,47	13	7,42	1,01	4,40
05	7,21	-	590	1,67	0,74	20	6,31	1,58	4,95
06	7,35	-	637	1,99	0,88	24	4,87	1,96	4,48
07	7,47	-	625	2,14	0,95	36	2,60	2,44	4,64
08	7,54	-	632	2,11	0,94	46	0,12	2,88	4,48
09	7,59	-	628	2,14	0,95	56	0,06	3,36	5,29
10	7,45	-	516	2,24	0,99	59	0,04	3,71	5,27
11	7,46	-	460	2,24	0,99	64	0,04	4,11	3,98
12	7,55	-	471	2,23	0,99	61	0,03	4,38	2,42

*Valores foram ajustados manualmente de acordo com a duplicata.

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Figura 15 – Curvas de biomassa (DO₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com o dobro das concentrações de lactato, dos seus cinco aminoácidos constitutivos, com adição apenas dos aminoácidos do YE, com 30% de oxigênio dissolvido. **Grupo E**, ensaio 9



FONTE: (GONÇALVES, 2012)

No grupo E, houve crescimento até a 9ª hora no ensaio 8, onde a DO_{540} foi de 2,30 e no ensaio 9 foi de 2,14. A massa seca foi de 1,02 e 0,95 g/L, respectivamente. A fase estacionária dos dois ensaios se manteve até o final do cultivo. Não foi observado o ponto de inflexão nas curvas de biomassa dos dois ensaios.

A concentração de OMV foi aumentando até o final dos dois cultivos, com tendência a se manter estável nas últimas horas. Os máximos valores de OMV foram de 61 mg/L na 12ª hora no ensaio 8, e de 64 mg/L na 11ª hora no ensaio 9. O lactato foi consumido até a 6ª hora no ensaio 8 e até a 8ª hora no ensaio 9. O acetato foi produzido até o final dos dois cultivos, chegando à concentração de 4,03 g/L no ensaio 8 e 4,38 g/L no ensaio 9. A curva de citrato atingiu valores máximos de 5,60 g/L no ensaio 8 e 4,95 g/L no ensaio 9 em torno da 5-6ª hora, seguido de um pequeno consumo, e foi novamente produzido, chegando a 5,31 g/L no ensaio 8 e a 5,29 g/L no ensaio 9, na 8-9ª hora e depois novamente consumido.

Neste grupo, o pH aumentou do início para o final do cultivo. Variou de 7,14 a 7,62 no ensaio 8 e de 7,09 a 7,55 no ensaio 9. A agitação máxima foi observada na 6ª hora, com 672 rpm no ensaio 8 e com 637 rpm no ensaio 9. Os dados obtidos em tempo real estão no APÊNDICE C.

3.2.7 Ensaios do grupo F

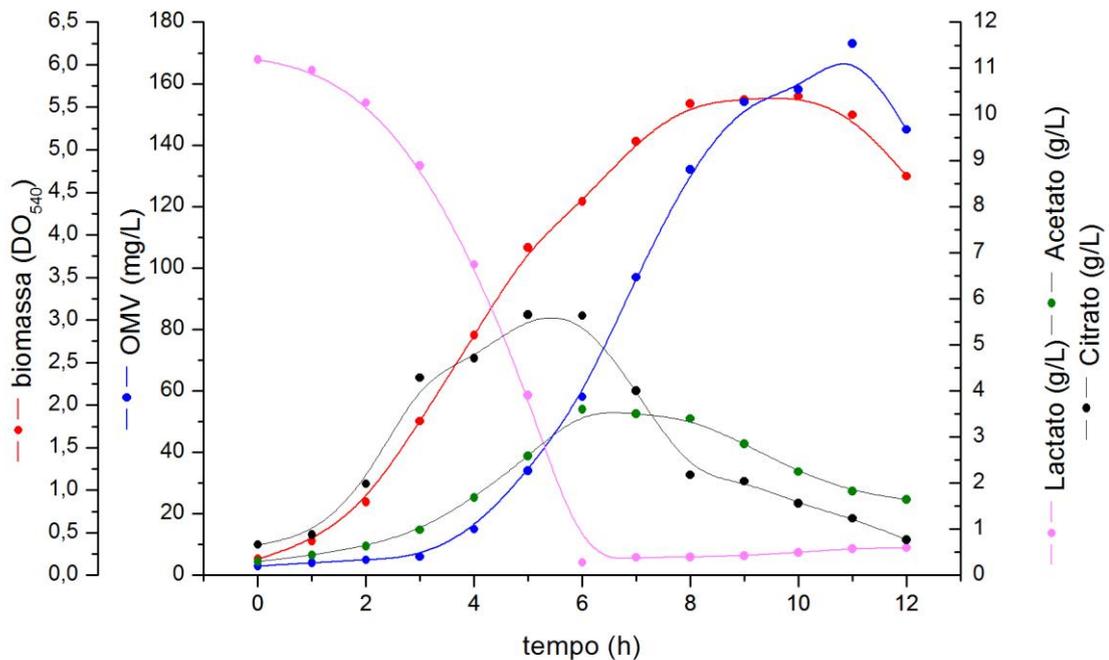
Os ensaios do grupo F foram realizados em cultivo descontínuo em MC com o dobro das concentrações de lactato, dos seus cinco aminoácidos constitutivos e com 2 g/L YE e 30% de oxigênio dissolvido.

A Tabela 21 e Figura 16 apresentam os resultados do ensaio 10 e a Tabela 22 e Figura 17, do ensaio 11.

Tabela 21 – Resultados experimentais do **grupo F**, ensaio 10

Tempo	pH	O ₂ D (%)	rpm	DO ₅₄₀	Massa seca (g/L)	OMV (mg/L)	lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)
00	7,14	45,1	250	0,19	0,08	3	11,19	0,30	0,66
01	7,09	27,5	356	0,40	0,18	4	10,96	0,44	0,88
02	7,13	30,0	472	0,86	0,38	5	10,25	0,63	1,98
03	7,20	27,3	566	1,81	0,80	6	8,88	0,98	4,29
04	7,03	1,2	850	2,82	1,25	15	6,74	1,68	4,71
05	7,17	1,2	851	3,85	1,71	34	3,90	2,59	5,65
06	7,31	1,2	849	4,39	1,95	58	0,28	3,60	5,63
07	7,69	27,7	684	5,10	2,27	97	0,39	3,50	4,00
08	7,88	31,1	806	5,54	2,46	132	0,40	3,40	2,18
09	8,16	29,4	752	5,59	2,48	154	0,43	2,85	2,04
10	8,31	29,8	687	5,63	2,50	158	0,50	2,25	1,56
11	8,40	31,3	630	5,41	2,40	173	0,58	1,82	1,24
12	8,50	22,3	657	4,69	2,08	145	0,59	1,64	0,77

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Figura 16 – Curvas de biomassa (DO₅₄₀), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com o dobro das concentrações de lactato, dos seus cinco aminoácidos constitutivos, com 2g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. **Grupo F**, ensaio 10

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Os valores de oxigênio dissolvido do ensaio 11 não estão apresentados na Tabela 22 pois houve um problema com a sonda de oxigênio. O oxigênio dissolvido foi mantido em 30%, controlando-se manualmente a agitação no biorreator, conforme a réplica deste ensaio, o ensaio 10.

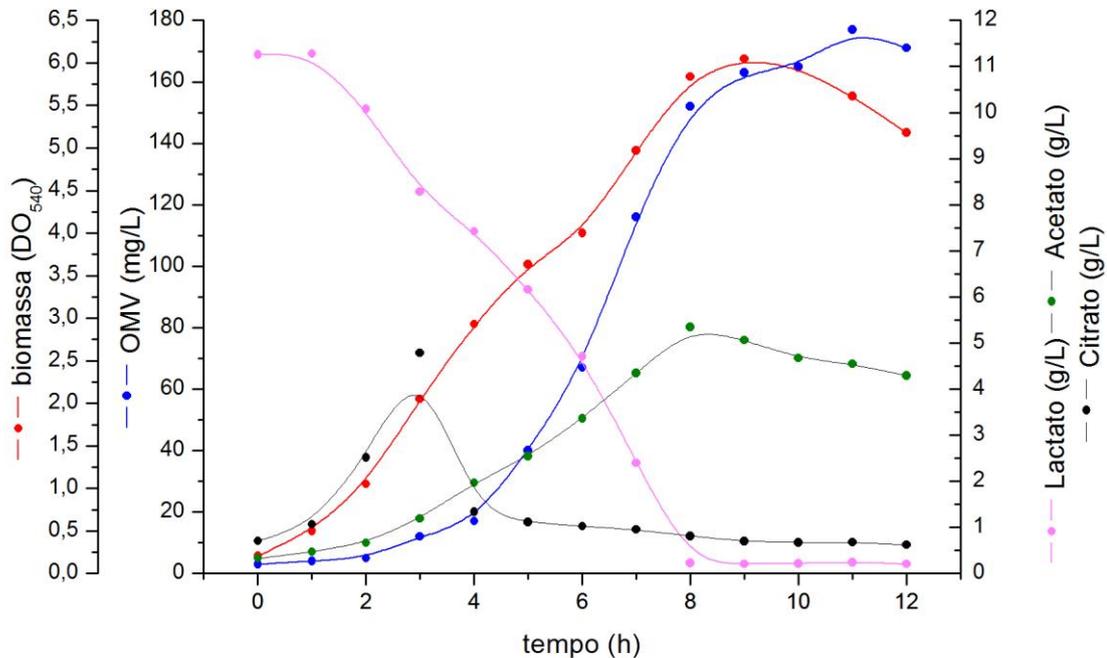
Tabela 22 – Resultados experimentais do grupo F, ensaio 11

Tempo	pH	O ₂ D (%)	rpm*	DO ₅₄₀	Massa seca (g/L)	OMV (mg/L)	lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)
00	7,08	-	250	0,21	0,09	3	11,26	0,33	0,71
01	7,04	-	356	0,50	0,22	4	11,28	0,47	1,07
02	7,08	-	472	1,05	0,47	5	10,08	0,66	2,52
03	7,04	-	566	2,05	0,91	12	8,28	1,20	4,79
04	6,99	-	850	2,93	1,30	17	7,43	1,97	1,34
05	7,13	-	851	3,63	1,61	40	6,16	2,54	1,12
06	7,19	-	849	4,00	1,78	67	4,71	3,37	1,03
07	7,30	-	684	4,97	2,21	116	2,40	4,35	0,96
08	7,44	-	806	5,84	2,60	152	0,23	5,35	0,81
09	7,96	-	752	6,05	2,69	163	0,21	5,07	0,70
10	8,14	-	687	5,95	2,64	165	0,22	4,68	0,67
11	8,23	-	630	5,61	2,49	177	0,25	4,55	0,68
12	8,28	-	657	5,18	2,30	171	0,21	4,29	0,62

*Valores foram ajustados manualmente, de acordo com a duplicata

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Figura 17 – Curvas de biomassa (DO_{540}), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com o dobro das concentrações de lactato, dos seus cinco aminoácidos constitutivos, com 2 g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. **Grupo F**, ensaio 11



FONTE: (GONÇALVES, 2012)

No grupo F, houve crescimento até a 9^a-10^a hora onde a DO_{540} foi de 5,63 no ensaio 10, e de 6,05 no ensaio 11. A massa seca foi de 2,50 e 2,69 g/L, respectivamente. A fase de declínio nos dois ensaios (réplicas) começou em torno da 10^a hora.

O lactato foi consumido desde o início do cultivo até a 6^a hora do ensaio 10, em que atingiu sua concentração mínima de 0,28 g/L, e até a 8^a hora no ensaio 11, com 0,23 g/L.

Ao mesmo tempo em que havia a queda do lactato foi possível observar um aumento das concentrações de acetato e citrato, sendo que o citrato foi produzido e consumido antes do acetato. No ensaio 10, a concentração máxima de acetato foi de 3,60 g/L na 6^a hora, e a de citrato foi de 5,65 g/L na 5^a hora. No ensaio 11 estes valores foram de 5,35 g/L de acetato na 8^a hora e de 4,79 g/L de citrato na 3^a hora. O perfil de produção e consumo de citrato foi um pouco diferente entre os ensaios, pois no ensaio 11, houve consumo deste já na 3^a hora de cultivo, enquanto que no ensaio 10, o consumo se iniciou apenas na 6^a hora de cultivo.

Na 5ª hora dos dois ensaios, houve um ponto de inflexão na curva da biomassa sugerindo uma alteração de via metabólica.

A concentração de OMV foi aumentando até a 11ª hora nos dois ensaios, atingindo um valor máximo de 173 mg/L no ensaio 10 e 177 mg/L no ensaio 11. A partir destes resultados, foi observado que a presença do extrato de levedura foi importante na produção de OMV, principalmente quando se comparam estes resultados aos resultados do grupo anterior (grupo E).

Neste grupo o pH aumentou do início para o final do cultivo. Variou de 7,14 a 8,50 no ensaio 10 e de 7,08 a 8,28 no ensaio 11. A agitação máxima no ensaio 10 ocorreu na 4ª, 5ª e 6ª horas, com cerca de 850 rpm. Após este período a agitação diminuiu, aumentado novamente na 8ª hora, com 806 rpm e na 12ª hora, com 657 rpm. Os dados obtidos em tempo real estão no APÊNDICE C.

3.2.8 Ensaio do grupo G

O ensaio do grupo G foi realizado por 14 horas, em cultivo descontínuo alimentado a partir de 4 h 30' após o início do cultivo com solução de lactato 500 g/L, com vazão de alimentação de 0,06 L/h. O meio utilizado foi o MC com o dobro das concentrações de lactato, dos seus cinco aminoácidos constitutivos, com 2 g/L YE e 30% de oxigênio dissolvido.

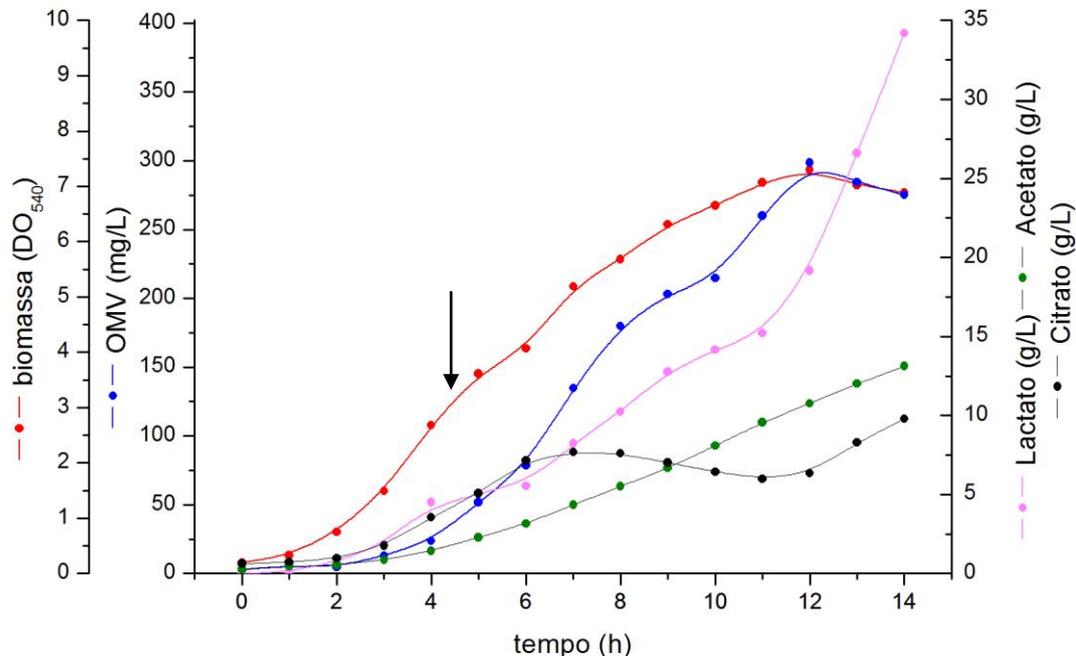
A Tabela 23 e Figura 18 apresentam os resultados do ensaio 12. Os valores de lactato apresentados são os valores consumidos (g/L) e os residuais (g/L).

Tabela 23 – Resultados experimentais do grupo G, ensaio 12

Tempo	pH	O ₂ D (%)	rpm	DO ₅₄₀	Massa seca (g/L)	OMV (mg/L)	lactato consumido (g/L)	lactato residual (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)
00	7,18	50,9	250	0,20	0,09	3	0,00	11,03	0,25	0,62
01	7,14	24,9	358	0,33	0,15	5	0,10	10,93	0,44	0,73
02	7,17	28,1	438	0,75	0,33	5	0,77	10,26	0,54	0,96
03	7,19	29,6	582	1,49	0,66	13	1,83	9,20	0,86	1,75
04	7,25	28,7	671	2,68	1,19	24	4,52	6,51	1,43	3,56
05	7,28	31,1	700	3,62	1,61	52	-	6,65	2,27	5,08
06	7,31	29,3	726	4,07	1,81	78	5,54	9,84	3,16	7,16
07	7,35	30,0	745	5,19	2,31	135	8,23	14,14	4,34	7,68
08	7,41	30,0	774	5,68	2,52	180	10,24	18,92	5,51	7,61
09	7,42	29,6	775	6,31	2,80	203	12,76	23,00	6,67	7,02
10	7,44	30,1	770	6,65	2,96	215	14,15	28,03	8,08	6,44
11	7,46	29,8	789	7,07	3,14	260	15,22	33,20	9,57	5,99
12	7,57	30,5	829	7,30	3,24	298	19,16	35,34	10,76	6,34
13	7,64	30,5	762	7,02	3,12	284	26,60	33,82	12,01	8,29
14	7,69	29,9	752	6,89	3,06	275	34,19	31,99	13,12	9,79

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Figura 18 – Curvas de biomassa (DO_{540}), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com o dobro das concentrações de lactato, dos seus cinco aminoácidos constitutivos, com 2g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. **Grupo G**, ensaio 12



A seta indica o início da alimentação com lactato
 FONTE: (GONÇALVES, 2012)

No grupo G, houve crescimento até a 12^a hora, onde a DO_{540} foi de 7,30 e a massa seca foi de 3,24 g/L. O ponto de inflexão da curva, que sugere alteração do metabolismo, ocorreu na 5^a hora de cultivo.

A concentração de OMV foi aumentando até a 12^a hora, com um máximo valor de 298 mg/L, com pequena queda após esta hora, chegando a 275 mg/L na 14^a hora.

Na Figura 18, a curva de lactato representa o lactato consumido. Houve consumo de lactato durante todo o ensaio, sendo que foi consumido mais rapidamente a partir da 11^a hora, chegando a um consumo final de 34,19 g/L na 14^a hora.

O acetato foi sendo produzido até o final do cultivo, chegando a concentração de 13,12 g/L na última hora. A curva de citrato atingiu um máximo de 7,68 g/L na 7^a hora, foi consumido até a 11^a hora chegando a 5,99 g/L, e foi novamente produzido até a 14^a hora, atingindo a valor máximo de 9,79 g/L. O citrato também foi consumido da 7^a até a 11^a hora de cultivo ao mesmo tempo em que o lactato

também era consumido. Provavelmente, o acúmulo de citrato ao final do cultivo foi resultante devido ao excesso de lactato no meio de cultura ou então pela limitação da fonte de nitrogênio.

Neste grupo, o pH variou de 7,18 a 7,69. A agitação máxima foi observada na 12^a hora, com 829 rpm. Os dados obtidos em tempo real estão no APÊNDICE C.

3.2.9 Ensaio do grupo H

O ensaio do grupo H foi realizado por 14 horas, em cultivo descontínuo alimentado a partir de 4 h 30' após o início do cultivo, com solução de lactato 500 g/L, com vazão de alimentação de 0,06 L/h. O meio foi o MC com o dobro das concentrações de lactato, dos seus cinco aminoácidos constitutivos, com 2 g/L YE e 30% de oxigênio dissolvido.

Houve um pulso de aminoácidos do meio de Catlin às 4 h 30' e um pulso de extrato de levedura às 8 h 30'.

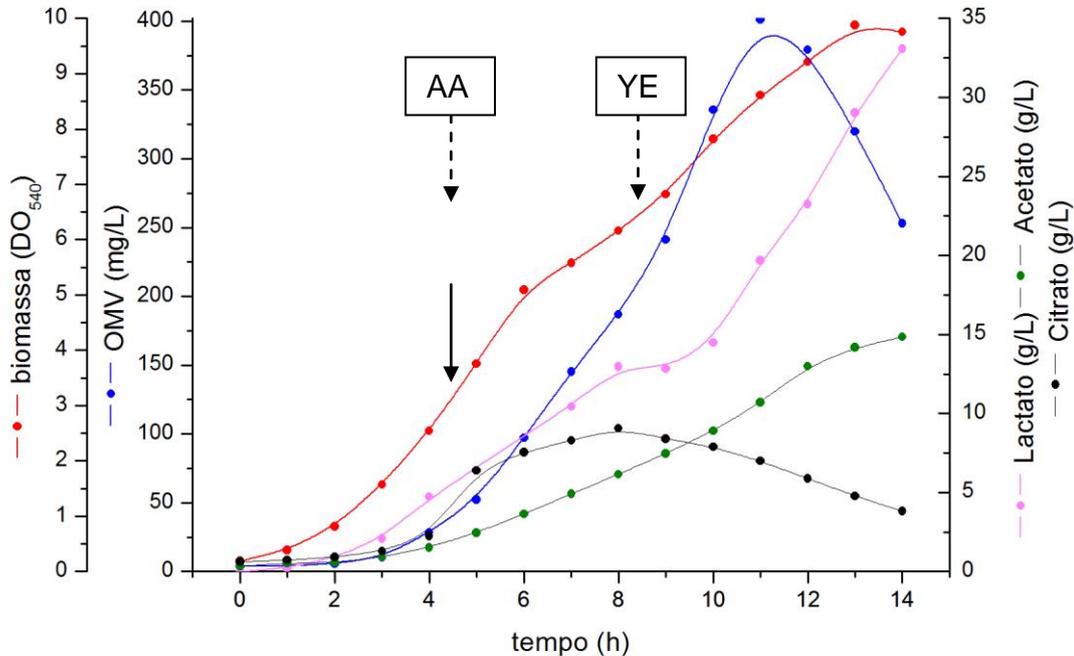
A Tabela 24 e Figura 19 apresentam os resultados do ensaio 13. Assim como no ensaio 12, os valores de lactato apresentados são os valores de consumo (g/L) e os valores residuais (g/L).

Tabela 24 – Resultados experimentais do grupo H, ensaio 13

Tempo	pH	O ₂ D (%)	rpm	DO ₅₄₀	Massa seca (g/L)	OMV (mg/L)	lactato consumido (g/L)	lactato residual (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)
00	7,11	16,5	250	0,19	0,08	4	0,00	11,04	0,33	0,62
01	7,09	28,3	366	0,39	0,17	4	0,19	10,86	0,53	0,72
02	7,13	29,5	483	0,81	0,36	6	0,90	10,14	0,56	0,91
03	7,19	29,9	605	1,57	0,70	10	2,08	8,96	0,93	1,29
04	7,28	29,2	693	2,54	1,13	28	4,73	6,32	1,52	2,24
05	7,25	28,5	812	3,76	1,67	52	-	6,14	2,45	6,39
06	7,27	30,3	782	5,09	2,26	97	-	12,35	3,64	7,55
07	7,38	30,6	729	5,58	2,48	145	10,43	14,19	4,91	8,29
08	7,38	30,7	749	6,16	2,74	187	12,96	19,44	6,16	9,06
09	7,35	25,0	850	6,82	3,03	241	12,82	27,10	7,47	8,40
10	7,34	2,9	850	7,82	3,48	335	14,47	32,74	8,89	7,89
11	7,39	2,0	850	8,61	3,83	401	19,68	34,60	10,69	6,99
12	7,39	1,6	849	9,21	4,09	379	23,25	37,88	12,98	5,88
13	7,50	1,3	851	9,88	4,39	320	29,02	38,76	14,18	4,77
14	7,56	1,1	851	9,76	4,34	253	33,07	41,15	14,84	3,82

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Figura 19 – Curvas de biomassa (DO_{540}), OMV (mg/L), lactato (g/L), acetato (g/L) e citrato (g/L). MC com o dobro das concentrações de lactato, dos seus cinco aminoácidos constitutivos, com 2g/L YE, com 30% de oxigênio dissolvido. **Grupo H**, ensaio 13



A seta cheia indica o início da alimentação com lactato e as setas tracejadas indicam o momento dos pulsos

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

No grupo H, houve crescimento até a 13ª hora, onde a DO_{540} foi de 9,88 e a massa seca foi de 4,39 g/L. O ponto de inflexão da curva ocorreu na 6ª hora de cultivo.

A concentração de OMV foi aumentando até a 11ª hora, com um máximo valor de 401 mg/L. Foi observada uma queda na concentração de OMV a partir desta hora, chegando num valor de 253 mg/L na 14ª hora.

Assim como no ensaio anterior, o ensaio 12, a curva de lactato representa o lactato consumido na Figura 19. Houve consumo de lactato durante todo o ensaio, sendo que foi consumido mais rapidamente a partir da 10ª hora, chegando a um consumo final de 33,07 g/L na 14ª hora.

O acetato foi sendo produzido até o final do cultivo, chegando a concentração de 14,84 g/L na última hora. A curva de citrato atingiu um máximo de 9,06 g/L na 8ª hora, e depois foi consumido até o final do cultivo, diferentemente do grupo anterior (grupo G), chegando a 3,82 g/L na 14ª hora. Como neste ensaio houve pulso de

aminoácidos e de extrato de levedura, provavelmente havia fonte de nitrogênio disponível para o micro-organismo, possibilitando que o citrato fosse consumido até o final do cultivo, diferente do que ocorreu no grupo G, que o citrato acumulou ao final do ensaio.

Neste grupo, o pH variou de 7,11 a 7,56. A agitação máxima foi observada da 9ª hora em diante, com 850 rpm. Os dados obtidos em tempo real estão no APÊNDICE C.

3.3 Análises da produtividade e fatores de conversão dos ensaios realizados em biorreator

A Tabela 25 a seguir apresenta um resumo dos valores obtidos de crescimento de *N. lactamica* e de rendimento de OMV em biorreator. Foram calculadas as médias quando havia duplicatas dos ensaios.

Tabela 25 – Máximos valores de DO₅₄₀, de massa seca (g/L) e de OMV (mg/L)

Grupos	Meios de cultura	Máx DO ₅₄₀	Máx massa seca (g/L)	Máx OMV (mg/L)
A*	MC + 1 g/L YE	3,05 ± 0,08	1,36 ± 0,03	84 ± 4
B	MC + 1 g/L YE	3,02 ± 0,04	1,34 ± 0,02	86 ± 7
C*	MC sem os 5 aminoácidos + 1 g/L YE	2,55	1,13	53
D	MC sem os 5 aminoácidos + 1 g/L YE	2,58 ± 0,06	1,15 ± 0,02	47 ± 2
E	MC com o dobro das concentrações de lactato, de aminoácidos, com adição dos aminoácidos do YE	2,27 ± 0,03	1,01 ± 0,02	63 ± 2
F	MC com o dobro das concentrações de lactato, de aminoácidos e com 2 g/L YE	5,84 ± 0,21	2,60 ± 0,10	175 ± 2
G	MC com o dobro das concentrações de lactato, de aminoácidos e com 2 g/L YE <u>alimentação com lactato</u>	7,30	3,24	298
H	MC com o dobro das concentrações de lactato, de aminoácidos e com 2 g/L YE <u>alimentação com lactato e pulsos de aminoácidos e de extrato de levedura</u>	9,88	4,39	401

*Cultivos realizados com 10% de oxigênio dissolvido. Os demais foram realizados com 30%
 FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Foram calculados os valores de produtividade celular e de OMV, assim como os fatores de conversão $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$ e $Y_{p/x}$ e as velocidades específicas máximas de geração de biomassa ($\mu_{x\text{máx}}$) de acordo com as equações citadas anteriormente. Os resultados obtidos estão na Tabela 26.

Tabela 26 – Concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$), concentração de OMV máxima ($P_{m\acute{a}x}$), produtividade em biomassa (Prod X) e de OMV (Prod P); fatores de conversão OMV/lactato ($Y_{p/s}$), biomassa/lactato ($Y_{x/s}$) e OMV/biomassa ($Y_{p/x}$); e velocidade específica máxima de geração em biomassa ($\mu_{xm\acute{a}x}$)

Grupos	Ensaio	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$P_{m\acute{a}x}$ (mg/L)	Prod X (g/L.h)	Prod P (mg/L.h)	$Y_{p/s}$ (mg/g)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/x}$ (mg/g)	$\mu_{xm\acute{a}x}$ (h ⁻¹)
A	1	1,32	88	0,16	9,62	15,76	0,23	69,82	0,63
	2	1,39	80	0,16	7,05	14,30	0,24	59,62	0,59
B	3	1,36	92	0,16	8,26	16,79	0,23	71,53	0,57
	4	1,32	79	0,17	7,01	14,92	0,23	63,23	0,56
C	5	1,13	53	0,10	4,31	9,81	0,17	56,87	0,59
D	6	1,17	48	0,16	5,14	8,08	0,19	42,41	0,59
	7	1,11	45	0,17	4,11	7,67	0,19	39,51	0,61
E	8	1,02	61	0,11	4,90	5,41	0,09	61,93	0,45
	9	0,99	64	0,09	5,62	5,35	0,08	67,14	0,47
F	10	2,50	173	0,24	15,49	16,05	0,23	70,40	0,70
	11	2,69	177	0,29	15,83	15,82	0,24	66,99	0,77
G	12	3,24	298	0,26	24,64	15,43	0,16	93,63	0,67
H	13	4,39	401	0,33	36,12	20,19	0,15	92,25	0,66

FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Não foram encontrados trabalhos de cultivo de *N. lactamica* na literatura para comparar os valores de crescimento e de rendimento de OMV obtidos neste trabalho. Entretanto, para *N. meningitidis*, como mencionado anteriormente na Introdução, Santos (2007) obteve em batelada simples, 1,7 g/L de biomassa na 10^a hora de cultivo; e a concentração de OMV chegou a cerca de 160 mg/L na 20^a hora.

De acordo com o que foi visto anteriormente, dentre as bateladas simples, o grupo que obteve os maiores valores de $X_{m\acute{a}x}$ comparando com os demais grupos foi o grupo F (2,50 g/L e 2,69 g/L). O grupo com os menores valores de $X_{m\acute{a}x}$ foi o grupo E (1,02 g/L e 0,99 g/L). A alimentação com lactato propiciou um aumento no $X_{m\acute{a}x}$ para 3,24 g/L no grupo G. Os pulsos de aminoácidos e extrato de levedura aumentaram ainda mais este valor, chegando a 4,39 g/L no grupo H, confirmando a importância do lactato e dos pulsos, principalmente do pulso de extrato de levedura que, foi o componente que teve efeito positivo sobre a biomassa, no planejamento fatorial, ensaio C, dos experimentos realizados em agitador rotativo (Tabela 8).

Em relação à $P_{\text{máx}}$, os maiores valores, dentre as bateladas simples, também foram obtidos no grupo F (173 mg/L e 177 mg/L), pois a biomassa neste meio de cultura foi muito alta e houve uma maior população de bactérias para produzir mais OMV. Com a alimentação de lactato, o $P_{\text{máx}}$ atingiu o valor de 298 mg/L no grupo G, e aumentou para 401 mg/L no cultivo com alimentação e pulsos, no grupo H. Estes resultados também corroboram aqueles obtidos no planejamento fatorial, ensaio C, Tabela 8, onde o lactato exerceu efeito positivo significativo sobre o rendimento de OMV. Os menores valores da $P_{\text{máx}}$ não foram do grupo E, mas sim do grupo D (48 mg/L e 45 mg/L). Neste grupo, o meio de cultura utilizado não continha os aminoácidos presentes no meio de Catlin. Portanto, estes parecem ser importantes para um bom rendimento de OMV.

A Prod X foi menor nos grupos C (0,10 g/L.h) e E (0,11 g/L.h e 0,09 g/L.h), possivelmente porque no grupo C, os aminoácidos constitutivos do meio de Catlin não foram adicionados ao meio de cultura; e no grupo E o extrato de levedura não foi acrescentado e algum fator de crescimento deste componente estaria faltando. O meio de cultura do grupo D também não continha os aminoácidos do meio de Catlin, como no grupo C, no entanto, os valores da Prod X foram de 0,16 g/L.h e 0,17 g/L.h. A única diferença entre esses dois grupos foi a porcentagem de oxigênio dissolvido: 10% no grupo C e 30% no grupo D. Dentre as bateladas simples, os maiores valores obtidos foram no grupo F (0,24 g/L.h e 0,29 g/L.h), onde o meio utilizado continha as concentrações dobradas de lactato, aminoácidos e de extrato de levedura. Nas bateladas alimentadas, os valores de Prod X também foram os maiores, de 0,26 e 0,33 g/L.h nos grupos G e H, respectivamente. Nos outros grupos, a Prod X foi semelhante. Estes dados mostram que os aminoácidos constitutivos do meio de Catlin, juntamente com algum fator de crescimento presente no YE (e não apenas seus aminoácidos) além de serem importantes na formação de OMV, também são importantes para a formação da biomassa bacteriana.

A Prod P foi menor nos grupos C (4,31 mg/L.h) e D (5,14 mg/L.h e 4,11 mg/L.h), que foram os grupos em que o meio de cultura não tinha os aminoácidos constitutivos do meio de Catlin. Os maiores valores de Prod P dentre as bateladas simples, foram no grupo F (15,49 mg/L.h e 15,83 mg/L.h) onde o meio de cultura utilizado tinha na sua composição o dobro de aminoácidos, que estavam disponíveis para a formação das OMV, além do dobro da concentração do extrato de levedura.

No grupo G com a alimentação de lactato, o valor da Prod P foi de 24,64 mg/L.h, e no grupo H com a alimentação e os pulsos, esse valor chegou a 36,12 mg/L.h.

O $Y_{p/s}$ foi semelhante entre os grupos A, B, F e G (~15 mg/g). Foi menor nos grupos C e D, que foram os grupos em que o meio não tinha os aminoácidos constitutivos do MC. Mas os menores valores de $Y_{p/s}$ foram os do grupo E (~5 mg/g), que foi utilizado o meio sem o YE, apenas com os aminoácidos presentes em 2 g/L do YE. Estes resultados indicam que além da importância dos aminoácidos constitutivos do MC, o YE também é importante para $Y_{p/s}$. O maior valor obtido foi da batelada alimentada e com pulsos, pois foram fornecidos, além do lactato, pulsos de aminoácidos e de YE, resultando em um $Y_{p/s}$ de 20,19 mg/g, grupo H.

O $Y_{x/s}$ também foi semelhante entre todos os grupos (~0,2 g/g), com exceção do grupo E (~0,1 g/g), onde o YE não foi acrescentado ao meio, apenas os aminoácidos presentes em 2 g/L de YE. Portanto, o YE é importante na conversão de substrato em células, mais uma vez comprovando o que foi visto anteriormente.

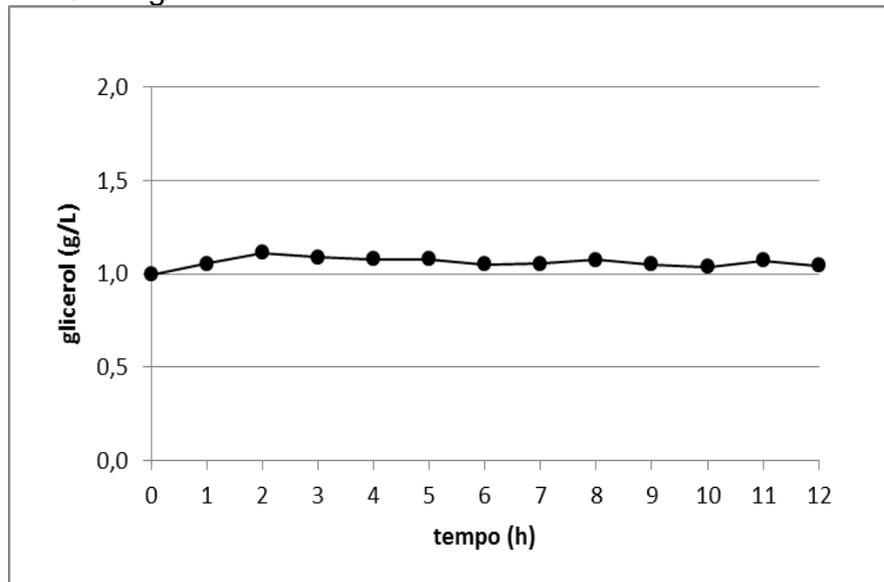
O $Y_{p/x}$ foi menor no grupo D (42,41 mg/g e 39,51 mg/g) e foi semelhante entre todos os outros grupos, dentre as bateladas simples. Indicando que os aminoácidos constitutivos do meio de Catlin são importantes para aumento de biomassa e rendimento de OMV mesmo quando uma substância complexa como o extrato de levedura é adicionado. O valor de $Y_{p/x}$ aumentou quando as bateladas foram alimentadas com o lactato, chegando a 93,63 mg/g no grupo G e a 92,25 mg/g no grupo H, comprovando a importância do lactato na conversão OMV/biomassa.

O $\mu_{x\text{máx}}$ foi de aproximadamente 0,6 h⁻¹ nos grupos A, B, C e D. Foi menor no grupo E, com valor de cerca de 0,5 h⁻¹, possivelmente pela ausência do YE no meio de cultura. O maior valor de $\mu_{x\text{máx}}$ foi obtido nos grupos F, G e H, de aproximadamente 0,7 h⁻¹, onde desde o início o meio de cultura continha as concentrações dobradas de lactato, aminoácidos e de extrato de levedura.

3.4 Glicerol

As concentrações de glicerol de apenas um ensaio foram mensuradas, por HPLC, com o objetivo de verificar se este componente estaria sendo utilizado por *N. lactamica* como fonte de carbono, além do lactato. As amostras do sobrenadante analisadas foram as do ensaio 4, grupo B. A curva das concentrações de glicerol está apresentada na Figura 20.

Figura 20 – Cinética do glicerol durante o cultivo de *N. lactamica* em biorreator em MC + 1 g/L YE



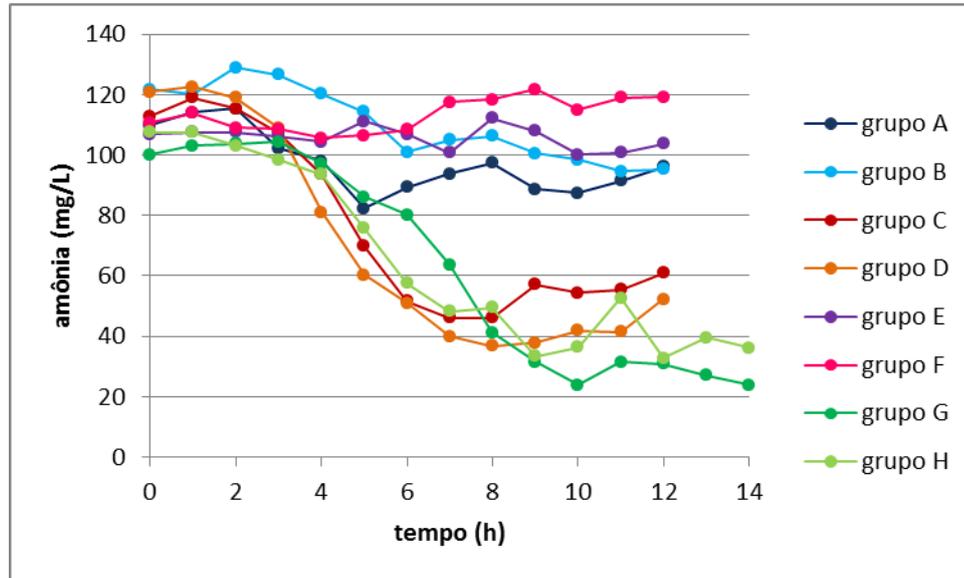
FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Como esperado, este componente não foi consumido durante o cultivo de *N. lactamica*. Por esta razão foram apresentados apenas os valores do ensaio 4 do grupo B, para exemplificar. Santos (2007) verificou que o glicerol também não era consumido por *N. meningitidis*, mas sugeriu que este componente poderia ter importância na preservação e integridade das OMV, atuando como um protetor, justificando sua presença na composição do MC.

3.5 Amônia

A Figura 21 apresenta a cinética da concentração de amônia obtida dos ensaios em biorreator. Foram calculadas as médias, quando havia duplicatas dos ensaios. Não foi possível analisar as amostras do ensaio 9, grupo E. Os valores da concentração de amônia (mg/L) de cada ensaio estão no APÊNDICE D.

Figura 21 – Valores dosados de amônia dos cultivos realizados em biorreator



FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Na Figura 21, é possível observar que nos grupos A, B, E e F a concentração de amônia é praticamente constante durante o cultivo, variando entre 95 e 120 mg/L. Nos grupos C, D, G e H a concentração de amônia decai de aproximadamente 100 mg/L para 20-60 mg/L. Em cultivo de *N. meningitidis*, Santos (2007) demonstrou que a concentração de amônia aumentava, diferentemente destes resultados obtidos para *N. lactamica*.

O meio de cultura dos grupos C e D não continha os aminoácidos constitutivos do MC, e os grupos G e H, apesar de conterem estes aminoácidos, foram os grupos que receberam alimentação de lactato, e houve maior crescimento bacteriano. Uma hipótese é de que a amônia do meio foi utilizada pela bactéria para formar glutamina, glutamato e/ou glicina. De acordo com o genoma de *N. lactamica* isolado 020-06 depositado no KEGG (2012), sabe-se que *N. lactamica* é capaz de transformar a amônia em: glutamina, pela enzima glutamina sintase; glutamato, pela enzima glutamato desidrogenase; e em glicina, pela enzima aminometiltransferase. Estes aminoácidos podem ter sido necessário para os grupos C e D, que não continham os aminoácidos do MC e continham o extrato de levedura.

Uma explicação para o consumo de amônia dos grupos G e H seria que, como nestes grupos havia muita formação de biomassa e formação de OMV, a glutamina, o glutamato e/ou a glicina podem ter sido requeridos, e mesmo os pulsos

de aminoácidos e extrato de levedura, do grupo H, não foram suficientes para suprir a demanda destes aminoácidos pela bactéria.

3.6 Discussão geral dos resultados obtidos em biorreator

Recentemente, muitos trabalhos têm priorizado a utilização de técnicas de biologia molecular no desenvolvimento de vacinas. O genoma de muitas espécies de micro-organismos de interesse para a produção de vacinas está disponibilizado na internet. Porém, outras abordagens em pesquisa também são importantes para gerar conhecimento sobre cada um destes micro-organismos. Não se conhece, por exemplo, muitos detalhes sobre a biologia de *N. lactamica*, que embora tenha seu genoma sequenciado, estudos básicos ainda são escassos, como estudos de requerimentos nutricionais e cinética do cultivo.

Trabalhos envolvendo cultivo são essenciais, um exemplo é a vacina contra o sorogrupo B da Novartis que está sendo desenvolvida (SANTOLAYA et al., 2012; SNAPE et al., 2010). Esta vacina em fase de testes é composta por três proteínas de *N. meningitidis* obtidas por recombinação genética, porém, OMV precisam ser adicionadas a esta vacina para a obtenção de uma resposta eficaz. Ou seja, ainda é necessária a realização do cultivo de *N. meningitidis* para obtenção das OMV, mesmo com tais proteínas selecionadas por vacinologia reversa.

Nas seções 3.2.2 a 3.2.9 foram apresentados e discutidos os resultados dentro de cada grupo. Nesta seção serão discutidos os resultados dos diferentes grupos entre si.

Neste trabalho, na maioria dos ensaios de crescimento de *N. lactamica* em biorreator, o lactato foi completamente consumido na 6ª hora, quando não houve alimentação.

Em geral, nas primeiras horas de cultivo, ocorre uma ligeira diminuição do pH antes de ocorrer o aumento (APÊNDICE C). A variação do pH foi relativamente pequena, pois o pH do meio foi acertado inicialmente para 7,0, e no final dos cultivos havia aumentado para, no máximo, 8,65 quando são levados em consideração todos os cultivos em biorreator. Santos (2007) atribuiu este aumento de pH ao acúmulo de amônia no meio, no entanto, em *N. lactamica* a amônia permanece constante ou diminui dependendo das condições de cultivo (APÊNDICE D). Provavelmente tal aumento de pH está relacionado com o consumo de lactato, pois nos ensaios de

batelada alimentada, grupos G e H, onde o lactato era adicionado ao meio, a variação de pH foi pequena (Tabelas 23 e 24).

Foi estabelecida a agitação livre, com valores entre 250 rpm e 850 rpm, para manter o oxigênio dissolvido (O_2D), em 10% ou 30%. Nos ensaios de batelada alimentada, a agitação não chegou rapidamente no máximo valor de 850 rpm e o oxigênio dissolvido não ficou baixo tão rapidamente pois foi adicionado antiespumante ao cultivo e a troca gasosa não foi tão dificultada pela formação de espuma, o que aconteceu muitas vezes nos experimentos de bateladas simples, em que o antiespumante não foi adicionado.

Não houve diferença no crescimento bacteriano e produção de OMV quando a porcentagem de oxigênio foi alterada de 10% para 30%, principalmente quando se compara os grupos A e B e grupos C e D. Os experimentos passaram a ser realizados com 30% de oxigênio dissolvido para evitar que este componente fosse limitante nos ensaios seguintes.

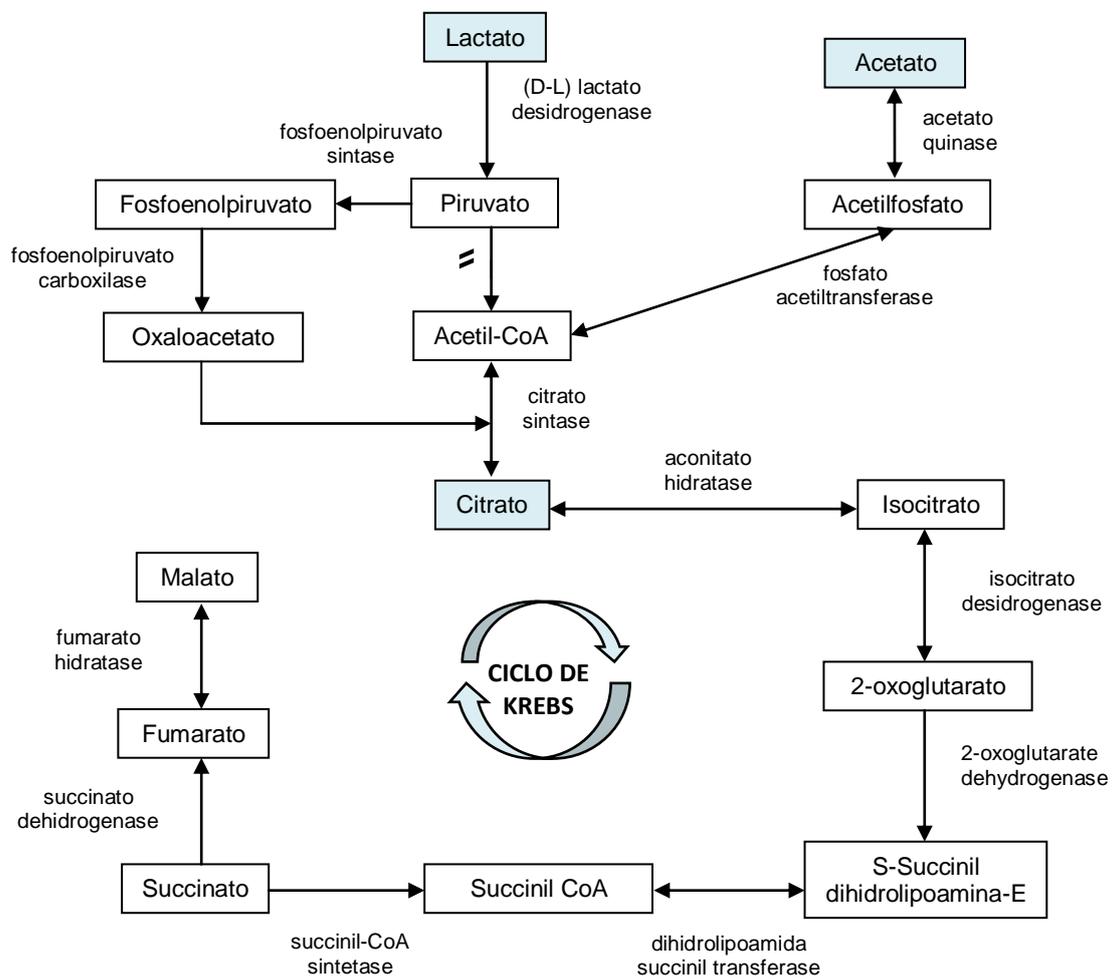
Foi observado que *N. lactamica* consome o lactato e libera citrato e acetato no meio. Quando a concentração de lactato é praticamente zero se inicia o consumo de citrato e acetato. Neste momento, há um ponto de inflexão na curva da biomassa sugerindo uma alteração da velocidade de crescimento decorrente de uma mudança de via metabólica.

Em vários ensaios, o esgotamento do lactato coincidiu com valores de oxigênio dissolvido muito baixos, pois o crescimento bacteriano estava tão intenso que a velocidade de agitação era máxima e mesmo assim não conseguia atingir o valor de oxigênio do 'setpoint'. Tal fato dificultou muitas vezes para se saber se o decaimento da velocidade de crescimento era devido a diminuição do lactato ou do oxigênio. Então, o antiespumante foi adicionado aos grupos G e H. Mesmo assim, não foi possível manter, no grupo H, o oxigênio dissolvido nos 30%, pois ele caiu para 2,9% na 10^a hora de cultivo, Tabela 24, e se manteve baixo até o final do experimento. Ainda assim, o crescimento bacteriano não foi prejudicado neste momento, pois as bactérias não diminuíram a velocidade de crescimento, Figura 19, indicando que esta porcentagem de oxigênio dissolvido não deve ter sido o fator limitante do crescimento nos ensaios anteriores, mas sim, de fato, o lactato.

De acordo com o genoma de *N. lactamica* isolado 020-06 depositado no KEGG (2012), o citrato pode ser convertido em Acetil-CoA e vice-versa, e entra diretamente no ciclo de Krebs. O acetato, com alguns passos metabólicos a mais,

pode ser convertido em acetil-CoA, que também entra no ciclo de Krebs (KEGG, 2012), Figura 22. Em todos os ensaios realizados em biorreator, foi possível observar que o consumo de citrato tem início antes do consumo do acetato, já que o citrato entra diretamente no ciclo, Figura 22. Nos ensaios de batelada alimentada com lactato, grupos G e H, o acetato nem chega a ser consumido, apenas o citrato, Figuras 18 e 19.

Figura 22 – Ciclo de Krebs e outras reações



Destaque para o lactato, citrato e acetato, que foram analisados neste trabalho
 FONTE: (GONÇALVES, 2012)

N. lactamica, de acordo com o KEGG (2012), não apresenta a enzima malato desidrogenase, então não é capaz de converter o malato a oxaloacetato. Porém, a bactéria consegue obter o oxaloacetato por outra via - a partir do piruvato.

Comparando-se os ensaios do grupo B (Tabelas 14 e 15) e D (Tabelas 17 e 18) foi possível observar uma grande diferença entre ambos na produção de OMV. No grupo D, a concentração aproximada de OMV foi de 45 mg/L e no grupo B foi 85 mg/L, apesar do crescimento ter sido semelhante, na média de 1,15 e 1,34 g/L, respectivamente. A única diferença entre estes dois grupos foi a não adição dos aminoácidos constitutivos do MC, no grupo D. Estas análises indicam que os aminoácidos constitutivos do meio de Catlin são importantes principalmente para um melhor rendimento de OMV mesmo na presença de extrato de levedura. Porém, no ensaio C, Tabela 10, realizado em agitador rotativo, não foi observada a importância significativa ($P < 0,1$) dos aminoácidos nem na formação de biomassa, nem na produção de OMV. Tal fato indica que o cultivo, quando realizado em agitador rotativo, possui dinâmica diferente quando comparado aos ensaios realizados em biorreator, possivelmente porque no biorreator, o suprimento de oxigênio é maior.

Para verificar quais componentes do extrato de levedura são necessários para o crescimento de *N. lactamica*, foram realizados os ensaios 8 e 9, do grupo E (Tabelas 19 e 20). Neste grupo, o meio de cultura utilizado foi o MC com o dobro da concentração de lactato e de seus cinco aminoácidos constitutivos. Porém, não foi acrescentado o extrato de levedura, mas apenas seus aminoácidos, na quantidade em que estariam em 2 g/L desta substância complexa, ver APÊNDICE A. A média da concentração celular máxima foi de 1,21 g/L e a máxima concentração de OMV obtida foi de aproximadamente 62 mg/L. Estes valores foram muito baixos se comparados aos do grupo F (Tabelas 21 e 22), que teve o extrato de levedura adicionado ao meio. O cultivo permaneceu na fase estacionária até o final, possivelmente, porque as bactérias ainda não tinham liberado, no meio de cultura, metabólitos tóxicos e o pH não variou tanto. Portanto, apenas os aminoácidos do extrato de levedura não são os componentes essenciais para o crescimento de *N. lactamica*.

As melhores condições de rendimento de OMV, dentre as bateladas simples, foram as do grupo F (Tabelas 21 e 22), onde foi adicionado 2 g/L de extrato de levedura ao meio, e as concentrações de lactato e dos cinco aminoácidos constitutivos do MC foram dobradas, a 15,0 g/L e 2,9 g/L, respectivamente. A biomassa máxima foi em média de 2,64 g/L e cerca de 6,0 de DO_{540} , na 8^a-10^a hora. O rendimento de OMV chegou a aproximadamente 175 mg/L, na 11^a hora de cultivo.

O maior valor de rendimento de OMV obtido neste trabalho foi no grupo H, chegando a 401 mg/L, que foi o grupo com o mesmo meio de cultura do grupo F porém com alimentação de lactato e com pulsos de aminoácidos e extrato de levedura. Este foi o maior rendimento de OMV obtido, porém, houve uma queda na concentração de OMV no meio de cultura após este momento, Figura 19. Este decréscimo não foi observado nos ensaios anteriores, pois os valores de OMV geralmente ficaram constantes até o final dos cultivos. Esta queda pode significar que as vesículas de membrana externa foram lisadas ou então possam ter sido consumidas pela bactéria.

O meio de cultura no qual foram obtidos melhores resultados de biomassa e de rendimento de OMV, apesar de não ser um meio definido, devido ao acréscimo de extrato de levedura ultrafiltrado, é um meio adequado para produção de vacinas, pois não contém componentes de origem animal.

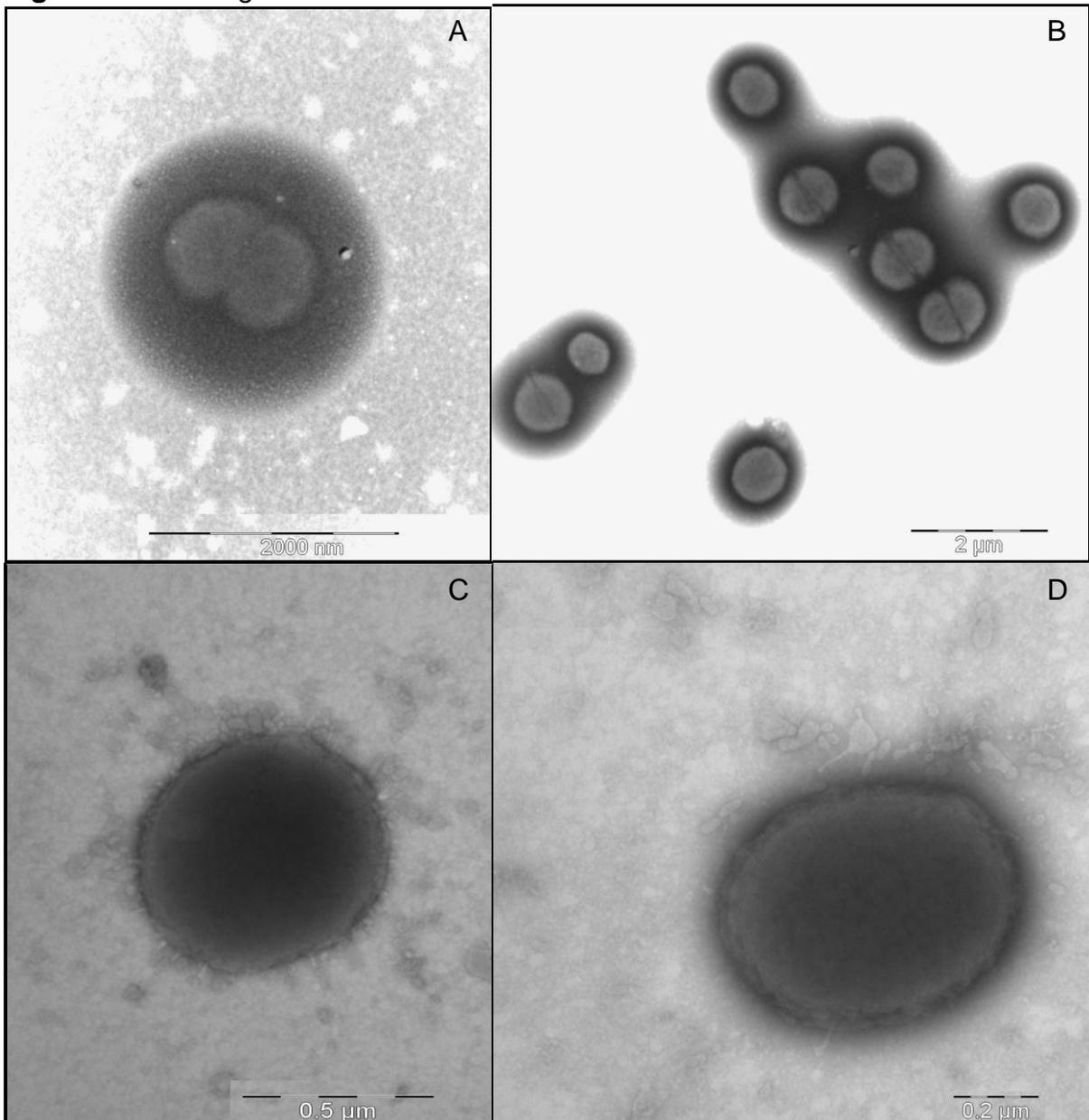
3.7 Microscopia eletrônica das amostras de biorreator

São raras na literatura, imagens de *Neisseria lactamica*. Na Figura 23, estão apresentadas micrografias eletrônicas de *N. lactamica*. Estas imagens foram obtidas em colaboração com a Dra Sylvia Mendes Carneiro do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

O meio de cultivo utilizado para o crescimento bacteriano foi o mesmo do grupo F, que foi o MC com as concentrações de lactato e de aminoácidos constitutivos do meio de cultura dobradas e com 2 g/L de YE. *N. lactamica* estava na forma de cocos e de diplococos (Figura 23).

As Figuras 23A e 23B, foram de amostras coletadas na 2ª hora de cultivo em biorreator e mostram bactérias em divisão celular, e as Figuras 23C e 23D foram obtidas a partir de amostras coletadas na 9ª hora de cultivo e com grande quantidade de OMV em seu redor.

Figura 23 – Micrografias eletrônicas de *N. lactamica*



Bactéria em forma de diplococos (A; B). É possível observar a liberação de OMV pela bactéria (C; D)
 FONTE: (GONÇALVES, 2012) em colaboração com (CARNEIRO; SALUSTIANO; SCHENKMAN, 2012)³

Na Figura 23A a bactéria parece estar envolta por material elétron denso, porém, é conhecido que *N. lactamica* não possui cápsula. Possivelmente, o tratamento da amostra que causou este efeito.

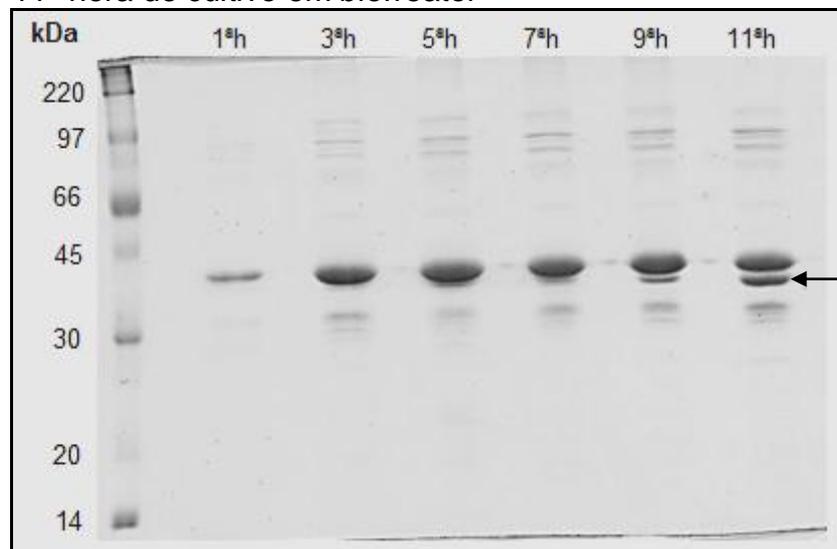
Nas Figuras 23C e 23D, é possível observar a bactéria liberando as vesículas de membrana externa, com toda sua diversidade de formas: em forma esférica, formas tubulares, forma de “raquete”.

³ Imagens produzidas em colaboração com (CARNEIRO; SALUSTIANO; SCHENKMAN, 2012).
 Dados não publicados.

3.8 Perfil eletroforético das OMV do ensaio realizado em biorreator

Quando se compara o padrão de proteínas obtido por eletroforese nos diferentes grupos observa-se que são semelhantes, ver APÊNDICE E. A Figura 24 mostra o perfil proteico de OMV obtidas a partir do grupo F, ensaio 11 (Tabela 22 e Figura 17), em que o meio de cultura foi o MC com o dobro de lactato e aminoácidos constitutivos do MC e com 2 g/L de YE.

Figura 24 – SDS-PAGE 12,5% das amostras de OMV obtidas na 1^a, 3^a, 5^a, 7^a, 9^a e 11^a hora de cultivo em biorreator



Seta indica proteína que aumenta de concentração durante o cultivo
 FONTE: (GONÇALVES, 2012)

Neste ensaio, o pico de liberação de OMV foi na 11^a hora, com 177 mg/L (Tabela 22). Observa-se que a banda com aproximadamente 35 kDa torna-se mais intensa ao final do cultivo (Figura 24 seta). Se for levada em consideração a massa molecular, a banda apontada pela seta parece ser a proteína de redução modificável, Rmp, pois Abel et al. (2007) verificaram que a Rmp tem massa molecular entre 32-34 kDa em *N. lactamica*. A banda acima desta proteína, parece ser a PorB (37-42 kDa), visto que *N. lactamica* não possui a PorA (TRONCOSO et al., 2002). Uma outra hipótese é de que a proteína observada, de forma mais evidente no final do cultivo, de aproximadamente 35 kDa pode ser produto da degradação da porina B, PorB, banda mais intensa em torno de 38 kDa, ou então se trata de proteína formada durante o cultivo.

O gel mostrado na Figura 24 é semelhante ao apresentado no trabalho de Mukhopadhyay et al. (2005) e Finney et al. (2008). Não foram encontrados, na literatura, trabalhos de cinética de rendimento de OMV de *N. lactamica* que permitam a comparação do padrão proteico com estas duas bandas tão intensas como as observadas.

4 CONCLUSÕES

Em agitador rotativo, a adição de vitaminas do complexo B e de aminoácidos ao meio de Catlin não foram suficientes para promover crescimento significativo de *Neisseria lactamica*. O extrato de levedura e o lactato tiveram influência positiva no aumento de biomassa e no rendimento de OMV.

Nas bateladas simples, no meio padrão (MC com 1 g/L de extrato de levedura) e no meio padrão sem aminoácidos, o oxigênio dissolvido em 10% ou 30% da saturação em ar não teve influência direta nem sobre a biomassa bacteriana nem sobre o rendimento de OMV.

O extrato de levedura apresentou papel importante na biomassa que foi de 2,64 g/L no grupo F, o dobro da biomassa do grupo E, 1,21 g/L, onde o extrato de levedura foi substituído por aminoácidos da sua composição.

Os cinco aminoácidos constitutivos do meio de Catlin foram fundamentais para um melhor rendimento de OMV, 85 mg/L nos grupos A e B comparado a 50 mg/L nos grupos C e D, que foram os grupos sem adição destes aminoácidos. A melhor condição dentre as bateladas simples, foi no grupo F, onde foram dobradas as concentrações do lactato, dos aminoácidos constitutivos do meio de Catlin e do extrato de levedura. A biomassa máxima foi de 2,60 g/L e o rendimento de OMV foi de 175 g/L.

O lactato foi importante para biomassa e rendimento de OMV, pois na batelada alimentada com lactato, grupo G, a biomassa foi de 3,24 g/L, e o rendimento de OMV foi de 298 mg/L. Quando, além da alimentação com lactato, foram dados os pulsos de aminoácidos constitutivos do MC e de extrato de levedura, grupo H, a biomassa chegou a 4,39 g/L e o rendimento de OMV a 401 mg/L.

O citrato e o acetato são produtos do metabolismo de *N. lactamica*, sendo que o citrato é sempre consumido antes do acetato. Há consumo mesmo quando ainda há lactato no meio, como visto nos grupos G e H.

A concentração de amônia permaneceu constante nos grupos A, B, E e F; e diminuiu nos grupos C, D, G e H.

Neste trabalho, os melhores resultados obtidos foram da batelada alimentada com lactato, e com pulsos de aminoácidos e de extrato de levedura, o grupo H. A biomassa foi de 4,39 g/L, o rendimento de OMV foi de 401 mg/L, a produtividade

em biomassa foi de 0,33 g/L.h, a produtividade de OMV foi de 36,12 mg/L.h, o fator de conversão OMV/lactato foi de 20,19 mg/g, o fator de conversão biomassa/lactato foi de 0,15 g/g, o fator de conversão OMV/biomassa foi de 92,25 mg/g e a velocidade específica máxima de geração em biomassa foi de 0,66 h⁻¹.

A análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão propiciou imagens inéditas e raras de *N. lactamica* em forma de cocos e diplococos, e imagens de OMV em sua diversidade de formas.

A qualidade do padrão proteico das OMV visualizada pela eletroforese foi semelhante entre os diferentes grupos de ensaios realizados em biorreator.

REFERÊNCIAS⁴

- ABEL, A.; SÁNCHEZ, S.; ARENAS, J.; CRIADO, M. T.; FERREIRÓS, C. M. Bioinformatics analysis of outer membrane proteome of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*. **International Microbiology**, v. 10, p. 5-11, 2007.
- BARUQUE-RAMOS, J. **Estudo comparativo entre processos descontínuo e descontínuo alimentado na produção de polissacarídeo de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C**. 2000. 274 f. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- BARUQUE-RAMOS, J.; HISS, H.; CONVERTI, A.; GONÇALVES, V. M.; RAW, I. Accumulation of organic acids in cultivations of *Neisseria meningitidis* C. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 869-877, 2006.
- BJUNE, G.; HOIBY, E. A.; GRONNESBY, J. K.; ARNESEN, O.; FREDRIKSEN, J. H.; HALSTENSEN, A.; HOLTEN, E.; LINDBAK, A. K.; NOKLEBY, H.; ROSENQVIST, E.; SOLBERG, L. K.; CLOSS, O.; ENG, J.; FROHOLM, L. O.; LYSTAD, A.; BAKKETEIG, L. S.; AREIDE, B. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. **Lancet**, v. 338, p. 1093–1096, 1991.
- BOSLEGO, J.; GARCIA, J.; CRUZ, C.; ZOLLINGER, W.; BRANDT, B.; RUIZ, S.; MARTINEZ, M.; ARTHUR, J.; UNDERWOOD, P.; SILVA, W.; MORAN, E.; HANKINS, W.; GILLY, J.; MAYS, J. Efficacy, safety, and immunogenicity of a meningococcal group B (15:p1.3) outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. **Vaccine**, v. 13, p. 821–829, 1995.
- CATLIN, W. Nutritional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and *Neisseria lactamica* in chemically defined media and the use of growth requirement for gonococcal typing. **Journal of Infectious Diseases**, v. 128, n. 2, p. 178-194, 1973.
- CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - CVE. Doença meningocócica: casos e porcentagem por sorogrupo. Estado de São Paulo. Boletim Epidemiológico Paulista. Disponível em: <www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em: 18 jun. 2012.
- COEN, P. G.; CARTWRIGHT, K.; STUART, J. Mathematical modeling of infection and disease due to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*. **International Journal of Epidemiology**, v. 29, p. 180-188, 2000.
- CORRÊA, A.P. **Estudo da formulação da vacina anti-meningocócica polissacarídeo C, conjugada a vesícula de membrana externa B de *Neisseria meningitidis***. 2002. 47 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- DAVIDSEN, T.; TONJUM, T. Meningococcal genome dynamics. **Nature Reviews microbiology**, v. 4, p. 11-22, 2006.

⁴ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DE MORAES, J. C.; CAMARGO, M. C.; HIDALGO, N. T. R.; BARBOSA, H. A.; GATTAS, V. C.; VASCONCELOS, H. G.; SACCHI, C. T.; LAND GRAL, I. M.; PERKINS, B. A.; WENGER, J. D.; PLIKAYTIS, B. D.; BROOME, C. V. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in São Paulo, Brazil. **Lancet**, v. 340, p. 1074–1078, 1992.

DEVOE, I. W.; GILCHRIST, J. E. Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 138, p. 1156-1167, 1973.

ERWIN, A. L.; GOTTSCHLICH, E. M. Oxidation of D-lactate and L-lactate by *Neisseria meningitidis*: Purification and cloning of meningococcal D-lactate dehydrogenase. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 20, p. 6382-6391, 1993.

FINNE, J.; BITTER-SUERMAN, D.; GORIDIS, C.; FINNE, U. An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. **Journal of Immunology**, v. 138, n. 12, p. 4402-4407, 1987.

FINNEY, M.; VAUGHAN, T.; TAYLOR, S.; HUDSON, M. J.; PRATT, C.; WHEELER, J. X.; VIPOND, C.; FEAVERS, I.; JONES, C.; FINDLOW, J.; BORROW, R.; GORRINGE, A. Characterization of the key antigenic components and pre-clinical immune responses to a meningococcal disease vaccine based on *Neisseria lactamica* outer membrane vesicles. **Human Vaccines**, v. 4, n. 1, p. 23-30, 2008.

FRASCH, C. E. Meningococcal vaccine: past, present and future. In: CARTWRIGHT, K. **Meningococcal disease**, Chichester, UK: Wiley, 1995, p. 245-283.

FRASCH, C. E.; VAN ALPHEN, L. V.; HOLST, J.; POOLMAN, J. T.; ROSENQVIST, E. Outer membrane protein vesicle vaccines for meningococcal disease. In: POLLARD, A. J.; MAIDEN, M. C. J. **Methods in Molecular Medicine**, Totowa: Humana Press, 2001, v. 66, p. 81-107.

FUKASAWA, L. O. **Obtenção e avaliação imunológica de vacina conjugada antimeningocócica sorogrupos B e C**. 2002. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, 2002. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

FUKASAWA, L. O.; GORLA, M. C. O.; LEMOS, A. P. S.; SCHENKMAN, R. P. F.; BRANDILEONE, M. C. C.; FOX, J. W.; RAW, I.; FRASCH, C. E.; TANIZAKI, M. M. Immune response to native NadA from *Neisseria meningitidis* and its expression in clinical isolates in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 121-125, 2003.

FUKASAWA, L.O. **Desenvolvimento de uma vacina conjugada meningocócica sorogrupos B/C**. 2004. 152 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

FUKASAWA, L. O.; SCHENKMAN, R. P. F.; PERCIANI, C. T.; CARNEIRO, S. M.; DIAS, W. O.; TANIZAKI, M. M. Optimization of the conjugation method for a serogroup B/C meningococcal vaccine. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 45, p. 141-146, 2006.

GIULIANI, M. M.; ADU-BOBIE, J.; COMANDUCCI, M.; ARICÒ, B.; SAVINO, S.; SANTINI, S.; BRUNELLI, B.; BAMBINI, S.; BIOLCHI, A.; CAPECCHI, B.; CARTOCCI, E.; CIUCCHI, L.; MARCELLO, F.; FERLICCA, F.; GALLI, B.; LUZZI, E.; MASIGNANI, V.; SERRUTO, D.; VEGGI, D.; CONTORNI, M.; MORANDI, M.; BARTALESI, A.; CINOTTI, V.; MANNUCCI, D.; TITTA, F.; OVIDI, E.; WELSCH, J. A.; GRANOFF, D.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 29, p. 10834-10839, 2006.

GOLD, R.; GOLDSCHNEIDER, I.; LEPOW, M. L.; DRAPER, T. F.; RANDOLPH, M. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. **Journal of Infectious Diseases**, v. 137, p. 112-121, 1978.

GONÇALVES, B. I. **Estudo do crescimento de *Neisseria lactamica***. 2008. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2008.

GORRINGE, A.; HALLIWELL, D.; MATHESON, M.; REDDIN, K.; FINNEY, M.; HUDSON, M. The development of a meningococcal vaccine based on *Neisseria lactamica* outer membrane vesicles. **Vaccine**, v. 23, p. 2210-2213, 2005.

HARRISON, L. H.; TROTTER, C. L.; RAMSAY, M. E. Global epidemiology of meningococcal disease. **Vaccine**, v. 27S, p. B51-B63, 2009.

HOLLIS, D. G.; WIGGINS, G. L.; WEAVER, R. E. *Neisseria lactamica* sp. N, a lactose-fermenting species resembling *Neisseria meningitidis*. **Applied Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 71-77, 1969.

JOHNSTON, K. H.; GOTSCHLICH, E. C. Isolation and characterization of the outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Bacteriology**, v. 119, n. 1, p. 250-257, 1974.

KELLY, C.; ARNOLD, R.; GALLOWAY, Y.; O'HALLAHAN, J. A prospective study of the effectiveness of the New Zealand meningococcal B vaccine. **American Journal of Epidemiology**, v. 166, p. 817-823, 2007.

KIM, J. J.; MANDRELL, R. E.; GRIFFISS, J. M. *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis* share lipooligosaccharide epitopes but lack common capsular and class1, 2 and 3 protein epitopes. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 2, p. 602-608, 1989.

KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES – KEGG. Disponível em: <<http://www.genome.jp/keg>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

LANCELOTTI, M.; GUIYOULE, A.; RUCKLY, C.; HONG, E.; ALONSO, J. M.; TAHA, M. K. Capsule virulence of C to B capsule switched *Neisseria meningitidis* clinica isolates belonging to ET-37/ST-11 clonal complex. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 191-196, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAIDEN, M. C. J.; CAUGANT, D. A. The population biology of *Neisseria meningitidis*: implications for meningococcal disease, epidemiology and control. In: FROSCHE, M.; MAIDEN, M. C. J. **Handbook of meningococcal disease**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2006. Cap 2, p. 17-32.

MUKHOPADHYAY, T. K.; HALLIWELL, D.; O'DWYER, C.; SHAMLOU, P. A.; LEVY, M. S.; ALLISON, N.; GORRINGE, A.; REDDIN, K. M. Rapid characterization of outer-membrane proteins in *Neisseria lactamica* by SELDI-TOF-MS (surface-enhanced laser desorption ionization-time-of-flight MS) for use in a meningococcal vaccine. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 41, p. 175-182, 2005.

MÜLLER, H.; HINTON, J. A. A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 48, p. 330, 1941.

PANATTO, D.; AMICIZIA, D.; LAI, P. L.; GASPARINI, R. *Neisseria meningitidis* B vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 10, n. 9, p. 1337-1351, 2011.

PAZ, M. F. **Influência da composição do meio de cultura sobre as produtividades em polissacarídeo da *Neisseria meningitidis* sorogrupo C cultivada em processo descontínuo submerso**. 1997. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

PAZ, M. F.; BARUQUE-RAMOS, J.; HISS, H.; VICENTIN, M. A.; LEAL, M. B. B.; RAW, I. Polysaccharide production in batch process of *Neisseria meningitidis* serogroup C comparing Franz, modified Franz and Catlin 6 cultivation media. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 27-32, 2003.

POLLARD, A. J.; FRASCH, C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v. 19, p. 1327-1346, 2001.

POOLMAN, J. T. Development of a meningococcal vaccine. **Infectious agents and disease**, v. 4, n. 1, p. 13-28, 1995.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. **Vaccine**, v. 19, p. 2688-2691, 2001.

SALUSTIANO, G. F. C. L. **Cinética de crescimento e produção de vesículas de membrana externa de *Neisseria lactamica* em agitador rotativo**. 2010. 46 f.

Trabalho de Conclusão de Curso – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2010.

SÁNCHEZ, S.; TRONCOSO, G.; CRIADO, M. T.; FERREIRÓS, C. In vitro induction of memory-driven responses against *Neisseria meningitidis* by priming with *Neisseria lactamica*. **Vaccine**, v. 20, p. 2957-2963, 2002.

SANTOLAYA, M. E.; O'RYAN, M. L.; VALENZUELA, M. T.; PRADO, V.; VERGARA, R.; MUÑOZ, A.; TONEATTO, D.; GRAÑA, G.; WANG, H.; CLEMENS, R.; DULL, P. M. Immunogenicity and tolerability of a multicomponent meningococcal serogroup B (4CMenB) vaccine in healthy adolescents in Chile: a phase 2b/3 randomised, observer-blind, placebo-controlled study. **Lancet**, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673611617133>>. Acesso em: 12 abr. 2012.

SANTOS, S.; BARUQUE-RAMOS, J.; TANIZAKI, M. M.; LEBRUN, I.; SCHENKMAN, R. P. F. Production of outer membrane vesicles (OMV) in batch cultivation of *Neisseria meningitidis* serogroup B. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 488-493, 2006.

SANTOS, S. **Cinética do cultivo em biorreator de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B**. 2007. 155 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SARDIÑAS, G.; REDDIN, K.; PAJON, R.; GORRINGE, A. Outer membrane vesicles of *Neisseria lactamica* as a potential mucosal adjuvant. **Vaccine**, v. 24, p. 206-214, 2006.

SCHNEIDER, M. C.; EXELY, R. M.; RAM, S.; SIM, R. B.; TANG, C. M. Interactions between *Neisseria meningitidis* and the complement system. **Trends in Microbiology**, v. 15, p. 233–240, 2007.

SIERRA, G. V.; CAMPA, H. C.; VARCACEL, N. M.; GARCIA, I. L.; IZQUIERDO, P. L.; SOTOLONGO, P. F.; CASANUEVA, G. V.; RICO, CO.; RODRIGUEZ, C. R.; TERRY, M. H. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. **NIPH Annals**, v. 14, p. 195–207, 1991.

SILVA, F. H.; MOURA, L. F.; BADINO, A. C. AnaBio 1.0: um programa para análise de biorreatores. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 14., 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2003.

SNAPE, M. D.; DAWSON, T.; OSTER, P.; EVANS, A.; JOHN, T. M.; OHENE-KENA, B.; FINDLOW, J.; YU, L. M.; BORROW, R.; YPMA, E.; TONEATTO, D.; POLLARD, A. J. Immunogenicity of two investigational serogroup B meningococcal vaccines in the first year of life: a randomized comparative trial. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 29, n. 11, p. e71-79, 2010.

STATISTICA (data analysis software system). Version 7. EUA: Statsoft Inc., 2004. Software.

TRONCOSO, G.; SÁNCHEZ, S.; CRIADO, M. T.; FERREIRÓS, C. Analysis of *Neisseria lactamica* antigens putatively implicated in acquisition of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, p. 9-15, 2002.

TUNES, C. F. **Imunização nasal em coelhos com *Neisseria lactamica*: importância dos antígenos de reatividade cruzada**. 2006. 140 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

TZENG, Y. L.; STEPHENS, D. S. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 687-700, 2000.

VAUGHAN, T. E.; SKIPP, P. J.; O'CONNOR, D.; HUDSON, M. J.; VIPOND, R.; ELMORE, M. J.; GORRINGE, A. R. Proteomic Analysis of *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle antigens. **Vaccine**, v. 24, p. 5277-5293, 2006.

ZOLLINGER, W. D.; MORAN, E. Meningococcal vaccines: present and future. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 37-43, 1991.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Composição dos Meios de Cultura (g/L)

Componentes	Fórmula	ágar Muller- Hinton	MCDA	MC N men	NEDA	RPMI 1640	Aács em 1 g de YE	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E	Grupo F
Acetato de sódio	NaC ₂ H ₃ O ₂ · 3H ₂ O	-	-	-	3,400	-	-	-	-	-	-	-	-
Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	-	-	-	0,042	2,000	-	-	-	-	-	-	-
Cloreto de amônio	NH ₄ Cl	-	0,401	0,401	0,218	-	-	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ · 2H ₂ O	-	0,037	0,037	0,037	-	-	0,037	0,037	0,037	0,037	0,037	0,037
Cloreto de magnésio	MgCl ₂ · 6H ₂ O	-	-	-	0,408	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloreto de potássio	KCl	-	0,186	0,186	-	0,400	-	0,186	0,186	0,186	0,186	0,186	0,186
Cloreto de sódio	NaCl	-	5,844	5,844	5,800	6,000	-	5,844	5,844	5,844	5,844	5,844	5,844
Citrato de sódio	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2H ₂ O	-	0,647	0,647	-	-	-	0,647	0,647	0,647	0,647	0,647	0,647
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	-	0,170	0,170	2,720	-	-	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170
Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	-	-	-	3,480	-	-	-	-	-	-	-	-
Fosfato de sódio	Na ₂ HPO ₄	-	1,065	1,065	-	0,800	-	1,065	1,065	1,065	1,065	1,065	1,065
Nitrato de cálcio	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	-	-	-	-	0,100	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato de ferro III	Fe(NO ₃) ₃ · 9 H ₂ O	-	-	-	0,0002	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato de ferro III	Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	0,004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ · 7H ₂ O	-	0,616	0,616	-	0,100	-	0,616	0,616	0,616	0,616	0,616	0,616
Sulfato de manganês	MnSO ₄ · 7H ₂ O	-	0,001	0,001	-	-	-	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Sulfato de potássio	K ₂ SO ₄	-	-	-	0,999	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido L-aspártico	C ₄ H ₇ NO ₄	-	-	-	0,500	0,020	0,017	-	-	-	-	0,017	-
Ácido L-glutâmico	C ₅ H ₉ NO ₄	-	1,176	1,180	1,298	0,020	0,068	1,180	1,180	-	-	2,496	2,360
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	-	0,150	0,150	0,025	0,010	0,013	0,150	0,150	-	-	0,313	0,300
L-alanina	C ₃ H ₇ NO ₂	-	-	-	0,100	-	0,048	-	-	-	-	0,048	-
L-arginina	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ · HCl	-	0,105	0,105	0,149	0,200	0,015	0,105	0,105	-	-	0,225	0,210
L-asparagina	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃ · H ₂ O	-	-	-	0,026	0,050	0,012	-	-	-	-	0,012	-
L-cisteína	C ₃ H ₇ NO ₂ S · HCl · H ₂ O	-	0,011	0,011	0,061	0,050	0,002	0,011	0,011	-	-	0,024	0,022

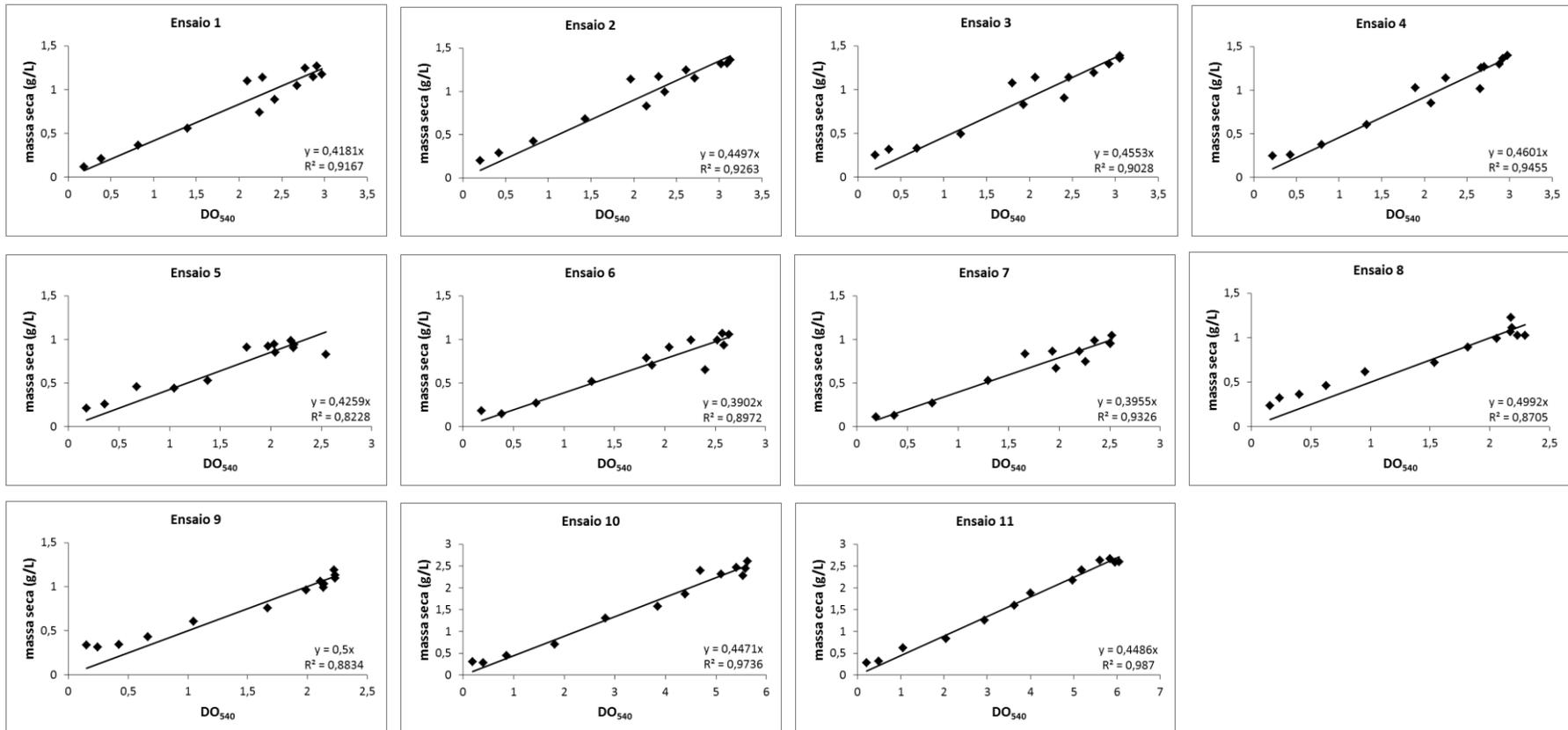
L-cistina	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂	-	-	-	0,036	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fenilalanina	C ₉ H ₁₁ NO ₂	-	-	-	0,025	0,015	0,021	-	-	-	-	0,021	-
L-glutamina	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	-	-	-	0,050	0,300	0,003	-	-	-	-	0,003	-
L-histidina	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂ . HCL.H ₂ O	-	-	-	0,016	0,015	-	-	-	-	-	-	-
	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	-	-	-	0,002	-	0,006	-	-	-	-	0,006	-
L-hidroxi prolina	C ₅ H ₉ NO ₃	-	-	-	-	0,020	-	-	-	-	-	-	-
L-isoleucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	-	-	-	0,030	0,050	0,018	-	-	-	-	0,018	-
L-leucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	-	-	-	0,090	0,050	0,028	-	-	-	-	0,028	-
L-lisina	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ . HCl	-	-	-	0,039	0,040	0,022	-	-	-	-	0,022	-
L-metionina	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	-	-	-	0,015	0,015	0,007	-	-	-	-	0,007	-
L-prolina	C ₅ H ₉ NO ₂	-	-	-	0,049	0,020	0,009	-	-	-	-	0,009	-
L-serina	C ₃ H ₇ NO ₃	-	0,021	0,021	0,050	0,030	0,016	0,021	0,021	-	-	0,058	0,042
L-tirosina	C ₉ H ₁₁ NO ₃	-	-	-	0,071	0,028	0,005	-	-	-	-	0,005	-
L-treonina	C ₄ H ₉ NO ₃	-	-	-	0,050	0,020	0,013	-	-	-	-	0,013	-
L-triptofano	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	-	-	-	0,080	0,005	0,005	-	-	-	-	0,005	-
L-valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	-	-	-	0,060	0,020	0,024	-	-	-	-	0,024	-
Ácido fólico (B9)	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	-	-	-	-	0,001	-	-	-	-	-	-	-
Ácido p-aminobenzóico (B10)	C ₇ H ₇ NO ₂	-	-	-	-	0,001	-	-	-	-	-	-	-
Biotina (B7)	C ₁₀ H ₁₆ O ₃ N ₂ S	-	-	-	0,001	0,0002	-	-	-	-	-	-	-
Cloreto de colina (B8)	C ₅ H ₁₄ NCIO	-	-	-	0,001	0,003	-	-	-	-	-	-	-
Cobalamina (B12)	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	-	-	-	-	0,000005	-	-	-	-	-	-	-
Nicotinamida (B3)	C ₆ H ₆ N ₂ O	-	-	-	0,002	0,001	-	-	-	-	-	-	-
Pantotenato de cálcio (B5)	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	-	-	-	0,002	0,0003	-	-	-	-	-	-	-
Piridoxina.HCL (B6)	C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl	-	-	-	-	0,001	-	-	-	-	-	-	-
Riboflavina (B2)	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	-	-	-	-	0,0002	-	-	-	-	-	-	-
Tiamina (B1)	C ₁₂ H ₁₇ CIN ₄ OS . HCl	-	-	-	0,002	0,001	-	-	-	-	-	-	-
Tiamina pirofosfato chloride	C ₁₂ H ₁₉ CIN ₄ O ₇ P ₂ S	-	-	-	0,0005	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	C ₆ H ₁₀ O ₅	1,500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	-	-	-	5,040	2,000	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	-	5,010	5,010	0,920	-	-	5,010	5,010	5,010	5,010	5,010	5,010

Lactato de sódio	$C_3H_5NaO_3$	-	7,510*	7,510	0,146	-	-	7,510	7,510	7,510	7,510	15,020	15,020
Inositol	$C_6H_{12}O_6$	-	-	-	-	0,035	-	-	-	-	-	-	-
Mio-inositol	$C_6H_{12}O_6$	-	-	-	0,0004	-	-	-	-	-	-	-	-
Ágar	$(C_{12}H_{18}O_9)_n$	17,000	10,000	-	10,000	-	-	-	-	-	-	-	-
Vermelho de fenol	$C_{19}H_{14}O_5S$	-	-	-	-	0,005	-	-	-	-	-	-	-
Etilenodiaminotetracetato (EDTA)	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$	-	-	-	0,003	-	-	-	-	-	-	-	-
Polyvinyl alcohol	$(C_2H_4O)_n$	-	-	-	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80, 0,5%	$C_{64}H_{124}O_{26}$ ou $C_{24}H_{44}O_6$	-	-	-	0,025	-	-	-	-	-	-	-	-
Uracila	$C_4H_4N_2O_2$	-	-	-	0,008	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido oxalacético	$C_4H_4O_5$	-	-	-	0,201	-	-	-	-	-	-	-	-
Glutaciona	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	-	-	-	-	0,001	-	-	-	-	-	-	-
Glutaciona (reduzida)	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	-	-	-	0,046	-	-	-	-	-	-	-	-
Spermina tetra-hidrochloride	$C_{10}H_{26}N_4 \cdot 4HCl$	-	-	-	0,087	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemina	$C_{34}H_{32}ClFeN_4O_4$	-	-	-	0,002	-	-	-	-	-	-	-	-
2,2' 2"-nitritotrietanol, 4%	$C_6H_{15}NO_3 N(CH_2CH_2OH)_3$	-	-	-	0,161	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácidos casamínicos	-	17,500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Infusão de Carne	-	300,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato de levedura UF	-	-	-	-	-	-	-	1,000	1,000	1,000	1,000	-	2,000
Soro equino	-	10,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Catlin (1973) utilizou 6,25 g/L do D-L lactato 60%

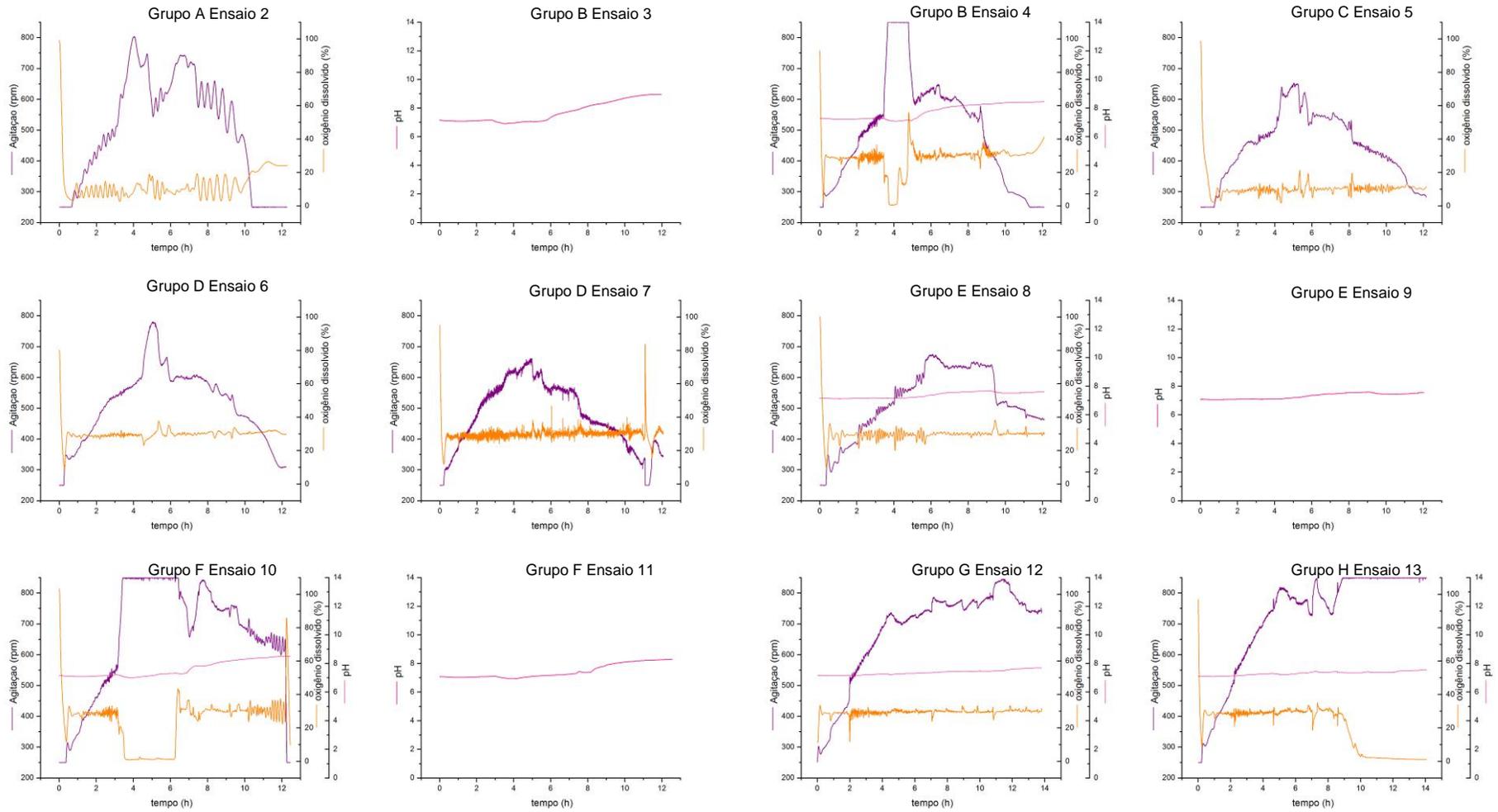
FONTE: (BD Bionutrients™ Technical Manual, 2006; CATLIN, 1973; GONÇALVES, 2012; Himedia Laboratories Manual, 2011; MULLER; HINTON, 1941; SANTOS, 2011)

APÊNDICE B – Curvas de DO₅₄₀ X Massa Seca (g/L)



FONTE: (GONÇALVES, 2012)

APÊNDICE C – Dados obtidos em tempo real dos cultivos em biorreator



FONTE: (GONÇALVES, 2012)

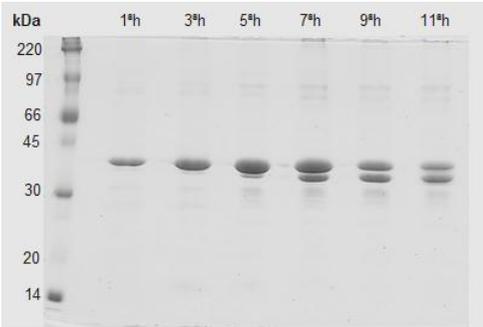
APÊNDICE D – Valores da concentração de amônia (mg/L)

ensaios tempo (h)	grupo A		grupo B		grupo C	grupo D		grupo E		grupo F		grupo G	grupo H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0	114	106	131	113	113	127	114	107	107	117	105	100	107
1	118	110	130	110	119	130	115	107	110	123	105	103	107
2	114	117	149	109	115	125	113	107	-	112	106	104	103
3	101	103	147	106	107	115	103	106	-	109	108	104	98
4	101	95	137	103	93	86	76	104	-	106	106	97	93
5	89	75	132	97	70	64	56	111	-	92	121	86	76
6	96	83	95	107	52	51	51	107	-	87	129	80	58
7	92	96	112	98	46	46	35	101	-	97	138	64	48
8	99	96	107	105	46	34	40	112	-	115	121	41	49
9	90	87	104	97	57	35	40	108	-	117	126	32	33
10	95	80	110	87	54	38	46	100	-	117	114	24	36
11	92	91	103	87	56	38	45	101	-	117	121	32	53
12	97	95	96	95	61	51	53	104	-	113	126	31	33
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27	39
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24	36

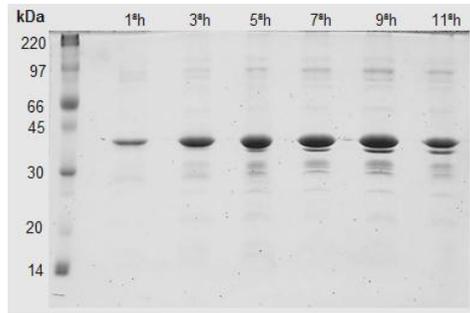
FONTE: (GONÇALVES, 2012)

APÊNDICE E – Géis de Eletroforese

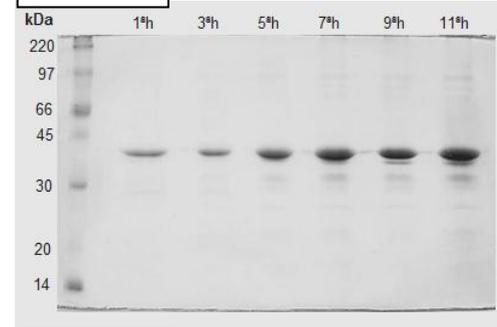
Grupo A



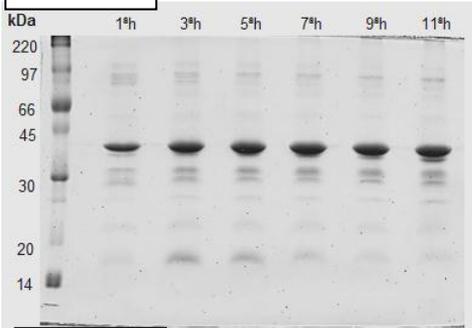
Grupo B



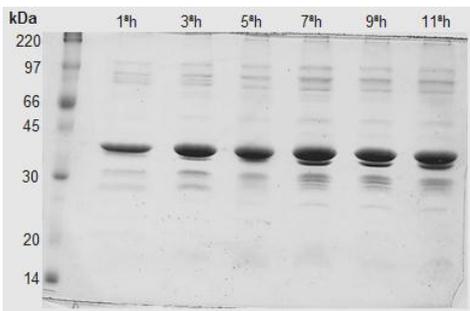
Grupo C



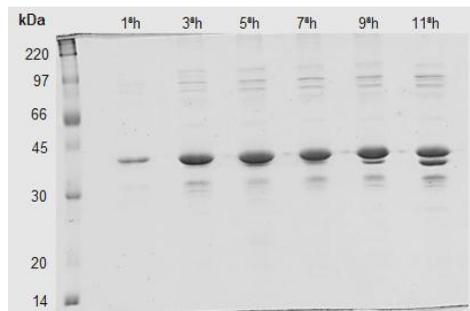
Grupo D



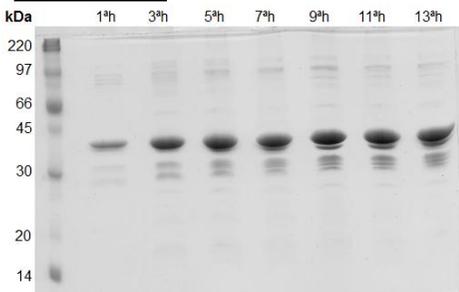
Grupo E



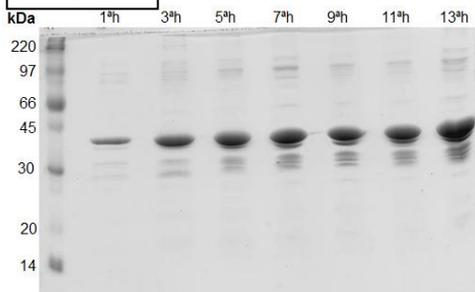
Grupo F



Grupo G



Grupo H



FONTE: (GONÇALVES, 2012)