

**BRUNO VITÓRIO MARTHOS**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA EM CULTIVOS DE  
*Streptococcus pneumoniae* SOROTIPO 1 PARA PRODUÇÃO DE  
POLISSACARÍDEO CAPSULAR**

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

São Paulo  
2012

**BRUNO VITÓRIO MARTHOS**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA EM CULTIVOS  
DE *Streptococcus pneumoniae* SOROTIPO 1 PARA PRODUÇÃO DE  
POLISSACARÍDEO CAPSULAR**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Viviane Maimoni Gonçalves

Versão original

São Paulo  
2012

## **AGRADECIMENTOS**

Dedico este trabalho a minha família, alicerce de tudo que sou. Em especial aos meus pais por não medirem esforços e investimentos em meus estudos e ao meu Tio Hamilton por ter me ensinado a tratar os livros como grandes amigos. Assim como eles, acredito que a educação é o maior bem que podemos deixar para o próximo.

Agradeço ao Laboratório de fermentação do Centro de biotecnologia do Instituto Butantan por proporcionar estrutura e excelentes profissionais sem os quais essas linhas jamais teriam sido escritas.

Fica aqui meu “muito obrigado” aos imprescindíveis técnicos de laboratório Sr. Lorival, Sr. Hélio, Sr. Máximo, Sra. Inês e Sra. Ana por estarem sempre disponíveis a ajudar.

Aos colegas de labuta Mateus, Anne, Bia, Daniel, Roger, Grazielle, Sílvia, Roberta, Érica, Patt, Claudia, Jú, Paulo, Maurício, Douglas, Verônica, Nathália, Taís, Paola, Juliano Buba e Felipe que em pequena ou grande parte ajudaram esse trabalho a tomar forma e se consolidar. Valeu pessoal!

Em especial, gostaria de agradecer as inigualáveis amizades, companhias e conselhos dos grandes amigos Mateus, Jú, Paulo, Douglas, Juliano Buba, Felipe e Anne. Cada um de vocês marcou de forma única esses anos de trabalho. Ah, e um grande “Obrigado” aos companheiros de angústias e mistérios pneumocócicos: Anne Letícia, Douglas e Verônica. Só a gente sabe o quanto o pneumo pode nos tirar do sério, não é?

Por último, agradeço este mestrado aos grandes pilares desta conquista: Dra. Mickie Takagi, Dra. Célia Liberman, Dra. Teresa Zangirolami, Dr. Joaquim Cabrera Crespo, Dra. Maria Elisabeth Sbrógio de Almeida e em especial a minha orientadora Dra. Viviane Maimoni Gonçalves.

À Dra Viviane, meus sinceros agradecimentos pela inabalável paciência e excelência profissional despendida durante esses anos. O exemplo de profissional dedicada, honesta, correta e persistente foi passado adiante. Muito obrigado, Vivi.

*Rir muito e com freqüência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu. Isso é ter tido sucesso.*

**(Ralph Waldo Emerson)**

## RESUMO

MARTHOS, B. V. **Influência de diferentes meios de cultura em cultivos de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1 para produção de polissacarídeo capsular.** 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A bactéria Gram-positiva *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) é um patógeno humano transmitido principalmente por aerossóis. Segundo a Organização Mundial de Saúde, anualmente, 1,6 milhões de crianças morrem devido aos diversos tipos de doenças pneumocócicas graves. Atualmente, as vacinas são a principal estratégia de combate ao patógeno e a cápsula polissacarídica (PS) é o antígeno por ser o principal fator de virulência. As diferentes composições do PS que envolve o pneumococo permitem classificá-lo em mais de 90 sorotipos. No Brasil, os sorotipos 1, 14 e 6B estão entre os prevalentes. Assim, o Instituto Butantan vem estudando uma nova vacina conjugada mirando justamente esses sorotipos. Portanto, os objetivos deste trabalho foram: *i*) estabelecer um método de dosagem do PS1; *ii*) selecionar a melhor cepa de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1 para a produção de PS1; *iii*) avaliar diferentes peptonas na composição do meio de cultura e investigar os efeitos de quatro componentes do meio através de um planejamento experimental fracionado; *iv*) propor um novo meio de cultura e/ou estratégia de cultivo com base nos resultados do planejamento. Após o cultivo em frascos de nove cepas em meio de cultura com hidrolisado de caseína (Casaminoácidos) 3%, as cepas ST 595/01 e ST 710/03 apresentaram maiores produção de PS1 e crescimento celular e foram selecionadas para avaliação em biorreator. A cepa ST 595/01 foi selecionada por apresentar produção de PS1 duas vezes superior a ST 710/03. Três peptonas foram testadas em cultivos em biorreator com a cepa selecionada: Casaminoácidos e dois hidrolisados de soja, Phytone e Soytone. O Phytone foi escolhido para integrar o meio de cultura por apresentar a maior produção de PS1, 298mg/L. Um planejamento fatorial fracionado ( $2^{4-1}$ ) envolvendo o extrato de levedura (EL), Phytone, L-asparagina (Asn) e L-glutamina (Gln) foi realizado em reatores de 5L. O Phytone apresentou efeito positivo e significativo ( $p < 0,10$ ) para produção máxima de biomassa, PS1, acetato e lactato. O EL apresentou efeito positivo e significativo para a produção de biomassa. O aminoácido Asn não apresentou efeitos significativos e poderia ser excluído da composição do meio, enquanto que Gln apresentou efeito apenas sobre a produção de PS1, porém este efeito foi menor do que o verificado para Phytone. Deste modo, um novo meio de cultura foi testado com base em Phytone (15 g/L), EL (2 g/L) e glicose (20 g/L) empregando duas estratégias: descontínuo e descontínuo alimentado. O cultivo alimentado levou à produção de biomassa quase duas vezes maior e 2,5 vezes maior de PS1 do que o descontínuo.

**Palavras-chave:** *Streptococcus pneumoniae*. Planejamento experimental. Polissacarídeo capsular sorotipo 1. Peptonas. Batelada alimentada.

## ABSTRACT

MARTHOS, B. V. **Influence of different culture media on *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 cultivations to produce capsular polysaccharide.** 2012. 111 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is a human pathogen largely transmitted by aerosols. Annually, 1.6 million children die worldwide due to severe invasive pneumococcal disease (WHO, 2010). Pneumococcal vaccines are the main strategy against this pathogen and the capsular polysaccharide (PS) is the major pneumococcal antigen and virulence factor. The pneumococcus can be classified in more than 90 different serotypes due to the high structural diversity of PS composition. Recently, serotypes 1, 14 and 6B have been reported to be prevalent in Brazil, and then Instituto Butantan has been studying a new conjugate vaccine targeting these serotypes. Thus, the objectives of this work were: *i*) establish a method to measure PS1 concentration; *ii*) screen *S. pneumoniae* serotype 1 strains to identify the best producer of PS1; *iii*) evaluate three different peptones for PS1 production and investigate the effects of four components of the culture medium by a design of experiment; *iv*) propose a new culture medium/strategy of cultivation based on the results. After cultivation of nine strains in 3% Casamino acids-based medium, strains ST 595/01 and ST 710/03 were chosen for further evaluation in bioreactor because both presented high values of PS1 and biomass. In bioreactor, ST 595/01 presented PS1 production two fold higher than ST 710/03 and was selected to the next experimental phase. Three peptones were tested in bioreactor culture using ST 595/01 strain: 3% Casamino acids, 3% Soytone and 3% Phytone. The highest PS1 production (298mg/L) was reached with Phytone, which was chosen to integrate the medium. Finally, a design of experiment ( $2^{4-1}$ ) was carried out to evaluate the effects of yeast extract (YE), Phytone, L-asparagin (Asn) and L-glutamin (Gln) on cultivation. Phytone presented positive effects ( $p < 0.10$ ) for maximum production of biomass, PS1, acetate and lactate. YE just demonstrated positive effects for biomass production. Gln exerted a minor positive effect on PS1 production. Asn did not evidence significant effects and could be removed from the medium. Hence, these results suggested a new culture medium based on Phytone (15 g/L), YE (2 g/L) and glucose (20 g/L) that was evaluated by two cultivation strategies: batch and fed-batch in reactor. The fed-batch culture showed biomass production almost two-fold higher and PS1 production 2.5-fold higher than batch culture.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*. Design of experiments. Capsular polysaccharides serotype 1. Peptones. Fed-batch.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Ilustração do envoltório e compartimentos celulares principais do pneumococo.....	19
<b>Figura 2</b> - Mecanismo de biossíntese do PS em <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	20
<b>Figura 3</b> - Fórmula estrutural da unidade repetitiva que compõe o PS1.....	24
<b>Figura 4</b> - Principais vias metabólicas do <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	27
<b>Figura 5</b> - Procedimento do método MHD com possível adição de sulfamato.....	33
<b>Figura 6</b> - Experimentos para a seleção de cepas de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 1.....	38
<b>Figura 7</b> - Ilustração do biorreator empregado neste trabalho .....	39
<b>Figura 8</b> - Efeito da adição de sulfamato no método MHD .....	46
<b>Figura 9</b> - Efeito dos diferentes tempos de hidrólise de no método MHDS .....	47
<b>Figura 10</b> - Reprodutibilidade do método MHDS para determinação da concentração de PS1 ....	48
<b>Figura 11</b> - Comparação entre o ELISA de captura e o método MHDS .....	49
<b>Figura 12</b> - Correlação entre os métodos MHDS e ELISA.....	50
<b>Figura 13</b> - Curva de calibração para conversão de DO em massa seca.....	51
<b>Figura 14</b> - Crescimento celular das cepas inoculadas com 10 µL do estoque .....	54
<b>Figura 15</b> - Crescimento celular das cepas inoculadas com 25 µL do estoque .....	55
<b>Figura 16</b> - Crescimento celular das cepas inoculadas com 50 µL do estoque .....	55
<b>Figura 17</b> - Crescimento celular das cepas inoculadas com 50 µL do estoque .....	56
<b>Figura 18</b> - Perfis cinéticos de cultivos de <i>S. pneumoniae</i> em biorreator de 5L .....	59
<b>Figura 19</b> - Cultivo de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 1 em diferentes meios de cultura.....	63
<b>Figura 20</b> - Crescimento celular de <i>S. pneumoniae</i> em meios com diferentes peptonas.....	64
<b>Quadro 1</b> - Coeficientes estequiométricos para o balanço de carbono. ....	69
<b>Figura 21</b> - Máxima concentração de biomassa em cultivos do planejamento experimental..	75
<b>Figura 22</b> - Máxima concentração de PS1 em cultivos do planejamento experimental..	75
<b>Figura 23</b> – Produção de PS1 em cultivos batelada simples e batelada alimentada .....	78
<b>Figura 24</b> – Produção de biomassa em cultivos batelada simples e batelada alimentada.....	79
<b>Figura 25</b> – Perfis cinéticos de batelada e batelada alimentada em biorreator de 5L.....	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição do meio líquido .....	35
<b>Tabela 2</b> - Composição da solução de sais .....	35
<b>Tabela 3</b> - Composição do meio THY.....	35
<b>Tabela 4</b> - Composição do meio ágar sangue .....	36
<b>Tabela 5</b> – Composição do meio de alimentação 4 vezes concentrado .....	36
<b>Tabela 6</b> - Composição dos meios de cultura do delineamento fatorial fracionado.....	41
<b>Tabela 7</b> - Cálculo dos parâmetros usados na análise dos resultados .....	45
<b>Tabela 8</b> - Comparação entre métodos de quantificação de PS1 em amostras de cultivos de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 1 .....	49
<b>Tabela 9</b> - Viabilidade celular dos estoques congelados das nove cepas de <i>S. pneumoniae</i> tipo 1 .....	52
<b>Tabela 10</b> - Efeito das três condições de inóculo inicial no crescimento celular em diferentes cepas de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 1 .....	53
<b>Tabela 11</b> - Crescimento celular, viabilidade do estoque e produção de PS1 das quatro cepas de desempenho superior.....	57
<b>Tabela 12</b> - Comparação entre o cultivo das cepas de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 1 para produção do PS capsular .....	58
<b>Tabela 13</b> - Média e desvio dos principais resultados dos cultivos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> sorotipo 1 com diferentes peptonas.....	61
<b>Tabela 14</b> - Máxima produção de PS1 entre os cultivos de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 1 com meios contendo diferentes peptonas .....	65
<b>Tabela 15</b> - Médias e desvios padrão dos fatores de conversão resultantes de cultivos com <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 1.....	66
<b>Tabela 16</b> - Produção de máxima alcançada de biomassa, acetato e lactato em cultivos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> sorotipo 1.....	67
<b>Tabela 17</b> - Concentração de carboidratos totais fornecidos pelos meios de cultura com diferentes peptonas.....	67
<b>Tabela 18</b> – Quantidades de hexose fornecidas pelo meio de cultura e quantidades calculadas pelo balanço estequiométrico .....	70



<b>Tabela 19</b> - Concentração de nitrogênio total fornecido pelos meios de cultura com diferentes peptonas.....	71
<b>Tabela 20</b> - Quantidades de nitrogênio fornecidas pelo meio de cultura e quantidades calculadas pelo balanço estequiométrico .....	72
<b>Tabela 21</b> - Análise de significância estatística dos efeitos das variáveis independentes.....	73
<b>Tabela 22</b> - Análise de significância estatística dos efeitos das variáveis independentes sobre os fatores de conversão globais.....	76
<b>Tabela 23</b> – Concentrações máximas de biomassa, acetato, lactato e PS1 alcançadas em diferentes estratégias de cultivo .....	80
<b>Tabela 24</b> – Contribuição em moles de hexoses que cada reagente fornece ao meio de cultura para cultivos de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 1 .....	82
<b>Tabela 25</b> – Produção máxima de biomassa, acetato e lactato em diferentes estratégias de cultivo de <i>S. pneumoniae</i> tipo 1 .....	83
<b>Tabela 26</b> – Comparação entre as quantidades de hexoses fornecidas pelo meio de cultura com as quantidades calculadas pelo balanço .....	83
<b>Tabela 27</b> – Contribuição em moles de nitrogênio que cada reagente fornece ao meio de cultura para cultivos de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 1 .....	84
<b>Tabela 28</b> – Comparação entre as quantidades de nitrogênio fornecidas pelo meio de cultura com as quantidades calculadas pelo balanço estequiométrico.....	85
<b>Tabela 29</b> – Comparação entre cultivos de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 1 .....	86
<b>Tabela 30</b> - Comparação entre o meio de cultura do início e posterior aos estudos relativos a este trabalho .....	87

## LISTA DE SÍMBOLOS

- $C_x$  – Concentração de biomassa (g/L)
- $C_S$  – Concentração de glicose residual (g/L)
- $C_{Si}$  – Concentração de glicose residual inicial (g/L)
- $C_{Sf}$  – Concentração de glicose residual final (g/L)
- $C_{lac}$  – Concentração de lactato (g/L)
- $C_{laci}$  – Concentração de lactato inicial (g/L)
- $C_{lacf}$  – Concentração de lactato final (g/L)
- $C_{PS1}$  – Concentração de PS1 (mg/L)
- $C_{PS1i}$  – Concentração de PS1 inicial (mg/L)
- $C_{PS1f}$  – Concentração de PS1 final (mg/L)
- $C_{ace}$  – Concentração de acetato (g/L)
- $C_{acei}$  – Concentração de acetato inicial (g/L)
- $C_{acef}$  – Concentração de acetato final (g/L)
- $Y_{x/s}$  – Fator de conversão de glicose a células (g de biomassa/ g de glicose)
- $Y_{PS1/s}$  – Fator de conversão de glicose a PS1 (mg de PS1 / g de glicose)
- $Y_{lac/s}$  – Fator de conversão de glicose a lactato (g de lactato / g de glicose)
- $Y_{ace/s}$  – Fator de conversão de glicose a acetato (g de acetato / g de glicose)
- FC – Fator de conversão de densidade ótica à biomassa (g/L. $DO^{-1}$ )
- $P_{PS1}$  – Produção específica de PS1 (mg de PS1 / g de biomassa)
- $T_{bat}$  – Tempo de duração do cultivo em batelada (h)
- F – Vazão de entrada no tanque (L/h)
- $V_0$  – Volume inicial do tanque (L)
- $T_{total}$  – Tempo total de cultivo (h)
- $C_{Se}$  – Concentração de substrato na entrada do tanque (g/L)
- $C_{Xe}$  – Concentração de células na entrada do tanque (g/L)
- $K_{dp}$  – Constante de degradação de produto
- $K_d$  – Constante de morte celular
- $C_{s1}$  – Valor da concentração de substrato a partir da qual inicia-se a morte celular (g/L)
- $C_{s2}$  - Valor da concentração de substrato a partir da qual inicia-se a formação de produto (g/L)

$\mu_{m\acute{a}x}$  - Velocidade de crescimento específico máxima

$\alpha$  – Parâmetro (coeficiente angular) para formação de produto associado ao crescimento celular

$\beta$  – Parâmetro (coeficiente linear) para formação de produto não associado ao crescimento celular

$K_s$  – Constante de saturação pertencente ao modelo de Monod

S – Concentração de substrato inicial

$\gamma$  – Coeficiente estequiométrico para hexoses

$\delta$  – Coeficiente estequiométrico para produção de lactato a partir de hexoses

$\varepsilon$  – Coeficiente estequiométrico para produção de acetato a partir de hexoses

$\omega$  – Coeficiente estequiométrico para produção de formiato a partir de hexoses

$\rho$  – Coeficiente estequiométrico para produção de  $\text{CO}_2$  a partir de hexoses

$\phi$  – Coeficiente estequiométrico para formação de biomassa

$R^C_{(F/B)}$  – Razão entre as hexoses fornecidas e as calculadas pelo balanço de carbono

$R^N_{(F/B)}$  – Razão entre o nitrogênio fornecido e o calculado pelo balanço de nitrogênio

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – *Analysis of variance*

ATCC – *American Type Culture Collection*

Asn – L-asparagina

ATP – Adenina trifosfato

BHI – *Brain and heart infusion*

CRM<sub>197</sub> – *Cross-reacting material 197*, mutante atóxico da toxina diftérica

DO – Densidade ótica

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EL – Extrato de levedura

FAPESP – Fundação de amparo à pesquisa do Estado de São Paulo

Gln – L-glutamina

HPLC – *High performance liquid chromatography* Cromatografia líquida de alta eficiência

MHD – meta-hidroxidifenil

MHDS – meta-hidroxidifenil com sulfamato

NAD<sup>+</sup> - Molécula de nicotinamida oxidada

OPD – ácido o-fenilenodiacético (da sigla em inglês)

PEP – Fosfoenolpiruvato (da sigla em inglês)

AAT-Gal -  $\alpha$ -2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxigalactose

PepS – Peptidase tipo S

Phy – Phytone

PS – Polissacarídeo capsular

PS1 – Polissacarídeo capsular sorotipo 1

PS3 – Polissacarídeo capsular sorotipo 3

PS14 – Polissacarídeo capsular sorotipo 14

PS23F – Polissacarídeo capsular sorotipo 23F

THY – meio de cultura Todd e Hewitt com adição de extrato de levedura

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 Doenças pneumocócicas.....	17
1.2 Pneumococo e cápsula polissacarídica.....	18
1.3 Histórico das vacinas pneumocócicas.....	21
1.4 Sorotipo 1.....	24
1.5 Cenário atual dos bioprocessos com <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	25
1.6 Fonte de carbono e energia.....	26
1.7 Fonte de nitrogênio.....	28
1.8 pH.....	29
1.9 Planejamento de experimentos.....	29
1.10 Motivação.....	30
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	31
2.1 Geral.....	31
2.2 Específicos.....	31
2.2.1 Estabelecimento do método de dosagem de PS1.....	31
2.2.2 Seleção de cepa.....	31
2.2.3 Escolha da peptona.....	31
2.2.4 Avaliação dos efeitos de quatro componentes do meio de cultura em três níveis através de um Delineamento Fatorial Fracionado ( $2^{4-1}$ ).....	31
2.2.5 Avaliação do novo meio de cultura.....	32
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
3.1 Estabelecimento do método de quantificação de PS1.....	33
3.1.1 Efeito da adição do sulfamato.....	33
3.1.2 Efeito do tempo de hidrólise.....	34
3.1.3 Teste de reprodutibilidade.....	34
3.1.4 Comparação do MHD com imunoensaio de ELISA.....	34
3.2 Meios de cultura.....	34
3.3 Seleção de cepas.....	36
3.3.1 Microrganismos .....	36
3.3.2 Preparo dos estoques congelados.....	37
3.3.3 Cultivos em frascos .....	37
3.3.4 Cultivos em biorreator.....	38

3. 4 Escolha da peptona.....	40
3. 4. 1 <i>Preparo do lote congelado da cepa selecionada</i> .....	40
3. 4. 2 <i>Cultivos e meios de cultura</i> .....	40
3. 5 Delineamento fatorial fracionado.....	40
3. 6 Cultivos adicionais para avaliação do novo meio.....	42
3. 7 Análises.....	42
3. 7. 1 <i>Determinação da viabilidade celular dos estoques congelados</i> .....	42
3. 7. 2 <i>Determinação do crescimento celular</i> .....	42
3. 7. 3 <i>Preparo da curva de calibração para conversão DO em massa seca</i> .....	43
3. 7. 4 <i>Determinação da concentração de PS1 no sobrenadante</i> .....	43
3. 7. 5 <i>Determinação da glicose residual e concentração de ácidos orgânicos</i> .....	44
3. 7. 6 <i>Controle de pureza</i> .....	44
3. 8 Determinação de parâmetros.....	44
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46
4.1 Estabelecimento do método de quantificação de PS1.....	46
4. 2 Conversão da densidade ótica em massa seca .....	51
4. 3 Seleção de cepas.....	52
4. 3. 1 Cultivos em frascos.....	52
4. 3. 2 <i>Cultivos em biorreator para seleção da melhor cepa produtora</i> .....	58
4. 4 Escolha da peptona.....	60
4. 4. 1 <i>Balanco de massa estequiométrico da escolha da peptona</i> .....	65
<u>4. 4. 1. 1 <i>Balanco de carbono para a produção de ácidos orgânicos</i></u> .....	67
<u>4. 4. 1. 2 <i>Balanco de nitrogênio para a produção de biomassa</i></u> .....	70
4. 5 Delineamento fatorial fracionado ( $2^{4-1}$ ).....	72
4. 5. 1 <i>Efeitos na produção de biomassa, PS1 e ácidos orgânicos</i> .....	73
4. 5. 2 <i>Efeitos nos fatores de conversão globais</i> .....	76
4. 6 Avaliação do novo meio de cultura.....	77
4. 6. 1 Cultivos descontínuos e descontínuos alimentados.....	77
4. 6. 2 <i>Balanco de massa estequiométrico</i> .....	82
<u>4. 6. 2. 1 <i>Balanco de carbono para a produção de ácidos orgânicos</i></u> .....	82
<u>4. 6. 2. 2 <i>Balanco de nitrogênio para produção de biomassa</i></u> .....	84
4.7 Comparação das condições de cultivos avaliadas.....	85
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	88
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	90
<b>APÊNDICE A – Relação entre medidas de PS1 (Curvas padrão)</b> .....	99

<b>APÊNDICE B</b> – Crescimento celular de cepas de <i>S. pneumoniae</i> tipo 1.....	100
<b>APÊNDICE C</b> - Cultivos do planejamento fatorial fracionado.....	102
<b>APÊNDICE D</b> – Composição dos reagentes.....	108
<b>APÊNDICE E</b> – Cultivos da avaliação do novo meio de cultura.....	109
<b>ANEXO A</b> - Simulação de cultivo em Anabio 1.2.....	110

## 1 INTRODUÇÃO

Em 1880 ocorreu o primeiro isolamento da bactéria *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) por Sternberg nos EUA e por Pasteur na França. A partir de então, surgiu uma estreita relação entre os estudos do pneumococo com o desenvolvimento de importantes fundamentos científicos nas áreas da bacteriologia, genética e terapias antimicrobianas (SIBER; KLUGMAN; MAKELA, 2008). Austrian (1999) também lista e relaciona o desenvolvimento de alguns dos marcos da biologia com o estudo do pneumococo, tais como: o advento da reação de Quellung, a coloração de Gram, a compreensão da capacidade da molécula de DNA transmitir a informação genética (AVERY; HORSFALL, 1943) e uma série de outros fundamentos da imunologia. O *Streptococcus pneumoniae* pode ser considerado um patógeno extraordinário graças à variada gama de doenças provocadas e o fato de ser o responsável pela maior quantidade de mortes relativas a um único patógeno (MCALISTER et al., 2011).

### 1.1 Doenças pneumocócicas

O pneumococo é uma bactéria patogênica exclusivamente humana, transmitida principalmente por aerossóis. Segundo os dados de novembro de 2010 da Organização Mundial de Saúde, os casos de pneumonia matam anualmente 1,6 milhões de crianças em todo o mundo – menores de cinco anos de idade em sua maioria (World Health Organization, 2010). A pneumonia pode ser definida como uma infecção respiratória aguda que afeta os pulmões, ela pode ser provocada por vírus, bactérias ou até fungos, mas seu principal agente causal é justamente o pneumococo. Além da pneumonia, o pneumococo também causa infecções como meningite, otite aguda do ouvido médio, sepse, sinusite e bacteremia. Globalmente, foram registrados 14,5 milhões de casos graves de doenças pneumocócicas em crianças entre 1-59 meses; o que resultou em 826.000 mortes no ano de 2000 no mundo (O'BRIEN et al., 2009). Os principais grupos de risco, onde a incidência de doenças



pneumocócicas é maior, são crianças menores de 2 anos e adultos maiores de 65 anos.

Dentro deste contexto, o declínio dos índices de meningites causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b devido à introdução de uma vacina efetiva colocou o pneumococo como o principal agente causal de meningite bacteriana em crianças (TOTAPALLY; WALSH, 1997). No Brasil, a incidência de meningite pneumocócica foi de 31,7/100.000 em crianças menores de 1 ano e 24,7/100.000 em crianças menores de 5 anos (KO et al., 2000; REIS et al., 2002). Tal como verificado para *H. influenzae* tipo b, a vacinação tem sido a maneira mais eficiente para prevenção da infecção pneumocócica.

## 1.2 Pneumococo e cápsula polissacarídica

*S. pneumoniae* é uma bactéria Gram-positiva, cuja morfologia pode se apresentar na forma de cocos, diplococos lanceolados ou cadeias (BRANDILEONE, 2003). Sua superfície consiste de três estruturas distintas: membrana plasmática, parede celular e cápsula polissacarídica, conforme ilustra a Figura 1.

A membrana plasmática apresenta estrutura conservada, com moléculas de ácido lipoteicóico inseridas na bicamada lipídica. A parede celular de bactérias Gram-positivas é composta por peptidoglicanos e frequentemente contém os ácidos teicóico e lipoteicóico e ainda ancora diversas proteínas de superfície.

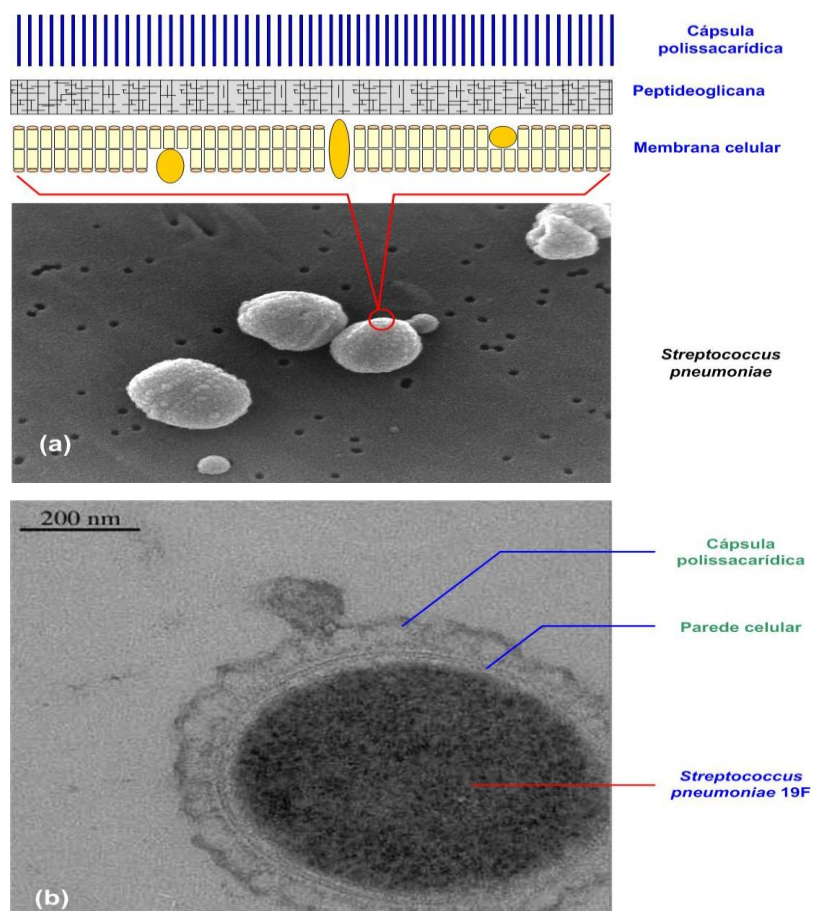
O ácido teicóico contém resíduos de colina e é um dos responsáveis pela resposta inflamatória intensa observada na infecção por pneumococo. Da literatura, constata-se que o principal fator de virulência do pneumococo é a cápsula envoltória de PS.

A cápsula do *S. pneumoniae* é formada por um polissacarídeo (PS) e possui papel importante na patogenia microbiana, incluindo a inibição da fagocitose, a prevenção da deposição do complemento, a aderência a células do hospedeiro e a contribuição para processos inflamatórios (VENTURA et al., 2006). A expressão da cápsula é importante para a sobrevivência deste

microrganismo no sangue e está fortemente associada com a capacidade do pneumococo em causar doenças invasivas (BENTLEY et al., 2006).

Cada linhagem de pneumococo caracteriza-se pela produção de um único PS. Inicialmente as cepas de pneumococo foram classificadas em sorotipos com base na reação com o soro de pacientes infectados, atualmente sabe-se que cada sorotipo apresenta um PS com uma composição molecular diferente (WEINBERGER et al., 2009) e, com os avanços das técnicas, novas estruturas têm sido caracterizadas, por exemplo, os novos sorotipos do grupo 6 (BRATCHER et al., 2009; PARK et al., 2007). Atualmente mais de 90 sorotipos distintos já foram identificados. A distribuição dos sorotipos varia entre regiões geográficas, ao decorrer do tempo e nas diversas faixas etárias das populações (SIBER; KLUGMAN; MAKELA, 2008).

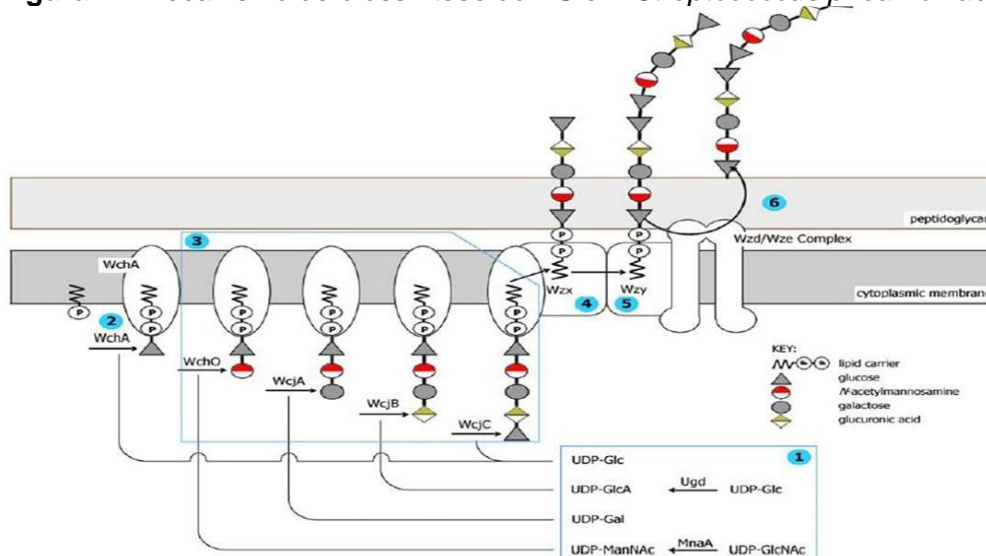
**Figura 1** - Ilustração do esquema do envoltório celular e compartimentos celulares principais do pneumococo



FONTE: (a) Adaptado de CDC / Janice Carr (2012); domínio público;  
(b) adaptado de Tapiainen (2004)

A biossíntese do PS ocorre geralmente pela via da flipase/polimerase ou Wzx/Wzy-dependente (Figura 2), com exceção dos sorotipos 3 e 37 que são sintetizados pela via da sintase. Assim, através da via Wzx/Wzy-dependente, a grande maioria dos sorotipos sintetiza suas cápsulas pela transferência de um monossacarídeo fosfato inicial para um nucleotídeo difosfato ligado a um lípido carregador que está associado à membrana plasmática.

**Figura 2 - Mecanismo de biossíntese do PS em *Streptococcus pneumoniae***



1- Via de biossíntese dos açúcares que não fazem parte do metabolismo central

2- A transferase inicial liga o açúcar inicial com o nucleotídeo fosfato associado com o lípido carregador

3- Glicosil transferase liga sequencialmente mais açúcares para gerar a unidade repetitiva

4- Wzx flipase transporta a unidade repetitiva através da membrana citoplasmática

5- Wzy polimerase liga individualmente as unidades repetitivas para formar o PS maduro

6- O complexo Wzd/Wze transloca o PS maduro para a superfície celular

FONTE: Adaptado de Bentley (2006)

Então, depois de seguidas transferências sequenciais de monossacarídeos, a unidade repetitiva é externada através da membrana citoplasmática pela Wzx flipase e a Wzy polimerase se encarrega de ligar as unidades repetitivas individualmente para produzir o polissacarídeo capsular ainda ligado ao lípido carregador. Por fim, o complexo Wzd/Wze transloca o PS maduro para a superfície celular e deve ser o provável responsável pelo ancoramento do mesmo na peptidoglicana (BENTLEY et al., 2006).

### 1.3 Histórico das vacinas pneumocócicas

Em 1926, Felton e Bailey isolaram pela primeira vez um polissacarídeo capsular (PS), o que culminou com a primeira vacina baseada em PS (BOGAERT, 2003). Em 1942, nos EUA, começaram os primeiros tratamentos de humanos com antibiótico, no caso a penicilina (SIBER et al., 2008). O consequente avanço dessas terapias, que em um primeiro momento mostraram-se muito eficientes contra as doenças pneumocócicas, retirou o foco do mercado nas vacinas (AUSTRIAN, 1981). No entanto, pouco tempo após a inserção de tratamentos à base de antibióticos, foram relatados os primeiros casos de linhagens resistentes, que persistiram apesar do surgimento de novas classes de antibióticos (AUSTRIAN; GOLD, 1964). Sobre o grave problema de resistência a antibióticos em *Streptococcus pneumoniae*, o ponto de vista conservador de Maher et al. (2012) sugere que a melhor política na luta contra a resistência seja mesmo a prevenção.

Em 1977, foi licenciada a vacina polissacarídica 14-valente que foi expandida em 1980 e tornou-se a 23-valente (composta por 23 PS purificados dos sorotipos de maior prevalência nos EUA), com cobertura teórica estimada em 80% da população adulta norte americana (BOGAERT, 2003). Seus efeitos foram benéficos na diminuição de bacteremias pneumocócicas em idosos nos EUA (JACKSON et al., 2003) e de doenças invasivas pneumocócicas na Espanha (VILA-CÓRCOLES et al., 2010). No Canadá não houve relação entre a redução do risco de morte ou hospitalização pela vacinação com a 23-valente em grupos de alto risco (JOHNSTONE et al., 2010). Nos últimos vinte anos a vacinação de populações idosas, do ponto de vista da saúde pública, demonstrou ótimo custo-benefício para os governos da Europa (AMENT et al., 2000), Turquia (AKIN et al., 2011) e Estados Unidos (WEAVER et al., 2001). Na região da Catalunha o custo-benefício também foi observado e a idade recomendada para vacinação caiu para adultos maiores de 45 anos (PLANS, 2002).

Entretanto, os resultados observados após a introdução da 23-valente mostraram uma grave limitação dessa vacina: a baixa proteção em crianças menores de dois anos (DARKES; PLOSKER, 2002). Esse fato fez o meio

científico buscar estratégias mais eficazes para a prevenção de doenças pneumocócicas nesta faixa etária, uma vez que as taxas de mortalidade por pneumococo permaneceram altas. Estudos datados de 1929 já mostravam que a ligação covalente do PS a proteínas aumentava sua imunogenicidade (POLAND, 1999). Assim, uma nova geração de vacinas foi introduzida no mercado: as vacinas conjugadas.

Em 2000, foi licenciada a vacina conjugada polissacarídeo-proteína 7-valente (Prevenar, Wyeth Lederle Vaccines), composta pelos PS dos sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, prevalentes na população infantil dos EUA, ligados covalentemente à proteína diftérica CRM<sub>197</sub> (HICKS et al., 2007). Um dos impactos imediatos da inserção da vacina conjugada 7-valente foi a redução do número de casos de doenças pneumocócicas invasivas (PULIDO; SORVILLO, 2009) e da incidência absoluta de linhagens resistentes a antibióticos, culminando com a redução do uso desse tipo de medicamento (DAGAN; KLUGMAN, 2008). Estudos também relatam a redução dos sorotipos incluídos na vacina entre os portadores assintomáticos (O'BRIEN, 2007).

Em 2009, a vacina 10-valente foi licenciada na Europa com adição dos PS dos sorotipos 1, 3 e 5 aos já presentes na 7-valente, nesta vacina conjugados com a proteína-D do *H. influenzae*. Em 2010, foi licenciada nos Estados Unidos a 13-valente com a adição dos PS dos sorotipos 1, 3, 5, 6A, 7F e 19A aos da 7-valente, porém conjugados à proteína CRM<sub>197</sub>. A PCV13, no Canadá, preveniu mais casos de pneumonia do que a PCV10. O custo benefício da campanha de vacinação com PCV13 também apresentou melhores resultados ao governo que a campanha anterior com PCV10, representando uma economia aos cofres públicos canadense de 5.7 milhões de dólares (EARNSHAW et al., 2012).

A principal limitação dessas vacinas conjugadas reside na inerente substituição de sorotipos prevalentes no decorrer do tempo (TROTTER et al., 2010), ou seja, a incidência dos sorotipos incluídos nas vacinas diminui na população, deixando espaço para sorotipos não vacinais tornarem-se dominantes. No início de 2011, a vacina 10-valente foi introduzida no calendário nacional de vacinação do Brasil.

#### 1.4 Sorotipo 1

Apesar de existirem 90 sorotipos patogênicos, dados recentes sugerem que 11 sorotipos mais comuns são responsáveis por 75% das infecções pneumocócicas no mundo. Nos EUA e Europa os sorotipos pediátricos mais importantes são 14, 6, 19 e 23 (FRIEDLAND; CRACKEN, 1994), enquanto que nos adultos predominam os sorotipos 3, 4, 7, 8 e 14 (DAGAN, 2004). Nos países em desenvolvimento é comum encontrar também os sorotipos 1 e 5 em adultos (MANGTANI; CUTTS; HALL, 2003).

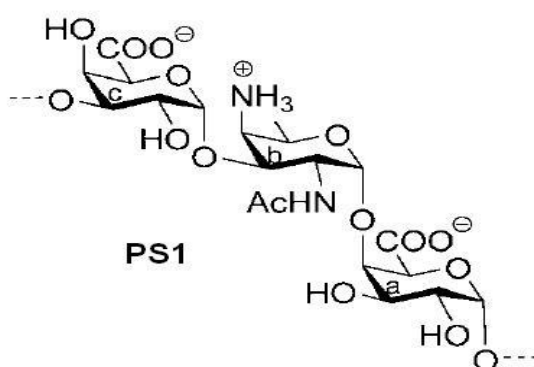
No Brasil, levando-se em conta todas as faixas etárias, existem 13 sorotipos responsáveis por 75% dos casos de doenças invasivas, sendo que 1/3 do total de casos são provocados pelos sorotipos 1, 6B e 14. O sorotipo 14 é responsável por 35,9% dos casos da doença na faixa etária de 0-6 anos e por 10,8% de 6-14 anos. O sorotipo 6B é o segundo em prevalência na faixa etária de 0-6 anos, com 11% dos casos, e responsável por 6% dos casos de 6-14 anos. O sorotipo 1 é responsável por 5,6% dos casos das doenças invasivas entre 0-6 anos e 7,3% entre 6-14 anos. A distribuição de prevalência dos sorotipos se altera com a idade e o sorotipo 3 passa a ser prevalente entre a população de 15-60 anos, com 9,3% dos casos e na população maior de 60 anos com 14,6% dos casos (OMS, 2005). Desde a sua identificação em 1913 o sorotipo 1 tem se mantido como uma das principais causas das doenças pneumocócicas mais graves (BRUEGGEMANN; SPRATT, 2003). Além de ser um dos poucos sorotipos associados a surtos em pequenas regiões ou comunidades fechadas e possuir altas taxas de ataque (LEIMKUGEL et al., 2005). Gupta et al. (2008) registraram um pequeno surto de pneumonia pneumocócica ocasionada pelo sorotipo 1 em uma escola no nordeste do Reino Unido, o que corrobora o histórico deste sorotipo, pois os surtos de *S. pneumoniae* frequentemente relacionam o sorotipo 1 a indivíduos de alto risco (ex. alcoólatras) em diminutos bolsões populacionais isolados, mesmo em países desenvolvidos. Devido à importância epidemiológica para a população brasileira citada, o sorotipo 1 foi escolhido para o desenvolvimento deste trabalho.

O polissacarídeo da cápsula do sorotipo 1 (PS1) apresenta uma estrutura composta pela repetição do trissacarídeo:  $\rightarrow 3)$   $\alpha$ -2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxigalactose (1 $\rightarrow$ 4)  $\alpha$ -D-ácido galacturônico (1 $\rightarrow$ 3)  $\alpha$ -D-ácido galacturônico (1 $\rightarrow$ , também representado por  $\rightarrow 3)$  AAT-Gal (1 $\rightarrow$ 4) GalA (1 $\rightarrow$ 3) GalA (1 $\rightarrow$  e esquematicamente ilustrado na Figura 3.

O PS1 também contém uma quantidade não estequiométrica de grupo O-acetil (STROOP et al., 2002). O ácido galacturônico é parte componente do PS1, integrando aproximadamente 60% de sua massa total (LINDBERG, 1980). Alguns métodos de quantificação de ácidos urônicos (ácido idurônico, glucurônico e galacturônico) estão em uso desde o fim da década de 60 e os mais estudados se referem a medidas por orcinol, carbazol e *m*-hidroxidifenil (MHD). Dentre esses, o MHD foi o método que apresentou menor interferência de pentoses e hexoses (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973).

Algumas modificações desse método parecem diminuir ainda mais os níveis de interferências por açúcares neutros (pentoses e hexoses, basicamente) com a adição de sulfamato anteriormente à aplicação do reagente *m*-hidroxidifenil responsável pelo surgimento do cromógeno (FILISETTI-COZZI; CARPITA, 1991).

**Figura 3** - Fórmula estrutural da unidade repetitiva que compõe o PS1



FONTE: (WU et al., 2010)

De forma alternativa, alguns métodos de quantificação de polissacarídeos baseados em outros princípios, diferentes dos colorimétricos atrelados a hidrólises ácidas e reações químicas, têm sido estabelecidos na literatura. Por

exemplo, Chen e Wang (2009) utilizaram o conhecido detergente brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB) para ressuspender o biopolímero ácido hialurônico e assim quantificá-lo através da turbidez provocada pelos compostos insolúveis.

Já Widmer (2011) utilizou cromatografia de troca iônica para quantificar o ácido galacturônico com acetato de sódio e cloreto de sódio como fase móvel.

### 1.5 Cenário atual dos bioprocessos com *S. pneumoniae*

No Brasil, a demanda contínua gerada pelo programa de vacinação federal implica na necessidade da produção industrial de vacinas e, portanto, no desenvolvimento de tecnologias adequadas para atender tais demandas. A ausência de informações a respeito da produção de PS – devido provavelmente aos segredos industriais das grandes empresas farmacêuticas – praticamente obriga os países em desenvolvimento, como o Brasil, a criarem suas próprias tecnologias na produção de vacinas.

Até o momento, a literatura não disponibiliza muitos estudos sobre processos fermentativos envolvendo *S. pneumoniae* e o sorotipo 1 não é exceção. O único trabalho encontrado sobre o processo fermentativo de produção de PS1 foi realizado em frascos com uma cepa aleatória da ATCC em meio de cultura infusão de cérebro e coração, obtendo-se aproximadamente 35mg/L de PS1 (KIM et al., 1996). Já para o sorotipo 3, através de uma análise de superfície de resposta, o efeito do pH, agitação e concentração de glicose foi avaliado em cultivos controlados em fermentador. Os resultados apontaram para um ponto ótimo de produção de PS3 a pH = 7,5, 180 rpm e glicose 1%, alcançando 256mg/L (SHENG-DE et al., 2009). Também em fermentador, Gonçalves et al. (2006) mostraram que a adição de ar durante a fase estacionária em cultivos do sorotipo 23F estimulou a liberação de PS para o meio de cultura, atingindo aproximadamente 466mg/L de PS23F no sobrenadante.

Segundo Gogola et al. (2010), que estudou o metabolismo do pneumococo em cultivos contínuos, a produção de PS14 é associada ao crescimento celular, então a estratégia de produção de PS14 deve focar na alta



densidade celular e condições de limitação de nutrientes visando elevar a eficiência da conversão substrato a células e PS, o que poderia ser atendido, por exemplo, por uma batelada alimentada.

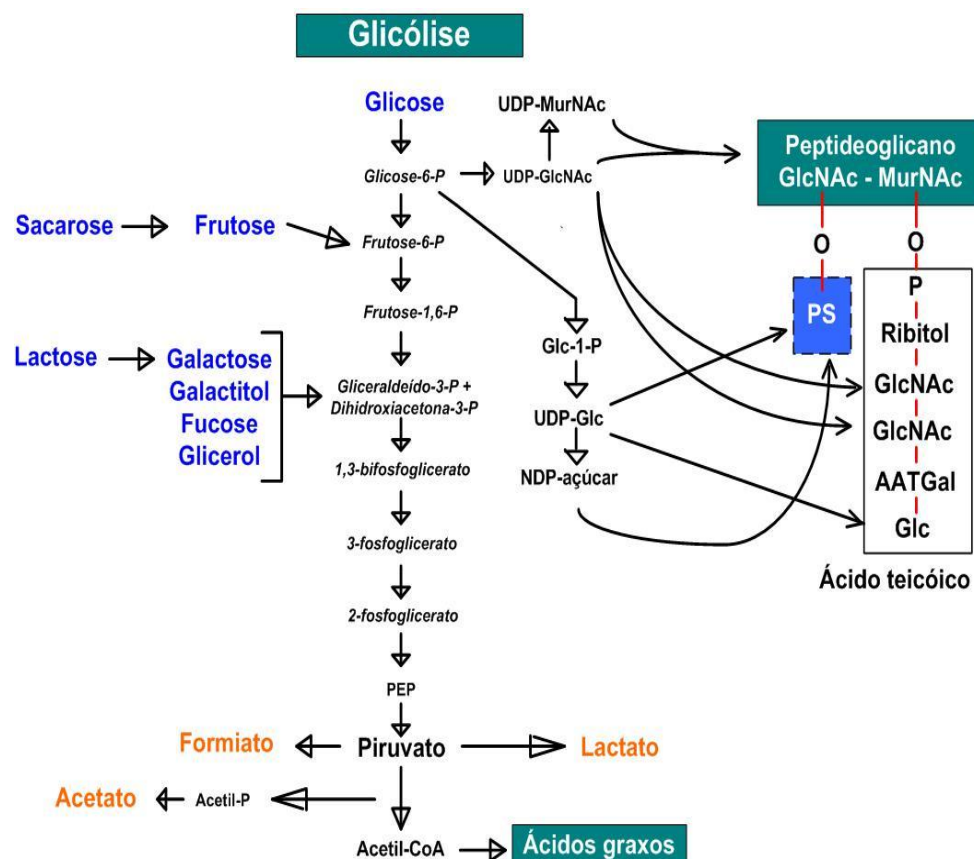
Atualmente, do ponto de vista de otimização de processos, a batelada alimentada possui um vasto histórico de sucesso entre uma grande e diversa gama de microrganismos (DIETZSCH et al., 2011; JALLOULI et al., 2012; LI-HUI et al., 2012; SETLHAKU et al., 2012; YU et al., 2012). No entanto, a literatura carece de conhecimento a respeito do comportamento de cultivos em batelada alimentada envolvendo o *Streptococcus pneumoniae*, até os dias de hoje, nenhum artigo científico que utilize esta estratégia para produção de PS foi publicado para esse microrganismo.

#### 1.6 Fonte de carbono e energia

As bactérias láticas constituem um grupo de microrganismos Gram-positivos unidos por uma série de características morfológicas, metabólicas e fisiológicas. Essas bactérias produzem o ácido lático como principal produto final da fermentação de carboidratos (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004).

O *Streptococcus pneumoniae* faz parte do grupo das bactérias láticas e apresenta metabolismo anaeróbico aerotolerante com o ácido lático como metabólito principal. A produção de ATP ocorre por fosforilação ao nível do substrato, onde uma molécula de carboidrato (ex: glicose) segue a clássica via metabólica da glicólise até lactato, acetato ou formiato, conforme ilustra a Figura 4.

**Figura 4** - Principais vias metabólicas do *Streptococcus pneumoniae*



FONTE: Adaptado de (SIBER; KLUGMAN; MAKELA, 2008; TETTELIN et al., 2001)

Como já era esperada, a análise genômica do pneumococo mostrou a inexistência dos genes requeridos para que se realize qualquer cadeia transportadora de elétrons, seja ela aeróbia ou anaeróbia (HOSKINS et al., 2001). Além disso, por não possuir nenhum dos 18 genes que propiciam a realização do ciclo de Krebs (ou Ciclo dos ácidos tricarbóxicos) o pneumococo também não consegue gerar os precursores de determinados aminoácidos, como aspartato e glutamato. Deste modo, para que haja a duplicação celular plena, surge a necessidade de se formular meios de cultura que primem pela robustez nutritiva e forneçam os aminoácidos que o pneumococo não sintetiza naturalmente.

A síntese do PS requer a produção de açúcares precursores ligados a nucleotídeos (Figura 4), os quais dependem da atuação de enzimas específicas para serem sintetizados. Com relação aos componentes da unidade repetitiva do PS1, sabe-se que o AAT-Gal é derivado de "pools" de

açúcares disponíveis no ambiente intracelular, pois o mesmo é incorporado em outras estruturas celulares, como o ácido teicóico. A via que sintetiza o GalA ainda permanece desconhecida. (SIBER; KLUGMAN; MAKELA, 2008).

De modo geral, a fonte de carbono universal para microrganismos é a glicose. A oxidação total da glicose (resultando em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ ) é um processo exergônico, que libera uma quantidade de energia equivalente a  $2870 \text{ KJ.mol}^{-1}$ . Nas células, essa transformação é estritamente acoplada à síntese de ATP, um processo endergônico. Microrganismos anaeróbios, como o pneumococo, realizam a oxidação parcial da glicose a piruvato e produzem menos de 10% do total de ATP que a oxidação completa é capaz de proporcionar. Ainda assim esses microrganismos conseguem suprir sua demanda energética (MARZOCCO; TORRES, 2010). Como a duplicação celular é inibida pela produção de ácidos orgânicos, que são o produto final do metabolismo energético desses microrganismos, a produção de biomassa é consideravelmente baixa.

Em cultivos contínuos do sorotipo 14 com meios quimicamente definidos a concentração de glicose alterou o metabolismo energético, variando entre homolático e misto respectivamente com concentrações elevadas e em condições de limitação de glicose, o que tem grande influência sobre a produção de células, aproveitamento da fonte de carbono e, conseqüentemente, na produção de PS14. A glicose deixou de ser limitante acima de  $15 \text{ g/L}$  (GOGOLA et al., 2010).

### 1.7 Fonte de nitrogênio

Como já dito, em geral, bactérias lácticas são microrganismos fastidiosos que requerem fontes de aminoácidos ou peptídeos exógenos para realizarem o crescimento celular ótimo (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004). As proteases do envelope celular são enzimas chave nesse processo, pois iniciam a quebra dos grandes complexos protéicos em oligopeptídeos que serão transportados para o ambiente intracelular onde sofrerão a ação de aminopeptidases (LIU et al., 2010). Para *Streptococcus thermophilus*, um estudo com mutantes negativos para a peptidase PepS mostrou que existe

uma correlação entre o crescimento celular e diferentes meios de cultura, pois houve menor crescimento dos mutantes negativos em meios menos ricos em aminoácidos (THOMAS et al., 2009). Por ser uma bactéria de alta exigência nutricional, os meios de cultura usados em cultivos de pneumococo costumam ser enriquecidos com extrato de levedura, peptona e aminoácidos.

Fornecedores de extrato de levedura descrevem-no como sendo um concentrado de porções solúveis de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* autolisadas. Deste modo não é considerado um produto de origem animal, além de ser um substituto ao soro fetal bovino em formulações de meio de cultura para células eucarióticas. O extrato de levedura fornece vitaminas (complexo B), aminoácidos (18 no total, dentre eles a L-asparagina e L-glutamina), peptídeos e carboidratos totais não especificados (108,2 mg/g).

As peptonas de soja comerciais são compostos hidrolisados por processos enzimáticos e apresentam altas concentrações de vitaminas e carboidratos, além de aminoácidos. A peptona derivada do leite, ou hidrolisado de caseína, não possui em sua formulação os aminoácidos L-glutamina e L-asparagina devido à hidrólise ácida (etapa de produção) que os degrada. Experimentos em frascos com o sorotipo 1 mostraram que a adição de um coquetel de aminoácidos (metionina, fenilalanina e treonina) aumentou a produção de PS1 em duas vezes (KIM et al., 1996).

## 1.8 pH

Alguns estudos envolvendo cultivos de pneumococo apontaram algumas faixas de pH efetivas no crescimento celular e na produção de PS. O efeito do pH inicial em cultivos em frascos, para o sorotipo 1, mostrou uma faixa ótima de pH entre 6-8 (KIM et al., 1996). Sheng-De et al. (2009) encontraram pH 7,5 como ponto ótimo para produção de PS3 após um planejamento experimental com três fatores (concentração de glicose, agitação e pH) em cinco níveis.

## 1.9 Planejamento de experimentos

O desenvolvimento de um processo ou produto depende quase sempre de um grande número de variáveis. O planejamento consciente dos

experimentos que devem ser realizados para determinar, e mesmo quantificar a influência das variáveis sobre as respostas desejadas, é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos e para que análises estatísticas consistentes possam ser realizadas. Portanto, quantificar o efeito das variáveis do processo através das técnicas do planejamento experimental, com o objetivo de obter informações que otimizem rendimentos e processos, é de fundamental importância para a área de implementação de controle de processos (RODRIGUES; IEMMA, 2009). O planejamento de experimentos nos fornece uma gama de técnicas que possibilitam a extração da informação desejada proveniente dos resultados alcançados. Dentre essas muitas técnicas, os planejamentos fatoriais fracionados são vistos como uma espécie de triagem de variáveis, além de serem extremamente econômicos e utilizados nos estudos de dezenas de fatores de uma única vez (NETO et al., 2001).

#### 1.10 Motivação

O Instituto Butantan desde 1901 possui em suas atribuições a produção de imunobiológicos voltados à Saúde Pública. O Instituto está vinculado à Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo e é responsável por mais de 93% dos soros e vacinas produzidas no Brasil. Seus produtos são direcionados ao Ministério da Saúde, que os distribui de forma estratégica e gratuita à população através do Sistema Único de Saúde. O Centro de Biotecnologia é o braço do Instituto voltado à pesquisa de novas vacinas e forneceu estrutura para que este trabalho fosse desenvolvido como parte integrante do Projeto Temático FAPESP “Vacina conjugada antipneumocócica: Estudos sobre a viabilidade de uma vacina Polissacarídeo – Proteína A de superfície de pneumococo”. Assim, espera-se que, futuramente, os esforços empregados neste trabalho ajudem a compor uma eficiente vacina conjugada direcionada à população brasileira, já que as atuais vacinas conjugadas são importadas e devido ao elevado preço, se tornam extremamente onerosas para o governo brasileiro.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Investigar meios de cultura para *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1 que favoreçam a produção de polissacarídeo capsular.

### 2.2 Específicos

#### 2.2.1 Estabelecimento do método de dosagem de PS1

Estabelecer um método que quantifique a concentração de PS1 liberado no sobrenadante durante os cultivos.

#### 2.2.2 Seleção de cepa

Selecionar a cepa de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1 que seja a melhor produtora de PS1.

#### 2.2.3 Escolha da peptona

Escolher a peptona mais favorável à produção de PS1 em cultivos descontínuos de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1, comparando um hidrolisado ácido de caseína, Casaminoácidos, e dois hidrolisados enzimáticos de soja, Soytone e Phytone.

#### 2.2.4 Avaliação dos efeitos de quatro componentes do meio de cultura em três níveis através de um Delineamento Fatorial Fracionado ( $2^{4-1}$ )

Investigar a influência de diferentes concentrações de extrato de levedura, peptona, L-asparagina e L-glutamina em bateladas de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1 através de cultivos exploratórios guiados por um planejamento experimental fracionado ( $2^{4-1}$ ).

### 2.2.5 Avaliação do novo meio de cultura

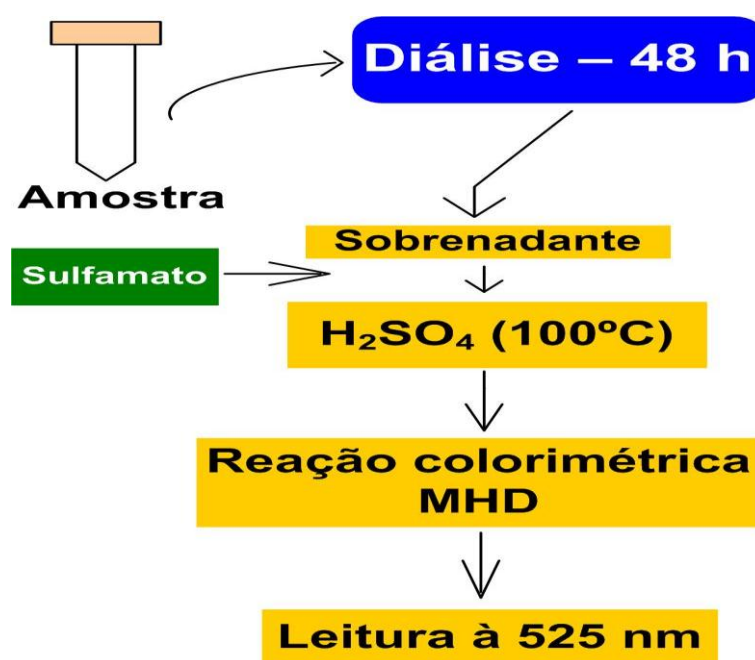
Investigar o comportamento do *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1 sob a influência do novo meio de cultura proposto e testá-lo em um cultivo descontínuo alimentado sob condições simuladas previamente em Anabio 1.2.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Estabelecimento do método de quantificação de PS1

A medida de ácidos urônicos pelo método *m*-hidroxidifenil (MHD) de acordo com o proposto por Filizetti-cozzi e Carpita (1991) foi escolhida para a quantificação do PS1. Para isso fez-se necessário estabelecer as condições ideais para medir PS1 em amostras do sobrenadante da cultura. A Figura 5 esquematiza o protocolo do método.

**Figura 5** - Procedimento do método MHD com possível adição de sulfamato



FONTE: (MARTHOS, 2012)

##### 3.1.1 Efeito da adição do sulfamato

Foram realizadas duas medidas com o tempo de hidrólise previamente estabelecido (seção 3.1.2), a primeira com e a segunda sem adição de sulfamato. O meio de cultura fresco foi utilizado para comparar o efeito da adição de sulfamato sobre a interferência de componentes do meio no método.



### *3.1.2 Efeito do tempo de hidrólise*

Foram realizados quatro ensaios separadamente variando-se o tempo de hidrólise com ácido sulfúrico concentrado a 100 °C em 10, 20, 30 e 40 minutos. A amostra foi composta de 10 µg de PS1 purificado adquirido da ATCC. O método MHD com adição de sulfamato foi empregado.

### *3.1.3 Teste de reprodutibilidade*

O teste de reprodutibilidade foi realizado ao se medir duas vezes as amostras do mesmo cultivo seguindo o protocolo estabelecido nas etapas anteriores.

### *3.1.4 Comparação do MHDS com imunoensaio de ELISA*

A validação do método foi realizada por meio da comparação entre a quantificação de PS1 de um dos cultivos do ponto central pelo método MHD com adição de sulfamato e pelo ELISA de captura. O MHDS seguiu protocolo estabelecido anteriormente e o ELISA de captura seguiu o protocolo estabelecido em nosso laboratório (FIGUEIREDO et al., 2012).

## **3.2 Meios de cultura**

A composição do meio de cultura utilizado nas etapas experimentais de seleção de cepas, escolha da peptona e delineamento fatorial fracionado está apresentada nas Tabelas 1 e 2. As seguintes peptonas foram usadas: hidrolisado ácido de caseína ou Casaminoácidos (Bacto™ Casamino Acids, BD/Difco) e dois hidrolisados enzimáticos de soja, Bacto™ Soytone hidrolisado com pepsina e Phytone™ Peptone hidrolisado com papaína, ambos também fornecidos pela BD/Difco (APÊNDICE D).

**Tabela 1** - Composição do meio líquido

Componentes	g/L
<u>Peptona</u> <sup>a</sup>	30,00
<u>Extrato de levedura</u>	20,00
<u>L-glutamina</u>	0,650
<u>L-asparagina</u>	0,10
Glicose	20,0
Fosfato bipotássico	5,00
Bicarbonato de sódio	1,00
Colina	0,010
# Solução de sais	0,2
# Ácido tioglicólico 10%	0,1

#Concentração expressa em porcentagem (v/v)

<sup>a</sup>Casaminoácidos, Phytone ou Soytone

Sublinhado: reagentes que tiveram suas concentrações variadas durante os experimentos do delineamento fatorial fracionado

FONTE: (MARTHOS, 2012)

**Tabela 2** - Composição da solução de sais

Componentes	g/L
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	250
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	2,50
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,40
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,18
#Ácido clorídrico	1,0

#concentração expressa em porcentagem (v/v)

FONTE: (MARTHOS, 2012)

A composição do meio de cultura THY utilizado no preparo do banco semente do *S. pneumoniae* sorotipo 1 está apresentada na Tabela 3.

**Tabela 3** - Composição do meio THY

Componentes	g/L
Todd e Hewitt	30,0
Extrato de levedura	5,0

FONTE: (MARTHOS, 2012)

A composição do meio de cultura semi-sólido ágar sangue com base nutriente em Brain Heart Infusion (BHI) utilizado no preparo do lote de trabalho do *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1 está apresentada na Tabela 4.

**Tabela 4** - Composição do meio ágar sangue

Componentes	g/L
Ágar	20,0
BHI	37,0
#Sangue de carneiro	5,0

# Concentração expressa em porcentagem (v/v)

FONTE: (MARTHOS, 2012)

A composição do meio de alimentação 4<sub>x</sub> concentrado empregado para o cultivo descontínuo alimentado está mostrada na Tabela 5.

**Tabela 5** – Composição do meio de alimentação 4 vezes concentrado

Componentes	g/L
Peptona <sup>a</sup>	60,00
Extrato de levedura	8,00
Glicose	80,0
Fosfato bipotássico	5,00
Bicarbonato de sódio	1,00
Colina	0,010
# Solução de sais	0,2
# Ácido tioglicólico 10%	0,1

<sup>a</sup> Peptona selecionada

# Concentração expressa em porcentagem (v/v)

FONTE: (MARTHOS, 2012)

### 3.3 Seleção de cepas

#### 3.3.1 *Microrganismos*

Nove cepas congeladas de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1, provenientes do Instituto Adolfo Lutz, foram cedidas pelo Laboratório de Biotecnologia Molecular do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan: ST 710/03, ST 716/03, ST 1012/01, ST 714/05, ST 29306/09, ST 477, ST 595/01, ST 592/03 e ST 1079.

### 3.3.2 Preparo dos estoques congelados

Para o preparo dos estoques do nosso laboratório, inicialmente as cepas previamente congeladas foram crescidas em meio líquido THY (Tabela 3) a 37 °C em atmosfera de aproximadamente 3% de CO<sub>2</sub> até alcançar densidade ótica (DO) em 600 nm próxima de 1,0. Em seguida, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 2.655 g por 15 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas no mesmo meio THY contendo 30% de glicerol, aliqotadas em criotubos e conservadas em nitrogênio líquido.

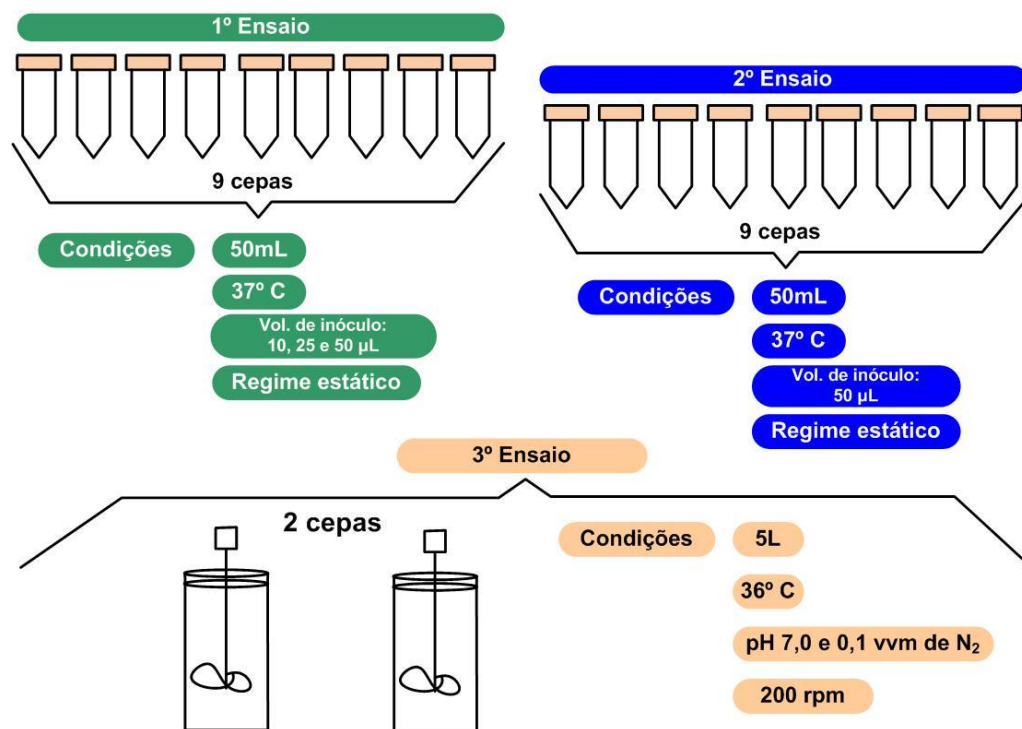
### 3.3.3 Cultivos em frascos

Foram realizados dois ensaios independentes, incubados a 37 °C em estufa TECNAL modelo TE-391, em regime estático e ambiente microaerofílico (aproximadamente 3,0% de CO<sub>2</sub> com extinção parcial do oxigênio por meio de chama de vela).

O primeiro ensaio foi realizado com diferentes volumes de inóculo de 10, 25 e 50 µL do estoque congelado para cada cepa em tubos contendo 50 mL de meio líquido com Casaminoácidos (Tabelas 1 e 2). O segundo ensaio foi realizado sob as mesmas condições que o primeiro, porém utilizando-se apenas 50 µL como volume de inóculo.

As cepas que apresentaram os melhores resultados em frascos foram submetidas ao teste final de seleção em biorreator com o meio de cultura contendo Casaminoácidos, conforme mostra a Figura 6.

**Figura 6** - Experimentos para a seleção de cepas de *S. pneumoniae* sorotipo 1



FONTE: (MARTHOS, 2012)

### 3.3.4 Cultivos em biorreatores

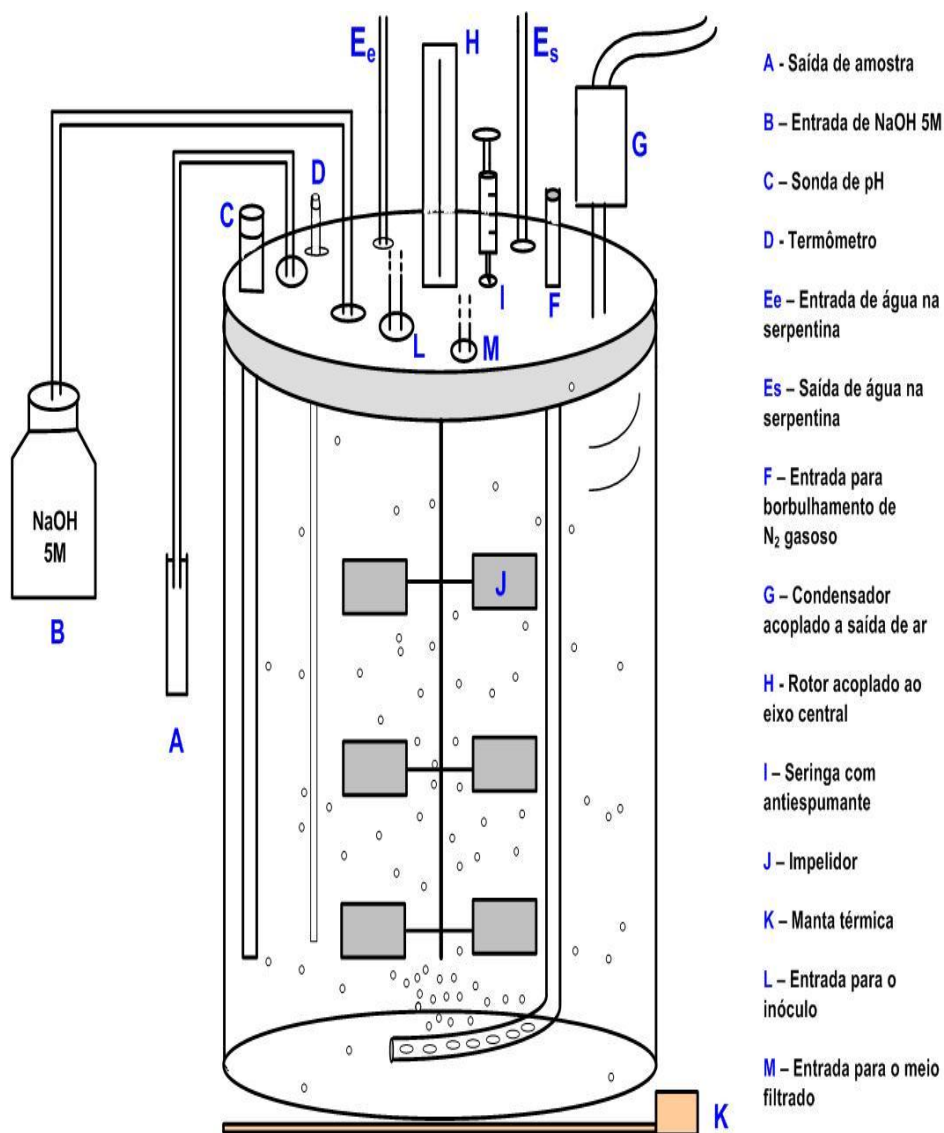
Para os cultivos em biorreator, os inóculos foram crescidos em frascos de 500 mL em meio de cultura líquido a partir de 100 µL do estoque congelado. A Figura 6 resume a sequência de experimentos tanto em frascos como em reator para seleção de cepa. A incubação foi realizada como descrito para os cultivos em frascos (seção 3.3.3). O crescimento celular foi acompanhado até que fosse possível obter uma concentração celular suficiente para alcançar DO inicial de 0,1 no biorreator, empregando-se o volume calculado pela equação 1.

$$DO_{\text{inoc}} \times Vol_{\text{inoc}} = 0,1 \times Vol_{\text{reator}} \quad \text{Eq. (1)}$$

Deste modo, o volume inoculado nos reatores variou entre 200 mL e 250 mL. Foi empregado o biorreator BIOFLO 2000 (New Brunswick), conforme mostra a Figura 7, com volume de 5 L, agitação em 200 rpm, temperatura em

36 °C, vazão de N<sub>2</sub> gasoso em 0,54 L/min. O pH foi controlado em 7,0 pela adição automática de NaOH 5 M.

**Figura 7** - Ilustração do biorreator empregado neste trabalho



FONTE: (MARTHOS, 2012)

Amostras foram retiradas do biorreator a cada 30 minutos. O crescimento celular foi medido pela DO imediatamente após amostragem, 10 ml da suspensão foram centrifugados a 8.228 g e o sobrenadante congelado a -20 °C para posterior dosagem de PS1 liberado no sobrenadante, carboidratos residuais no meio e ácidos orgânicos produzidos.

### 3.4 Escolha da peptona

#### 3.4.1 Preparo do lote congelado da cepa selecionada

Uma ampola com a cepa liofilizada escolhida teve seu conteúdo ressuscitado e semeado em quatro placas de ágar sangue (Tabela 3.4) incubadas por 18 h a 37 °C e atmosfera a 3% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as células de cada placa foram ressuscitadas e esta suspensão foi usada para inocular 50 mL de meio THY de modo a obter DO inicial próxima de 0,1. A cultura foi incubada sem agitação a 37 °C em atmosfera a 3% de CO<sub>2</sub>. O crescimento foi acompanhado até DO=1,0 e as células foram centrifugadas a 3.214 g por 15 minutos. O pellet foi ressuscitado com 4,70 mL de THY e glicerol esterilizado foi acrescentado para uma concentração final de 30%. Distribuiu-se 300 µL da suspensão final por criotubo e o lote foi congelado em N<sub>2</sub> líquido.

#### 3.4.2 Cultivos e meios de cultura

Foram realizados seis cultivos submersos – três duplicatas - em biorreator BIOFLO 2000 com volume de 5 L (Figura 7). Os meios de cultura foram elaborados como descrito nas Tabelas 1 e 2 alterando-se apenas os tipos de peptona. Três peptonas foram testadas na concentração de 30 g/L: Casaminoácidos, Soytone e Phytone. Os inóculos foram crescidos em frascos Schott com 250 mL de seus respectivos meios após a injeção de 300 µL do lote de trabalho. As condições de cultivo do inóculo e da cultura em reator foram as mesmas descritas na seção 3.3.4.

### 3.5 Delineamento fatorial fracionado

Os meios de cultura foram elaborados seguindo a matriz proposta por Rodrigues e lemma (2009) para delineamentos fatoriais fracionados com quatro fatores ( $2^{4-1}$ ), conforme mostra a Tabela 6. Ao todo foram realizados

doze ensaios em reator de 5 L nas mesmas condições do item 3.3.4, dos quais quatro foram replicatas do ponto central (0, 0, 0, 0).

**Tabela 6** - Composição dos meios de cultura do delineamento fatorial fracionado

Valores codificados (X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub> , X <sub>4</sub> )	Extrato de levedura X <sub>1</sub> (g/L)	Peptona X <sub>2</sub> (g/L)	Asparagina X <sub>3</sub> (g/L)	Glutamina X <sub>4</sub> (g/L)
(-1, -1, -1, -1)	2,0	5,0	0,135	0,03
(+1, -1, -1, +1)	10,0	5,0	0,135	0,7
(-1, +1, -1, +1)	2,0	15,0	0,135	0,7
(+1, +1, -1, -1)	10,0	15,0	0,135	0,03
(-1, -1, +1, +1)	2,0	5,0	0,435	0,7
(+1, -1, +1, -1)	10,0	5,0	0,435	0,03
(-1, +1, +1, -1)	2,0	15,0	0,435	0,03
(+1, +1, +1, +1)	10,0	15,0	0,435	0,7
(0, 0, 0, 0)	6,0	10,0	0,285	0,365

\* Concentrações constantes para todos os cultivos: glicose 20 g/L, fosfato bipotássico 5,0 g/L, bicarbonato de sódio 1,0 g/L colina 0,01 g/L, solução de sais 0,2 % e ácido tioglicólico 0,1 %

FONTE: (MARTHOS, 2012)

Em relação aos meios de cultura utilizados nos experimentos anteriores, apenas quatro componentes tiveram sua concentração variada em três diferentes níveis. O ponto central representado por “0” refere-se às concentrações intermediárias, já +1 e -1 remetem às concentrações dos níveis superiores e inferiores, respectivamente. Os resultados (efeitos, erro padrão, intervalos de confiança, teste de hipóteses e médias) foram analisados com o programa STATISTICA 8.0 (StatSoft LTDA). Com relação ao meio de cultura, optou-se por não variar a concentração de glicose, pois é de conhecimento prévio que este componente exerce papel fundamental no crescimento celular e como o planejamento fatorial fracionado exige faixas amplas para a visualização dos efeitos, concluiu-se que seus efeitos seriam certamente influenciados por zonas de limitação ou inibição pelo substrato, mascarando o efeito dos demais componentes do meio de cultura, como este cenário não era o desejado, fixou-se a glicose em 20 g/L. As faixas de concentração escolhidas para a peptona de soja e extrato de levedura no nível +1 foram 15,0 g/L e 10,0 g/L, respectivamente, ou seja metade dos 30,0 g/L e 20,0 g/L adicionados até então. Esta opção foi tomada pois acreditou-se que tanto a peptona de soja



como o extrato de levedura, ambos fonte de nitrogênio, estivessem sendo adicionados em quantidades excessivas. Portanto, buscaram-se valores balanceados que, concomitantemente, não limitassem o crescimento microbiano e não desperdiçassem os onerosos nutrientes em questão.

### 3.6 Cultivos adicionais para avaliação do novo meio

Foram realizados dois cultivos, um descontínuo e um descontínuo alimentado, ambos com o meio de cultura proposto após o planejamento fatorial fracionado. Por meio de uma simulação através do software Anabio 1.2 (SILVA et al., 2003), estimou-se a vazão de alimentação constante (0,5 L/h), o volume inicial (3,0 L) e o fator de concentração do meio de alimentação (4<sub>x</sub>) para a peptona selecionada, EL, glicose (Tabela 5). Os demais componentes do meio de cultura foram mantidos nas mesmas concentrações do meio da batelada como descrito na Tabela 5. As condições de cultivo foram as mesmas descritas na seção 3.3.4.

### 3.7 Análises

#### *3.7.1 Determinação da viabilidade celular dos estoques congelados*

A viabilidade celular dos estoques congelados foi determinada por plaqueamento de diluições seriadas das amostras em ágar sangue (Tabela 4) e o resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

#### *3.7.2 Determinação do crescimento celular*

O crescimento celular foi acompanhado em intervalos de 30 minutos pela medida da DO a 600nm (espectrofotômetro HITACHI U1800) e a biomassa foi estimada de acordo com a curva de calibração preparada como segue.

### *3.7.3 Preparo da curva de calibração para conversão de DO em massa seca*

Aproximadamente 200 ml de caldo fermentado foram amostrados de dez cultivos em biorreator (um da seção 3.4 e nove da seção 3.5) antes da fase estacionária. As células foram inativadas com formaldeído 2%(v/v) por 24 horas à temperatura ambiente. Centrifugou-se a suspensão de células inativadas à 10.621 *g* a 4 °C por 30 minutos. O pellet foi ressuspendido em 100 mL de salina e novamente centrifugado. Em seguida, retirou-se o sobrenadante, o pellet foi ressuspendido em 10 mL de salina e foram preparadas suspensões com diferentes DO. As suspensões foram distribuídas em tubos previamente secos e pesados. Os tubos com a suspensão celular foram então secos em estufa a 65 °C por 72 horas e pesados para determinação da massa seca.

### *3.7.4 Determinação da concentração de PS1 no sobrenadante*

As amostras do cultivo foram centrifugadas a 8.228 *g* a 4°C por 15 minutos e o sobrenadante livre de células foi submetido a 48 horas de diálise em membrana (12 kDa de corte nominal) contra água destilada. Nova centrifugação a 8.228 *g* a 4 °C por 10 minutos foi feita para eliminar material precipitado. A concentração de PS1 no sobrenadante da cultura foi determinada pelo método *m*-hidroxidifenil seguindo o protocolo estabelecido como descrito na seção 3.2. A determinação do PS1 foi feita utilizando o ácido galacturônico como padrão e, uma vez que este açúcar compõe aproximadamente 60% da massa do PS1, os valores de ácido galacturônico obtidos foram multiplicados por 1,66 para obtenção da concentração de PS1. O meio de cultura fresco dialisado foi empregado como controle de interferentes no método.

### *3.7.5 Determinação da glicose residual e concentração de ácidos orgânicos*

A produção de ácidos orgânicos e o consumo de glicose do meio foram quantificados por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) modelo Shimadzu 10Avp em coluna Aminex HPX-87H (BioRad), fase móvel de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 60 °C. Os açúcares foram detectados por índice de refração e os ácidos orgânicos por ultravioleta a 210 nm.

### *3.7.6 Controle de pureza*

A pureza dos cultivos foi acompanhada por coloração de Gram e plaqueamento em ágar sangue (Tabela 4). As placas foram incubadas em ambiente microaerofílico por 24 h a 37 °C e por mais 24 h em aerobiose para verificação da presença de contaminantes.

## 3.8 Determinação de parâmetros

As equações empregadas para estimativa dos parâmetros de cultivo estão apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7** - Cálculo dos parâmetros usados na análise dos resultados

Parâmetros	Nomenclatura	Equações	Unidade de medida
Máxima velocidade específica de crescimento	$\mu_{\text{máx}}$	Coef. angular da reta ajustada <sup>a</sup>	$\text{h}^{-1}$
Concentração máxima de biomassa	$C_x$	$C_x = \text{DO}_{\text{obs}} * \text{FC}$	g/L
Concentração máxima de PS1	$C_{\text{ps1}}$	Medida direta	mg/L
Concentração máxima de lactato	$C_{\text{lac}}$	Medida direta	g/L
Concentração máxima de acetato	$C_{\text{ace}}$	Medida direta	g/L
Conversão de glicose à biomassa	$Y_{x/s}$	$Y = \frac{(C_{x\text{máx}} - C_{xi})}{(C_{si} - C_{sf})}$	g de célula / g de glicose
Conversão de glicose a PS1	$Y_{\text{PS1}/s}$	$Y = \frac{(C_{\text{PS1 máx}} - C_{\text{PS1}})}{(C_{si} - C_{sf})}$	mg de PS1 / g de glicose
Conversão de glicose a lactato	$Y_{\text{lac}/s}$	$Y = \frac{(C_{\text{lac máx}} - C_{\text{lac i}})}{(C_{si} - C_{sf})}$	g de lactato / g de glicose
Conversão de glicose a acetato	$Y_{\text{ace}/s}$	$Y = \frac{(C_{\text{ace máx}} - C_{\text{ace i}})}{(C_{si} - C_{sf})}$	g acetato / g de glicose
Produção específica máxima de PS1	$P_{\text{espec}}$	$P = \frac{P_{\text{ps1máx}}}{C_{x \text{ em PS1 max}}}$	mg de PS1 / g de célula

<sup>a</sup>- No gráfico LN (DO) x Tempo (h), ajustou-se uma reta com os pontos que resultassem em  $R^2 = 0,99$ , aproximadamente  
 FONTE: (MARTHOS, 2012)

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

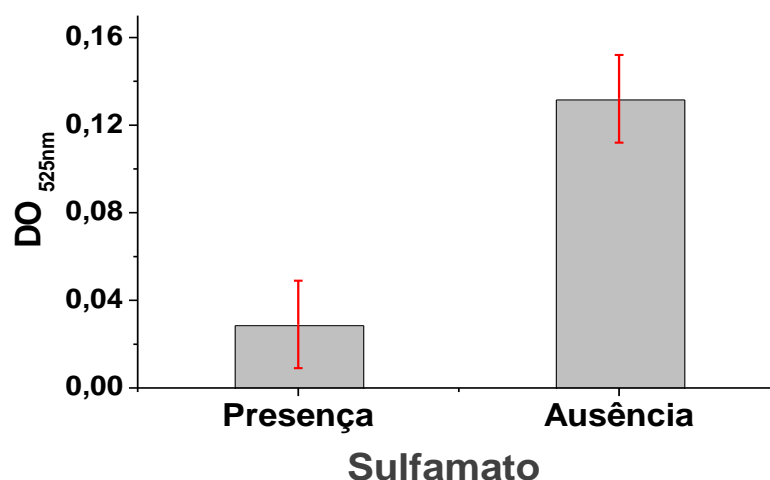
### 4.1 Estabelecimento do método de quantificação de PS1

Como já mencionado, o PS1 é um polímero composto por 60% de moléculas de ácido galacturônico. Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973) compararam a quantificação de amostras de mucopolissacarídeos compostos de diferentes ácidos urônicos por três métodos: orcinol, carbazol e *m*-hidroxidifenil (MHD). O método MHD foi o mais sensível e específico na determinação de ácido galacturônico, pois os métodos orcinol e carbazol apresentaram grande interferência de pentoses e hexoses, respectivamente.

Em uma adaptação deste método, Filizetti-Cozzi e Carpita (1991) propuseram a junção do método MHD com a adição de sulfamato (MHDS) para diminuição de interferências (GALAMBOS, 1967). Assim, o protocolo de Filizetti-Cozzi e Carpita (1991) foi escolhido como ponto de partida para realização do presente trabalho.

Primeiramente, o meio de cultura fresco, que não contém PS1 ou ácido galacturônico, foi dialisado e empregado para avaliação da interferência de seus componentes no método, conforme mostra a figura 8.

**Figura 8** - Efeito da adição de sulfamato no método MHD

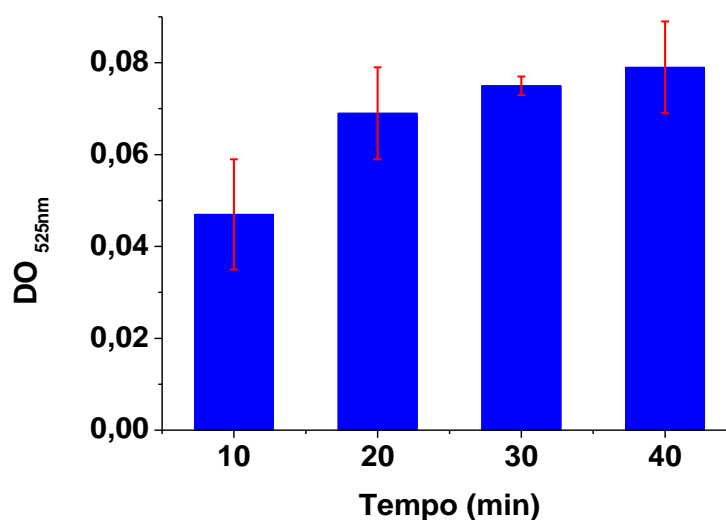


\*amostras do meio de cultura fresco dialisado  
FONTE: (MARTHOS, 2012)

A adição de sulfamato, tal como mostrado anteriormente por Filizetti-Cozzi e Carpita (1991), diminuiu a interferência dos componentes do meio no cromógeno, como mostrou a Figura 8, e foi incorporado ao método.

Em seguida, o tempo ótimo de hidrólise ácida para o PS1 foi determinado. Um teste de comparação de média (ANOVA one-way) foi realizado através do software STATISTICA 8.0 e indicou médias sem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os tempos 20, 30 e 40 minutos. De posse desse resultado, optou-se por 40 minutos como tempo de hidrólise padrão do método MHDS para que fosse garantido a hidrólise máxima de PS1. A Figura 9 mostra o comportamento ascendente da formação de cromógeno MHD-GalA proveniente da hidrólise de PS1 em função do tempo.

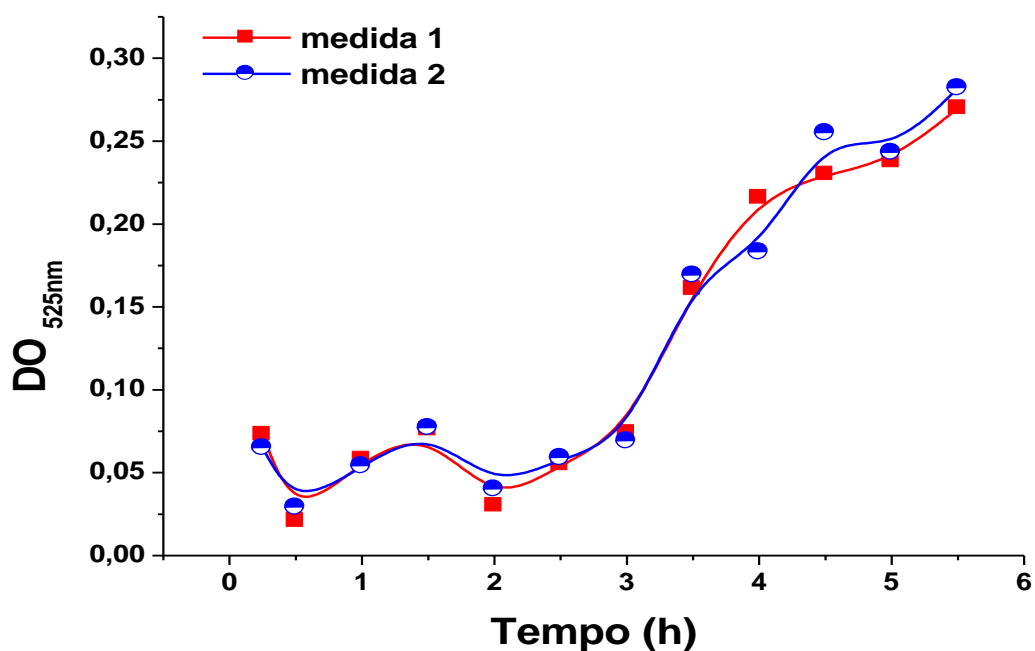
**Figura 9** - Efeito dos diferentes tempos de hidrólise no método MHDS



\*amostras com 10  $\mu\text{g}$  de PS1 (ATCC)  
FONTE: (MARTHOS, 2012)

A reprodutibilidade do MHDS foi então avaliada pela medida de PS1 presente nas amostras dialisadas do sobrenadante do cultivo em reator, como mostra a Figura 10. Uma curva padrão com concentrações conhecidas de ácido galacturônico apresentou excelente correlação ( $R^2=0,98$ ) com a curva padrão realizada com concentrações conhecidas de PS1 puro. O coeficiente angular da reta foi próximo de 1,0 (APÊNDICE A).

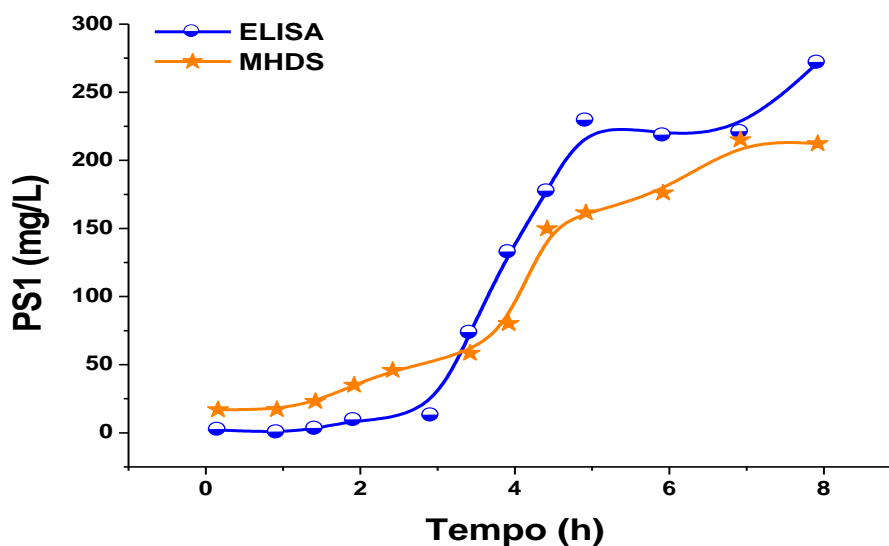
**Figura 10** - Reprodutibilidade do método MHDS para determinação da concentração de PS1



FONTE: (MARTHOS, 2012)

Finalmente, o MHDS foi comparado e validado com um método muito mais específico, o imunoenensaio ELISA de captura. Com ambos os métodos tanto o perfil de produção como a ordem de grandeza das concentrações de PS1 foram os mesmos, o que validou o método MHDS para a determinação da concentração de PS1 e confirmou sua exatidão, conforme mostra a Figura 12.

Tanto o método MHDS quanto o ELISA apresentaram diminuto erro padrão médio, mostrando que ambos foram bastante precisos. O ELISA apresentou maior especificidade e menor detecção de interferentes do meio de cultura fresco. A comparação entre os métodos está apresentada na Tabela 8.

**Figura 11** - Comparação entre o ELISA de captura e o método MHDS

\*Quantificação do PS1 no sobrenadante dialisado de cultivos  
 FONTE: (MARTHOS, 2012)

**Tabela 8** - Comparação entre métodos de quantificação de PS1 em amostras de cultivos de *S. pneumoniae* sorotipo 1

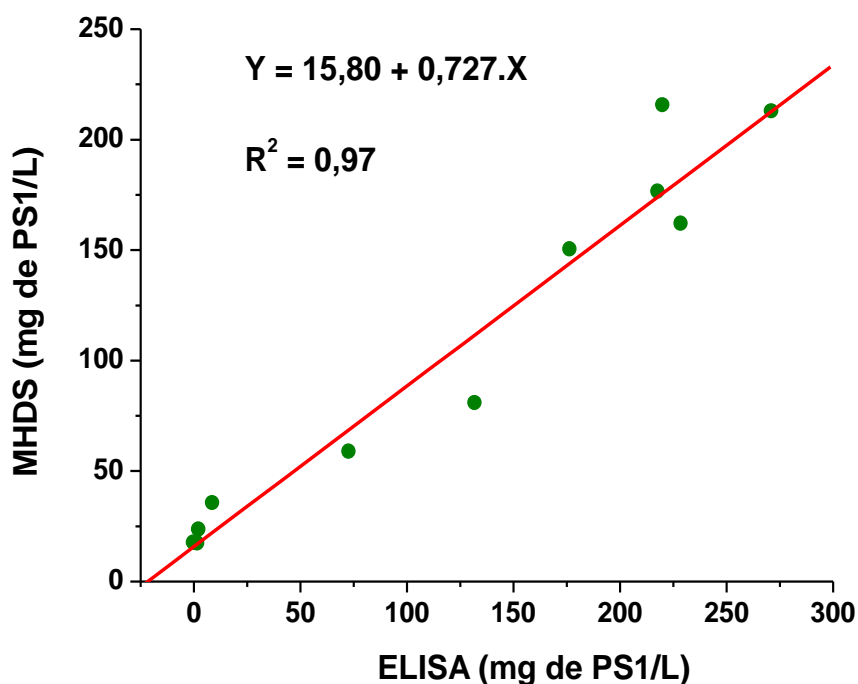
	MHDS	ELISA
Especificidade	Moderada	Alta
Interferentes <sup>a</sup>	10%	1%
Erro padrão médio	± 5,0 mg/L	± 9,0 mg/L
Preparo da amostra	Diálise e centrifugação	---
Volume de amostra	100 µL	100 µL
Tempo de trabalho por amostra	1,8 h	1,8 h
Resíduos	Ácido sulfúrico	OPD
Vantagens	Simplicidade de execução, reagentes baratos e leitura em espectrofotômetro	Método específico e não requer tratamento prévio das amostras
Desvantagens	Reagentes tóxicos, presença de interferentes e requer diálise prévia.	Necessita de um leitor de ELISA, protocolo elaborado, custoso e reagentes tóxicos

<sup>a</sup> Os interferentes foram estimados após medidas de meio de cultura fresco e a porcentagem calculada com relação a maior medida de PS1 obtida neste ensaio.  
 FONTE: (MARTHOS, 2012)



Como apresentado na Tabela 8, ambos os métodos mostraram relativa equivalência nos quesitos: erro padrão, volume de amostra requerido, tempo de trabalho por amostra e resíduos produzidos. Além disso, valendo-se das mesmas medidas mostradas na Figura 12 nota-se que ambos os métodos estão altamente correlacionados ( $R^2 = 0,97$ ).

**Figura 12** - Correlação entre os métodos MHDS e ELISA



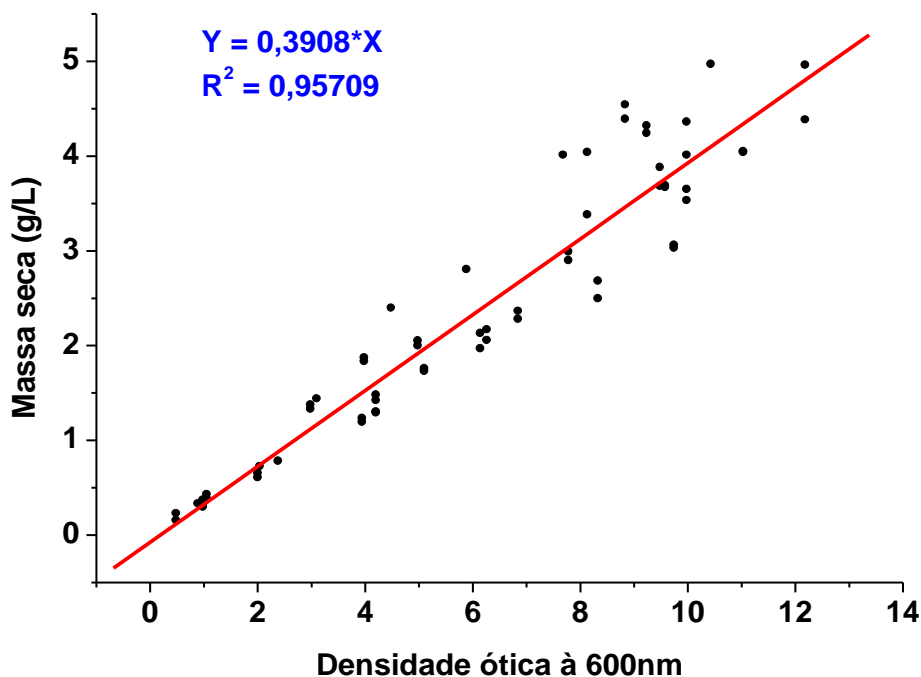
\*Quantificação do polissacarídeo capsular sorotipo 1  
FONTE: (MARTHOS, 2012)

A escolha do método MHDS para determinação de PS1 ocorreu devido, principalmente, a maior simplicidade de execução do protocolo uma vez que o planejamento do presente trabalho previa a dosagem de aproximadamente 300 amostras em duplicatas.

#### 4.2 Conversão da densidade ótica em massa seca

O fator de conversão (FC) foi estimado através da correlação linear de *Pearson* ( $R^2$ ) entre as medidas de DO das suspensões preparadas a partir do caldo fermentado inativado e suas respectivas massas secas (g/L). A curva de calibração está representada na Figura 13. O FC obtido de 0,39 é semelhante ao FC de 0,40 obtido por Liberman et al. (2008) em cultivos de linhagens acapsuladas de pneumococo e de 0,36 obtido por Gogola et al. (2010) para o sorotipo 14 em cultivos descontínuos.

**Figura 13** - Curva de calibração para conversão de DO em massa



seca

\**Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1 cepa ST 595/01

FONTE: (MARTHOS, 2012)

A faixa de leitura no espectrofotômetro variou de 0,04 – 0,4 de unidades de DO, deste modo as amostras dos cultivos foram diluídas para essas faixas.

#### 4.3 Seleção de cepas

#### 4.3.1 Cultivos em frascos

Inicialmente foram inoculados três volumes distintos (10, 25 e 50  $\mu\text{L}$ ) de cada cepa em 50 ml de meio de Casaminoácidos. A viabilidade celular dos estoques congelados apresentou pouca variação entre as cepas. Apenas as cepas ST 1012/01, ST 1079 e a ST 2930/03 apresentaram valores inferiores a  $10^9$  UFC/mL, como mostrado na Tabela 9.

**Tabela 9** - Viabilidade celular dos estoques congelados das nove cepas de *S. pneumoniae* tipo 1

Cepas <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 1	CFU/mL
#ST 1079	$1,03 \times 10^8$
ST 477	$3,69 \times 10^9$
#ST 716/03	$1,11 \times 10^9$
ST 1012/01	$8,5 \times 10^8$
ST 710/03	$2,9 \times 10^9$
ST 714/05	$2,23 \times 10^9$
ST 595/01	$2,39 \times 10^9$
ST 29306/09	$4,25 \times 10^8$
ST 592/03	$1,55 \times 10^9$

# cepas que não apresentaram crescimento significativo em 12 h de cultivo  
 FONTE: (MARTHOS, 2012)

De acordo com as Tabelas 9 e 10, não foi encontrada relação entre o crescimento celular e a quantidade de células viáveis no inóculo (taxa de inóculo) dos cultivos realizados, uma vez que os estoques congelados de todas as cepas, mesmo as duas que não cresceram, apresentaram valores semelhantes de UFC/mL, da ordem de  $10^8$  -  $10^9$  UFC/mL. Ou seja, o volume de inóculo não foi um fator determinante para o crescimento celular, entretanto, notou-se que o aumento do volume de inóculo foi sutilmente acompanhado por um aumento da  $\mu_{\text{máx}}$ , salvo para a cepa ST 595/01. Como esperado, os

períodos de crescimento não mensurável diminuíram com o aumento do volume de inóculo, como mostrado na Tabela 10.

**Tabela 10** - Efeito das três condições de inóculo inicial no crescimento celular em diferentes cepas de *S. pneumoniae* sorotipo 1

Cepa	Volume de inóculo (µL)	Taxa de inóculo (CFU/mL)	#Período de crescimento não mensurável (h)	DO <sub>600nm</sub> máxima	µ <sub>máx</sub> (h <sup>-1</sup> )
ST 1079	10	2,06 . 10 <sup>4</sup>	> 12	-	-
	25	5,15 . 10 <sup>4</sup>	> 12	-	-
	50	1,03 . 10 <sup>5</sup>	> 12	-	-
ST 714/05	10	4,46 . 10 <sup>5</sup>	> 12	-	-
	25	1,12 . 10 <sup>6</sup>	> 12	-	-
	50	2,23 . 10 <sup>6</sup>	> 12	-	-
ST 716/03	10	2,22 . 10 <sup>5</sup>	7	2,71	0,82
	25	5,55 . 10 <sup>5</sup>	6	2,71	0,88
	50	1,11 . 10 <sup>6</sup>	5	2,87	0,90
ST 1012/01	10	1,70 . 10 <sup>5</sup>	7	2,52	0,69
	25	4,25 . 10 <sup>5</sup>	6	2,44	0,72
	50	8,50 . 10 <sup>5</sup>	5	2,47	0,75
ST 477	10	7,38 . 10 <sup>5</sup>	6	1,95	0,50
	25	1,85 . 10 <sup>6</sup>	5	1,98	0,52
	50	3,69 . 10 <sup>6</sup>	5	2,07	0,53
ST 592/03	10	3,10 . 10 <sup>5</sup>	4	2,79	0,71
	25	7,75 . 10 <sup>5</sup>	4	2,79	0,80
	50	1,55 . 10 <sup>6</sup>	3	2,79	0,80
ST 29306/09	10	8,50 . 10 <sup>4</sup>	4,5	3,24	0,80
	25	2,13 . 10 <sup>5</sup>	4	3,04	0,89
	50	4,25 . 10 <sup>5</sup>	4	2,90	1,00
ST 710/03	10	5,80 . 10 <sup>5</sup>	4	4,04	0,82
	25	1,45 . 10 <sup>6</sup>	3,5	3,83	0,94
	50	2,90 . 10 <sup>6</sup>	3	3,73	1,01
ST 595/01	10	4,78 . 10 <sup>5</sup>	4	3,41	1,03
	25	1,20 . 10 <sup>6</sup>	3,5	3,30	0,94
	50	2,39 . 10 <sup>6</sup>	3	2,99	0,74

# intervalo de tempo para que a DO ≥ 0,1

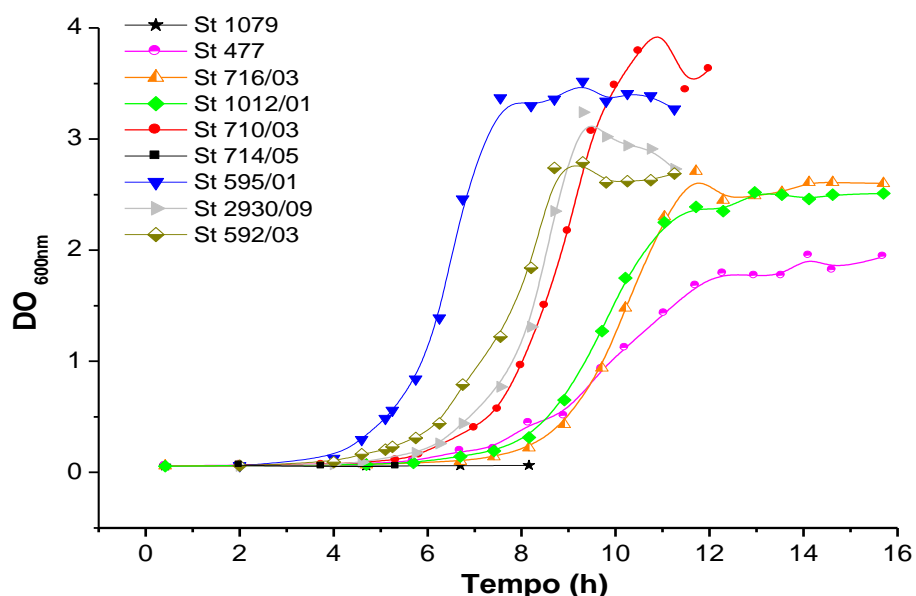
Em azul as cepas selecionadas

FONTE: (MARTHOS, 2012)

Os cultivos foram acompanhados por 12 h para as cepas ST 595/01, ST 710/03, ST 29306/09, ST 592/03 e por 16 h para as demais. As cepas ST 714/05 e ST 1079 não apresentaram crescimento celular em nenhuma das condições, conforme mostram as Figuras 14, 15 e 16, e foram excluídas dos ensaios posteriores (no APÊNDICE B pode-se observar o crescimento celular na escala logarítmica). Para melhor interpretação dos gráficos, as demais cepas podem ser divididas em 3 grupos:

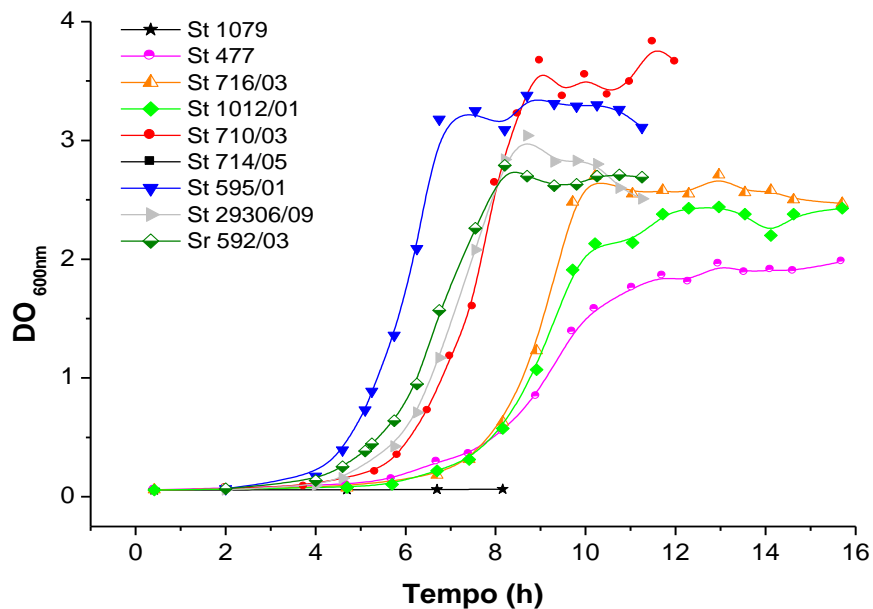
- ST 595/01 e ST 710/03 alcançaram as maiores produção de biomassa mesmo com a menor taxa de inóculo (Figura 14); no entanto ST 595/01 apresentou menor período de fase lag que ST 710/03 (Figuras 14 e 15);
- ST 29306/09 e ST 592/03 apresentaram fase lag e biomassa intermediárias com o menor volume de inóculo (Figura 14), mas igualaram-se às do grupo “a” com o aumento do volume inoculado (Figura 16);
- ST 477, ST 716/03 e ST 1012/01 apresentaram menor biomassa e maior fase lag em todas as condições (Figura. 14, 15 e 16).

**Figura 14** - Crescimento celular das cepas inoculadas com 10  $\mu$ L do estoque



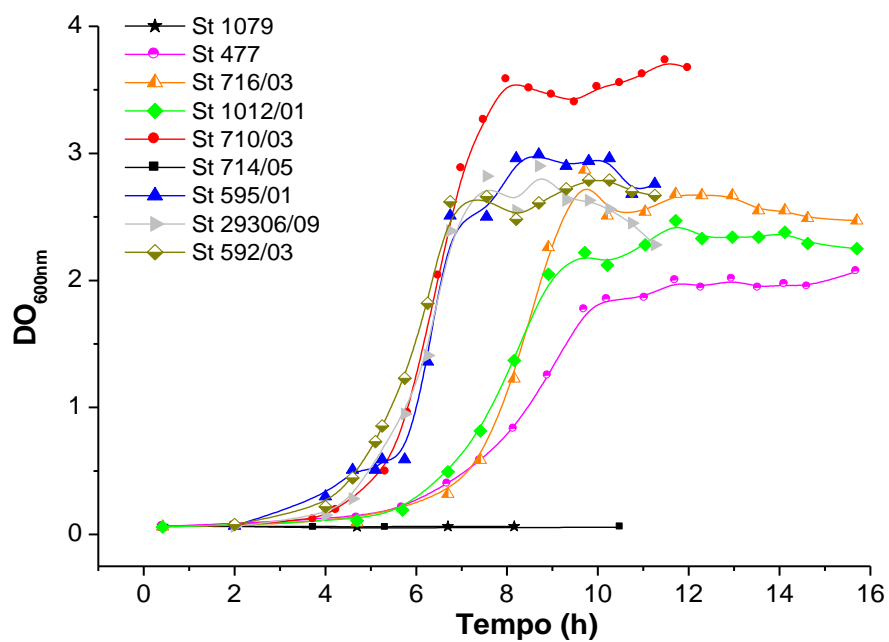
\*Nove cepas de *S. pneumoniae* sorotipo 1 cultivadas em 50 mL de meio  
 FONTE: (MARTHOS, 2012)

**Figura 15** - Crescimento celular das cepas inoculadas com 25  $\mu$ L do estoque



\*Nove cepas de *S. pneumoniae* sorotipo 1 cultivadas em 50 mL de meio  
 FONTE: (MARTHOS, 2012)

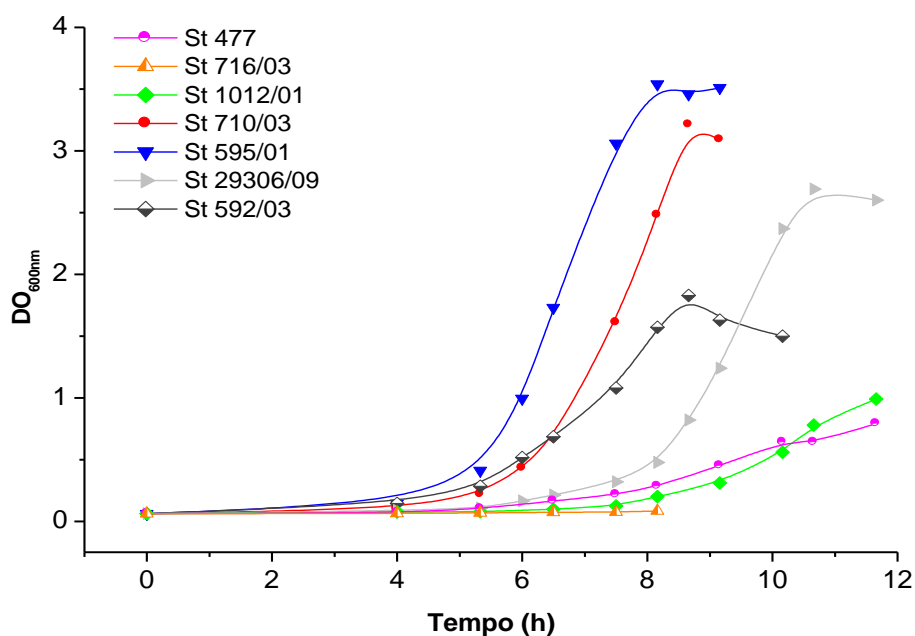
**Figura 16** - Crescimento celular das cepas inoculadas com 50  $\mu$ L do estoque



\*Nove cepas de *S. pneumoniae* sorotipo 1 cultivadas em 50 mL de meio  
 FONTE: (MARTHOS, 2012)

Foi realizado um novo ensaio independente apenas com o volume de inóculo de 50  $\mu$ L, onde as quatro cepas dos grupos “a” e “b” (ST 595/01, ST 710/03, ST 29306/09 e ST 592/03) apresentaram perfis de crescimento semelhantes. Entretanto, as cepas do grupo “c”, ST 1012/01, ST 716/03 e ST 477, apesar de não terem apresentado viabilidade celular discrepante das demais, não apresentaram o mesmo patamar de crescimento celular obtido no primeiro ensaio, como mostrado na Figura 17, e foram excluídas das posteriores análises.

**Figura 17** - Crescimento celular das cepas inoculadas com 50  $\mu$ L do estoque



\*Sete cepas de *S. pneumoniae* sorotipo 1 cultivadas em 50 mL de meio  
 FONTE: (MARTHOS, 2012)

A seleção das cepas ST 595/01 e ST 710/03 para a próxima etapa em biorreator foi baseada na comparação dos resultados das quatro cepas que apresentaram os melhores desempenhos quanto ao crescimento celular e a produção de PS1. Assim, foi verificado que a cepa ST 595/01 apresentou a melhor produção de biomassa (1,17 g/L) e PS1 (130 mg/L), já a cepa ST 710/03 se equiparou a ST 595/01 na produção de biomassa (1,15 g/L) e apresentou produção de PS1 (37 mg/L) inferior às demais, sendo superada

pelas cepas ST 29306/09 (39 mg/L) e ST 592/01 (58 mg/L), conforme mostra a Tabela 11.

**Tabela 11** - Crescimento celular, viabilidade do estoque e produção de PS1 das quatro cepas de desempenho superior

Cepas	DO <i>máx</i>	C <sub>x</sub> <i>máx</i> (g/L)	UFC/mL	PS1 <sub>final</sub> (mg/L)
ST 710/03	3,29±0,4	*1,15	2,90x10 <sup>9</sup>	37
ST 595/01	3,35±0,3	*1,17	2,30x10 <sup>9</sup>	*130
ST 592/03	1,74±0,1	0,61	1,55x10 <sup>9</sup>	58
ST 29306/09	2,81±0,1	0,98	4,25x10 <sup>8</sup>	39

\*Destaque para os pontos máximos de biomassa e PS1 que culminaram com a seleção das cepas ST 710/03 e ST 595/01

FONTE: (MARTHOS, 2012)

Sobre a diferença de produção de PS1 final observado entre as cepas, tal resultado corrobora o trabalho de Sahu et al. (2006), que mostrou que diferentes cepas de um mesmo sorotipo de *S. pneumoniae* podem apresentar variações na quantidade de PS produzido.

A cepa ST595/01 foi selecionada para prosseguir os estudos, mas optou-se por também incluir a cepa ST 710/03 para a fase em biorreatores por três motivos:

- esta cepa apresentou produção de biomassa semelhante a ST 595/01 e superior a ST 592/03 e ST 29306/09, cerca de 90 e 20% respectivamente;
- apesar da cepa ST 710/03 ter apresentado produção de PS1 inferior a ST 592/03 e ST 29306/09, em 5% e 56% respectivamente, optou-se em dar maior peso à produção de biomassa e verificar na próxima etapa seu desempenho de produção de PS1 em biorreator, uma vez que a produção de PS de pneumococo parece estar associada ao crescimento celular (GOGOLA et al., 2010);
- as cepas ST 710/03 e ST 29306/09 apresentaram produção de biomassa e PS1 semelhantes, no entanto a cepa ST 29306/09 apresentou fase lag demasiadamente longa, como mostra a Figura 17, levando à opção pela primeira.



#### 4.3.2 Cultivos em biorreator para seleção da melhor cepa produtora

As cepas selecionadas nos cultivos em frascos foram submetidas ao teste final em biorreator. Os cultivos foram acompanhados por 5 h e 30 min para ST 595/01 e 7,0 h para ST 710/03. Com relação ao crescimento celular, como mostrado na Figura 18, ambas as cepas apresentaram perfis semelhantes entre 0 – 2 h e 30 min, intervalo no qual as cepas ST 595/01 e ST 710/03 apresentaram  $\mu_{\text{máx}} = 1,36 \text{ h}^{-1}$  e  $1,41 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Após 3,0 h a cepa ST 595/01 entrou em fase estacionária e ST 710/03 apresentou perfil de crescimento linear com  $\dot{\mu} = 0,27 \text{ h}^{-1}$ . Com relação à produção de PS1, os perfis se mostraram díspares. A cepa ST 595/01 apresentou elevada produção de PS1 quando comparada com a ST 710/03, estabelecendo concentração máxima de PS1 em 90 mg/L contra 44 mg/L da cepa ST 710/03, como mostra a Tabela 12.

As cepas ST 710/03 e ST 595/03 atingiram  $\text{DO}_{\text{máx}} = 6,44$  e  $5,52$ , respectivamente, como mostra a Tabela 12.

**Tabela 12** - Comparação entre o cultivo das cepas de *S. pneumoniae* sorotipo 1 para produção do PS capsular

Cepa	$\mu_{\text{máx}}$	$\text{DO}_{\text{máx}}$	$\text{PS1}_{\text{máx}}$ mg/L	$P_{\text{esp}}$ mg PS1 / g cél	$Y_{x/s}$ g cél / g glic
ST 595/01	1,36	5,52	90	52	0,79
ST 710/03	1,41	6,44	44	24	0,76

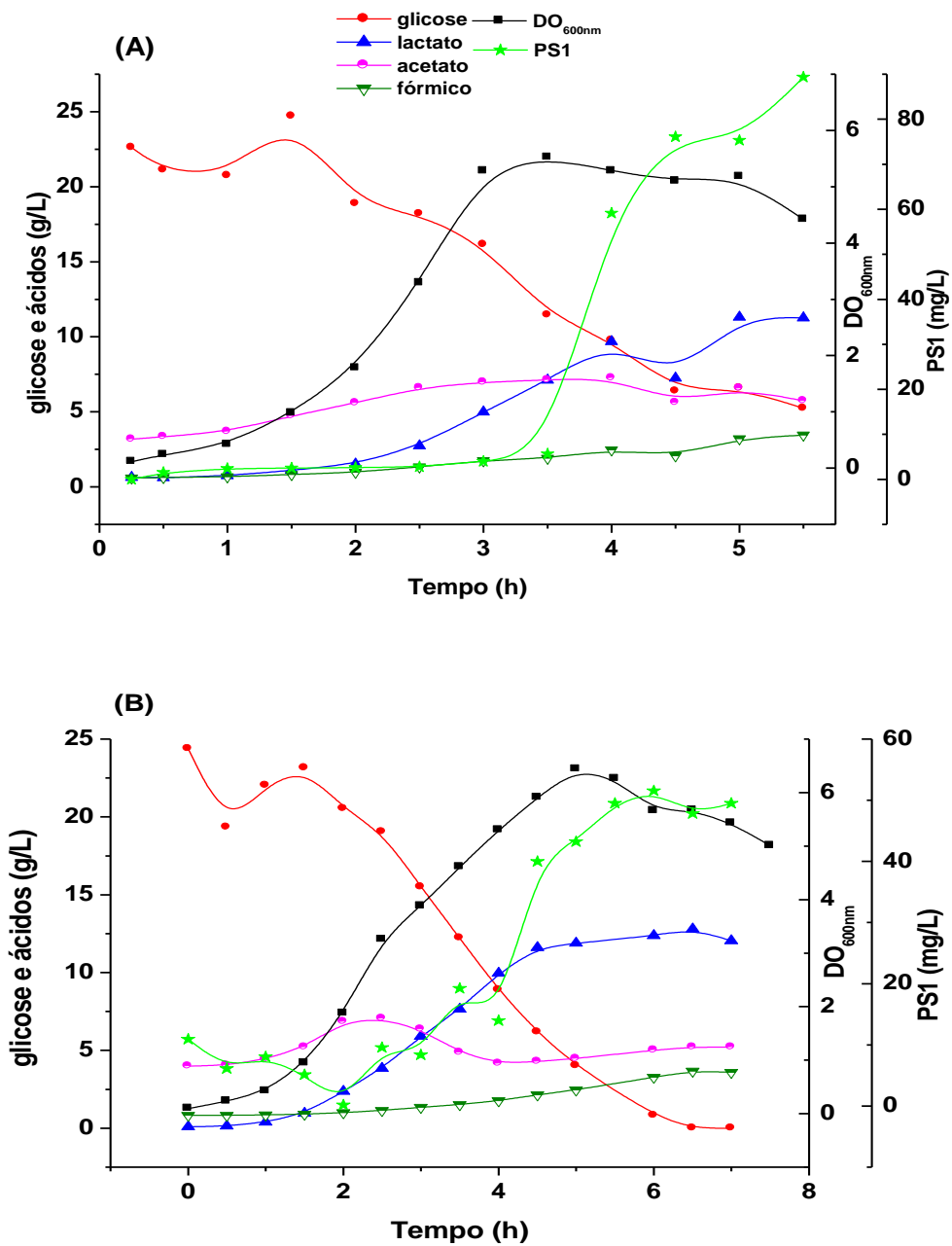
FONTE: (MARTHOS, 2012)

Os perfis de crescimento celular, produção de ácidos orgânicos, concentração de glicose residual e produção de PS1 são apresentados na Figura 18, onde pode-se observar que o PS1 foi liberado para o sobrenadante da cultura sobretudo na fase estacionária.

A concentração de glicose permaneceu inalterada (platô) entre 0 – 1 h e 30 min de cultivo devido principalmente ao incipiente crescimento celular. Quando a fase exponencial de crescimento celular iniciou-se, entre 1h e 30 min – 3 h aconteceu concomitantemente a diminuição da concentração de glicose, constatando-a como fonte de carbono principal para ambas as cepas. Lactato,

acetato e formiato foram os principais catabólitos observados para ambas as cepas.

**Figura 18** – Perfis cinéticos de cultivos de *S. pneumoniae* em biorreator de 5L



(A) cepa ST 595/01 e (B) cepa ST 710/03  
 FONTE:(MARTHOS,2012)

Como mostrado na Figura 18, a cepa ST 595/01 iniciou a produção de PS1 quando o crescimento celular praticamente cessou. Ou seja, o polissacarídeo capsular pôde ser detectado no sobrenadante assim que a fase estacionária foi atingida. Já a cepa ST 710/03 apresentou perfil de produção de PS1 diferenciado, pois a liberação de polissacarídeo capsular ocorreu de forma concomitante com o crescimento celular, acompanhando-o. Ainda para a cepa ST 710/03 notou-se que o crescimento celular apresentou duas fases distintas: uma fase exponencial entre 0 – 2 h e 30 min e uma fase linear entre 2 h e 30 min – 4 h e 30 min. Tal fato sugere um estado de limitação nutricional: a fonte de carbono foi prontamente descartada, pois a concentração de glicose residual (19,0 g/L) medida em 2 h e 30 min está acima dos 15 g/L sugerido por Gogola et al. (2010) para não limitação pelo substrato para o sorotipo 14.

Assim, verifica-se a necessidade de mais estudos direcionados para a cinética de consumo dos nutrientes fornecidos pelos meios de cultura complexos (como aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento e outros carboidratos), pois uma série de esclarecimentos a esse respeito permanece desconhecida.

#### 4.4 Escolha da peptona

Cultivos em duplicata foram realizados com a cepa selecionada, ST 595/01, empregando meios de cultura contendo as peptonas Soytone, Phytone e Casaminoácidos. Os experimentos contendo Soytone e Phytone apresentaram  $\mu_{m\acute{a}x} = 1,17 \text{ h}^{-1}$  e Casaminoácidos  $\mu_{m\acute{a}x} = 1,35 \text{ h}^{-1}$ . Para as três peptonas obteve-se uma  $DO_{m\acute{a}x}$  semelhante por volta de 4 h de cultivo, produzindo aproximadamente 4,4 g/L de biomassa, como mostra a Tabela 12.

Esses elevados valores, comparados com a literatura, podem estar relacionados com a maior formação de ácido acético do que o verificado para outros sorotipos de pneumococo (Carmo et al., 2008; Gogola et al., 2010 ; Liberman et al., 2008), uma vez que a produção de acetato rende um ATP a mais que a de ácido láctico.

Yelsilkaya et al. (2009) argumenta que linhagens de *Streptococcus pneumoniae* D39 realizaram fermentação homolática em presença exclusiva de glicose com fonte de carbono e a fermentação ácido mista (lactato, acetato,

formiato e etanol) em presença de galactose. Dentro deste cenário, é importante dar luz a composição nutricional do habitat natural deste patógeno: o trato respiratório. Segundo Sheehan et al. (1995) o tecido humano, onde se aloca o patógeno, é limitado em glicose e rico em glicoproteínas com O- e N-glicosilações com monossacarídeos, dentre eles a galactose. Deste modo, sugere-se que os cultivos com Phytone e Soytone tenham apresentado maior crescimento celular que o cultivo com Casaminoácidos, conforme mostra a Tabela 13, devido à presença carboidratos diferentes da glicose em sua composição. Assim esses carboidratos, apesar de não identificados pelo fabricante, poderiam simular um habitat nutricional mais semelhante ao habitat natural do pneumococo, propiciando um ambiente favorável à fermentação ácido mista, de maneira semelhante à verificada por Yelsilkaya et al. (2009) em cultivos com galactose em meio CDM.

**Tabela 13** - Média e desvio dos principais resultados dos cultivos de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1 com diferentes peptonas

	$C_x \text{ máx}$ g/L	$\mu \text{ máx}$ $\text{h}^{-1}$	$C_{\text{Lac}} \text{ máx}$ g/L	$C_{\text{Ace}} \text{ máx}$ g/L	$C_{\text{For}} \text{ máx}$ g/L	$Y_{X/S}$ $\frac{\text{g}_{\text{célula}}}{\text{g}_{\text{glicose}}}$	$C_{\text{PS1}} \text{ máx}$ mg/L
<b>Phytone</b>	4,38±0,3	1,17±0,02	19,8±1,0	18,0±2,0	4,19±0,1	0,20±0,01	254±5 <sup>#</sup>
<b>Soytone</b>	4,32±0,1	1,17±0,01	14,0±0,5	14,5±1,0	3,82±0,3	0,18±0,01	223±14
<b>Caseína</b>	4,30±0,3	1,28±0,1	14,1±0,3	11,8±1,8	2,00±0,1	0,19±0,02	157±9

# PS1<sub>max</sub> foi 298 mg/L em 7 h para um dos experimentos, mas a média foi feita com o valor de 6 h, pois o último ponto da duplicata não pôde ser medido  
 FONTE: (MARTHOS, 2012)

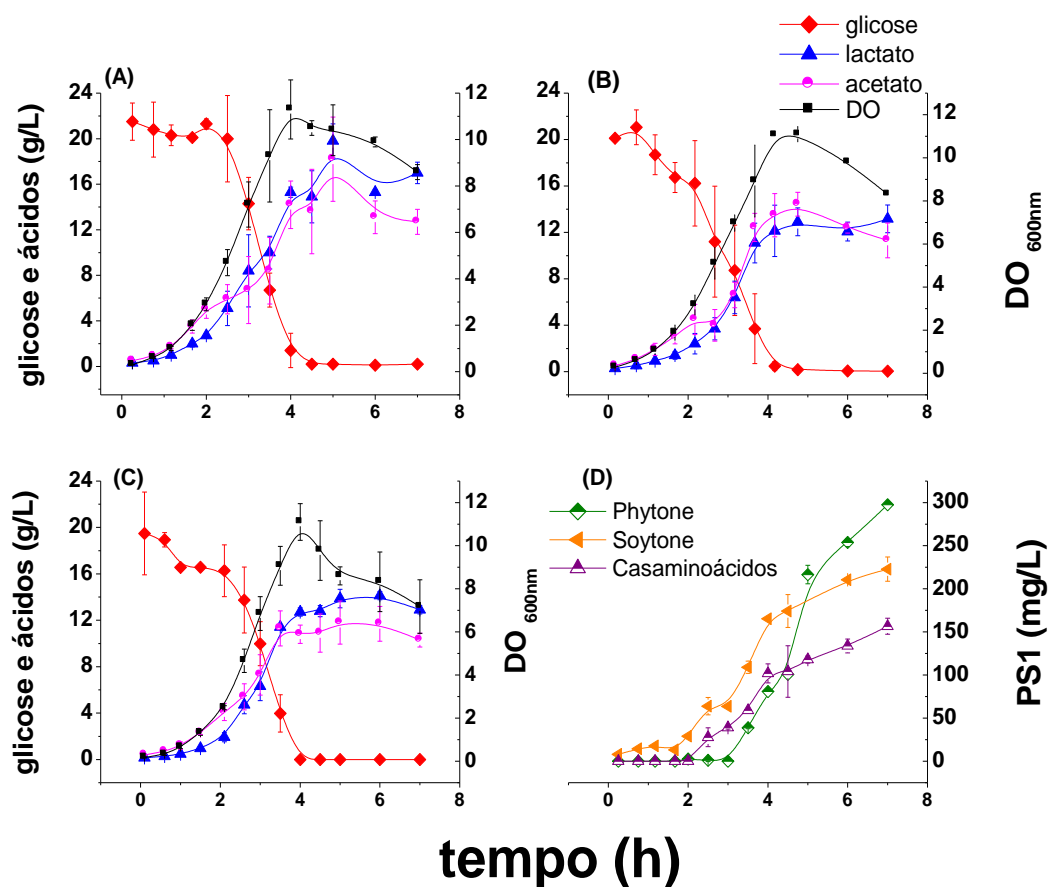
Como esperado, a conversão de substrato a células foi baixa e não variou muito entre os cultivos (Tabela 13). Isto se deve ao fato de que o pneumococo apresenta metabolismo restrito à fosforilação de ATP ao nível do substrato, ou seja, o baixo rendimento entre a biomassa formada por grama de glicose fornecida é inerente a sua rota metabólica central de obtenção de energia, cujos produtos principais são o lactato e o acetato, como mostra a Figura 19. O período de fase exponencial foi muito semelhante para todos os ensaios, ocorrendo entre 0 – 3 h para Casaminoácidos e 0 – 2 h e 30 min para Phytone e Soytone. Após esse período, verificou-se uma fase de crescimento linear de 1 h e 30 min a 2 h de duração, seguida pela fase de declínio celular

para todos os cultivos. O final da fase exponencial não é concomitante, nos três diferentes ensaios, com o período de esgotamento da glicose disponível no meio, pois em 3 h de cultivo a concentração deste substrato ficou entre 14 – 10 g/L. Esta observação, conforme mostra a Figura 19, sugere duas hipóteses:

- possível limitação do crescimento celular por algum nutriente esgotado do meio de cultura que não foi medido, como vitaminas do complexo B ou fatores de crescimento como a colina;
- possível inibição do crescimento celular pelos produtos lactato e acetato, uma vez que, com aproximadamente 3 h de cultivo, a concentração de ambos está ao redor de 8,0 g/L para as três peptonas testadas.

A produção de PS1 em todos os cultivos prosseguiu mesmo após o esgotamento da glicose, porém com uma velocidade menor a partir de 4 h nos cultivos com Soytone e Casaminoácidos e a partir de 5 h com Phytone (Figura 19 D). Como o PS1 foi medido no sobrenadante da cultura, este fenômeno poderia estar relacionado com uma cinética de produção parcialmente associada ao crescimento ou com a liberação do PS1 para o sobrenadante, uma vez que esta fase coincide com a fase de declínio celular.

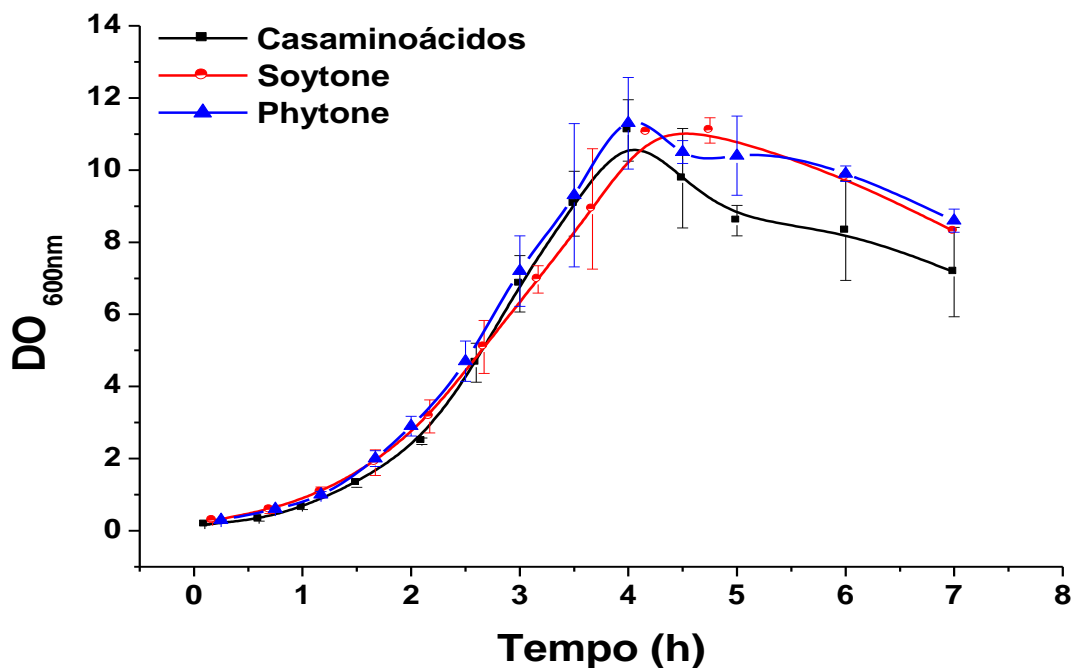
**Figura 19** – Cultivo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1 em diferentes meios de cultura



Consumo de glicose e produção de biomassa, lactato e acetato em cultivo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1 cepa ST 595/01 em meios com Phytone (A), Soytone (B) e Casaminoácidos (C). Em (D) a comparação da produção de PS1 entre os meios com as diferentes peptonas. Média e desvio padrão das duplicatas.  
 FONTE: (MARTHOS, 2012)

A produção dos principais ácidos orgânicos, lactato e acetato, mostraram perfis semelhantes entre os cultivos, alcançando maiores valores para Phytone e Soytone, respectivamente 19,8 g/L e 18,0 g/L. De um modo geral, as três curvas de crescimento celular também apresentaram perfis semelhantes, não demonstrando períodos de fase lag nem lise celular acentuada após a fase estacionária, como mostra a Figura 20.

**Figura 20** - Crescimento celular de *S. pneumoniae* em meios com diferentes peptonas



Comparação das curvas de crescimento celular da cepa ST 595/01 em meio de cultura com diferentes peptonas. Média e desvio padrão das duplicatas são apresentados.  
 FONTE: (MARTHOS, 2012)

O Phytone foi a peptona que mais favoreceu a produção de PS1, alcançando uma concentração máxima de 298 mg/L de PS1, sendo cerca de 25% superior ao Soytone e duas vezes maior que o Casaminoácidos. As diferentes quantidades de carboidratos totais entre as peptonas testadas: 394 mg/g no Phytone, 293 mg/g no Soytone e ausentes no Casaminoácidos, podem estar relacionadas com as distintas concentrações máximas de lactato e acetato alcançadas (Tabela 13). Do mesmo modo, a produção absoluta e específica máxima de PS1 foi superior em Phytone e Soytone quando comparados com Casaminoácidos (Tabela 14).

**Tabela 14** - Máxima produção de PS1 entre os cultivos de *S. pneumoniae* sorotipo 1 com meios contendo diferentes peptonas

	$C_{PS1 \text{ máx}}$ mg/L	$P_{PS1 \text{ máx espec}}$ mg de PS1 / g de cél
Phytone	254±5 <sup>#</sup>	76 ± 14,8
Soytone	223±14	69 ± 4,2
Casaminoácidos	157±9	57 ± 6,3

#  $PS1_{\text{max}}$  foi 298 mg/L em 7 h para um dos ensaios, mas a média foi feita com o valor de 6 h, pois o último ponto da duplicata não pôde ser medido. Em cor azul a peptona escolhida.

FONTE: (MARTHOS, 2012)

A produção de PS1 em meio com Phytone foi cerca de 9 vezes maior que a alcançada por Kim et al. (1996) para o sorotipo 1 em frascos, cerca de 15% maior que a alcançada por Sheng-De et al. (2009) após otimização de condições como pH, agitação e suplementação de glicose para produção de PS do sorotipo 3 e similar às obtidas para os PS dos sorotipos 6B (CARMO, 2010), 23F (GONÇALVES, 2002) e 14 (GOGOLA, 2010).

O Phytone foi a peptona escolhida para compor o meio de cultura na próxima etapa, pois apresentou a maior produção de PS1 ao final do cultivo. Além disso, o Phytone, por ser integralmente de origem vegetal, não possui restrições para produção de produtos injetáveis. Os “setpoints” do controle de pH, agitação, temperatura e fluxo de nitrogênio gasoso (CARMO, 2009; LIBERMAN, XXX; GONÇALVES, 2002) também mostraram-se adequados para o cultivo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1.

#### 4.4.1 Balanço de massa estequiométrico da escolha da peptona

Quando se comparam os fatores de conversão observados (Tabela 15), logo se observa que a glicose fornecida não supre totalmente a produção de ácidos orgânicos, pois os valores obtidos são superiores ao máximo teórico, ou seja, cada grama de glicose poderia ser convertida em, no máximo, 1,0 g de ácido láctico, resultando em um fator de conversão ( $Y_{\text{Lac/S}}$ ) igual a 1,0. Da mesma maneira, o fator de conversão máximo teórico de glicose para acetato ( $Y_{\text{Ace/S}}$ ) seria 0,67. Em outras palavras, se de 1,0 g/L de glicose formou 0,92 g/L de lactato (Tabela 15, Phytone), restariam apenas 0,08 g/L de glicose para



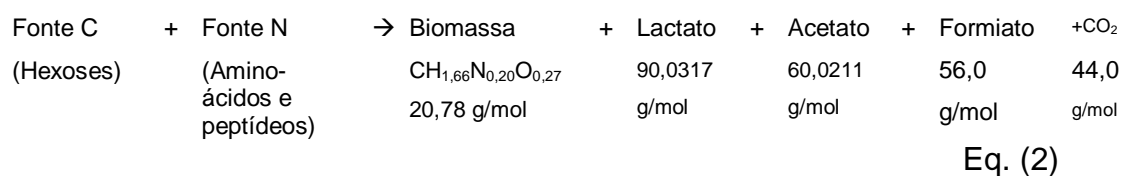
produzir todo acetato formado, que neste caso seria de apenas 0,05 g/L, o que não se verificou no experimento, onde aproximadamente 16 g/L de acetato foram produzidos (Figura 19 A).

**Tabela 15** - Médias e desvios padrão dos fatores de conversão resultantes de cultivos com *S. pneumoniae* sorotipo 1

	$Y_{Lac/S}$ (g <sub>Lactato</sub> / g <sub>glicose</sub> )	$Y_{Ace/S}$ (g <sub>Acetato</sub> / g <sub>glicose</sub> )
<b>Phytone</b>	0,92 ± 0,14	0,56 ± 0,14
<b>Soytone</b>	0,65 ± 0,07	0,49 ± 0,02
<b>Caseína</b>	0,73 ± 0,10	0,40 ± 0,001

FONTE: (MARTHOS, 2012)

Uma análise estequiométrica foi feita para calcular quanto carbono estaria sendo consumido para gerar os ácidos orgânicos e quanto nitrogênio estaria sendo direcionado para formação de biomassa nos experimentos para escolha da peptona. Tomou-se como ponto de partida a soma dos ácidos formados para calcular a quantidade teórica de hexoses necessária e a concentração de biomassa para calcular a demanda de nitrogênio de acordo com a Equação 2.



A fórmula molecular da biomassa foi estimada por Doran (2000) com peso molecular de 20,78 g/mol e 8% de cinzas. Sabe-se que as produções máximas de lactato, acetato e biomassa, em mols/L, foram (Tabela 16):

**Tabela 16** - Produção de máxima alcançada de biomassa, acetato e lactato em cultivos de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1

	$C_x$ Máx mols/L	$C_{Lac}$ Máx mols/L	$C_{Ace}$ Máx mols/L	$C_{For}$ Máx mols/L
<b>Phytone</b>	0,21±0,014	0,21±0,01	0,30±0,03	0,09±0,002
<b>Soytone</b>	0,20±0,005	0,16±0,006	0,24±0,01	0,08±0,006
<b>Caseína</b>	0,20±0,014	0,15±0,003	0,19±0,03	0,04±0,002

FONTE: (MARTHOS, 2012)

#### 4.4.1.1 Balanço de carbono para produção de ácidos orgânicos

Supondo que todo carboidrato oriundo do EL e das peptonas seria hexose ( $C_6H_{12}O_6$ ), podemos considerar que as composições dos meios de cultura forneceram, conforme mostram a Tabela 17 (APÊNDICE D), as seguintes quantidades de hexoses.

**Tabela 17** - Concentração de carboidratos totais fornecidos pelos meios de cultura com diferentes peptonas

	Concentração de hexoses oriundas de:					
	Phytone		Soytone		Casaminoácidos	
	g/L	mols/L	g/L	mols/L	g/L	mols/L
<b>Glicose</b>	20,0	0,111	20,0	0,111	20,0	0,111
<b>EL</b>	2,16	0,012	2,16	0,012	2,16	0,012
<b>Peptona</b>	11,79	0,066	8,78	0,048	-	-
<b>Total</b>	<b>33,95</b>	<b>0,189</b>	<b>30,94</b>	<b>0,171</b>	<b>22,16</b>	<b>0,123</b>

FONTE: (MARTHOS, 2012)

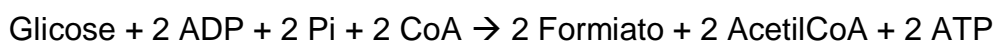
Considerando as reações simplificadas de formação de acetato e lactato, conforme mostra as Equações 3, 4 e 5, temos:



$$180,0634 \text{ g} \text{ ----- } 2 \times 90,0317 \text{ g}$$

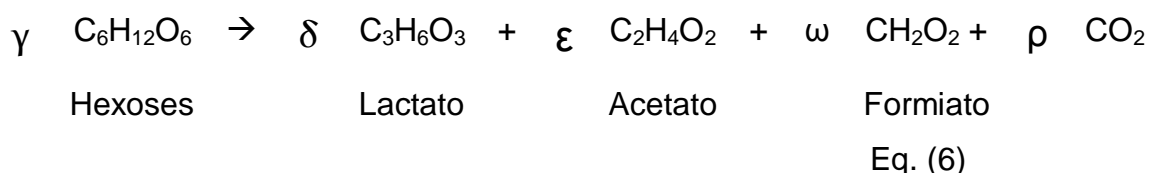


$$180,0634 \text{ g} \text{ ----- } 2 \times 60,0211 \text{ g} \text{ ----- } 2 \times 44 \text{ g}$$



$$180,0634 \text{ g} \text{ ----- } 2 \times 46,0254 \text{ g} \quad \text{Eq. (5)}$$

Supondo que os carboidratos presentes no extrato de levedura e na peptona são provavelmente dissacarídeos ou oligossacarídeos não identificados nos cromatogramas por HPLC e que entrariam na célula através de transportadores de açúcares específicos, nos quais o pneumococo é bastante rico (BIDOSSI et al., 2012); supondo ainda que o pneumococo realize as vias fermentativas exclusivamente a partir de carboidratos, que aminoácidos e peptídeos provenientes das peptonas e extrato de levedura não sejam usados para formação de ácidos e, portanto, que todo lactato, acetato e formiato (Tabela 16) fossem provenientes apenas dos carboidratos fornecidos, aqui considerados como hexoses e que o número de mols produzidos de CO<sub>2</sub> tenha sido igual ao de acetato (Equação 4), observaríamos o seguinte cenário (Equação 6):



Onde, substituindo os coeficientes  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  e  $\omega$  do Quadro 1 pelos valores mostrados na Tabela 16, temos:

**Quadro 1** - Coeficientes estequiométricos para o balanço de carbono

	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$	$\omega$
<b>Phytone</b>	$\gamma_{Phy}$	0,21	0,30	0,09
<b>Soytone</b>	$\gamma_{Soy}$	0,16	0,24	0,08
<b>Casaminoácidos</b>	$\gamma_{Cas}$	0,15	0,19	0,04

Deste modo, verifica-se que o balanço referente apenas aos átomos de carbono (balanço de C) para a Equação 6 resulta em:

- **Phytone**

$$6C * \gamma_{Phy} = 0,21 * 3C + 0,30 * 2C + 0,09 * 1C + 0,30 * 1C \quad ;$$

Resolvendo a equação chegamos em  $\gamma_{Phy} = 0,27$  mols de hexoses

- **Soytone**

$$6C * \gamma_{Soy} = 0,16 * 3C + 0,24 * 2C + 0,08 * 1C + 0,24 * 1C \quad ;$$

Resolvendo a equação chegamos em  $\gamma_{Soy} = 0,21$  mols de hexoses

- **Casaminoácidos**

$$6C * \gamma_{Cas} = 0,15 * 3C + 0,19 * 2C + 0,04 * 1C + 0,19 * 1C \quad ;$$

Resolvendo a equação chegamos em  $\gamma_{Cas} = 0,18$  mols de hexoses

A comparação da quantidade de hexoses fornecida pelos meios de cultura com a quantidade calculada pelas Equações 3, 4 e 5 está mostrada na Tabela 18.

**Tabela 18** – Quantidades de hexose fornecidas pelo meio de cultura e quantidades calculadas pelo balanço estequiométrico

	Hexose calculada pelo balanço		Hexose fornecida pelo meio		$R_{(F/B)}^C$ <sup>a</sup>
	mols/L	g/L <sup>b</sup>	mols/L <sup>c</sup>	g/L <sup>b</sup>	
<b>Phytone</b>	0,27	48,61	0,189	33,95	0,70
<b>Soytone</b>	0,21	37,81	0,171	30,94	0,82
<b>Casaminoácidos</b>	0,18	32,41	0,123	22,16	0,68

<sup>a</sup> Razão entre hexose fornecida e hexose calculada pelo balanço estequiométrico necessária para produção dos ácidos formados; <sup>b</sup> valores em g/L foram obtidos após multiplicação da concentração mol/L por 180,0634 (peso molecular das hexoses); <sup>c</sup> valores calculados na Tabela 17.

FORNE: (MARTHOS, 2012)

Quando  $R_{(F/B)} = 1$  entende-se que todos os ácidos foram formados a partir das hexoses fornecidas, quando  $R_{(F/B)} < 1$  o balanço estequiométrico indica que as quantidades de hexoses fornecidas não supriram as quantidades de ácidos formadas e quando  $R_{(F/B)} > 1$  o balanço estequiométrico indica que as quantidades de hexoses fornecidas estão em excesso em relação às quantidades de ácidos formadas. O valor de  $R_{(F/B)}^C$  foi extremamente semelhante para qualquer que fosse a peptona em questão. Portanto, de acordo com o balanço de carbono, verifica-se claramente que o microrganismo utilizou outros componentes como fontes de carbono, além das hexoses fornecidas pela adição de glicose, EL e peptona para suprir o metabolismo central.

#### 4.4.1.2 Balanço de nitrogênio para produção de biomassa

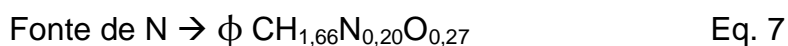
Considerando as composições das peptonas e do extrato de levedura nos meios de cultura empregados, temos as quantidades de nitrogênio mostradas na Tabela 19.

**Tabela 19** - Concentração de nitrogênio total fornecido pelos meios de cultura com diferentes peptonas

Concentração de nitrogênio total oriundos de:						
	Phytone		Soytone		Casaminoácidos	
	g/L	mols/L	g/L	mols/L	g/L	mols/L
<b>EL</b>	2,14	0,153	2,14	0,153	2,14	0,153
<b>Peptona</b>	2,70	0,193	2,82	0,200	3,24	0,231
<b>Total</b>	<b>4,84</b>	<b>0,346</b>	<b>4,96</b>	<b>0,353</b>	<b>5,38</b>	<b>0,384</b>

FORNTE: (MARTHOS, 2012)

Considerando ainda que toda a fonte de nitrogênio foi utilizada e assimilada para formação da biomassa, podemos assumir conforme mostra a Equação 7 que:



Onde, de acordo com a Tabela 16 ( $C_x \text{ máx}$ ), temos:

$$\phi_{\text{Phy}} = 0,21 \text{ mols}; \phi_{\text{Soy}} = 0,20 \text{ mols} \text{ e } \phi_{\text{Cas}} = 0,20 \text{ mols}$$

Uma vez que para cada átomo de carbono da biomassa teríamos 0,20 átomos de nitrogênio (Equação 7) e considerando o peso molecular de N = 14 g/mol, seriam requeridos para obtenção da máxima concentração de biomassa alcançada em cada cultivo:

- $\phi_{\text{Phy}} = 0,21 * 0,20 = 0,042$  mols de N/L
  - $\phi_{\text{Soy}} = 0,20 * 0,20 = 0,04$  mols de N/L
  - $\phi_{\text{Cas}} = 0,20 * 0,20 = 0,04$  mols de N/L
- em g/L, temos:
- $\phi_{\text{Phy}} = 0,042 * 14 = 0,588$  g de N/L
  - $\phi_{\text{Soy}} = 0,04 * 14 = 0,56$  g de N/L
  - $\phi_{\text{Cas}} = 0,04 * 14 = 0,56$  g de N/L

Ou seja, ao se comparar as quantidades de nitrogênio obtido através formação de biomassa com as quantidades realmente fornecidas pelo meio de

cultura, conforme mostra a Tabela 20, notou-se que as fontes de nitrogênio estariam, certamente, em excesso.

**Tabela 20** - Quantidades de nitrogênio fornecidas pelo meio de cultura e quantidades calculadas pelo balanço estequiométrico

	Nitrogênio calculado pelo balanço		Nitrogênio fornecido		$R^N_{(F/B)}^a$
	mols/L	g/L <sup>b</sup>	mols/L <sup>c</sup>	g/L <sup>b</sup>	
<b>Phytone</b>	0,042	0,588	0,346	4,84	8,23
<b>Soytone</b>	0,04	0,56	0,353	4,96	8,86
<b>Casaminoácidos</b>	0,04	0,56	0,384	5,38	9,61

<sup>a</sup> Razão entre nitrogênio fornecido e nitrogênio calculado pelo balanço necessário para produção da biomassa formada; <sup>b</sup> valores em g/L foram obtidos após multiplicação da concentração mol/L por 14,0; <sup>c</sup> valores calculados como mostrado na Tabela 19.

Fonte: (MARTHOS, 2012)

Portanto, de posse desses achados e vislumbrando a produção do PS1, faz-se presente a necessidade de mais estudos empíricos capazes de balancear as concentrações de peptona, glicose, aminoácidos e extrato de levedura quanto ao suprimento de carbono e nitrogênio ao *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1.

#### 4.5 Delineamento fatorial fracionado ( $2^{4-1}$ )

Doze ensaios foram planejados e executados seguindo o modelo proposto por Rodrigues e lemma (2009) para avaliar os efeitos de extrato de levedura (EL), Phytone, L-asparagina (Asn) e L-glutamina (Gln) no cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 1. Um dos objetivos deste planejamento foi investigar se Asn e Gln poderiam ser retirados da composição do meio de cultura sem prejuízo da produção de PS1, uma vez que EL contém Asn (12,0 mg/g) e Gln (3,0 mg/g) em sua composição e o Phytone possui 1,0 mg/g de Asn. Além disso, seria desejável reduzir as concentrações de EL e Phytone, pois estes são os componentes mais caros do meio de cultura e, como mostrado na seção 4.4.1, há excesso de nitrogênio no meio.

Todos os experimentos foram acompanhados por 4 h após o pico de biomassa ou início da fase estacionária (APÊNDICE C). Os dados obtidos foram analisados em duas etapas, tal como descrito a seguir.

#### 4.5.1 Efeitos na produção de biomassa, PS1 e ácidos orgânicos

O efeito principal de um determinado fator “A” pode ser entendido como a variação causada na resposta quando percorremos todos os níveis de “A” (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Deste modo, conforme mostrado na Tabela 21, os efeitos do EL, Phy, Asn e Gln sobre a concentração máxima de biomassa ( $C_x$ ), PS1 ( $C_{PS1}$ ), lactato ( $C_{lac}$ ) e acetato ( $C_{ace}$ ) podem ser analisados.

**Tabela 21** - Análise de significância estatística dos efeitos das variáveis independentes

Variáveis independentes	Variáveis dependentes	Efeitos	Erro padrão	p-valor (p<0,10)
<b>Extrato de levedura</b>	$C_x$	0,73	0,19	0,0303
	$C_{PS1}$	12,50	21,94	0,6087
	$C_{lac}$	-2,37	0,61	0,0304
	$C_{ace}$	-2,98	0,58	0,0146
<b>Phytone</b>	$C_x$	2,21	0,19	0,0013
	$C_{PS1}$	83,50	21,94	0,0318
	$C_{lac}$	4,89	0,61	0,0040
	$C_{ace}$	8,11	0,58	0,0008
<b>Asparagina</b>	$C_x$	-0,08	0,19	0,6942
	$C_{PS1}$	32,00	21,94	0,2408
	$C_{lac}$	0,76	0,61	0,3026
	$C_{ace}$	1,66	0,58	0,0656
<b>Glutamina</b>	$C_x$	0,43	0,19	0,1059
	$C_{PS1}$	25,00	21,94	0,3372
	$C_{lac}$	-0,28	0,61	0,6720
	$C_{ace}$	0,20	0,58	0,7489

Concentração de biomassa ( $C_x$ ), PS1 ( $C_{PS1}$ ), lactato ( $C_{lac}$ ) e acetato ( $C_{ace}$ )

Fundo azul: efeitos positivos estatisticamente significantes, fundo laranja: efeitos negativos estatisticamente significantes

FONTE: (MARTHOS, 2012)



O aminoácido Gln não apresentou efeitos significativos ( $p < 0,10$ ) em qualquer variável dependente analisada, enquanto que Asn apresentou efeito significativo e positivo apenas para a produção de acetato.

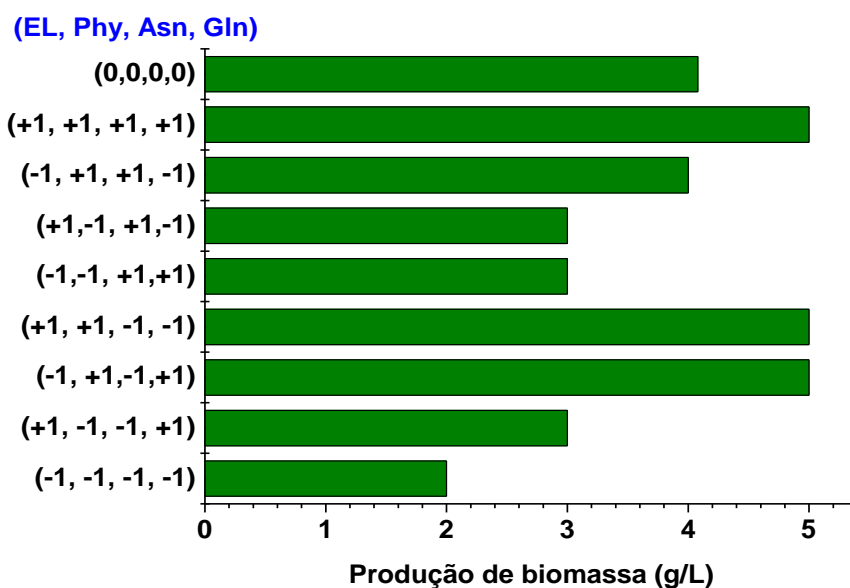
O EL não mostrou influência significativa na produção de PS1, no entanto seus efeitos foram significantes e positivos para produção de massa celular e negativos para lactato e acetato. Esse contraste de efeitos provavelmente está ligado à fração de carboidratos que compõe o extrato de levedura (108 mg/g de carboidratos totais). Ou seja, o extrato de levedura não apresenta uma concentração de carboidratos suficiente para gerar um efeito positivo na produção de metabólitos (ácidos orgânicos) provenientes da principal via energética do pneumococo, a glicólise. No entanto, o extrato de levedura é uma conhecida fonte de vitaminas do complexo B, e provavelmente tem um papel preponderante no crescimento do pneumococo.

As nicotinamidases são enzimas que convertem nicotinamida em ácido nicotínico, essas enzimas são essenciais no reciclo de nicotinamida em  $\text{NAD}^+$  na maioria dos procariotos (FRENCH et al., 2010). A biossíntese de  $\text{NAD}^+$  exerce função vital na célula, assim as nicotinamidases vêm sendo alvo freqüente de estudos para possíveis antibióticos (GERDES et al., 2002). Na maioria dos procariotos unicelulares, o reciclo de  $\text{NAD}^+$  via rota metabólica *de novo*, ocorre quando o  $\text{NAD}^+$  é sintetizado através da vitamina B<sub>3</sub> obtida por meio da dieta ou pela decomposição do próprio  $\text{NAD}^+$  e nucleotídeos relacionados (SAUVE, 2008). Portanto, sugere-se que o EL favoreça o crescimento celular graças ao fornecimento de vitaminas do complexo B que suprem o reciclo de  $\text{NAD}^+$ .

O Phytone apresentou efeitos positivos para produção de biomassa PS1, lactato e acetato, ou seja, o aumento da concentração de Phytone no meio de cultura foi acompanhado pelo aumento de todas as variáveis dependentes, ou respostas, analisadas. O efeito de Phytone sobre  $C_x$  foi três vezes superior ao efeito do EL, essa diferença deve-se, provavelmente, à elevada concentração de carboidratos em sua composição. O Phytone apresenta quase quatro vezes mais carboidratos totais (393 mg/g) que o extrato de levedura (108 mg/g), além de também fornecer nutrientes que possibilitam a síntese de vitaminas. Deste modo, os resultados sugerem que o Phytone exerce um papel fundamental sobre o crescimento celular do

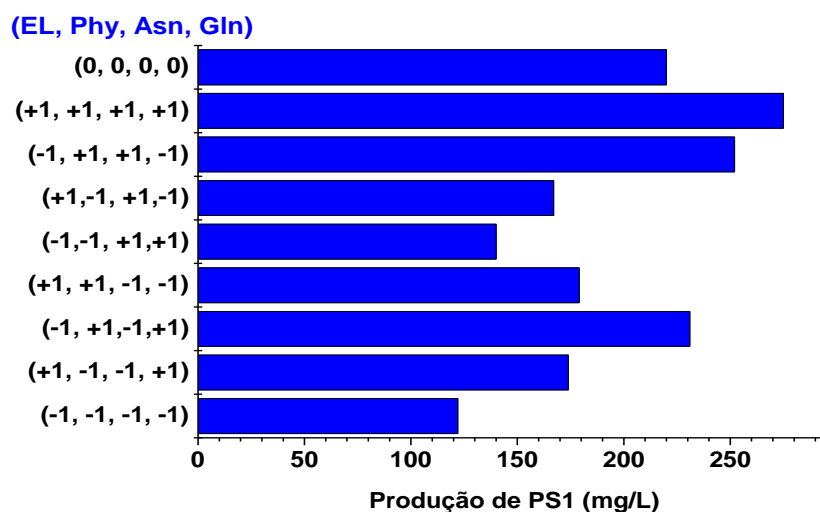
pneumococo e principalmente sobre a produção de PS1. Essa influência positiva do Phytone pode ser observada nas Figuras 21 e 22, que mostram que as concentrações máximas de biomassa e PS1 ocorrem justamente quando a concentração de Phytone está em +1. A identificação específica de carboidratos que compõem o extrato de levedura, Phytone e Soytone não foi disponibilizada pelos fornecedores (como mostrado no APÊNDICE D).

**Figura 21** - Máxima concentração de biomassa em cultivos do planejamento experimental



FONTE: (MARTHOS, 2012)

**Figura 22** - Máxima concentração de PS1 em cultivos do planejamento experimental



FONTE: (MARTHOS, 2012)

#### 4.5.2 Efeitos nos fatores de conversão globais

Os efeitos observados nos fatores de conversão globais ( $Y_{PS1/s}$ ,  $Y_{lac/s}$  e  $Y_{ace/s}$ ) corroboram a importância do Phytone no meio de cultura verificada no item anterior e estão apresentados na Tabela 22.

**Tabela 22** - Análise de significância estatística dos efeitos das variáveis independentes sobre os fatores de conversão globais

Variáveis independentes	Variáveis dependentes	Efeitos	Erro padrão	p-valor (p<0,10)
<b>Extrato de levedura</b>	$Y_{x/s}$	0,045	0,030	0,239
	* $Y_{PS1/s}$	1,86	1,046	0,172
	$Y_{lac/s}$	-0,05	0,041	0,308
	$Y_{ace/s}$	-0,08	0,05	0,206
<b>Phytone</b>	$Y_{x/s}$	0,015	0,030	0,659
	* $Y_{PS1/s}$	3,70	1,046	0,038
	$Y_{lac/s}$	0,23	0,041	0,011
	$Y_{ace/s}$	0,34	0,051	0,007
<b>Asparagina</b>	$Y_{x/s}$	0,01	0,030	0,766
	* $Y_{PS1/s}$	1,01	1,047	0,404
	$Y_{lac/s}$	-0,002	0,041	0,962
	$Y_{ace/s}$	0,07	0,052	0,250
<b>Glutamina</b>	$Y_{x/s}$	0,000	0,030	1,00
	* $Y_{PS1/s}$	2,50	1,05	0,097
	$Y_{lac/s}$	0,04	0,04	0,377
	$Y_{ace/s}$	0,17	0,05	0,047

\* mg PS1 / g glicose, o fundo azul representa os efeitos positivos estatisticamente significantes  
 FONTE: (MARTHOS, 2012)

O Phytone apresentou efeitos positivos e significantes para a conversão de glicose a lactato, acetato e PS1 ( $Y_{lac/s}$ ,  $Y_{ace/s}$  e  $Y_{PS1/s}$ , respectivamente). Ou seja, à medida que a concentração de Phytone foi elevada no meio de cultura, o microrganismo converteu mais glicose aos produtos, com exceção da biomassa. EL e Asn não apresentaram efeitos significantes sobre qualquer

fator de conversão global, enquanto que Gln teve efeito positivo sobre a conversão de glicose a PS1 e a acetato. Em conjunto os resultados do delineamento fatorial fracionado sugerem a respeito da composição de um novo meio de cultura:

- o aminoácido Asn poderia ser excluído do meio de cultura por não ter apresentado efeito significativo à produção de PS1 ou biomassa, ou seja, provavelmente a quantidade desse aminoácido presente no Phytone e EL deve ser suficiente para o crescimento pleno do pneumococo e produção de PS1;
- o aminoácido Gln apresentou efeito positivo e significativo para  $Y_{PS1/S}$  e  $Y_{Ace/S}$ , entretanto também se optou por excluí-lo do meio de cultura e tentar compensar essa exclusão com a adição de EL e Phy em um cultivo descontínuo alimentado, como será mostrado adiante;
- a concentração do Phytone deveria ser igual ou maior que 15g/L (*nível +1*) devido a sua fundamental participação na produção de PS1 e crescimento celular;
- a concentração do extrato de levedura poderia ser reduzida e provavelmente 2 g/L (*nível -1*) já seria suficiente para fornecer vitaminas essenciais ao crescimento celular do pneumococo.

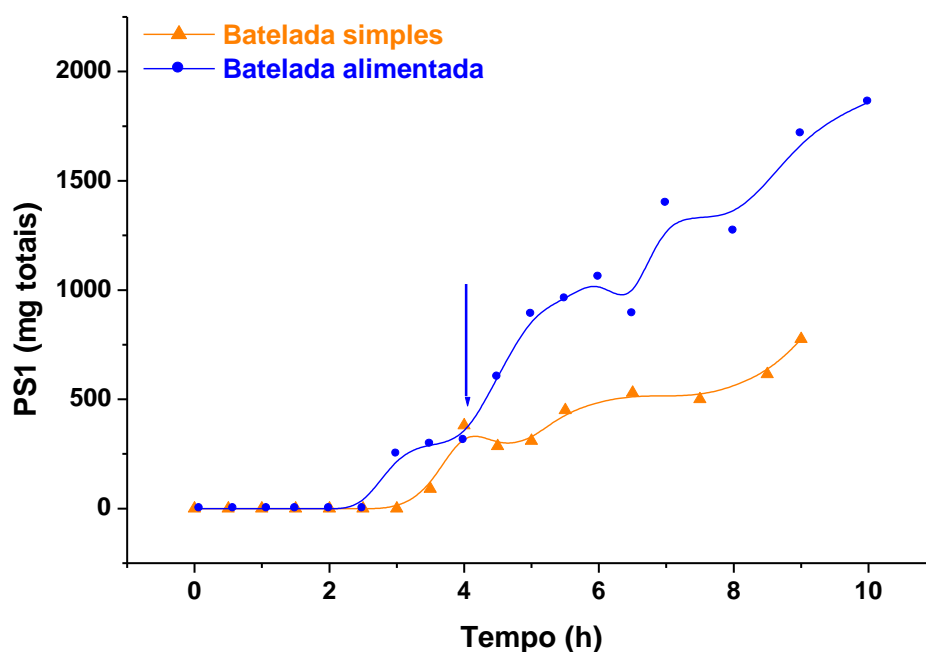
#### 4.6 Avaliação do novo meio de cultura

##### 4.6.1 Cultivos descontínuo e descontínuo alimentado

Para a avaliação do novo meio de cultura proposto foram utilizadas duas estratégias de cultivo: descontínuo (ou batelada simples) com adição de 15 g/L de Phy, 2 g/L de EL e sem adição de Asn e Gln, e descontínuo alimentado (ou batelada alimentada) empregando este mesmo meio para a fase inicial e meio de alimentação 4x concentrado em Phy, EL e glicose. O início da alimentação (2,0 L de meio) se deu em 3 h e 30 min até 5 h e 30 min de cultivo e está indicado pela seta em azul nas Figuras 23 e 24. Ambos os cultivos foram acompanhados por 4 horas após o pico de biomassa. A produção total de

biomassa ( $\text{g/L} \times \text{L}$ ) e de PS1 ( $\text{mg/L} \times \text{L}$ ) em batelada foi comparada com a produção em batelada alimentada (os gráficos de concentração de biomassa e PS1 estão no APÊNDICE E. A produção máxima de PS1 no cultivo descontínuo alimentado alcançou 1860 mg contra 775 mg no descontínuo, ou seja, um aumento de 144% da produção de PS1, conforme mostrado na Figura 23.

**Figura 23** – Produção de PS1 em cultivos batelada simples e batelada alimentada

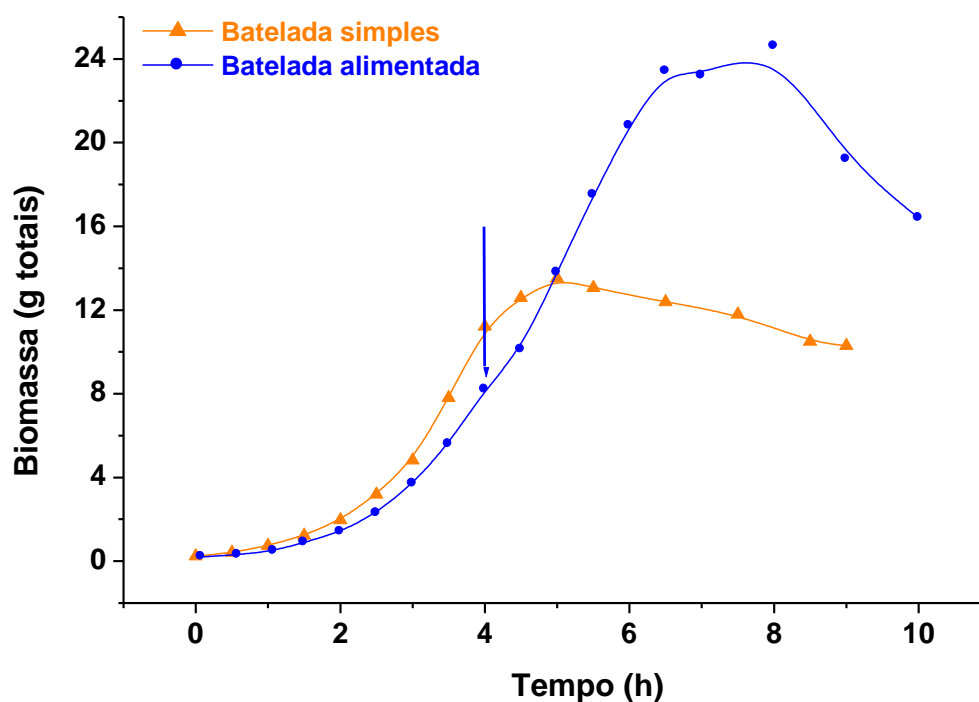


FONTE: (MARTHOS, 2012)

A curva de produção de PS1, durante a fase estacionária, mostrou uma tendência de crescimento com o decorrer do tempo, ou seja, tal fato sugere que esta fase da cinética influencia de forma positiva a liberação de PS1 para o sobrenadante.

Quanto à produção de biomassa, a batelada alimentada produziu 24,6 g contra 13,5 g no cultivo em batelada, conforme mostra a Figura 24, indicando um aumento de 1,8 vezes.

**Figura 24** - Produção de biomassa em cultivos batelada simples e batelada alimentada



FONTE: (MARTHOS, 2012)

Os resultados mostrados na Figura 24 e Tabela 23 evidenciam que o aumento de 2,4 vezes da produção de PS1 e 2,3 vezes de lactato em batelada alimentada em relação à batelada simples foi maior que o aumento da biomassa (1,8 vezes) e de acetato (1,7 vezes). Além disso, na Figura 25 observa-se que o crescimento celular cessa quando ainda há uma quantidade expressiva de glicose no meio ( $> 10$  g/L) em ambos os cultivos, portanto a glicose excedente do cultivo descontínuo alimentado provavelmente foi direcionada para a produção de lactato e PS1. No conjunto esses dados mostram que outro(s) componente(s) que não a glicose deve(m) estar limitando o crescimento celular nesse novo meio de cultura.

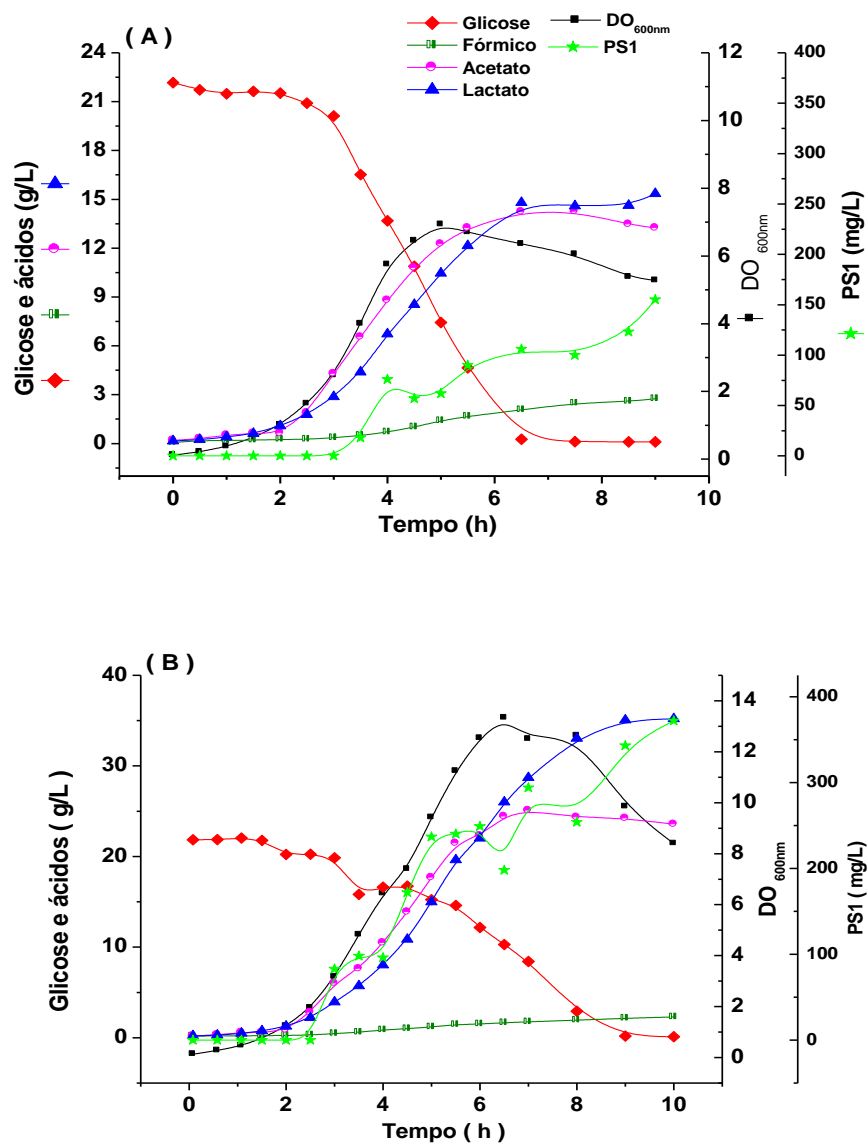
**Tabela 23** – Concentrações máximas de biomassa, acetato, lactato e PS1 alcançadas em diferentes estratégias de cultivo

Estratégias	$\mu_{m\acute{a}x}$ h <sup>-1</sup>	X <sub>máx</sub> g	Lac <sub>máx</sub> g	Ace <sub>máx</sub> g	PS1 <sub>máx</sub> mg
<b>Batelada</b>	0,97	13,5	77	71	775
<b>Batelada alimentada</b>	0,94	24,6	176	122	1860

Medidas absolutas considerando o volume final de 5 L

FONTA: (MARTHOS, 2012)

**Figura 25** – Perfis cinéticos de batelada e batelada alimentada em biorreator



( A ) batelada simples e ( B ) batelada alimentada.

FONTA: (MARTHOS, 2012)

Os resultados obtidos neste trabalho divergem dos obtidos por Liu et al. (2008) para produção de ácido hialurônico, que se valendo de estratégia semelhante cultivou em biorreator *Streptococcus zooepidemicus* em batelada alimentada em meio com sacarose 7% e registrou acréscimo de 23% para biomassa seguido de um inesperado decréscimo de 20% na produção de ácido hialurônico em relação à batelada simples.

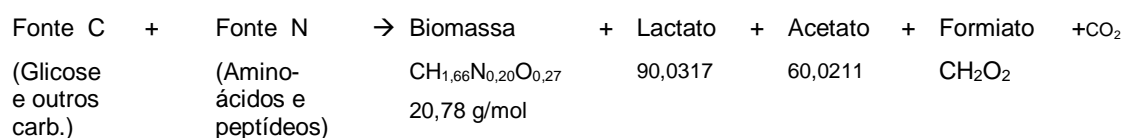
A produção máxima de PS1 no cultivo batelada, 155 mg/L, foi menor do que a obtida com os meios do planejamento experimental contendo 2,0 g/L de EL e 15,0 g/L de Phy (-1,+1,+1,-1 com 252 mg/L de PS1 e -1,+1,-1,+1 com 179 mg/L de PS1, ver Figura 22). Este resultado indica que provavelmente o aminoácido Gln tenha um papel importante na produção de PS1, o que confirma o observado para  $Y_{PS1/S}$  no planejamento experimental. A concentração de Gln no novo meio batelada foi de apenas 0,006 g/L, ou seja, 5 vezes menor do que a concentração mais baixa do planejamento (0,03 g/L, Tabela 5). O mesmo aconteceu com Asn, cuja concentração mais baixa dos meios do planejamento (0,135 g/L, Tabela 5) foi 3,5 vezes maior do que a do novo meio proposto (0,039 g/L).

Entretanto, os 2L de alimentação com meio 4x concentrado, contendo 8g/L de EL e 60g/L de Phy no cultivo descontínuo alimentado, provavelmente conseguiram suprir as necessidades do microrganismo para estes aminoácidos, fornecendo 0,312 g de Asn e 0,048 g de Gln oriundos de EL e Phy. Assim, a produção de PS1 alcançada no cultivo descontínuo alimentado foi 35% superior a maior produção alcançada pelo planejamento experimental (+1, +1, +1, +1, Figura 22), mais de 10 vezes superior ao obtido com um meio claramente inadequado para produção de vacinas devido à presença de infusão de cérebro e coração bovinos (KIM et al., 1996) e ainda aproximadamente 8 vezes superior a produção em cultivos de 100 L para o sorotipo 1 em meio com hidrolisado de caseína descrita em uma patente francesa (SOCIÉTÉ DITE, 1982).



#### 4.6.2 Balanço de massa estequiométrico

O balanço de carbono e nitrogênio seguiu o mesmo modelo descrito na seção 4.4.1. Deste modo, vale também a Equação 2:



##### 4.6.2.1 Balanço de carbono para a produção de ácidos orgânicos

Primeiramente, faz-se necessário, novamente considerando que os carboidratos do Phytone e extrato de levedura são ou podem ser convertidos em hexoses, calcular a quantidade de hexoses totais fornecida pelo meio de cultura em ambas as estratégias de cultivo, conforme mostra a Tabela 24.

**Tabela 24** – Contribuição em moles de hexoses que cada reagente fornece ao meio de cultura para cultivos de *S. pneumoniae* sorotipo 1

	Glicose	Extrato de levedura	Phytone	Total
	Moles/L			
<b>Batelada</b>	0,11	0,005	0,033	0,149
<b>Batelada alimentada</b>	0,24	0,003	0,072	0,319

FONTES: (MARTHOS, 2012)

Realizando o mesmo raciocínio utilizado para o balanço de massa da escolha da peptona, as diferentes estratégias de cultivo produziram as seguintes concentrações de biomassa, lactato, acetato e formiato como demonstra a Tabela 25.

**Tabela 25** – Produção máxima de biomassa, acetato e lactato em diferentes estratégias de cultivo de *S. pneumoniae* tipo 1

	$C_{x \text{ Max}}$ moles/L	$C_{\text{Lac máx}}$ moles/L	$C_{\text{Ace máx}}$ moles/L	$C_{\text{For máx}}$ moles/L
<b>Batelada</b>	0,13	0,17	0,24	0,04
<b>Batelada alimentada</b>	0,25	0,39	0,42	0,04

FONTE: (MARTHOS, 2012)

Deste modo, como mostrado na Tabela 26, observa-se que a razão de hexoses fornecidas por hexoses calculadas do balanço ( $R^C_{(F/B)}$ ) em regime de batelada alimentada foi 10% superior à da batelada simples.

**Tabela 26** – Comparação entre as quantidades de hexoses fornecidas pelo meio de cultura com as quantidades calculadas pelo balanço

	Hexose calculada pelo balanço		Hexose fornecida		$R^C_{(F/B)}^a$
	moles/L	g/L <sup>b</sup>	moles/L <sup>c</sup>	g/L <sup>b</sup>	
<b>Batelada</b>	0,212	38,17	0,149	26,76	0,70
<b>Batelada alimentada</b>	0,412	74,18	0,319	57,44	0,77

<sup>a</sup> Razão entre hexose fornecida e hexose calculada pelo balanço estequiométrico necessária para produção dos ácidos formados; <sup>b</sup> valores em g/L foram obtidos após multiplicação da concentração mol/L por 180,0634 (peso molecular das hexoses); <sup>c</sup> valores calculados como mostrado na Tabela 24.

FONTE: (MARTHOS, 2012)

Além disso, os carboidratos totais fornecidos, tal como verificado na seção 4.1, novamente não foram suficientes para produção de todo ácido formado em nenhum dos casos. Vale ressaltar que a produção de biomassa cessa quando ainda há uma concentração elevada de glicose residual no meio e que o esgotamento da glicose coincide com o platô de ácidos orgânicos. Deste modo acredita-se que os peptídeos e aminoácidos disponíveis no meio de cultura oriundos de Phytone e EL estão sendo degradados pelo pneumococo e entrando na via da glicólise para a produção de energia e precursores. Fato que vai de acordo com a hipótese levantada por Hartel et al. (2011), que menciona uma possível dupla utilização de carboidratos e aminoácidos no metabolismo do pneumococo. Ou seja, o pneumococo teria a capacidade de utilizar esses dois tipos de moléculas tanto no metabolismo do

carbono, que seria incorporado à biomassa, como no metabolismo energético, que teria os ácidos orgânicos como metabólitos principais. Hartel *et al.* (2011) ainda comenta que o sucesso patogênico do pneumococo em se adaptar às mudanças nutricionais do ambiente está intimamente ligado à sua capacidade de absorver e catabolizar livremente uma grande gama de carboidratos e aminoácidos, e deste modo se inserir em diversos nichos biológicos, adaptando-se sempre de forma competitiva.

#### 4.6.2.2 Balanço de nitrogênio para produção de biomassa

Seguindo o mesmo raciocínio do balanço de nitrogênio descrito no item 4.4.1, podemos considerar que toda fonte de nitrogênio foi transformada em biomassa, assim temos:



Primeiramente, faz-se necessário calcular a quantidade de nitrogênio fornecida pelo meio de cultura em ambas as estratégias de cultivo, conforme mostra a Tabela 27.

**Tabela 27** – Contribuição em moles de nitrogênio que cada reagente fornece ao meio de cultura para cultivos de *S. pneumoniae* sorotipo 1

	EL	Phytone	Total
	moles/L		
<b>Batelada</b>	0,015	0,096	0,111
<b>Batelada alimentada</b>	0,034	0,212	0,246

FONTES: (MARTHOS, 2012)

De acordo com a Tabela 25, a batelada e batelada alimentada produziram cada uma 0,13 mol/L e 0,25 mol/L de biomassa, respectivamente.

Segundo a Equação 7, deduz-se que foram transformados em

biomassa, 0,026 mol/L de nitrogênio para batelada e 0,05 mol/L de nitrogênio para a batelada alimentada.

Assim como observado para o balanço de carbono, observa-se que a razão de nitrogênio fornecido por nitrogênio calculado ( $R^N_{(F/B)}$ ) no regime batelada alimentada foi 14% superior à batelada, como mostrado na Tabela 28.

**Tabela 28** – Comparação entre as quantidades de nitrogênio fornecidas pelo meio de cultura com as quantidades calculadas pelo balanço estequiométrico

	Nitrogênio calculado pelo balanço		Nitrogênio fornecido		$R^N_{(F/B)}^a$
	mols/L	g/L <sup>b</sup>	mols/L <sup>c</sup>	g/L <sup>b</sup>	
<b>Batelada</b>	0,026	0,364	0,111	1,554	4,27
<b>Batelada alimentada</b>	0,05	0,700	0,246	3,444	4,91

<sup>a</sup> Razão entre nitrogênio fornecido e nitrogênio calculado pelo balanço estequiométrico necessário para produção da biomassa formada; <sup>b</sup> valores em g/L foram obtidos após multiplicação da concentração mol/L por 14,0 (massa atômica do nitrogênio); <sup>c</sup> valores calculados como mostrado na Tabela 27.

FONTE: (MARTHOS, 2012)

Assim como no balanço de massa da escolha da peptona (seção 4.4), o nitrogênio fornecido pelo meio de cultura - mesmo após as reduções das concentrações de EL e Phytone – continua em excesso, portanto o nitrogênio também poderia ser descartado como limitante do crescimento nestes experimentos.

#### 4.7 Comparação das condições de cultivo avaliadas

A comparação entre os produtos e parâmetros principais de um determinado processo, antes e após as estratégias de otimização, fornece informações valiosas na indicação do sucesso ou não dessas estratégias. Deste modo, a razão entre nitrogênio fornecido e calculado ( $R^N_{(F/B)}$ ) obtida em batelada alimentada com o novo meio de cultura foi 1,7 vezes menor do que em batelada simples em meio com 3% de Phytone (seção 4.4), enquanto que a razão para carbono  $R^C_{(F/B)}$  foi 10% maior (Tabela 29).

**Tabela 29** – Comparação entre cultivos de *S. pneumoniae* sorotipo 1

	$R^N_{(F/B)}$	$R^C_{(F/B)}$	$X_{máx}$ g	$PS1_{máx}$ mg	$Y_{x/s}$ g de célula / g de glicose
<sup>a</sup> Phytone 3%	8,23	0,70	21,9	1270	0,20
<sup>b</sup> Batelada alimentada	4,91	0,77	24,6	1860	0,44

<sup>a</sup> cultivo em batelada simples realizado durante a fase de escolha da peptona

<sup>b</sup> cultivo com novo meio de cultura proposto após o delineamento fracionado

FONTE: (MARTHOS, 2012)

Portanto, o meio de cultura desenvolvido com base no planejamento experimental mostrou-se mais balanceado do que o meio com 3% de Phytone empregado no princípio deste trabalho. Além disso, quando o novo meio foi aliado à estratégia de cultivo em batelada alimentada, o fator de conversão de substrato à célula foi 2,2 vezes superior e as produções máximas absolutas de biomassa e PS1 foram 12,3% e 46,5% maiores que a batelada simples com 3% de Phytone, respectivamente.

A Tabela 30 compara, em valores absolutos, o consumo dos principais reagentes dos meios de cultura e seus respectivos produtos ao início e no final deste trabalho. Pode-se observar o relevante papel que a otimização de meios de cultura pode exercer nos bioprocessos, pois foi obtido um aumento 2,4 vezes na produção de PS1 sem adição dos aminoácidos Gln e Asn, com praticamente a mesma quantidade de Phytone que de Casaminoácidos, com 4,5 vezes menos extrato de levedura e 2,2 vezes mais de glicose, que é o componente de menor custo do meio de cultura dentre os citados. Vale ressaltar também que o Casaminoácidos é 2,5 vezes mais caro do que o Phytone.

**Tabela 30** - Comparação entre o meio de cultura do início e posterior aos estudos relativos a este trabalho

<sup>a</sup> Inicial		<sup>b</sup> Final	
Substratos (g)		Substratos (g)	
Glicose	100,0	Glicose	220,0
EL	100,0	EL	22,0
<b>Casaminoácidos</b>	150,0	<b>Phytone</b>	165,00
L-glutamina	3,9	L-glutamina	-
L-asparagina	0,6	L-asparagina	-
Produtos		Produtos	
Biomassa	21,5 g	Biomassa	26,0 g
PS1	785 mg	PS1	1.860 mg

<sup>a</sup> – Batelada realizada durante a seleção de peptonas, descrito no item 4.4

<sup>b</sup> – Batelada alimentada após planejamento experimental, descrito no item 5.1

FONTE: (MARTHOS, 2012)

## 5 CONCLUSÕES

Em suma, este trabalho apresentou os seguintes avanços no desenvolvimento e produção de polissacarídeo capsular em cultivos de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1:

Um protocolo foi estabelecido para determinar a concentração de polissacarídeo capsular tipo 1 pelo método colorimétrico *m*-hidroxidifenil com adição de sulfamato. Este método foi comparado com o ELISA de captura, que é mais específico, e rendeu resultados bastante semelhantes.

A cepa ST 595/01 foi selecionada como a melhor produtora de PS1 para cultivos em biorreator e demais estudos do processo fermentativo.

O hidrolisado enzimático de soja - Phytone - foi selecionado para compor o meio de cultura por favorecer a produção de PS1 quando comparado ao Soytone e ao Casaminoácidos.

Os resultados do delineamento fatorial fracionado indicaram que os aminoácidos L-glutamina e L-asparagina poderiam ser excluídos do meio de cultura, enquanto que 2,0 g/L de extrato de levedura e 15,0 g/L de Phytone deveriam ser utilizados para o crescimento celular e produção de PS1 em cultivos em biorreator de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1.

A batelada simples com o novo meio de cultura sem os aminoácidos e contendo 2,0 g/L de EL, 15,0 g/L de Phytone, 20,0 g/L de glicose, colina, solução de sais e sais fosfatados não confirmou a hipótese de que Gln e Asn poderiam ser removidos meio de cultura sem prejuízo do crescimento celular e produção de PS1.

Por outro lado, a estratégia de batelada alimentada com o novo meio de cultura apresentou, quando comparado com a literatura, eficientes produções

de biomassa e PS1. Assim, o novo meio de cultura proposto se mostrou adequado e capaz de prover o crescimento celular juntamente com a produção do PS1 que alcançou 375 mg/L, uma das maiores concentrações de PS de pneumococo até então relatada na literatura. Além de estar livre de componentes de origem animal, o que o torna muito vantajoso para produção de injetáveis.



## REFERÊNCIAS\*

AIBA, S.; HUMPHREY, A. E.; MILLIS, N. F. **Biochemical engineering**. Tokyo: University of Tokyo Press, 1973.

AMENT, A.; BALTUSSEN, R.; DURU, G.; RIGAUD-BULLY, C.; DE GRAEVE, D.; RTQVIST, A. O.; JONSSON, B.; VERHAEGEN, J.; GAILLAT, J.; CHRISTIE, P.; CIFRE, A. S.; VIVAS, D.; LOISEAU, C.; FEDSON, D. S. Cost-Effectiveness of Pneumococcal Vaccination of Older People: A Study in 5 Western European Countries. **Clin. Infect. Dis.**, v. 31, p. 444–450, 2000.

AKIN, L.; KAYA, M.; ALTINEL, S.; DURAND, L. Cost of pneumococcal infections and cost-effectiveness analysis of pneumococcal vaccination in at risk adults and elderly in Turkey. **Hum. Vaccin.**, v. 7, p. 441-450, 2011.

AUSTRIAN, R.; GOLD, J. Pneumococcal bacteremia with special reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. **Ann. Intern. Med.**, v. 60, p. 759–776, 1964.

AUSTRIAN, R. Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. **Rev. Infect. Dis.**, v. 3, p. S1-S17, 1981.

AUSTRIAN, R. The pneumococcus at the millennium: not down, not out. **J. Infect. Dis.**, v. 179, p. 338-341, 1999.

EVERY, O. T.; HORSFALL, F. L. Study on the chemical nature of the substance inducing transformation of specific types of pneumococcus. **Scien. Res. Instit.**, v. 31, p. 143-175, 1943.

BENTLEY, S. D.; AANENSEN, D. M.; MAVROIDI, A.; SAUNDERS, D.; RABBINOWITSCH, E.; COLLINS, M.; DONOHOE, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; QUAIL, M. A.; SAMUEL, G.; SKOVSTED, I. C.; KALTOFT, M. S.; BARRELL, B.; REEVES, P. R.; PARKHILL, J.; SPRATT, B. G. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. **PLoS Genet.**, v. 2, n. 3, p. 31, 2006.

SOCIÉTÉ DITE. Berri-Balzac. **Procédé d'obtention de polysides capsulaires, polyosides capsulaires ainsi obtenus et leur application à la préparation de vaccins**. n. publicação: 0 071 515 A1. n. do depósito: 82401343.7, 1982.

BIDOSSI, A.; MULAS, L.; DECOROSI, F.; COLOMBA, L.; RICCI, S.; POZZI, G.; RICCI, S.; DEUSTCHER, J.; VITI, C.; OGGIONI, M. R. A functional genomics approach to establish the complement of carbohydrate transporters in *Streptococcus pneumoniae*. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33320, 2012.

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informações e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acid; **Anal. Biochem.**, v. 54, p. 484-489, 1973.

BOGAERT, D.; HERMANS, P. W. M.; ADRIAN, P. V.; RUMKE, H. C.; GROOT, R. Pneumococcal vaccines : an update on current strategies. **Vaccine**, v. 22, p. 2209-2220, 2004.

BRANDILEONE, M. C.; DE ANDRADE, A. L.; DI FABIO, J.L.; GUERRA, M.L.; AUSTRIAN, R. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. **J. Infect. Dis.**, v.187, p. 1206-1212, 2003.

BRATCHER, P. E.;PARK, I. H.; HOLLINGSHEAD, S. K.; NAHM, M. H. Production of a unique pneumococcal capsule serotype belonging to serogroup 6. **Microbiology**, v. 155, p. 576–583, 2009.

BRUEGGEMANN, A. B.; SPRATT, B. G. Geographic distribution and clonal diversity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4966-49701, 2003.

CARMO, T. S.; GOGOLA, V. M. R.; HORTA, A. C.; ZANGIROLAMI, T. C.; TANIZAKI, M. M.; GONÇALVES, V. M. Influência do inóculo e concentração de glicose residual no cultivo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 6B. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUIMICA, 18., 2010, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2010. p. 10198-10203.

CHEN, Y.; WANG, Q. Establishment of CTAB turbidimetric method to determine hyaluronic acid content in fermentation broth. **Carbohydr. Polym.**, v. 78, p. 178-181, 2009.

DARKES, M. J. M.; PLOSKER, G. L. Pneumococcal Conjugate Vaccine (Prevnar™; PN<sub>CRM7</sub>): A Review of its Use in the Prevention of *Streptococcus pneumoniae*. **Paediatr. Drugs.**, v. 4, p. 609-630, 2002.

DAGAN, L. M.; TUOMANEN E, M.T.; MORRISON D. A.; SPRATT B. G. Changing the ecology of pneumococci with antibiotics and vaccines. In:\_\_\_\_\_. **The pneumo**. Washington: ASM, 2004. p. 283-313.

DAGAN, R.; KLUGMAN, K. P. Impact of conjugate pneumococcal vaccines on antibiotic resistance. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 8, p. 785–795, 2008.

DORAN, P. **Bioprocessing engineering principles**. Estados Unidos: Academic Press, 2000.

DIETZSCH, C.; SPADIUT, O.; HERWIG, C. A fast approach to determine a fed batch feeding profile for recombinant *Pichia pastoris* strains. **Microb. Cell. Fact.**, v.10, p. 88, 2011.

EARNSHAW, S. R.; MCDADE, C. L.; ZANOTTI, G.; FARKOUH, R. A.; STRUTTON, D. Cost-effectiveness of 2 + 1 dosing of 13-valent and 10-valent pneumococcal conjugate vaccines in Canada. **BMC Infect. Dis.**, v. 24, p. 12, 2012.

FIGUEIREDO, D. B.; MARTHOS, B. V.; FERRI, A. L. S.; GOGOLA, V. M. R.; GONÇALVES V. M. Método imunoenzimático para quantificar o polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 19., 2012, Búzios. **Anais...** Búzios, 2012.

FILIZETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Anal. Biochem.**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FRENCH, J. B.; CEN, Y.; SAUVE, A. A.; EALICK, S. E. High-resolution crystal structures of *Streptococcus pneumoniae* nicotinamidase with trapped intermediates provide insights into the catalytic mechanism and inhibition by aldehydes. **Biochemistry**, v. 49 p. 8803–8812, 2010.

FRIEDLAND, I. R.; CRACKEN M. C. G.H. JR. Management infectious caused by antibiotic resistant *Streptococcus pneumonia*. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, p. 377-382, 1994.

GALAMBOS, J. T. The reaction of carbazole with carbohydrates: Effect of borate and sulfamate on the carbazole color of sugars. **Anal. Biochem.**, v. 19, p. 119-132, 1967.

GERDES, S. Y.; SCHOLLE, M. D.; D'SOUZA, M.; BERNAL, A.; BAEV, M. V.; FARRELL, M.; KURNASOV, O. V.; DAUGHERTY, M. D.; MSEEH, F.; POLANUYER, B. M.; CAMPBELL, J. W.; ANANTHA, S.; SHATALIN, K. Y.; CHOWDHURY, S. A.; FONSTEIN, M.Y.; OSTERMAN, A. L. From genetic footprinting to antimicrobial drug targets: Examples in cofactor biosynthetic pathways. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 4555–4572, 2002.

GOGOLA, V. M. R.; CARMO, T. S.; TANIZAKI, M. M.; GONÇALVES, V. M. Determinação das vitaminas essenciais para o cultivo de *Streptococcus pneumoniae* em frasco e em reator. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 18., 2010, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2010. p. 3876-3882

GONÇALVES, V. M.; ZANGIROLAMI, T. C.; GIORDANO, R. L. C.; RAW, I.; TANIZAKI, M. M.; GIORDANO, R. C. Optimization of medium and cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F. **Appl. Microbiol Biotechnol.**, v. 59, p. 713–717, 2002.

GONÇALVES, V. M.; TAKAGI, M.; CARNEIRO, S. M.; DE CAMPOS GIORDANO, R.; TANIZAKI, M. M. Introduction of air in the anaerobic culture of *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F induces the release of capsular

polysaccharide from bacterial surface into the cultivation medium. **J. Appl. Microbiol.**, v. 101, p. 1009-1014, 2006.

GUPTA, A.; KHAW, F. M.; STOKLE, E. L.; GEORGE, R. C.; PEBODY, R.; STANSFIELD, R. E.; SHEPPARD, C.L.; SLACK, M.; GORTON, R.; SPENCER, D. A. Outbreak of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 pneumonia in a United Kingdom school. **B.M.J.**, v. 31, p. 337, 2008.

HÄRTEL, T.; EYLERT, E.; SCHULZ, C.; PETRUSCHKA, L.; GIEROK, P.; GRUBMÜLLER, S.; LALK, M.; EISENREICH, W.; HAMMERSCHMIDT, S. Characterization of the central carbon metabolism of *Streptococcus pneumoniae* by isotopologue profiling. **J.B.C.**, 2011.

HICKS, L. A.; HARRISON, L. A.; FLANNERY, B.; HADLER, J. L.; SCHAFFNER, W.; CRAIG, A. S.; JACKSON, D.; THOMAS, A.; BEALL, B.; LYNFIELD, R.; REINGOLD, A.; FARLEY, M. M.; WHITNEY, C. G. Incidence of Pneumococcal Disease Due to Non-Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV7) Serotypes in the United States during the Era of Widespread PCV7 Vaccination, 1998–2004. **J. Infect. Dis.**, v. 196, p. 1346–1354, 2007.

HO, C. F.; LIN, T. Y. Pneumococcal vaccines. **Chang Gung Med. J.**, v. 28, p. 765-772, 2005.

HOSKINS, J.; ALBORN, JR W. E.; ARNOLD, J.; BLASZCZAK, L. C.; BURGETT, S.; DEHOFF, B. S.; ESTREM, S. T.; FRITZ, L.; FU, D. J.; FULLER, W.; GERINGER, C.; GILMOUR, R.; GLASS, J. S.; KHOJA, H.; KRAFT, A. R.; LAGACE, R. E.; LEBLANC, D. J.; LEE, L. N.; LEFKOWITZ, E. J.; LU, J.; MATSUSHIMA, P.; MCAHREN, S. M.; MCHENNEY, M.; MCLEASTER, K.; MUNDY, C. W.; NICAS, T. I.; NORRIS, F. H.; O'GARA, M.; PEERY, R. B.; ROBERTSON, G. T.; ROCKEY, P.; SUN, P. M.; WINKLER, M. E.; YANG, Y.; YOUNG-BELLIDO, M.; ZHAO, G.; ZOOK, C. A.; BALTZ, R. H.; JASKUNAS, S. R.; ROSTECK, JR P. R.; SKATRUD, P. L.; GLASS, J. I. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 5709-5717, 2001.

JACKSON, L. A.; NEUZIL, K. M.; YU, O.; BENSON, P.; BARLOW, W. E.; ADAMSA, L.; HANSON, C. A.; MAHONEY, L. D.; SHAY, D. K.; THOMPSON, W. W. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine in older adults. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, p. 1747-1755, 2003.

JALLOULI, W.; JAOUA, S.; ZOUARI N. Improvement of *Photorhabdus temperata* strain K122 bioinsecticide production by batch and fed-batch fermentations optimization. **Bioprocess. Biosyst. Eng.**, 2012.

JOHNSTONE, J.; EURICH, D. T.; MINHAS, J. K.; MARRIE, T. J.; MAJUMDAR, R. S. Impact of the Pneumococcal Vaccine on Long-Term Morbidity and Mortality of Adults at High Risk for Pneumonia. **Clin. Infect. Dis.**, v. 51, p. 15–22, 2010.

KIM, N. S.; MIN, K. K.; KIM, S. H.; CHOI, I. H.; LEE, S. H.; PYO, S. N.; RHEE, D. K. Optimization of culture conditions for production of pneumococcal capsular polysaccharide type I. **J. Microbiol.**, v. 34, p. 179-183, 1996.

KO, A. I.; REIS, J. N.; COPPOLA, S. J.; GOUVEIA, E. L.; CORDEIRO, S. M.; LOBO, T. S. Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningitis in Salvador, Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 78–86, 2000.

KORNELISSE, R. F.; WSTERBECK, C. M. L.; SPOOR, A. P.; SPANGAARD, H. J. Pneumococcal meningitis in children : prognostic indicators and outcome. **Clin. Infect. Dis.**, v. 21, p. 1390-1397, 1995.

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

LEIMKUGEL, J.; FORGOR, A. A.; GAGNEUX, S.; PFUGER, V.; FLIERL, C.; AWINE, E.; NAEGELI, M.; DANGY, J.; SMITH, T.; HODGSON, A.; PLUSCHKE, G. An outbreak of serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* meningitis in northern Ghana with features that characteristic of neisseria meningitidis Meningitis epidemics. **J. Infect. Dis.**, p. 192-199, 2005.

LI-HUI, S.; LI M.; WANG, Y.; ZHENG, Y. Significantly Enhanced Production of Acarbose in Fed-Batch Fermentation with the Addition of S-Adenosylmethionine. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 826–831, 2012.

LIU, L.; D. U, G.; CHEN, J.; WANG, M.; SUN, J. Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 8532-8536, 2008.

LIU, M.; BAYJANOV, J. R. RENCKENS, B.; NAUTA, A.; SIEZEN, R. J.; The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. **B.M.C. Genom.**, v. 11, p. 36, 2010.

LINDBERG, B.; LINDQVIST, B.; LONNGREN, J.; POWELL, D. A. Structural studies of the polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 1. **Carbohydr. Resear.**, v. 78, p. 111-117, 1980.

MAHER, M. C.; ALEMAYEHU, W.; LAKEW, T.; GAYNOR, B.D.; HAUGS.; CEVALLOS V.; KEENAN J.D.; LIETMAN T.M.; PORCO T.C. The fitness cost of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Insight from the field. **PLoS One**, v. 7, p. e29407, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0029407

MANGTANI, P.; CUTTS, F.; HALL, A. J. Efficacy of polysaccharide pneumococcal vaccine in adults in more developed countries: the state of the evidence. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 3, p. 71-78, 2003.

MARZZOCO A.; TORRES B. B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. v. 1.

MCALLISTER, L. J.; OGUNNIYI, A. D.; STROEHER, U. H.; LEACH, A. J.; PATON, J. C. Contribution of Serotype and Genetic Background to Virulence of 2 Serotype 3 and Serogroup 11 Pneumococcal Isolates. **Infect. Immun.**, 2011. doi:10.1128/IAI.05663-11

MYERS, C.; GERVAIX, A. *Streptococcus pneumoniae* bacteremia in children. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 30, p. 24–28, 2007.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Unicamp, 2001.

O'BRIEN, K. L.; HENKLE, E.; DELORIA-KNOLL, M.; MCCALL, N.; LEE, E.; LEVINE, O. S. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet.**, v. 374, p. 893–902, 2009.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Informe Regional de Sireva II – Datos por país y por grupo de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*; *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*; en procesos invasores; 2000-2005. Documentos Técnicos. Tecnologías Esenciales de Salud. THS/EV-2007/002; 2005.

PARK, I. H.; PARK, S.; HOLLINGSHEAD, S. K.; NAHM, M. H. Genetic basis for the new pneumococcal serotype, 6C. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 4482–4489, 2007.

PERICONE, C. D.; PARK, S.; IMLAY, J. A.; WEISER, J. N. Factors Contributing to Hydrogen Peroxide Resistance in *Streptococcus pneumoniae* Include Pyruvate Oxidase(SpxB) and Avoidance of the Toxic Effects of the Fenton Reaction. **J. Bacteriol.**, p. 6815–6825, 2003.

PLANS, P. Coste-efectividad de La vacunación antineumocócica 23-valente em Catalunya. **Gac. Sanit.**, v. 16, p. 392-400, 2002.

POLAND, G. A. The burden of pneumococcal diseases: the role of conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 17, p. 1674-1679, 1999.

PULIDO, M.; SORVILLO, F. Declining invasive pneumococcal disease mortality in the United States: 1990–2005. **Vaccine**, v. 28, p. 889–892, 2010.

REIS, J. N.; CORDEIRO, S. M.; COPPOLA, S.J.; SALGADO, K.; CARVALHO, M. G.; TEIXEIRA, L. M. Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* from meningitis patients in Salvador; Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 275–277, 2002.

RESTREPO, A. V.; SALAZAR, B. E.; AGUDELO, M.; RODRIGUEZ, C. A.; ZULUAGA, A. F.; VESGA, O. Optimization of culture conditions to obtain maximal growth of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **BMC Microbiol.**, v. 50, p. 285-315, 1996.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Cárita, 2009.

SAHU, R. K.; MORDECHAL, S.; PESAKHOV, S.; DAGAN, R.; PORAT, N. Use of FTIR spectroscopy to distinguish between capsular types and capsular quantities in *Streptococcus pneumoniae*. **Biopolym.**, v. 83, p. 434-442, 2006.

SALMINEN, S.; WRIGHT, A. V.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid bacteria: microbiological and functional aspects**. Estados Unidos: Marcel Dekker Inc., 2004.

SAUVE, A. A. NADp and vitamin B3: from metabolism to therapies. **J. Pharmacol.**, v. 324, p. 883–893, 2008.

SETLHAKU, M.; BRUNBERG, S.; VILLA, E.A.; WICHMANN, R. Improvement in the bioreactor specific productivity by coupling continuous reactor with repeated fed-batch reactor for acetone–butanol–ethanol production. **J. Biotechnol.**, 2012.

SHEEHAN, J. K.; RICHARDSON, P. S.; FUNG, D. C.; HOWARD, M.; THORNTON, D. J. Analysis of respiratory mucus glucoproteins in asthma: a detailed study from a patient who died in status asthmaticus. **J. Cell. Mol. Biol.**, v. 13, p. 748-756, 1995.

SHENG-DE, J.; KIM, Y.; KANG, H.; JUNG, S.; KIM, D. Optimization of capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* type 3. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 19, p. 1374-1378, 2009.

SIBER, G. R.; KLUGMAN, K. P.; MAKELA, P. H. **Pneumococcal vaccines: the impact of conjugate vaccine**. Local: ASM Press, 2008.

SILVA, F. H.; MOURA, L. F.; BADINO, A. C. AnaBio 1.0: um Programa para Análise de Biorreatores. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 24., 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2003.

STROOP, C. J. M.; XU, Q.; RETZLAFF, M.; ABEYGUNAWARDANA, C.; BUSH, C.A. Structural analysis and chemical depolymerization of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 1. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 335-344, 2002.

TAN, T. Q.; MASON, E. O. JR.; WALD, E. R.; BARSON, W. J.; SCHUTZE, G. E.; BRADLEY, J. S.; GIVNER, L. B.; YOGEV, R.; KIM, K. S.; KAPLAN, S. L. Clinical characteristics of children of complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. **Pediatrics**, v. 110, p. 1-6, 2002.

TAPIAINEN, T.; SORMUNEN, R.; KAIJALAINEN, T.; KONTIOKARI, T.; IKAHEIMO, I.; UHARI, M. Ultrastructure of *Streptococcus pneumoniae* after exposure to xylitol. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 54, p. 225-228, 2004.

TETTELIN, H.; NELSON, K. E.; PAULSEN, I T.; EISEN, J. A.; READ, T. D.; PETERSON, S.; HEIDELBERG, J.; DEBOY, R. T.; HAFT, D. H.; DODSON, R. J.; DURKIN, A. S.; GWINN, M.; KOLONAY, J. F.; NELSON, W. C.; PETERSON, J. D. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. **Science**, v. 293, p. 498-506, 2001,

THOMAS, S.; BESSET, C.; COURTIN, P. The role of aminopeptidase Peps in the growth of *Streptococcus thermophilus* is not restricted to nitrogen nutrition. **J. Appl. Microbiol.**, v. 108, p. 148-157, 2010.

TOTAPALLY, R. B.; WALSH, W. T. Pneumococcal bacteremia in childhood : A 6-year experience in a community hospital. **Chest**, v. 113, p. 1207-1214, 1998.

TROTTER, C. L.; WAIGHT, P.; ANDREWS, N. J.; SLACK, M.; EFSTRATIOU, A.; GEORGE, R.; MILLER, E. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in the pre-conjugate vaccine era: England and Wales; 1996 e 2006. **J. Infect.**, v. 60, p. 200-208, 2010.

VENTURA, C. L.; CARTEE, R. T.; FORSEE, W. T.; YOTHER, J. Control of capsular polysaccharide chain length by UDP-sugar substrate concentrations in *Streptococcus pneumoniae*. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 723-733, 2006.

VILA-CORCOLES, A.; OCHOA-GONDAR, O.; LLOR, C.; RODRÍGUEZ, T.; GOMEZ, A. Protective effect of pneumococcal vaccine against death by pneumonia in elderly subjects. **Eur. Respir. J.**, v. 26, p. 1086–1091, 2005.

VILA-CORCOLES, A.; OCHOA-GONDAR, O.; GUZMÁN, J. A.; RODRIGUEZ-BLANCO, T.; SALSENCH, E.; FUENTES, C. Effectiveness of the 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine against invasive pneumococcal disease in people 60 years or older . **BMC Infect. Dis.**, v. 10, p. 73, 2010.

WEINBERGER, D. M.; SKI, K. T.; LU, Y.; BOGAERT, D.; BRANDES, A.; GALAGAN, J.; ANDERSON, P. A.; MALLEY, R.; LIPSITCH M. Pneumococcal Capsular Polysaccharide Structure Predicts Serotype Prevalence. **PLoS Pathog.**, v. 5, p. e1000476, 2009.

WEAVER, M.; KRIEGER, J.; CASTORINA, J.; WALLS, M.; CISKE, S. Cost-effectiveness of Combined Outreach for the Pneumococcal and Influenza Vaccines. **Arch. Intern. Med.**, v. 161, p. 111-120, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pneumonia. 2010. Disponível em: <[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/)>. Acesso em: 1 Jul 2011.

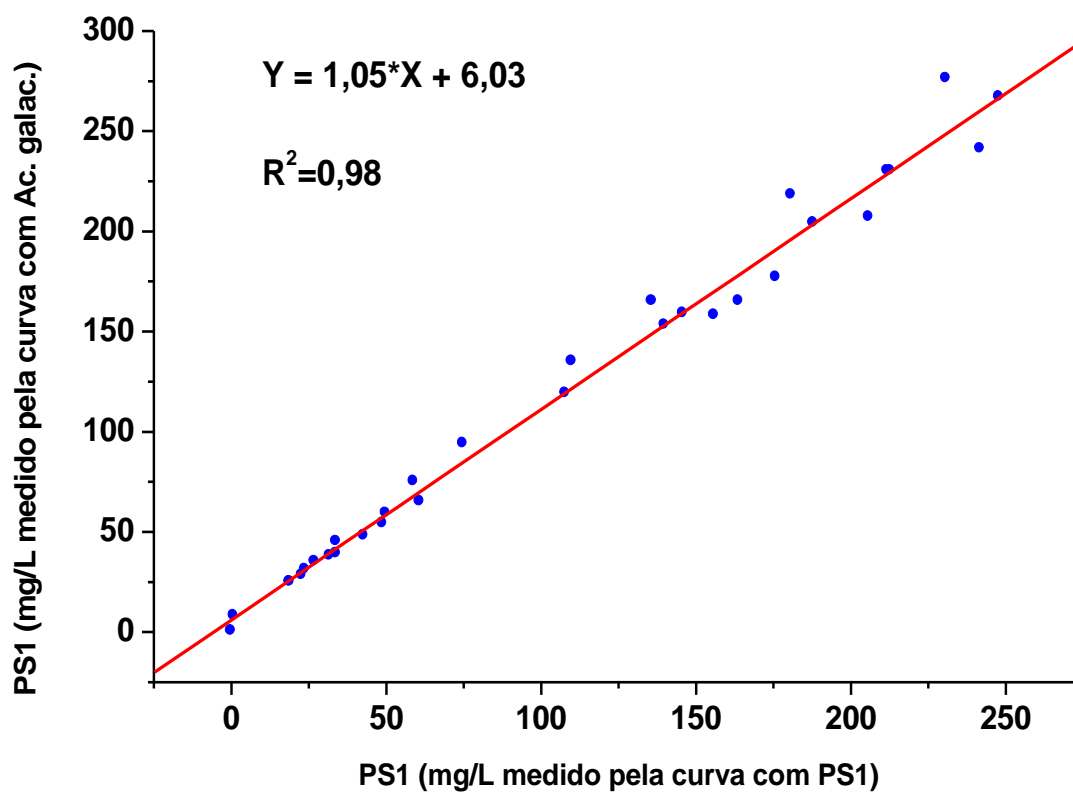


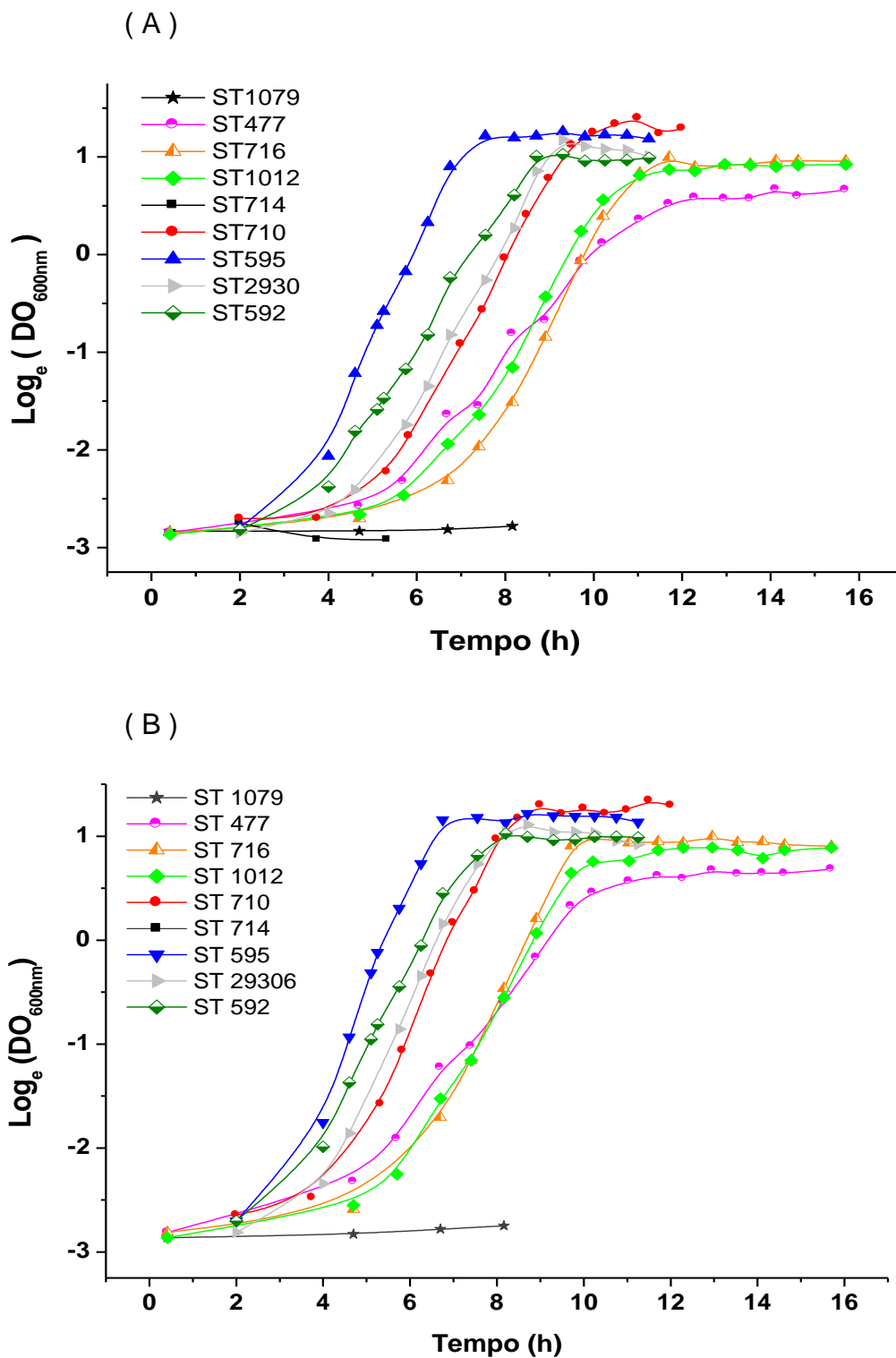
WIDMER, W. Analysis of biomass sugars and galacturonic acid by gradient anion Exchange chromatography and pulsed amperometric detection without post-column addition. **Biotechnol. Lett.**, v. 33, p. 365-368, 2011.

WU, X.; CUI L.; LIPINSKI, T.; BUNDLE, D. R. Synthesis of Monomeric and Dimeric Repeating Units of the Zwitterionic Type 1 Capsular Polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae*. **Chemistry**, v. 16, p. 3476–3488, 2010.

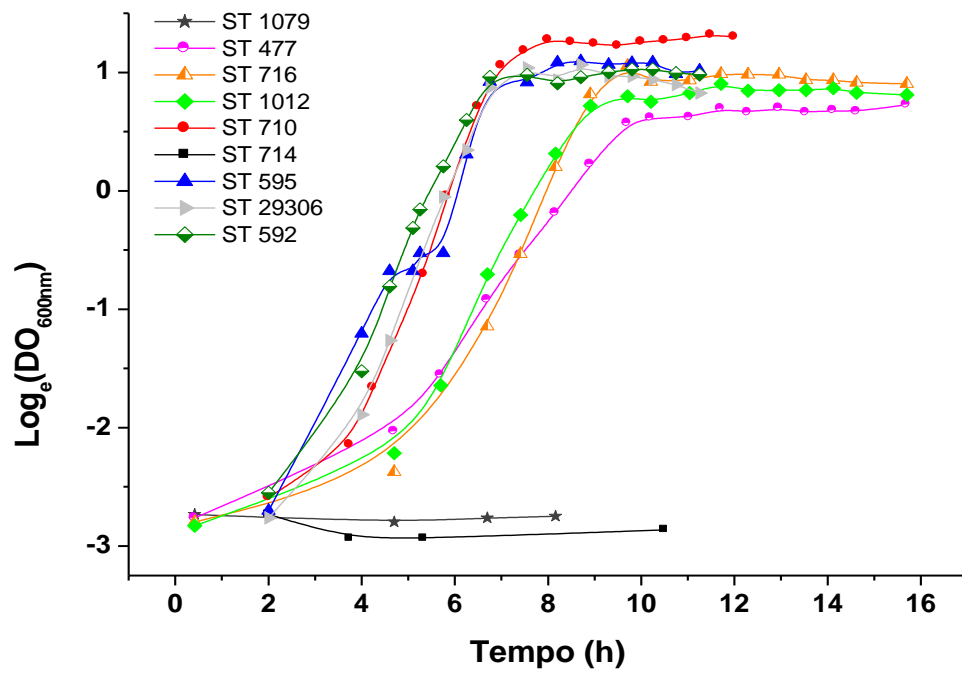
YESILKAYA, H.; SPISSU, F.; CARVALHO, S. M.; TERRA, V. S.; HOMER, K. A.; BENISTY, R.; PORAT, N.; NEVES, A. R.; ANDREW, P. W. Pyruvate formate lyase is required for pneumococcal fermentative metabolism and virulence. **Infect. Immun.**, p. 5418-5427, 2009.

YU, Z.; DU, G.; ZHOU, J.; CHEN, J. Enhanced  $\alpha$ -ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by an improved integrated fed-batch strategy. **Bioresour. Technol.**, v. 114, p. 597–602, 2012.

**APÊNDICE A – Relação entre medidas de PS1 (Curvas padrão diferentes)****Figura A1 – Pontos experimentais de três cultivos estimados a partir de curvas padrões diferentes**

APÊNDICE B - Crescimento celular de cepas de *S. pneumoniae* sorotipo 1Figura B1: Crescimento de *S. pneumoniae* com diferentes volumes de inóculo

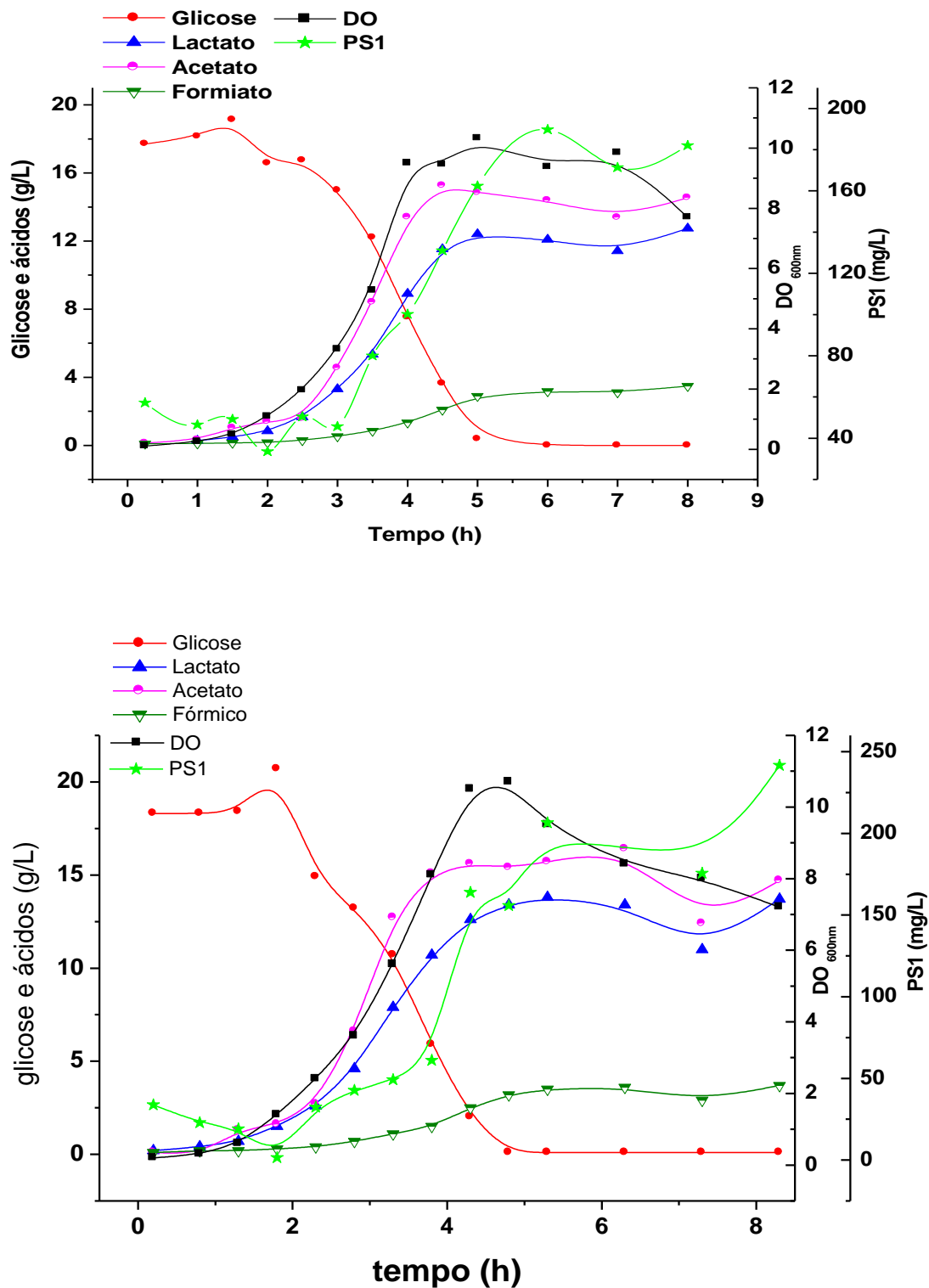
(C)



( A ) com 10  $\mu$ L de inóculo; ( B ) com 25  $\mu$ L e ( C ) com 50  $\mu$ L.

### APÊNDICE C – Cultivos do planejamento fatorial fracionado

**Figura C1** - Cultivos de *S. pneumoniae* sorotipo 1 dos pontos centrais (0; 0; 0; 0) do planejamento fatorial fracionado



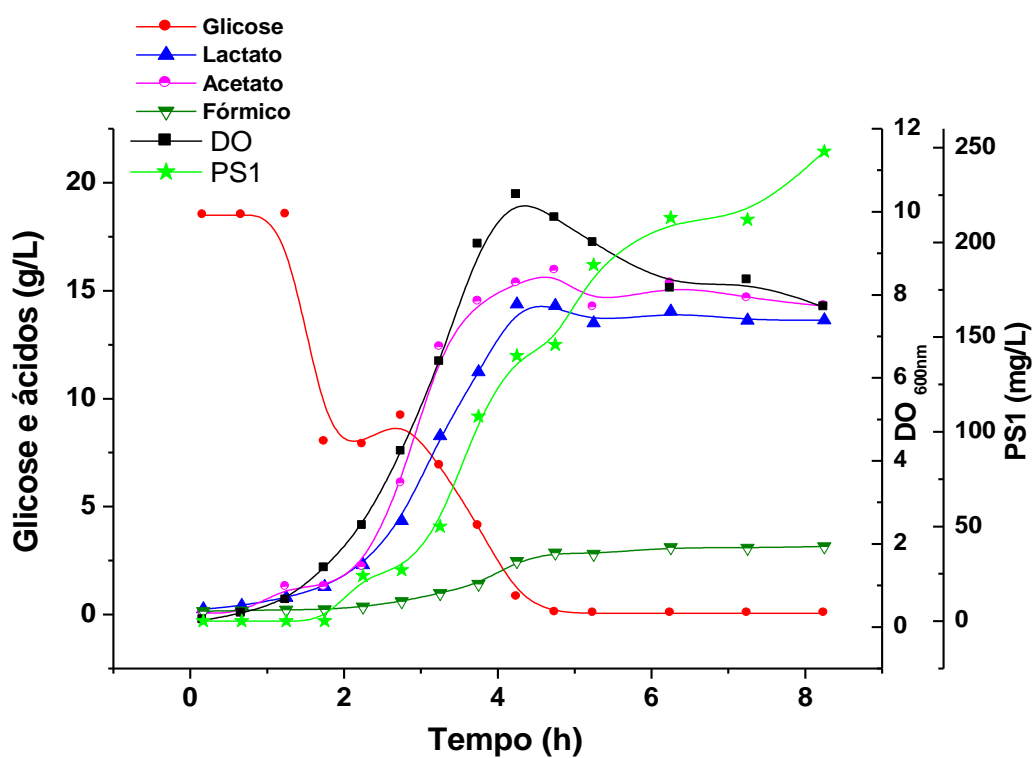
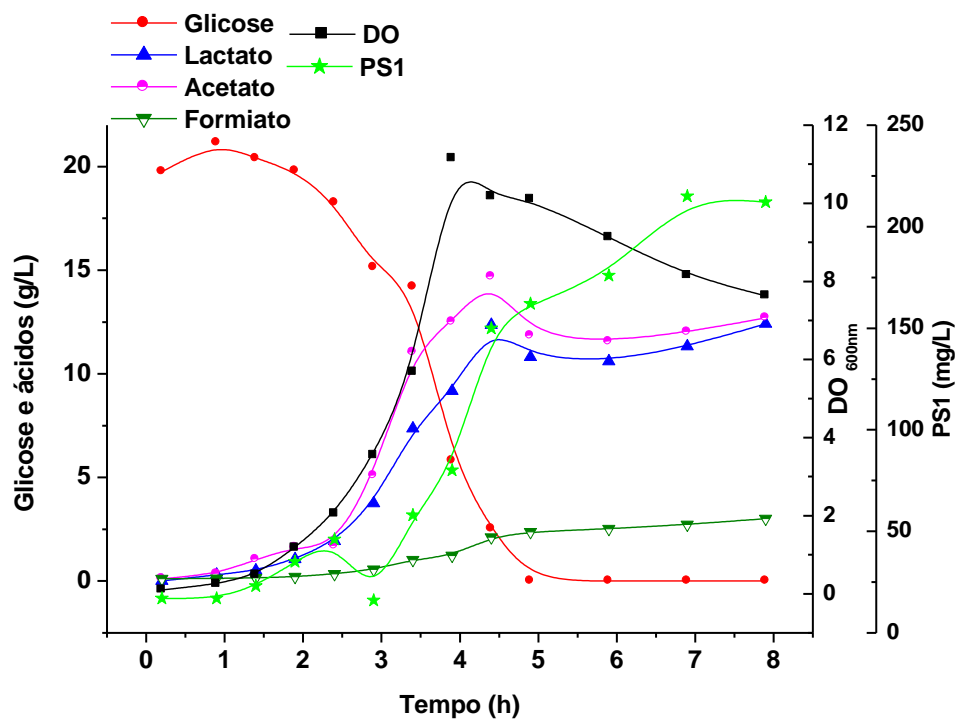


Figura C2 - Cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 1 do ponto (-1; -1; -1; -1) do planejamento fatorial fracionado

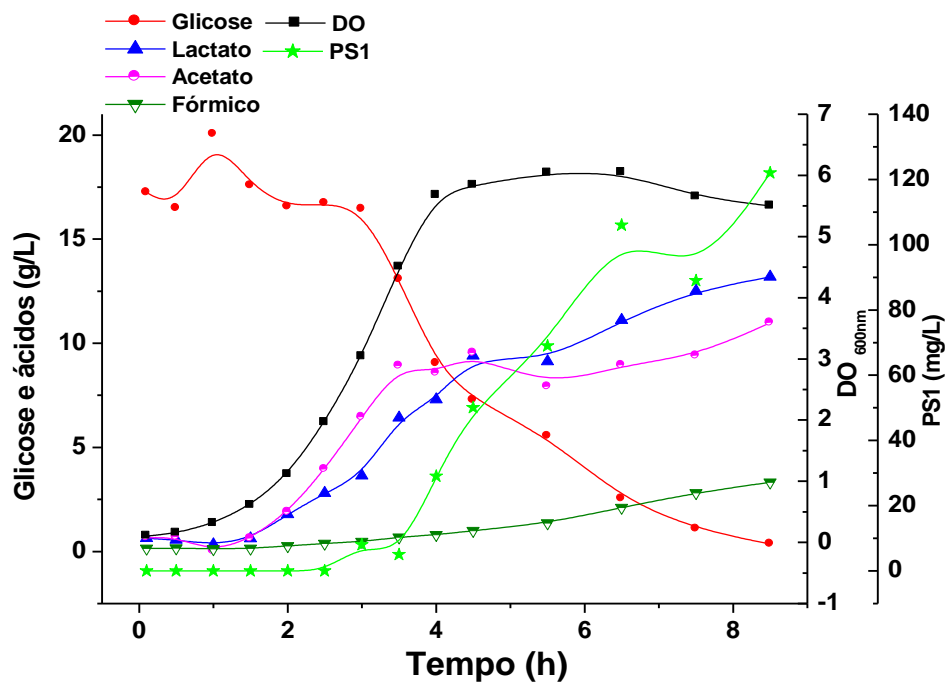
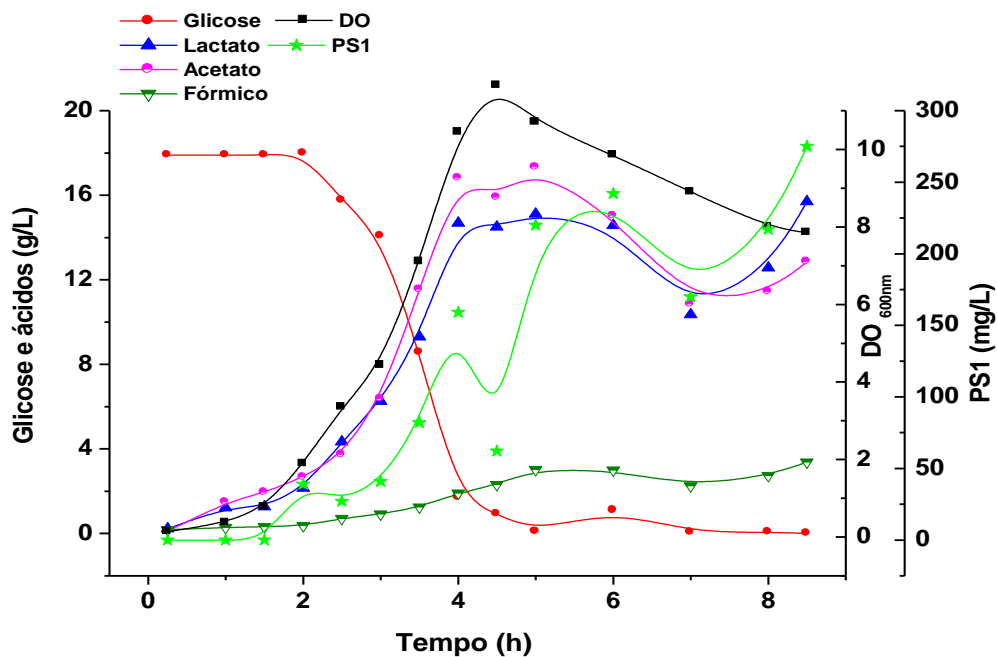
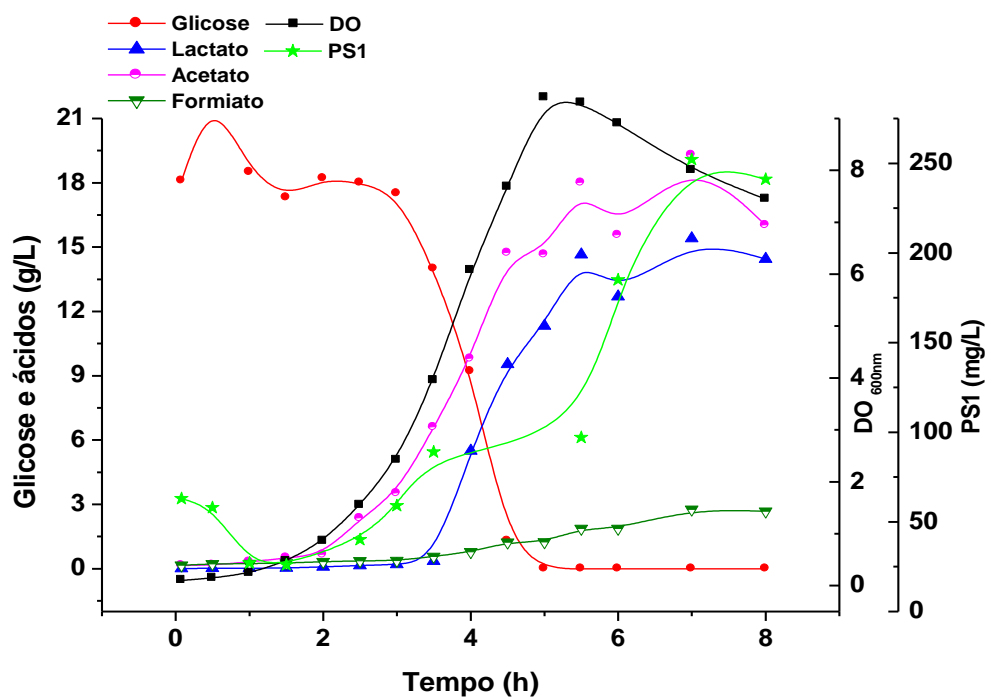


Figura C3 - Cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 1 do ponto (+1; +1; +1; +1) do planejamento fatorial fracionado



**Figura C4** - Cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 1 do ponto (-1; +1; +1; -1) do planejamento fatorial fracionado



**Figura C5** - Cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 1 do ponto (+1; -1; -1; +1) do planejamento fatorial fracionado

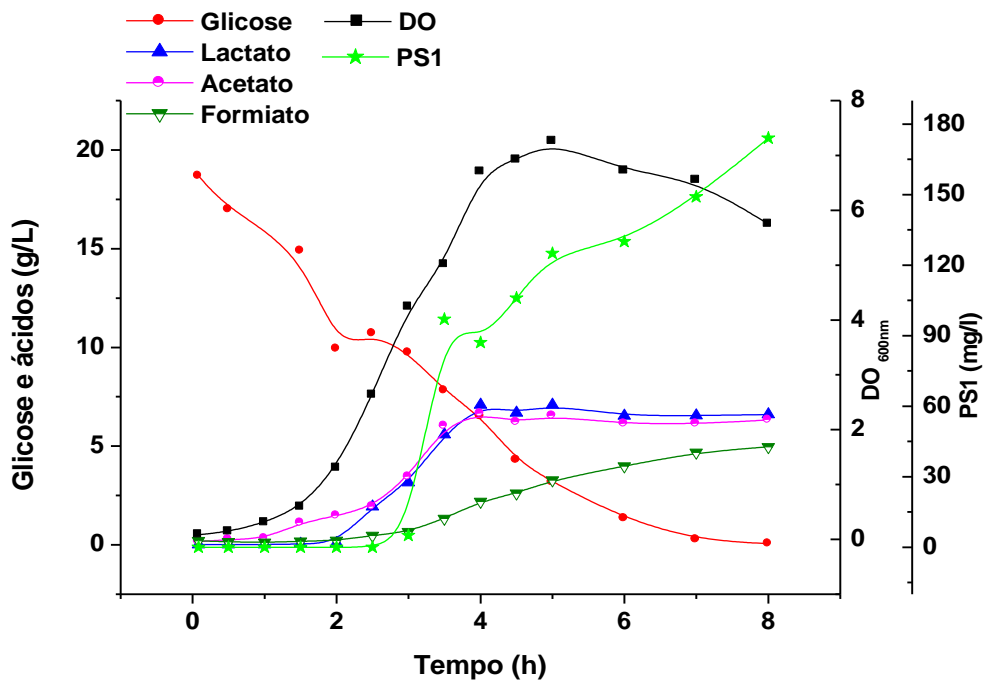




Figura C6 - Cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 1 do ponto (-1; +1; -1; +1) do planejamento fatorial fracionado

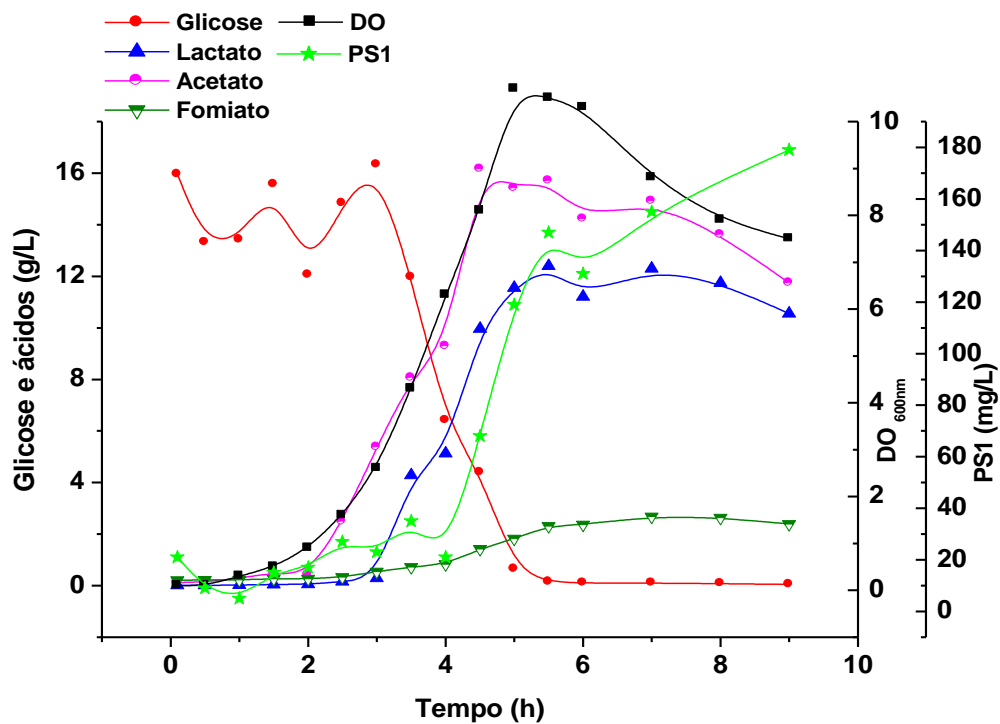
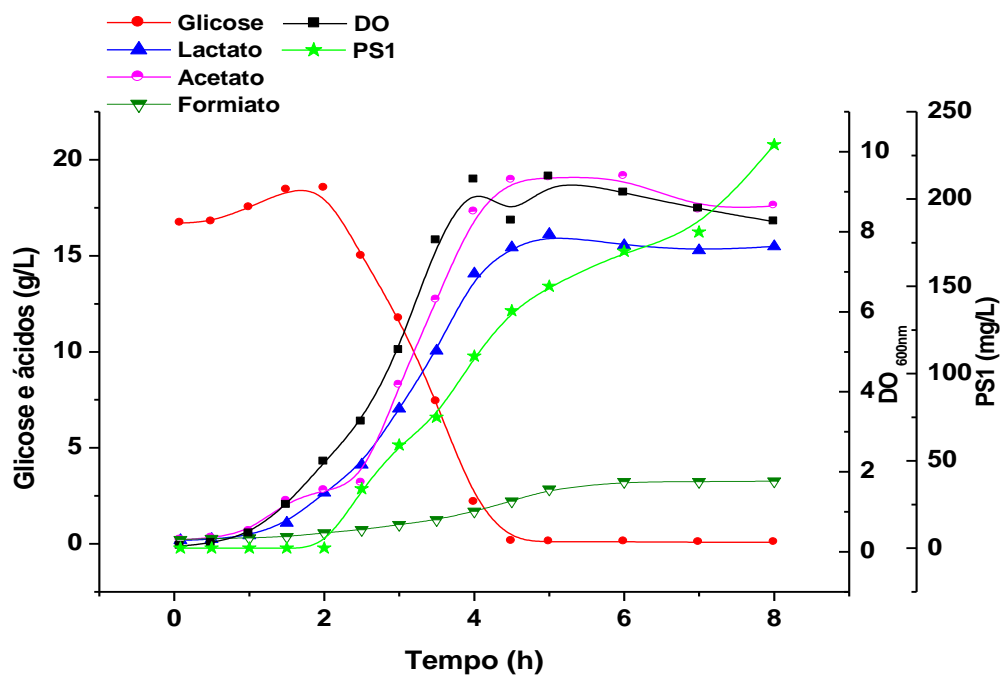
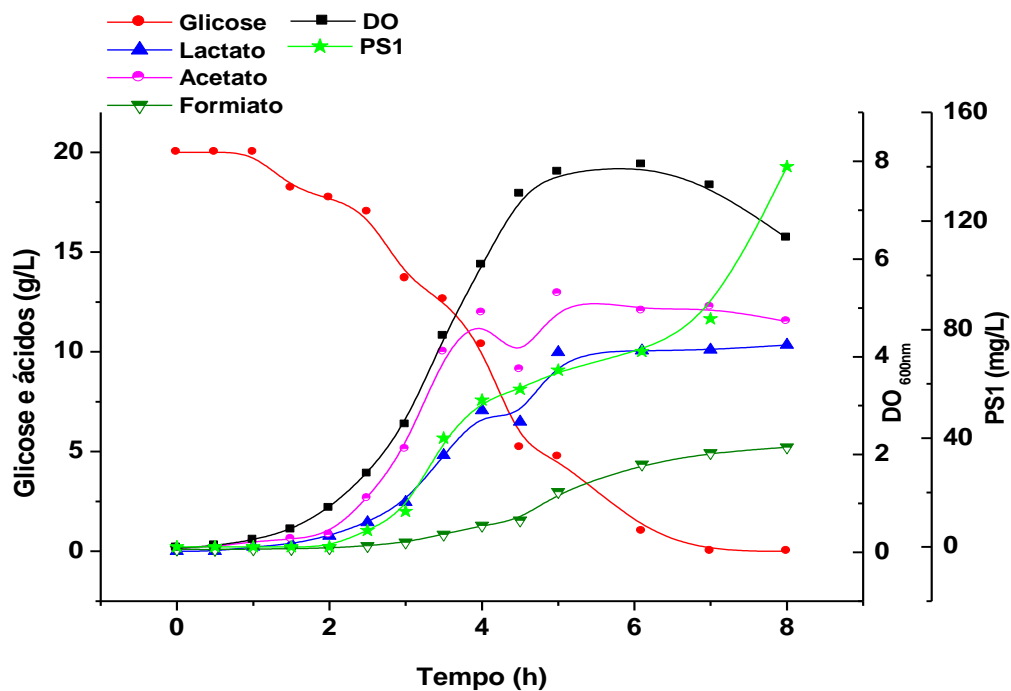


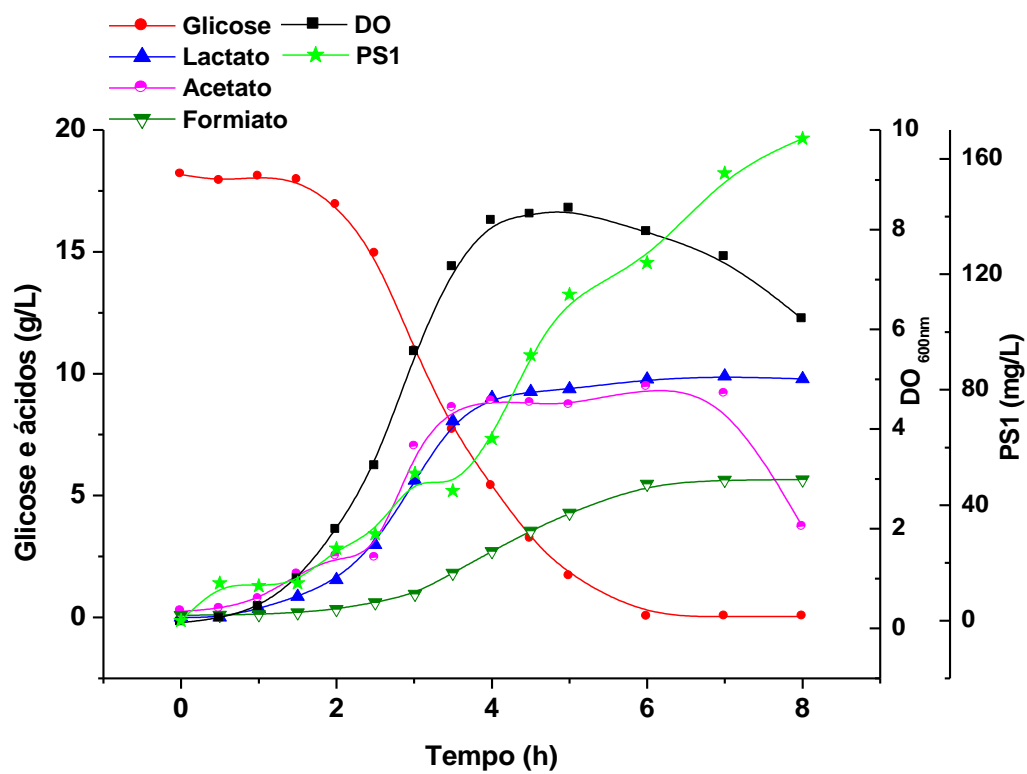
Figura C7 - Cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 1 do ponto (+1; +1; -1; -1) do planejamento fatorial fracionado



**Figura C8** - Cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 1 do ponto (-1; -1; +1; +1) do planejamento fatorial fracionado



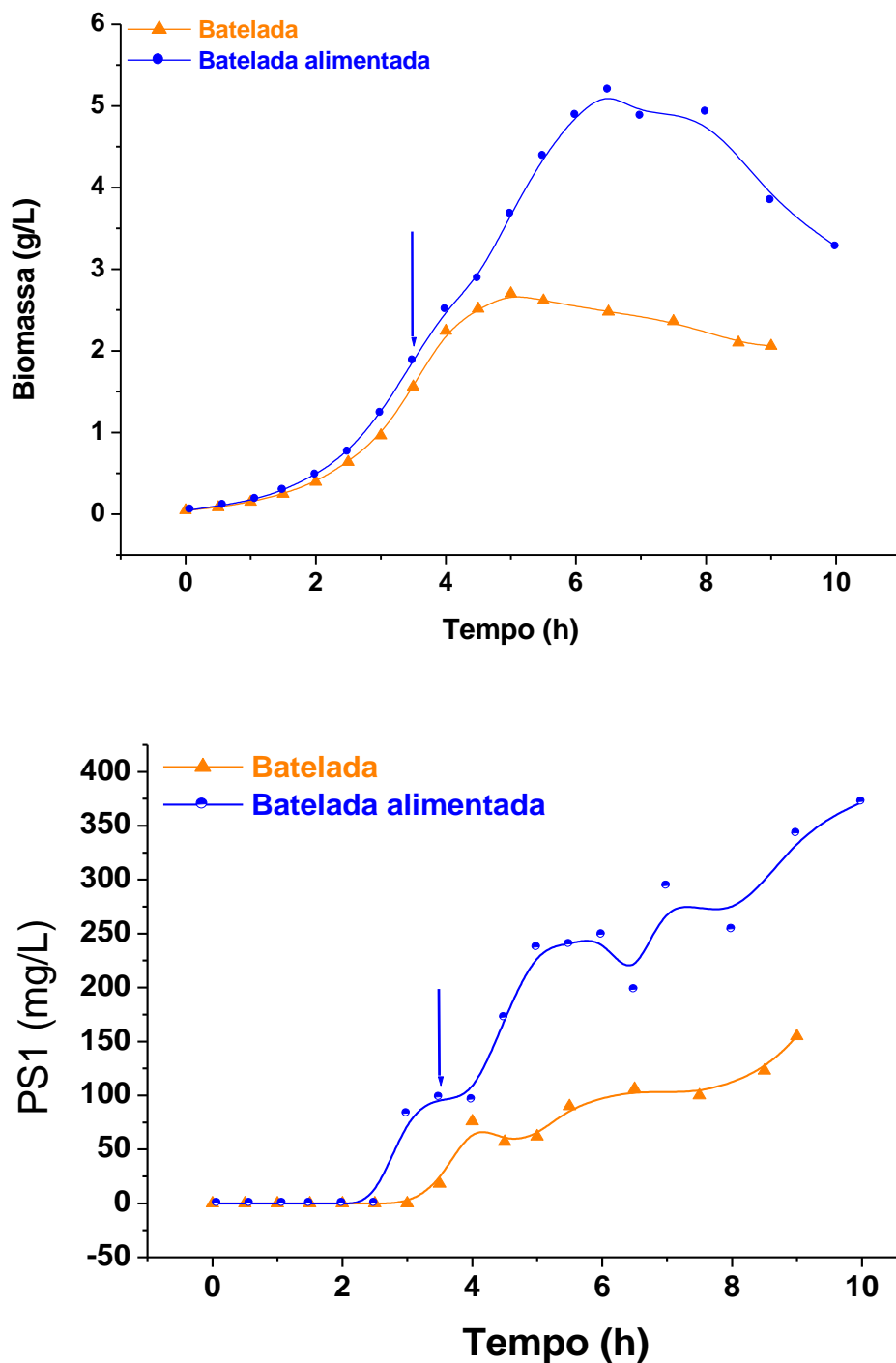
**Figura C9** - Cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 1 do ponto (+1; -1; +1; -1) do planejamento fatorial fracionado



**APÊNDICE D – Composição de reagentes****Tabela D1 - Composição dos componentes complexos utilizados nos diversos meios de cultura durante os experimentos**

		Casaminoácidos	Phytone	Soytone	Extrato de levedura
Nitrogênio Total	(%)	10,8	9,0	9,4	10,7
Amino Nitrogênio	(%)	9,4	2,4	3,1	6,0
Carboidratos Totais	(mg/g)	0,0	392,9	292,5	108,2
Cinzas	(%)	18,3	12,4	12,0	18,2

## APÊNDICE E – Cultivos da avaliação do novo meio de cultura

Figura E1 - Produção de biomassa e PS1 por *S. pneumoniae* sorotipo 1 em cultivos batelada simples e batelada alimentada

## ANEXO A - Simulação dos cultivos em Anabio 1.2

Modelo cinético:

- Monod; onde  $\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S}$

- Produto (lactato + acetato) parcialmente associado ao crescimento;  
onde  $\mu_p = \alpha \cdot \mu + \beta$

- Sem inibição pelo substrato nem pelo produto.

- A soma da produção de lactato e acetato ponto a ponto foi o produto escolhido para dar de entrada no software. O PS1 não foi escolhido para a simulação; pois este é um produto minoritário quando comparado à produção de ácidos e biomassa.

- Parâmetros e variáveis estimadas para ajustar o modelo aos dados experimentais:

$C_{X0}$	0,04 g/L	$C_{Se}$	105 g/L	$\mu_{\max}$	1,0 h <sup>-1</sup>
$C_{S0}$	26,0 g/L	$C_{Xe}$	0,0 g/L	$K_s$	0,4 g/L
$C_{p0}$	0,16 g/L	$Y_{x/s}$	0,17	$\alpha_0$	5,88
$T_{bat}$	4,0 h	$Y_{p/s}$	1,0	$\beta_0$	0,5 h <sup>-1</sup>
$F$	0,5 L/h	$K_{dp}$	0,0	$C_{S2}$	20,0 g/L
$V_0$	3 L	$K_d$	0,12		
$T_{total}$	9,5 h	$C_{s1}$	0,012 g/L		

Para os valores de  $C_{X0}$ ;  $C_{S0}$ ;  $C_{s1}$  e  $C_{p0}$  foram empregados os pontos experimentais do cultivo (-1; +1; +1; -1); isto é, com 2 g/L de extrato de levedura, 15 g/L de Phytone, 0,435 g/L de asparagina e 0,03 g/L de glutamina.

$T_{bat}$  – foi o período de batelada que o cultivo (-1; +1; +1; -1) levou para alcançar a concentração máxima de células.

$F$  – foi estimado pelo software.

$K_d$ ;  $K_s$ ;  $\alpha_0$ ;  $\beta_0$  e  $C_{s2}$  – foram estimados por tentativa e erro até que o modelo se ajustasse aos dados experimentais.

$C_{se}$  – valor calculado pela soma da glicose com os carboidratos totais (considerados como hexoses) de Phytone e Extrato de levedura concentrados 4 vezes no meio de alimentação.

$Y_{p/s}$  – considerou-se o máximo teórico igual a 1,0, pois a concentração de produto utilizada na simulação foi a soma das concentrações de acetato e lactato.

$\mu_{\max}$  e  $Y_{x/s}$  – foram calculados dos dados experimentais do cultivo (-1; +1; +1; -1).

Figura 1A: Entrada de dados no software Anabio 1.2

