ESCOLA POLITÉCNICA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Pós-Graduação em Engenharia Química

Luan Merida de Medeiros

**Produção de fragmentos de anticorpos VHH contra
toxinas de *Bothrops jararacussu* em biorreator por
Escherichia coli HB 2151**

São Paulo

2018

Luan Merida de Medeiros

**Produção de fragmentos de anticorpos VHH contra
toxinas de *Bothrops jararacussu* em biorreator por
Escherichia coli HB 2151**

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, da Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo, como requisito para obtenção
do título de mestre em Ciências.**

**Área de concentração: Engenharia
Química.**

Orientador: Prof. Dr. Aldo Tonso.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Medeiros, Luan

Produção de fragmentos de anticorpos VHH contra toxinas de *Bothrops jararacussu* em biorreator por *Escherichia coli* HB 2151 / L. Medeiros -- versão corr. -- São Paulo, 2018.
107 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.VHH 2.E. coli 3.Biorreator 4.Bioprocessos 5.Fermentação I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

*“Compreender as coisas que nos rodeiam
é a melhor preparação para compreender o que há mais além.”*

Hypatia de Alexandria
(a primeira grande matemática da história, aproximadamente 355 d.C.)

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Aldo Tonso, pela orientação prestada, sinceridade, humanidade, transparência, paciência e caráter, sem o qual este projeto seria totalmente inviável.

Agradeço aos meus pais, Rita de Cássia e João Batista, por tudo o que fizeram por mim.

Agradeço aos amigos do Grupo de Engenharia de Bioprocessos: em especial a Guilherme Fabri, pelo constante apoio e sobretudo troca de informações sobre biorreatores; a Gabriela Carmignotto, principalmente no tocante às técnicas de purificação; a Carla Reis, pelo auxílio em técnicas experimentais e a Letícia Parizotto, pela amizade, companhia durante experiências e auxílio na análise de amostras. Agradeço também a Daniela Teruya, Bianca Peres, Julia Ortiz e Rafael Risnik pelas discussões e paciência, que fizeram meu trabalho crescer.

Agradeço às funcionárias Orlinda e Andreia, pelo apoio imprescindível e grandes ensinamentos, principalmente no início da minha fase experimental.

Agradeço aos professores Dr. Adriano Azzoni e Dr. Thiago Basso que, dentro do departamento, contribuíram para que meu trabalho evoluísse.

Agradeço à Prof^a Dr.^a Carla Celedônio, chefe da equipe da Fiocruz Rondônia, e à Dr.^a Soraya dos Santos Pereira, pesquisadora, pela parceria, doação das cepas e presteza de informações, sempre que solicitadas.

Agradeço ao CNPq pelos proventos durante a vigência da bolsa.

Agradeço a todos os meus amigos e familiares que, direta ou indiretamente, auxiliaram na formação da minha conduta e me incentivaram a concluir meu projeto de mestrado.

Por fim, agradeço a todo aquele que fez uma crítica do meu trabalho e me permitisse evoluir.

RESUMO

Em caso de envenenamento ofídico, o tratamento no Brasil hoje é realizado pela administração de soros geralmente produzidos por equinos, que apresentam eficácia limitada: são úteis para os efeitos sistêmicos, mas não inibem efetivamente a evolução dos danos locais, podem causar reações adversas e apresentam alto custo de produção. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), trata-se de uma doença negligenciada pelas autoridades científicas mundiais. O presente projeto, em parceria com o Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais da Fundação Oswaldo Cruz – Rondônia, propõe a produção por *Escherichia coli* de fragmentos de anticorpos de cadeia pesada de camelídeos, denominados VHH, contra as toxinas do veneno de *Bothrops jararacussu*, utilizando biorreator.

Neste trabalho há interesse em produzir VHH, através da otimização do crescimento desta *E. coli*. A cinética do crescimento bacteriano foi realizada em shaker orbital sob diferentes condições, variando tamanho do frasco, rotação do shaker, composição do meio de cultura e concentração de substrato; e em biorreatores, alternando meios de cultura e modo de operação do reator (descontínuo e descontínuo alimentado), alterando a vazão de alimentação (linear e exponencial)

O processo cinético é fortemente limitado pela formação de acetato, por condições auxotróficas da célula e pela transferência de oxigênio. Nos ensaios em frascos agitados, uma melhor condição de crescimento foi obtida utilizando frascos de 1 L, sob rotação a 270 rpm e 5,0 g/L de glicose.

Nos ensaios em reator, quando operados em batelada obtiveram-se cerca 5,5 g/L de células finais, contra 9,3 g/L de células em batelada alimentada com vazão constante. Um maior crescimento foi ainda obtido em um reator de 2 L em regime de batelada alimentada exponencialmente. O biorreator varia a agitação do meio e mantém um nível pré-definido de oxigênio dissolvido, evitando a limitação de oxigênio e controlando a oferta de glicose para o crescimento celular. Neste processo, atingimos 25,6 g/L de células e 0,35 g/L de proteína total após purificação, utilizando meio M9 suplementado.

Palavras-chave: *E. coli*, VHH, nanocorpos, bioprocessos, biorreator, fermentação.

ABSTRACT

Nowadays in Brazil, the treatment for snakebite poisoning is carried out by the administration of horse sera, which have limited effectiveness: they are useful for systemic effects, but do not effectively inhibit local damage, cause adverse reactions, and present high production costs. According to the WHO, this disease is neglected by the world's scientific authorities. This project, in partnership with the Institute for Research in Tropical Diseases of Oswaldo Cruz Foundation – Rondonia, proposes the production of heavy chain antibody fragments from camelids, called VHH, using *Escherichia coli*, to be used against the toxins from the *Bothrops jararacussu* poison, using a bioreactor.

This work is interested in producing VHH through the use of *E. coli*. The kinetics of bacterial growth were performed in orbital shaker under different conditions, varying vial size, shaker rotation, composition of the culture medium and substrate concentration; and bioreactors, alternating culture media and operation mode of reactor (batch and fed-batch), changing feeding rate (linear and exponential).

The kinetic process is statically bound to acetate formation, auxotrophic conditions of the cell and oxygen transfer. In assays in shaken flasks, an output of 270 rpm and 5.0 g/L of glucose.

In reactor runs, when operated in a batch 5.5 g/L of final cells were obtained, against 9.3 g/L of final cells in fed-batch with constant flowrate. A larger value was obtained in an exponentially fed-batch reactor of 2 L. The bioreactor varies the agitation of oxygen and controls glucose addition for cell growth. In this process, 25.6 g/L cells and 0.35 g/L total protein after purification were reached, using supplemented M9 medium.

Keywords: *E. coli*, VHH, nanobodies, bioprocess, bioreactor, fermentation.

ABREVIATURAS

Abs = absorbância (medida obtida através de densidade óptica)

Abs_{FINAL} = absorbância no final do ensaio (medida obtida através de densidade óptica)

DO = densidade óptica (absorbância)

m_{umidade} = massa da umidade (g)

m_{memb.vazia úmida} = massa da membrana vazia úmida (g)

m_{memb.vazia seca} = massa da membrana vazia seca (g)

R² [X(abs)] = erro quadrático da linearização da massa seca por absorbância

S₀ = concentração de substrato no início da alimentação (g/L)

t = tempo (usado, preferencialmente, em horas)

V = volume do reator (L)

V_{filtrado} = volume filtrado no kitassato (L)

X₀ = concentração celular no início da alimentação (g/L)

Y_{sp/s} = fator de conversão subproduto a substrato (g/g)

Y_{x/s} = fator de conversão células a substrato (g/g)

X = massa seca (g/L)

X_{FINAL} = massa seca no final do ensaio (g/L)

Δt_{fase exponencial} = intervalo de tempo que durou a fase exponencial (h)

μ = velocidade específica de crescimento

μ_{máx} = velocidade específica de crescimento na fase exponencial (h⁻¹)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Bothrops jararacussu</i> , com destaque para sua fosseta lateral.....	02
Figura 2. Representação esquemática da igG convencional (a), de um anticorpo de cadeia pesada da família <i>Camelidae</i> (HCAb); (b) e domínio variável de HCAb (VHH).....	05
Figura 3. Local da clivagem na <i>E. coli</i> utilizando <i>EcoRI</i>	11
Figura 4. <i>Escherichia coli</i> com zoom de 10.000x.....	14
Figura 5. Glicólise.....	16
Figura 6. Efeito da temperatura no crescimento da <i>E. coli</i>	19
Figura 7. Fluxograma de procedimentos analíticos.....	28
Figura 8. Biorreator sendo utilizado para crescimento de <i>E. coli</i> e expressão de VHHs.....	33
Figura 9. Vazão da bomba de nutriente.....	34
Figura 10. Evolução no tempo da absorbância e concentração celular dos três clones bacterianos no shaker dos ensaios S1 , S2 e S3	41
Figura 11. Análise da fase exponencial na comparação de três diferentes clones dos ensaios S1 , S2 e S3	42
Figura 12. Evolução no tempo da absorbância e concentração celular ao se compararem tamanhos de erlenmeyers distintos, referentes aos ensaios S4 e S5 . ..	43
Figura 13. Análise da fase exponencial nos ensaios S4 e S5	44
Figura 14. Evolução no tempo da absorbância e concentração celular na comparação entre glicose 1x (ensaio S6) e glicose 5x (ensaio S7).....	45
Figura 15. Análise da fase exponencial na comparação entre crescimento celular com glicose 1x (ensaio S6) e glicose 5x (ensaio S7).....	45
Figura 16. Perfil da medida pH durante ensaio, na comparação entre crescimento celular com glicose 1x (ensaio S6) e glicose 5x (ensaio S7).....	47
Figura 17a. Análise da concentração de acetato e glicose, ambos medidos por HPLC, no meio de concentração 1X (S6).....	47

Figura 17b. Análise da concentração de acetato e glicose, ambos medidos por HPLC, no meio de concentração 5X (S7).....	48
Figura 18. Resultados de HPLC para amostras crescidas em meio M9, com foco na interpretação dos resultados de ácido acético; pelos métodos RID e PDA.....	49
Figura 19a. Concentração celular por substrato do meio 5x (ensaio S7).....	50
Figura 19b. Concentração celular por substrato do meio 1x (ensaio S6).....	51
Figura 20. Evolução no tempo da absorbância nos ensaios S8 e S9.....	52
Figura 21. Análise da fase exponencial dos ensaios S8 e S9.....	53
Figura 22. Comparação entre os experimentos análogos S6 e S8.....	53
Figura 23a. Evolução no tempo do pH, da absorbância e da massa seca no shaker (ensaio S6).....	54
Figura 23b. Evolução no tempo do pH, da absorbância e da massa seca no reator (ensaio R1).....	55
Figura 24. Evolução no tempo da concentração de substrato (glicose medida no YSI) e subprodutos no ensaio S10.....	55
Figura 25. Evolução no tempo da concentração de substrato (glicose medida no YSI) e subprodutos no ensaio R1.....	56
Figura 26. Evolução no tempo da absorbância e massa seca nos ensaios S11, S12 e S13.....	58
Figura 27. Análise da fase exponencial nos ensaios S11, S12 e S13.....	58
Figura 28. Evolução de subproduto e substrato nos ensaios S11, S12 e S13.....	59
Figura 29 a, b, c. Resumos dos ensaios S11, S12 e S13.....	60
Figura 30. Conversão de substrato a subproduto dos ensaios S11, S12 e S13.....	61
Figura 31. Conversão de substrato a células dos ensaios S11, S12 e S13, pelo método exponencial.....	62
Figura 32. Evolução no tempo de absorbância e massa seca, relativos aos ensaios R2 e S14.....	63
Figura 33. Análise da fase exponencial relativa aos ensaios R2 e S14.....	63
Figura 34. Perfil do pH nos ensaios R2 e S14.....	64
Figura 35. Tela do programa BioCommand referente ao ensaio R2.....	65

Figura 36. Subproduto e substrato nos ensaios R2 e S14 , utilizando meio suplementado 2.....	65
Figura 37. Conversão substrato a subproduto nos ensaios R2 (reator) e S14 (shaker).....	66
Figura 38. Conversão substrato a células nos ensaios R2 (reator) e S14 (shaker).....	67
Figura 39. Evolução no tempo de absorbância e massa seca no ensaio R3	68
Figura 40. Análise da fase exponencial do ensaio R3	68
Figura 41. Absorbância, massa de base consumida e glicose no ensaio R3	69
Figura 42. Conversão de substrato a células, pelo método global, do ensaio R3 ..	70
Figura 43. Evolução no tempo da absorbância e massa seca do ensaio F1	70
Figura 44. Análise da fase exponencial do ensaio F1	71
Figura 45. Balanço de massa de glicose no reator em regime descontínuo-alimentado.....	72
Figura 46. Conversão substrato consumido a células..... no ensaio F1	72
Figura 47. Evolução no tempo da absorbância e massa seca do ensaio F2	73
Figura 48. Evolução massa seca em função da absorbância no ensaio F2	74
Figura 49. Evolução no tempo da massa de base consumida.....	74
Figura 50. Análise da fase exponencial do ensaio F2	75
Figura 51. Balanço de massa de glicose do ensaio F2	76
Figura 52. Conversão de substrato a células do ensaio F2	76
Figura 53. Resumo do ensaio F3	77
Figura 54. Evolução no tempo da massa seca e absorbância no ensaio F3	78
Figura 55. Comparação da massa seca em função da absorbância do ensaio F3 ...	79
Figura 56. Base Consumida, Glicose Residual, Acetato e Massa Seca do ensaio F3	79
Figura 57. Balanço de massa de glicose no ensaio F3	80
Figura 58. Conversão de substrato a células do ensaio F3	81
Figura 59. Evolução no tempo da absorbância e da massa seca do ensaio F4	82
Figura 60. Massa seca em função da absorbância no ensaio F4	83
Figura 61. Massa de base consumida durante o ensaio F4	83

Figura 62. Análise da fase exponencial do ensaio F4	84
Figura 63. Balanço de massa de glicose do ensaio F4	85
Figura 64. Conversão de substrato consumido em células no ensaio F4	85
Figura 65. Resumo do ensaio F4	86
Figura 66. Comparação entre os ensaios F3 e F4.....	87
Figura 67. Comparativo de indução: concentração celular em shaker sem induzir e em shaker com indução com IPTG.....	88
Figura 68. Eletroforese evoluindo no tempo.....	89
Figura 69. Comparação da concentração celular obtida em diferentes formas de condução dos ensaios.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vantagens do VHH e explicações moleculares.....	8
Tabela 2. Composição dos meios M4 e M5	26
Tabela 3. Quadro resumo com ensaios.....	38
Tabela 4. Correspondência entre ensaios e meios de cultura.....	57
Tabela 5. Tabela comparativa com o resultado de todos os ensaios de cinética..	90

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Equação de Monod.....	20
Equação 2. Massa da umidade da membrana de celulose.....	30
Equação 3. Massa seca.....	31
Equação 4. Vazão da bomba de nutriente.....	34
Equação 5. Vazão de nutriente na batelada alimentada.....	34
Equações 6. Integração da velocidade específica de crescimento.....	37
Equação 7. Velocidade específica de crescimento da fase exponencial.....	37
Equação 8. Velocidade específica do consumo de substrato.....	38
Equação 9. Conversão substrato a célula global.....	38
Equação 10. Conversão substrato a célula da fase exponencial.....	38
Equação 11. Conversão substrato consumido a célula gerada da fase exponencial em regime fed-batch.....	38
Equação 12. Produtividade em células.....	39
Equação 13. Massa consumida no reator em batelada alimentada.....	71
Equação 14. Massa consumida acumulada no reator em batelada alimentada....	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 ANTICORPOS DE CAMELÍDEOS (VHH).....	5
3.2 CLONAGEM.....	10
3.3 METABOLISMO BACTERIANO.....	13
3.4 MÉTODOS DE SE OBTER ALTA CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 CÉLULAS.....	25
4.2 MEIOS DE CULTURA.....	25
4.3 PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DO PRÉ INÓCULO.....	27
4.4 PROTOCOLO INICIAL DO CRESCIMENTO DO VHH EM <i>E. COLI</i>	27
4.5 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS.....	27
4.6 PROTOCOLO DE CRESCIMENTO EM BIORREATOR.....	30
4.7 PROTOCOLO DE INDUÇÃO.....	34
4.8 PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO.....	34
4.9 ANÁLISE ELETROFORÉTICA.....	35
4.10 CÁLCULO DE PARÂMETROS CINÉTICOS.....	36
4.11 QUADRO RESUMO COM ENSAIOS.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 ENSAIOS S1, S2 E S3: COMPARAÇÃO ENTRE TRÊS DIFERENTES CLONES DE HB2151.....	41
5.2 ENSAIOS S4 E S5: COMPARAÇÃO DA GEOMETRIA DO FRASCO.....	43
5.3 ENSAIOS S6 E S7: COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE GLICOSE EM CRESCIMENTO EM SHAKER.....	44
5.4 ENSAIOS S8 E S9: COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES FREQUÊNCIAS DE AGITAÇÃO DE SHAKER.....	52

5.5 ENSAIOS S10 E R1: COMPARAÇÃO ENTRE CINÉTICA EM SHAKER E BIORREATOR DESCONTÍNUO COM MEIO M9 E AMPICILINA.....	54
5.6 ENSAIOS S11, S12 E S13: COMPARAÇÃO EM SHAKER ENTRE CRESCIMENTOS COM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	57
5.7 ENSAIOS R2 E S14: COMPARAÇÃO ENTRE CINÉTICA EM SHAKER E BIORREATOR DESCONTÍNUO COM MEIO O MEIO 2 SUPLEMENTADO.....	62
5.8 ENSAIO R3: CULTIVO DESCONTÍNUO COM MEIO M9 SUPLEMENTADO COM TIAMINA E L-PROLINA.....	67
5.9 ENSAIOS F1 E F2: CULTIVO DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM MEIO M9 SUPLEMENTADO COM TIAMINA E L-PROLINA COM VAZÃO CONSTANTE.....	70
5.10 ENSAIOS F3 E F4: CULTIVO DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM MEIO M9 SUPLEMENTADO COM TIAMINA E L-PROLINA COM ALIMENTAÇÃO EXPONENCIAL.....	78
5.11 INDUÇÃO.....	87
5.12 PURIFICAÇÃO.....	89
5.13 DISCUSSÃO GERAL.....	90
6. CONCLUSÕES.....	93
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	94
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
9. ANEXOS.....	106
10. APÊNDICE.....	107

1. INTRODUÇÃO

Com 1,8 a 2,7 milhões de acidentes ofídicos por ano, em 2017 a Organização Mundial da Saúde (OMS) voltou a reconhecer o problema como uma doença tropical negligenciada. Deste total, chegam a 138 mil óbitos por ano decorrentes do envenenamento. No Brasil, reportaram-se quase 30 mil acidentes em 2017, dos quais 106 evoluíram para óbito. (Portal do Ministério da Saúde, acessado no endereço <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/svs/43413-brasil-copatrocinau-resolucao-para-o-problema-dos-acidentes-ofidicos-no-mundo>>).

Ainda de acordo com a OMS, cerca de 4% dos novos medicamentos do começo da década foram destinados às doenças tropicais negligenciadas, que afetam 1 bilhão de pessoas em todo o mundo e acabam ameaçando a saúde de outros milhões. Apesar de afetarem muitas pessoas, as doenças negligenciadas não se tornam prioridade para investimento das indústrias farmacêuticas, que preferem garantir pesquisa para medicamentos que tenham significativo retorno financeiro. Muitas dessas doenças assolam lugares pobres e provocam intensos sofrimentos há séculos (OMS, 2010).

O veneno de serpentes é constituído por uma complexa mistura de proteínas, peptídeos e compostos inorgânicos capazes de afetar uma grande variedade de processos biológicos. As manifestações fisiopatológicas do envenenamento ofídico iniciam instantes após o envenenamento e diferem de acordo com o gênero de serpente. O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* é composto por metaloproteínas (mionecrose), serinoproteases (atividade do tipo trombina), fosfolipases (efeitos fisiológicos diversos), desintegrinas (bloqueia proteínas), miotoxinas (mionecroses) e neurotoxinas (efeitos no sistema nervoso central) (Cunha, 2012).

Dos acidentes ofídicos no Brasil reportados anualmente ao Ministério da Saúde, o gênero *Bothrops* é responsável por mais de 85% dessas notificações de ofidismo (Ribeiro et al., 1997).

As serpentes do gênero *Bothrops* apresentam as fossetas laterais, que são orifícios que possuem mecanismos termossensíveis e que permitem que esses animais sintam a presa pela temperatura, e não apenas usando visão, audição e olfato, o que torna os ataques muito comuns em bosques, campos e plantações. (Pinho et al., 2001).

Os acidentes ofídicos respondem por 23% dos casos de intoxicação humana no país, ficando em 2º lugar, perdendo apenas para intoxicações medicamentosas. (Ministério da Saúde, acesso em <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03_peconhentos.pdf>).

Os efeitos do veneno do gênero *Bothrops* gera inflamações agudas, miotoxicidade, atividades coagulante e hemorrágica, o que faz com que a vítima sinta dor intensa, edema e sangramento no local da picada. O edema pode evoluir para necrose e perda do membro afetado (Pinho et al., 2001).

Figura 1. *Bothrops jararacussu*, com destaque para sua fosseta lateral

Extraído de <<http://cobrasvenenosas.com>>

A orientação do Ministério da Saúde é que em caso de acidente com animais peçonhentos, a vítima procure atendimento médico imediatamente. (Portal do Ministério da Saúde, acessado em <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos-serpentes>>). Contudo, são frequentes na mídia brasileira reportagens de demora no atendimento, escassez do soro e até metodologia incorreta de aplicação, o que pode explicar boa parte dos óbitos. No anexo 1 encontram-se dois exemplos de reportagens sobre o tema.

Atualmente, o tratamento em caso de envenenamento por serpente é realizado pela administração de soros produzidos normalmente por equinos (Pinho et al., 2012) que, apesar de apresentarem eficácia para os efeitos sistêmicos, não inibem efetivamente a evolução dos danos locais, podem causar reações adversas e apresentam alto custo de produção (Silva, 2012).

O presente projeto propõe contribuir para o desenvolvimento de insumos biotecnológicos úteis à soroterapia antiofídica (botrópica). Como insumos são utilizados fragmentos de imunoglobulinas G de camelídeos que, além dos anticorpos clássicos de mamíferos, produzem anticorpos formados apenas por cadeias pesadas; de forma que o sítio de reconhecimento antigênico é constituído por uma única sequência peptídica, denominada VHH ou nanocorpo.

Após imunização do animal *Lama glama* com toxinas majoritárias do veneno de *Bothrops jararacussu*, fosfolipases (Bothropstoxina I e II - BthTX-I e BthTX-II), o *pool* de VHHs foi obtido por PCR, após extração de linfócitos, extração de RNA e síntese de cDNA. O material amplificado foi clonado em vetor fagomídeo para construção de biblioteca de cDNA (biblioteca primária). Os clones VHH capazes de reconhecer BthTX-I e II foram selecionados pela tecnologia *Phage Display* após expressão de forma recombinante na superfície de bacteriófagos filamentosos (Prado et al., 2014).

Subsequentemente, os clones foram transformados em cepa bacteriana *Escherichia coli*, para obtenção de sua forma solúvel e purificada. É importante mencionar que a produção de fragmentos de anticorpos em microrganismos apresenta vantagens relacionadas ao custo de produção, quando comparada a utilização de grandes animais para soroterápicos ou células de mamíferos.

A partir de três clones que expressam VHH em *E. coli*, gentilmente cedidos pela Prof.^a Dr.^a Carla Fernandes (Fiocruz Rondônia), foram gerados bancos de células que nortearam os processos analisados nesta pesquisa, no GEnBio (Grupo de Engenharia de Bioprocessos da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo).

No presente trabalho, se estudou a otimização do crescimento da bactéria visando a produção de VHHs, variando meios de cultura, condições de cultura em frasco e em biorreator, inclusive utilizando o modo de operação descontínuo-alimentado.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Contribuir para o desenvolvimento do processo de produção de VHHs capazes de reconhecer as fosfolipases BthTX-I e II do gênero *Bothrops*, por meio da otimização da expressão dos fragmentos proteicos, com vistas ao incremento da soroterapia antiofídica, através da otimização do crescimento da bactéria *E.coli* produtora de VHHs.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos incluem:

- desenvolver bioprocessos para crescimento bacteriano em frascos agitados em diferentes condições, variando tamanho do frasco, rotação do shaker, composição do meio de cultura e concentração de substrato;
- desenvolver bioprocessos para crescimento bacteriano em biorreatores, alternando meios de cultura e regime de operação do reator (batch e fed-batch), alterando a forma de alimentação (linear e exponencial);
- obter condições de cultivo que permitam chegar em maiores concentrações celulares;
- aumentar o rendimento do processo já realizado pela Fundação Oswaldo Cruz Rondônia;
- purificar, quantificar e analisar comparativamente os resultados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ANTICORPOS DE CAMELÍDEOS (VHH)

Os anticorpos convencionais são moléculas complexas que consistem em cadeias pesadas e leves (figura 2) que contêm um oligossacarídeo N ligado ao domínio constante da cadeia pesada (CH₂), que é essencial para as funções efetoras do anticorpo, como a citotoxicidade celular que depende de anticorpos. (Rocha et al., 2009).

Já foram descritos na literatura (Greenberg et al., 1995) outras espécies animais com anticorpos de domínio único, no caso, de peixes cartilaginosos, mas as espécies dos camelídeos continuaram sendo as mais utilizadas devido a sua facilidade de manuseio e imunização.

Figura 2. Representação esquemática da igG convencional (a), de um anticorpo de cadeia pesada da família *Camelidae* (HCAb); (b) e domínio variável de HCAb (VHH). (Rocha et al., 2009).

As imunoglobulinas G (IgG) de humanos, roedores e demais mamíferos são formadas por duas cadeias peptídicas – uma pesada e uma leve – e o sítio variável de interação específico do anticorpo com o antígeno é formado pelas extremidades das duas cadeias. Os animais da família *Camelidae* (camelídeos), por sua vez, além dessas IgGs produzem um outro tipo de anticorpo funcional formado apenas pela cadeia

pesada. O sítio de reconhecimento do antígeno é uma única sequência peptídica na extremidade do anticorpo, conhecido como VHH (Muyldermans, 2001).

Tratam-se de estruturas homodiméricas apresentadas em duas isoformas: IgG₂ e IgG₃, que diferem entre si pelo tamanho da região da dobradiça (Blanc et al., 2009).

O domínio variável desses anticorpos de cadeia pesada (VHH) não está emparelhado, enquanto que o domínio de cadeia pesada (VH) de todos os outros anticorpos forma um heterodímero com o domínio variável da cadeia leve (VL), mantidos juntos por uma interface hidrofóbica. O VHH, também conhecido por nanocorpo, tem peso molecular de aproximadamente 15 kDa, cerca 10% do peso molecular do anticorpo convencional. (Ewert et al., 2002).

Esses fragmentos de anticorpos de domínio único, nos quais o único domínio N-terminal é totalmente capaz de fazer a ligação do antígeno, têm várias vantagens para aplicações biotecnológicas. A ausência do domínio VL permite ao VHH diversas variações estruturais, não observadas quando o domínio VH está associado ao VL, o que proporciona uma maior diversidade da ligação ao antígeno, fazendo com que eles sejam bem expressos em microrganismos. Além disso, os VHHs têm elevada estabilidade, são facilmente solúveis e são adequados para a construção de moléculas de maiores dimensões, sendo neste projeto aplicado em bactéria *Escherichia coli*. (Harmsen et al., 2007).

3.1.1. Propriedades específicas, produção e aplicação

Semelhante aos domínios VH convencionais, os VHHs contêm quatro regiões estruturais que formam a estrutura do núcleo do domínio de imunoglobulina e três regiões determinantes de complementaridade que estão envolvidas na ligação ao antígeno. Se comparadas com a dos domínios VH humanos, as regiões estruturais de VHH mostram uma homologia de sequências elevada (Muyldermans et al., 2001).

A característica mais marcante de VHHs é a presença de substituições de aminoácidos em quatro posições específicas, que são conservados em domínios VH convencionais e que estão envolvidas na formação da interface hidrófoba com domínios VL. (Harmsen et al., 2007).

A sequência do linfócito B do camélídeo, após ser clonada, apresenta interação codificada com o antígeno. Com isso, a informação genética pode ser inserida em um

outro microrganismo, que passa a expressar esses anticorpos denominados VHH. (Freken et al., 2000).

Lauwereys et al. (1998) relatam que, após a imunização de um dromedário com anidrase carbônica de eritrócitos bovinos e α -amilase pancreática, viu-se que uma quantidade considerável de anticorpos de cadeia pesada, que atuam como verdadeiros inibidores competitivos, circulam na corrente sanguínea. Em contraste, os anticorpos convencionais aparentemente não interagem com o sítio ativo da enzima. Quando produzidos como proteína recombinante em *Escherichia coli*, estes ligantes de sítios ativos parecem ser potentes inibidores enzimáticos. Lauwereys et al. conclui que a baixa complexidade do sítio de ligação ao antígeno desses anticorpos de domínio único pode ser valioso para a concepção de inibidores sintéticos menores.

Frenken et al. (2000) produziram os VHH em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, criando imunoglobulinas de cadeia pesada em *Lama glama*. Também mencionam seleção de fragmentos específicos de VHH por seleção direta da bactéria *Escherichia coli* ou de outras leveduras.

Harmsen et al. (2005) relatam que a administração oral de anticorpos policlonais dirigidos contra certo tipo de *Escherichia coli* é usada em uma aplicação veterinária para proteger contra a diarreia pós-desmame do leitão. Por razões de custo, em sua pesquisa substituíram esses anticorpos policlonais por fragmentos de anticorpo de um único domínio de VHHs que podem ser produzidos eficientemente em microrganismos. No caso, eles também utilizaram células de levedura.

Hultberg et al. (2011), por sua vez, defendem a prevenção eficiente de infecções virais e proteção cruzada. Para realização de seu trabalho, os fragmentos de anticorpo de cadeia pesada de lhama (VHH) contra as proteínas do vírus sincicial respiratório (proteína Fusion), o vírus da raiva (Glicoproteína) e a Influenza H5N1 (Hemaglutinina 5) foram selecionados de bibliotecas derivadas de lhama por exibição de fagos.

O interesse em terapia humana tem culminado em desenvolvimento rápido de tecnologias para utilização de anticorpos recombinantes, desde melhorias em sua estabilidade e afinidade bem como o nível de expressão. A grande escala, a purificação altamente específica de proteínas valiosas do sangue e a remoção de componentes indesejáveis prometem ter amplas aplicações terapêuticas. (Klooster et al., 2007).

Segundo reportado por Rocha (2012), a finalidade em terapia humana pode ser diagnóstica ou terapêutica. Há um grande interesse em soroterapia, pois o anticorpo secretado pela bactéria é uma molécula muito menor que o anticorpo de mamíferos e

consegue ultrapassar membranas, inclusive a barreira hematoencefálica (BHE), de alta seletividade e que protege o sistema nervoso central. Além disso, ele é mais termorresistente e, portanto, não precisa ser conservado por refrigeração. Torna-se possível, portanto, estocar bancos de bactérias que secretam esses anticorpos específicos mesmo antes de eles serem necessários. (Rocha, 2012).

Harmsen et al. (2007) descrevem muitas vantagens do VHH para aplicações biotecnológicas, em relação a outros anticorpos, que são resumidas na tabela a seguir.

Vantagens	Característica Molecular
Facilidade de manipulação gênica	Natureza de domínio único
Aumentar o tamanho funcional de bibliotecas imunes	Nenhuma diminuição no tamanho da biblioteca por causa do rearranjo dos domínios VL e VH
Facilidade de produção fácil de formatos multivalentes	Design ligante mais flexível e pareamento cabível de domínios VL e VH
Alta estabilidade físico-química	Enovelamento eficiente devido ao aumento da hidrofiliidade e ao domínio de natureza único
Alta solubilidade	Aumento da hidrofiliidade
Penetração rápida nos tecidos e fácil reconhecimento de sítios antigênicos	Pequeno tamanho
Bem expressa	Enovelamento eficiente

Tabela 1. Vantagens do VHH e explicações moleculares (Harmsen et al., 2007)

Desde a descoberta de anticorpos de cadeia pesada em 1993, o campo de fragmentos de anticorpos de domínio único vem crescendo rapidamente. Muitas de suas vantagens são explicadas pela sua natureza de domínio único, o que faz com que as bibliotecas geradas a partir dos VHHs de camelídeos imunizados gerem bibliotecas com grande diversidade funcional (Harmsen et al., 2007). Isso contrasta grandemente com as diminutas opções de bibliotecas de anticorpos convencionais, uma vez que, por serem menores, não são glicoproteínas, e portanto podem ser produzidos em bactérias, que por sua vez não são capazes de fazer modificações pós-traducionais, como glicosilar proteínas (Klooster et al., 2007).

Além disso, o domínio da natureza única facilita a manipulação molecular subsequente. Por exemplo, para muitas aplicações, torna-se vantajoso manipular fragmentos de anticorpo monovalente em formatos multivalentes para aumentar a afinidade funcional ou para produção de fragmentos de anticorpos bioespecíficos que podem se ligar a antígenos diferentes simultaneamente (Mass et al., 2007).

Tais moléculas podem ser produzidas utilizando anticorpos recombinantes convencionais, utilizando os elementos de ligação entre os domínios VH e VL de um comprimento específico, embora isso geralmente resulte em agregação e afinidade reduzida. Nesse sentido, VHHs são mais adequados para a produção de tais formatos porque permitem concepção ligante mais flexível (Whitlow et al., 1993).

3.1.2. Efeito biológico

Devido ao seu tamanho pequeno de cerca de 15 kDa, os VHHs tendem a passar rapidamente pelo filtro renal, que tem um ponto de corte de cerca de 60 kDa, o que resulta na sua rápida depuração do sangue. Além disso, o tamanho pequeno de sua molécula implica em uma rápida penetração nos tecidos. Isto é vantajoso para o direcionamento de VHHs acoplados a substâncias tóxicas, para diagnóstico in vivo e tratamento de picadas de serpentes. Contudo, para tratamento de doenças infecciosas ou inflamatórias, a curta meia-vida de 2 horas mostra-se uma desvantagem. (Harmsen et al., 2007).

Mass et al. (2007) relatam que até a data, os VHHs se tornaram amplamente utilizados como reagentes de ligação e estão começando a mostrar potencial como agentes terapêuticos e fonte do material genético. Em seu trabalho, é mostrado que a alpaca menor, mais atraente e amplamente disponível é uma excelente fonte de DNA de codificação VHH.

3.1.3. Microrganismos

Segundo Arbabi (2005), a IgG não glicosilada conseguiu ser produzida em altas concentrações por *Escherichia coli*, embora seja natural que anticorpos mais complexos para aplicação terapêutica, que necessitam de glicosilação, sejam mais eficientemente produzidos usando células de mamíferos.

Algumas leveduras tornaram-se um sistema hospedeiro de expressão altamente popular para a produção recombinante de uma grande variedade de proteínas, tais como fragmentos de anticorpos pois devido ao seu pequeno tamanho e propriedades de reconhecimento de antígenos, teriam um grande impacto nas estratégias de engenharia de anticorpos. (Rahbarizadeh et al., 2006). Rahbarizadeh desenvolve o primeiro trabalho de expressão de VHH em *Pichia pastoria*.

Segundo Baneyx (1999), os sistemas microbianos são mais vantajosos em relação aos demais (principalmente em relação às células animais), devido basicamente a dois grandes fatores:

- a) seu menor tempo de desenvolvimento do gene ao produto final;
- b) precisam de condições bem mais simples de crescimento.

Isso implica que tais sistemas microbianos são executáveis, mais facilmente, em grandes escalas e resultam em produtos finais mais baratos.

Existem referências do VHH sendo produzido pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Frenken et al., 2000) e *Pichia pastoria* (Rahbarizadeh et al., 2006), mas a bactéria *Escherichia coli* é o mais comum, tanto pelas propriedades mostradas acima, quanto pelo fato que alguns açúcares obtidos na fermentação de leveduras podem elevar a imunogenicidade do produto e reduzir sua meia vida (Ewert et al., 2002).

3.2. CLONAGEM

Em biologia molecular, uma colônia de bactérias é considerada como um clone, já que todas as bactérias são geneticamente idênticas à bactéria de origem. A partir da clonagem molecular, geram-se moléculas de DNA idênticas à inicial. Este é o processo básico da tecnologia do DNA recombinante (Zaha et al., 2014).

A metodologia do DNA recombinante compreende, primeiramente, uma ligação de um fragmento de DNA de interesse (inserto) em outra molécula de DNA (vetor), a fim de formar uma nova molécula (o DNA recombinante), para que seja enfim inserido em uma célula hospedeira compatível. A célula transformada pode produzir colônias contendo milhares de cópias do DNA recombinante, através de processos de divisão celular (Dillon et al., 1985)

A partir da técnica de DNA recombinante, podem ser produzidas proteínas oriundas de genes clonados. São as chamadas proteínas recombinantes, com uma importância muito grande para a biotecnologia (Chen, 2012).

Escherichia coli é um dos hospedeiros mais utilizados para a produção de proteínas heterólogas e sua genética é muito melhor caracterizada do que a de qualquer outro microrganismo. O progresso recente na compreensão fundamental da transcrição, tradução e dobramento de proteínas em *E. coli*, juntamente com serendipidade e avanços de ferramentas genéticas, tornam esta bactéria mais valiosa do que nunca para a expressão de proteínas eucarióticas complexas (Baneyx, 1999).

Existem proteínas bacterianas que são capazes de reconhecer determinadas sequências nucleotídicas, de 4 a 8 pares de base, dentro de uma molécula de DNA, clivando o DNA em dois sítios de sua fita dupla. Essas proteínas são chamadas de enzimas de restrição e a sequência de reconhecimento é denotada por sítio de restrição. As enzimas de restrição permitem, com maior eficiência, que dois fragmentos de DNA se liguem, uma vez que suas extremidades são mais coesivas para que os pares de bases se complementem (Stryer, 1998).

No caso da *Escherichia coli*, a enzima *EcoRI* é isolada a partir de uma cepa da bactéria (Overton, 2014). A figura 3 ilustra o local de clivagem, considerando uma fita dupla de DNA.

Figura 3. Local da clivagem na *E. coli* utilizando *EcoRI* (Fonte: autoria própria)

Após clivagem da fita de DNA com enzimas de restrição, os fragmentos de DNA devem ser inseridos em outra molécula de DNA, chamada de vetor de clonagem molecular, para que seja capaz de transmitir a informação genética em suas cópias. Por via de regra, os vetores mais usados são os plasmídeos bacterianos, que são moléculas de DNA circulares capazes de se replicarem independentemente (Overton, 2014).

3.2.1. Construção do DNA Recombinante

A produção de proteínas recombinantes é crucial tanto para o desenvolvimento de novas drogas proteicas quanto para a determinação estrutural de alvos medicamentosos. Como tal, a produção de proteínas recombinantes tem um papel importante no desenvolvimento de drogas. Os hospedeiros bacterianos são comumente usados para a produção de proteínas recombinantes, representando cerca de 30% dos atuais biofármacos no mercado (Chen, 2012).

O processo de clonagem in vitro começa com as construções de vetores que contenham os genes de interesse. Para isso, tais construções envolvem as enzimas de restrição para cortar e ligar o DNA em fragmentos específicos para o uso, que podem ser divididos em três regiões: promotora, codificadora e terminal (Tortora et al., 2013).

Como resultado de numerosos projetos de sequenciamento do genoma, estão sendo identificados grandes números de quadros de leitura abertos candidatos, muitos dos quais não têm função conhecida. A análise desses genes envolve tipicamente a transferência de segmentos de DNA para uma variedade de origens vetoriais para expressão proteica e análise funcional (Hartley et al, 2000).

A *Escherichia coli* é capaz de codificar enzimas de DNA ligase. Tais enzimas são úteis para juntar fragmentos de DNA com diferentes extremidades, utilizando como cofator moléculas de NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo), para assim exercerem suas funções (Pereira, 2009).

O próximo passo do processo de clonagem envolve a reação de ligação e o emparelhamento entre as bases complementares. Partindo da premissa que tanto o vetor de clonagem quanto o fragmento de DNA foram tratados com a mesma enzima de restrição, suas extremidades serão coesas e, com o auxílio da enzima DNA ligase, ocorrerá uma ligação fosfodiéster entre os nucleotídeos das extremidades das duas moléculas (Madigan, 2006).

Na referida ligação, a DNA ligase atua como catalisador da ligação entre o grupo fosfato (ligado ao carbono 5') e o grupo hidroxila (ligado ao carbono 3') da desoxirribose dos nucleotídeos das moléculas. O passo seguinte se baseia na transformação das células hospedeiras com moléculas de DNA recombinante (Madigan, 2006).

Prado (2013), por exemplo, em sua clonagem do VHH, imunizam um camélideo com as toxinas BthTX-I e II, isolam os linfócitos do animal, extraem o RNA a partir dos linfócitos e sintetizam o cDNA, amplificando o fragmento VHH por duas reações

de PCRs para, então, realizar a clonagem de fato, utilizando um vetor fagomídeo pHEN1 e construindo uma biblioteca primária de cDNA.

Um procedimento para extrair DNA de plasmídeo de células bacterianas é descrito por Bimboim & Doly (1979). O método é simples o suficiente para permitir a análise por eletroforese em gel de 100 ou mais clones por dia, mas produz DNA puro o suficiente para ser digerível por enzimas de restrição. O princípio do método é a desnaturação alcalina seletiva de DNA cromossômico de alto peso molecular, enquanto o DNA circular covalentemente fechado permanece de cadeia dupla.

3.3. METABOLISMO BACTERIANO

3.3.1. Introdução

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria da família das *Enterobacteriaceae*, que assume a forma de um bacilo, anaeróbica facultativa e Gram-negativa, e pode ser benéfica ou prejudicial ao ser humano. Segundo a fonte de carbono utilizada, a *E. coli* é heterotrófica, pois para o ATP ser obtido é necessária a oxidação de compostos orgânicos; e quanto a fonte de energia utilizada, a *E. coli* é quimiotrófica, já que a obtenção de energia envolve oxidação de compostos químicos (Tortora et al., 2013).

Por ser uma bactéria Gram-negativa, a *E. coli* tem elevada quantidade de porinas, uma determinada proteína associada à membrana externa que permite a passagem de moléculas hidrofílicas, de baixa massa molecular. No espaço periplasmático, encontram-se proteases, fosfatases, lipases, nucleases e enzimas degradadoras de carboidratos (Pelczar et al., 1996).

De acordo com Madigan (2006), a bactéria *E. coli* também pode ser classificada de acordo:

- a) com a temperatura: são mesófilas, isto é, apresentam crescimento máximo em temperaturas que pertencem ao intervalo 25 a 40°C (uma temperatura favorável a crescimento em muitas regiões da superfície da Terra e em organismos animais);
- b) com o pH: são neutrófilas, pois crescem em pHs que variam de 5,4 a 8,5, tendendo a ser ótimo mais perto de 7 – 7,4.

- c) pressão osmótica: são não halofílicas, isto é, não se desenvolvem em ambientes com altas concentrações de sais.
- d) com a necessidade oxigênio: são aeróbias e anaeróbias facultativas.

Figura 4. *Escherichia coli* com zoom de 10.000x

Fonte: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=130129>

3.3.2. Metabolismo

Segundo Lazar & Birnbaum (2012), o metabolismo é um tópico muito citado na ciência, desde a epidemia de "doenças metabólicas", como obesidade e diabetes, até a redescoberta do "metabolismo do câncer" alterado como característica definidora das células malignas. Como é frequentemente o caso, uma vez que um tópico se tornou em voga, seu nome deixa de ter significado, pois os pesquisadores tentam identificar seu trabalho como relevante para a última moda. Assim, é oportuno reconsiderar significado do "metabolismo", que pode ser visto como um grande conjunto de reações bioquímicas complexas que mantêm um ser vivo; o que exige dele uma comunicação

com o meio externo, seja retirando matéria prima para manutenção dos processos ou liberando substâncias diversas.

Todos os sistemas de reações químicas são controlados por enzimas, e incluem reações de quebra ou catabólicas, que liberam energia (são exergônicas) e reações de síntese ou anabólicas, que absorvem energia (são endergônicas) (Collins et. al, 1991).

De um modo geral, os estudos sobre metabolismo de *E. coli* estão divididos em duas grandes vertentes. Na primeira delas, enquadram-se todos os que estão se desenvolvendo estudos de fluxos e concentrações metabólicas, que apresentam sérias limitações especialmente quando duas vias metabólicas funcionam simultaneamente. Enquanto outra parte das pesquisas discorre sobre modelos de metabolismo e determinação das variáveis de controle (Brosius, 1981).

Entender como uma bactéria absorve energia significa, generalizadamente, compreender os processos de síntese de ATP (adenosina trifosfato), uma vez que a maior parte das necessidades energéticas das bactérias é suprida pela energia química oriunda das moléculas de ATP (Buchanan et al., 1974).

3.3.3. ATP

Segundo Bogaert & Naidu (2000), o ATP é o principal transportador de energia na célula porque forma prontamente adenosina difosfato (ADP) e liberta fosfato em uma reação exergônica. A quebra do ATP está ligada, nas células vivas, a muitas reações endergônicas diferentes.

Na presença da enzima fosforilase, o ATP reage com a glicose ($C_6H_{12}O_6$), formando glicose-1-fosfato (um éster de ácido fosfórico com o grupo hidroxila glicosídico) (Bogaert & Naidu, 2010).

A biossíntese bacteriana é uma parte vital do metabolismo e compreende a produção dos compostos químicos mais complexos, estes oriundos da glicose e de sais minerais. A maior parte dos processos biossintéticos, além do ATP, necessita utilizar a coenzima NADPH para redução de alguns compostos intermediários (Buchanan et al., 1974).

Por ser heterotrófica, a *E. coli* é capaz de metabolizar a partir de substâncias diversas, tais como ácidos graxos, proteínas (incluindo triptonas e peptonas), dentre outros; mas certamente os carboidratos, tendo a glicose como principal representante na natureza (já que se apresenta como os polímeros amido e celulose), é o principal

meio da *E. coli* suprir suas necessidades energéticas. Dessa maneira, a glicose está no centro do metabolismo bacteriano, sendo uma das vias principais na oxidação de glicose a dióxido de carbono (Hofvendahl & Hägerdal, 2000).

3.3.4. Glicólise

A glicólise é o caminho mais comum, mas não necessariamente o único, para se degradar a glicose e oxidar outros moossacarídeos, sendo que a energia livre liberada no processo é utilizada para a produção de compostos de alta energia de ATP e redução do NADP^+ . Esta série de reações bioquímicas também é chamada de via de Embden-Meyerhof-Parnas (Axelsson, 2004).

A figura 5 mostra o ciclo completo da glicólise.

Figura 5. Glicólise

Extraído de

<<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/17/Glycolysis2.svg>>

3.4. BACTÉRIAS: MÉTODOS PARA OBTER ALTA CONCENTRAÇÃO CELULAR EM PROCESSOS FERMENTATIVOS

Processos fermentativos utilizam enzimas para catalisar a transformação da matéria orgânica. Processos estes são utilizados desde a Antiguidade, seja para produção de pão, queijo, vinho ou cerveja. Atualmente, a indústria química utiliza destes processos para produção, principalmente, de alimentos e fármacos (Ward, 1991).

Ao se trabalhar com bactérias recombinantes, é de extrema importância, no que tange ao aumento de sua escala, conhecer os processos que visam obter altas concentrações celulares, a partir de alguma alteração nas condições iniciais do cultivo (Schein et Noteborn, 1988).

No caso da *E. coli* recombinante, a sua velocidade específica de crescimento antes da indução, a composição e as propriedades físico-químicas do meio de cultura, a forma como o bioprocesso é conduzido (descontínuo, descontínuo alimentado ou contínuo), o tipo de biorreator utilizado e o controle do metabolismo e de substâncias tóxicas são os principais fatores que controlam a concentração celular e o rendimento celular específico do produto (Luli et al., 1990).

3.4.1. Velocidade específica de crescimento

A velocidade específica de crescimento das células (μ) reflete o estado fisiológico das células dentro do biorreator, mas seus valores são muito variáveis. Há um primeiro grupo de casos em que o rendimento final de produto é otimizado aumentando-se o valor de μ ; um segundo grupo de casos em que quanto menor o valor de μ , maior será o rendimento; e ainda há um terceiro caso que o rendimento do produto não está intrinsicamente ligado a μ . (Riesenberg et. al, 1991).

Shehata et. al (1971) estudaram a relação entre taxa de crescimento específica da fase exponencial (neste trabalho denominada $\mu_{\text{máx}}$) e a concentração de nutrientes limitantes para populações em estado estacionário. Em altas concentrações, a taxa de crescimento específica é independente da concentração de nutrientes, mas a baixas

concentrações a taxa de crescimento específica é uma função fortemente dependente da concentração de nutrientes. Esse relacionamento foi previsto por Monod; no entanto, a equação de Monod não prevê a relação em toda a gama de concentração de nutrientes. Se os parâmetros da equação forem estimados a partir dos resultados obtidos em baixas concentrações, então, em altas concentrações de nutrientes, a taxa de crescimento específico é significativamente maior do que a predita pela equação de Monod. A equação de Monod descreve o comportamento de um crescimento bacteriano em função da concentração de um único substrato limitante e é representada por:

$$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_s + S} \quad (\text{eq. 1})$$

onde μ_x é a velocidade específica de crescimento (h^{-1}) $\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima de crescimento (parâmetro cinético) (h^{-1}), K_s é a constante de Monod e S é a concentração do substrato limitante.

Os resultados de Shehata et. al (1971), por sua vez, foram interpretados com base em que a taxa de crescimento é controlada por pelo menos duas reações paralelas e que as afinidades das enzimas que catalisam essas reações são diferentes. A relação entre taxa de crescimento específico e volume celular médio também foi medida e os resultados indicam que o volume celular médio depende não apenas da taxa de crescimento específica, mas também da natureza do nutriente limitante. Existem diferentes volumes celulares médios com a mesma taxa de crescimento específica estabelecida por diferentes nutrientes limitantes. Portanto, o volume celular médio não é determinado exclusivamente pela taxa de crescimento específica.

3.4.2. Meio de cultura: composição e propriedades físico-químicas

3.4.2.1. Temperatura

A temperatura tem efeitos importantíssimos sobre o crescimento bacteriano, uma vez que sua variação pode trazer efeitos diretos na cinética. Existe uma temperatura correspondente a um valor ótimo, na qual a velocidade de divisão celular é máxima e o tempo de geração é mínimo (Neidhardt et. al, 1981).

Figura 6. Efeito da temperatura no crescimento da *E. coli*

A figura 6 mostra o comportamento gráfico da velocidade de crescimento da *E. coli* como função da temperatura.

Neidhardt et. al (1981) estudaram um grupo de nove proteínas de *Escherichia coli* K12 que varia em estado estacionário com a temperatura de crescimento e são particularmente abundantes acima de 40 °C e são conhecidas como proteínas HTP (produção de alta temperatura). Evidências em seu trabalho sugeriram que um gene regulador (*htpR*), faz uma proteína ativadora que é necessária para a indução de calor de proteínas HTP.

3.4.2.2. População e Nutrientes

Para que a quantidade de células cresça, é necessário disponibilidade de espaço e nutrientes adequados (Talaat et. al, 1971).

A quantidade de nutrientes disponível no meio de cultura diminui à medida que a quantidade de bactérias aumenta. A população continuará em seu crescimento desde que haja um mínimo de nutrientes disponíveis no meio de cultura (Talaat et. al, 1971).

Losen et al. (2004) colocaram a glicose e o glicerol como sendo as principais fontes de carbono utilizadas para a *E. coli* gerar energia e crescer.

Em seu recente trabalho, Mesgari-Shadi et al. (2017) reportaram que os açúcares adequados podem melhorar a concentrações de fragmentos de anticorpo no meio de cultura perto de cinco vezes a média da etapa de triagem.

3.4.2.3. pH

Como a *E. coli* cresce preferencialmente em pHs neutros (por volta de 7 – 7,4), é considerada uma bactéria neutrófica; sendo que deslocamentos de pHs com uma unidade para mais ou para menos podem ser responsáveis pela bactéria não crescer. O limite de ácido para crescimento ocorre em pH cerca de 4,5 (Small et. al, 1994).

Nessa faixa de pH, ocorre o equilíbrio de dissociação entre a forma protonada e a forma ionizada do ácido acético, o principal subproduto de seu metabolismo. Quando a forma protonada sai o meio extracelular, há consumo de íons H^+ , de tal forma a restabelecer o equilíbrio de dissociação, gerando um fluxo de prótons para o centro da célula. Além disso, o pH interno é reajustado com o próprio metabolismo da *E. coli*, ao consumir energia (Gombert, 1996).

Kleman et al. (1994) mostraram que o acúmulo de ácido acético é maior em pHs mais elevados (dentro da faixa 6,0 – 7,5) e Suárez (1995) verificou que em meios complexos, o acúmulo do acetato é maior que em meios definidos.

Russell et al. (1998) mostraram que é possível crescimento de *E. coli* em meios ácidos com ajuste de ácido clorídrico, porém também destaca a inabilidade de crescer em presença de ácido láctico.

3.4.2.4. Oxigênio Dissolvido

A *Escherichia coli*, por ser uma bactéria anaeróbia facultativa, pode fazer uso do oxigênio para obter energia em seu metabolismo, como também pode crescer na ausência desta molécula. Essa é uma vantagem muito grande, uma vez que a possibilita de crescer em ambientes com pouca disponibilidade do gás, bem como permite uma divisão razoavelmente homogênea entre regiões óxicas e anóxicas (Macnab, 1987).

Büchs (2001) mostrou que o fornecimento de oxigênio é um parâmetro essencial para o crescimento de anaeróbios facultativos e consegue ser monitorado, indiretamente, em frascos de agitação. Unden et al. (1995) citaram que mais de 200 genes de *E. coli* são dependentes da oferta de oxigênio no meio de cultura e, cada um deles, apresenta um teor de oxigênio dissolvido (O.D.) que gera uma maior velocidade

específica de crescimento na fase exponencial (μ_{max}).

3.4.3. Modo operacional do bioprocesso

Considera-se como modo operacional do bioprocesso uma das três formas clássicas de crescimento: descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo (Borzani, 2001).

Ao decorrer dos anos, novos processos surgiram, com mais tecnológicos, tornando-os mais confiáveis e reprodutíveis. Para isso, foi necessário maior entendimento da fisiologia da bactéria e da compreensão de como o microrganismo interage com o meio (Buckland, 1993).

O reator descontínuo apresenta um inóculo por tanque, com recirculação de células. Nele, adicionam-se antes do início do bioprocesso todos os nutrientes necessários e são acoplados ao biorreator bombas de ácido, base e antiespumante. O volume no decorrer da fermentação permanece constante. No decorrer do ensaio, só é adicionado ar. Apesar de ser mais fácil e contar com menor risco de contaminação, esse tipo de biorreator geralmente está associado a baixos rendimentos e produtividade (Luli et al., 1990).

Roubos et al. (1999) definiram o descontínuo alimentado como sendo uma operação na qual pelo menos um dos nutrientes é gradualmente alimentado durante o cultivo, sendo que os produtos permanecem no meio até o fim do experimento. Dentre suas vantagens, melhora o controle do metabolismo celular, que pode evitar que elevadas concentrações de substrato causem inibições da fermentação.

Por fim, no processo contínuo, o reator opera em estado estacionário, e a concentração de células, de substrato e de produto tendem a permanecer constantes durante um grande intervalo da vazão específica de alimentação (Shiloach et al., 2005).

Dentre todos, o descontínuo alimentado mostra-se o mais vantajoso, pois a partir do controle de substratos, é possível controlar a velocidade específica de crescimento da bactéria; não sendo necessário retirar grandes volumes de meio de cultura do biorreator, como no caso do contínuo (Shiloach et al., 2005).

Luli et al. (1990) mostraram que, para o cultivo em *Escherichia coli*, o objetivo do método descontínuo alimentado é alimentar a glicose aos poucos, de modo a limitar

a velocidade específica de crescimento a valores menores que μ_{max} , minimizando assim a formação de acetato (subproduto tóxico para a célula).

Campani et al. (2014) mostraram que a *E. coli* pode também ser produzida utilizando o biorreator airlift, cujas vantagens em relação aos tipos convencionais de reatores incluem a menor complexidade de construção, o baixo risco de contaminação e a maior eficiência energética na transferência de oxigênio.

3.4.4. Metabolismo e toxicidade

O consumo de nutrientes gera um desejado aumento da população, porém também acarreta numa indesejável produção de metabólitos secundários, que são produtos que, quando em baixas concentrações, pouco são os efeitos nas bactérias e em suas velocidades de divisões celulares; mas à medida que sua concentração aumenta, podem tanto interromper a divisão celular quanto matar as células e destruir nutrientes essenciais (Reizer et. al, 1987).

No caso do metabolismo da *Escherichia coli*, ácidos orgânicos são produzidos secundariamente e, atingindo grandes concentrações, são altamente prejudiciais à célula, sendo o mais notável o acetato (ácido acético). Quanto mais a célula se alimenta de carbono, mais ela crescerá e, em contrapartida, mais ácido acético produzirá. Losen (2004) mostrou que cultivos limitados pela transferência de oxigênio têm a tendência de terminarem seus cultivos com cerca de 1,6 g/L de acetato.

A formação de acetato em culturas de *E. coli* sob condições aeróbias pode ser causada por dois fenômenos. Por um lado, uma limitação de oxigênio dissolvido ativa as vias de fermentação, causando a excreção de acetato, fenômeno reportado na literatura como fermentação de ácido misto. Por outro lado, essa excreção de acetato também é devida a um mecanismo metabólico, causado por um desequilíbrio entre a rápida absorção de glicose e sua conversão em biomassa e produtos, desviando a acetil-CoA do ciclo metabólico para o acetato (Akesson et al., 1999).

Em seus resultados de crescimento de *E. coli*, Luli et al. (1990) mostraram que quando a concentração de acetato atinge níveis de 2,0 g/L, a velocidade máxima de crescimento das células cai cerca de 50%.

De acordo com Han et al. (1992), a formação do ácido acético pode ser reduzida tanto diminuindo a captação de glicose quanto aumentando a capacidade do metabolismo oxidativo.

Já Contiero et al. (2000) reportaram que concentrações de acetato acima de 1,0 g/L já começam a se tornar prejudiciais, embora não limitantes, tanto para a produção de biomassa quanto para a produção de proteínas recombinantes, já que o acetato tem um efeito negativo na estabilidade das proteínas intracelulares.

Além do que, o acúmulo de acetato acidifica o meio, podendo levar à lise celular consequente de uma irreversível desnaturação de proteínas e de DNA. Por esta razão, nos ensaios realizados neste projeto, fora adicionada uma base ao longo do crescimento das células de modo a controlar o pH do meio de cultura (Kleman et al., 1994).

3.4.5. Comparações de diferentes estratégias utilizadas

Konstantinov et al. (1990) prepararam um cultivo descontínuo alimentado da *E. coli* recombinante AT2471 que abrigava o plasmídeo pSY130-14 para a produção de fenilalanina. Para isso, uma grande quantidade de ácido acético foi excretado pelas células e acumulado no meio de cultura, sendo que o crescimento celular parou quando a concentração de ácido chegou em cerca de 15 g/L, obtendo 16 g/L de células. A estratégia para contornar o problema e aumentar a concentração celular foi uma estrutura de controle implementada por um computador, que impedia a excreção de ácido acético no meio. Como resultado, a concentração de células aumentou para 36 g/L.

Korz et al. (1995) desenvolveram um processo em batelada alimentada para aumentar a densidade celular da *E. coli* recombinante TG1. A estratégia de alimentação pré-determinada foi escolhida para, usando um meio de carbono definido, aumentar a concentração de massa celular exponencialmente e controlar as velocidades de crescimento que não causem a formação de ácido acético, tóxico às células (mantendo $\mu < \mu_{crit}$), sendo μ_{crit} a velocidade para a qual haja a formação do acetato. Eles relataram que foram atingidas concentrações de 128 e 148 g/L de massa seca, usando glicose e glicerol, respectivamente, como fonte de carbono.

Lee (1996), em sua revisão, mostrou que a *E. coli* é o sistema procariótico mais utilizado para síntese de proteínas heterólogas. Ele compara o aumento da produtividade específica (aumento da produção de proteína por célula por unidade de tempo) com o aumento da produtividade celular (aumento da concentração de células por tempo), e mostra que em batelada alimentada não é raro de se encontrar concentrações maiores que 100 g/L, em massa seca de células.

Rossi (2001), em sua dissertação, defendeu os cultivos em biorreatores descontínuos-alimentados em relação aos cultivos descontínuos, ao se cultivar *E. coli* RR1 contendo o gene para síntese do hormônio de crescimento humano (hGH), utilizando meio de cultura com quantidades suplementadas de extrato de levedura e bactotripton. Conseguiu obter concentração final de células de 9,2 g/L e fator de conversão substrato a células $Y_{X/S} = 0,36$ g/g.

Shiloach et al. (2005) exploraram os limites da densidade da cultura bacteriana para obter o máximo de produtividade. Para isso, ele investiga melhorias nas técnicas de cultivo e na manipulação da fisiologia da bactéria, em conjunto com melhorias no meio de cultura, em função da biologia molecular de sua cepa em específico, que permitiram que a *E. coli* crescesse até densidades de 190 g/L (em massa seca), com mínimo acúmulo de acetato.

3.4.6. Crescimento díáuxico

“Diauxia” foi um termo utilizado por Jacques Monod em *The Growth of Bacterial Cultures*, em 1949, para descrever um crescimento bacteriano em duas fases, onde o organismo consome primeiro um substrato mais assimilável (geralmente glicose) e depois o outro, gerando duas fases exponenciais. Entre os crescimentos exponenciais existe uma fase lag, na qual as células produzem as enzimas necessárias para metabolizar o segundo açúcar. (Monod, 1949).

Radhakrishnan et. al (2002) utilizaram o crescimento díáuxico para analisar as redes metabólicas de uma *E. coli*, cujos resultados podem ser comparados com Varma et. al (1994). A partir de uma análise de via metabólica com a glicose, acetato e oxigênio, mostra-se que a vazão do gás, o coeficiente de transferência de massa (k_{La}) e a velocidade de consumo de açúcar influenciam no formato das duas fases exponenciais e da fase lag entre elas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Células

A Prof.^a Dr.^a Carla Fernandes, do laboratório IPEPATRO da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz – RO), gentilmente cedeu três clones de células de camelídeo VHH, inseridas em uma *E. coli* da linhagem HB 2151, identificados por clone 20, 30 e 82, que foram fundamentais para o início deste trabalho. Esta cepa é um híbrido da K12 e da HB101 e apresenta auxotrofia em relação às substâncias L-prolina e tiamina e devem ser adicionadas ao meio de cultura (no apêndice são apresentadas informações complementares da biologia da cepa HB 2151).

4.2. Meios de cultura

Os meios de cultura foram aqui definidos como **M_i**, $i = 1, 2, \dots, 5$.

4.2.1. Meio **M1**: LB (Luria Bertani, HiMedia)

Composição (por litro): hidrolisado enzimático de caseína (10,0 g), extrato de levedura (5,0 g), cloreto de sódio (10,0 g). pH final: 7,5.

4.2.2. Meio **M2**: meio M9 (Fluka)

Composição (por litro): triptona (12,0 g), CaCl_2 ($1 \cdot 10^{-4}$ mol), MgCl_2 $2 \cdot 10^{-4}$ mol), tiamina (4,0 mg) e ampicilina (10 mg). pH final: 7,0. A quantidade de glicose adicionada não foi igual ao longo dos ensaios e está sendo especificada no texto. Nos últimos ensaios em fed-batch, a este meio foi adicionado L-prolina (0,2 g/L).

4.2.3. Meio **M3**: Meio de Indução 10X

Composição (por litro): Triptona (12,0 g), extrato de levedura (24,0 g), glicerol 97% (4 mL), IPTG (Isopropil- β -D-thiogalactopiranosídeo) 1 M (1000 μL), ampicilina 100 mg/mL (100 μL).

4.2.4. Meio **M4** e **M5**

As composições dos meios **M4** e **M5** foram obtidas de dissertações desenvolvidas no Grupo de Engenharia de Bioprocessos: Gombert (1996) e Rossi

(2001), respectivamente. Suas composições foram exatamente seguidas nos ensaios aqui mencionados, sendo apenas suplementadas com 10 mg/L de ampicilina.

	M4 (GOMBERT)	M5 (ROSSI)
Fonte de Carbono		
Glicose	5,0 g/L	5 g/L*
Aditivos (meio complexo)		
Extrato de levedura	0,5 g/L	2,0 g/L
Bactotripton	-	1,0 g/L
Sais		
KH ₂ PO ₄	13 g/L	13 g/L
K ₂ HPO ₄	10 g/L	10 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3,0 g/L	3,0 g/L
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	4,6 g/L	4,6 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 g/L	2,0 g/L
Micronutrientes		
SOLUÇÃO #1 - 3 mL/L		
FeCl ₃ .H ₂ O	27 g/L	27 g/L
ZnCl ₂	1,3 g/L	1,3 g/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,0 g/L	2,0 g/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2,0 g/L	2,0 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,0 g/L	1,0 g/L
CuCl ₂	1,0 g/L	1,0 g/L
H ₃ BO ₃	0,5 g/L	0,5 g/L
HCl concentrado	100 mL/L	100 mL/L
SOLUÇÃO #2 - 3 mL/L		
Al ₂ (SO ₄) ₃ .16H ₂ O	1,6 g/L	1,6 g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	6,8 g/L	6,8 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	23,6 g/L	23,6 g/L
HCl concentrado	100 mL/L	100 mL/L

Tabela 2. Composição dos meios M4 e M5

(*) Durante alguns dos ensaios indicados no texto, esta composição foi alterada para 5,0 g/L para se comparar com outro meio de cultura na mesma concentração de glicose.

4.3. Protocolo de preparação do pré-inóculo

1. Um pré-inóculo é preparado, inoculando-se 200 µL de suspensão celular em meio de criopreservação em 20 mL de meio de cultura **M1**, incubado sob agitação a 240 rpm, overnight a 37 °C.
2. Este mesmo protocolo é utilizado para replicação das células. Após replicadas, à suspensão celular é adicionado glicerol (15% do volume final) para ser utilizado como meio de criopreservação.

4.4. Protocolo inicial do crescimento de *E. coli* com VHH

1. Prepara-se 200 mL de meio mínimo **M2**.
2. Retira-se uma alíquota do meio de cultura para ser o branco das futuras análises de densidade óptica no espectrofotômetro (e armazena-se sob refrigeração adequada).
3. Após crescimento do inóculo em meio LB, 9 mL da solução é transferida para erlenmeyer de 500 mL e adicionado aos 200 mL de meio M9 suplementado.
4. A cultura é mantida sob agitação em shaker a 180 rpm por 30 horas a 30 °C.
5. Retira-se amostra de 5 mL a cada hora (para medição de pH, absorbância, concentração de glicose e de acetato) e 10 mL de amostra em horas específicas (para medição de massa seca), sendo imediatamente resfriadas, de modo que as células reduzem substancialmente seu metabolismo e o consumo de glicose.
6. Caso o pH diminua ao longo do ensaio, adiciona-se solução de NaOH 1M para corrigir o valor.

4.5. Procedimentos analíticos

Os procedimentos analíticos estão resumidos no fluxograma a seguir.

Figura 7. Fluxograma de procedimentos analíticos.

4.5.1. Medição de absorvância

Utilizando o espectrofotômetro, zera-se o aparelho com o branco retirado do meio de cultura sem inóculo, e mede-se a absorvância da amostra retirada. Para resultados de densidade óptica (D.O.) superior a 0,4; dilui-se a amostra. Utilizou-se uma pequena faixa de leitura, diluindo-se as amostras para chegar na absorvância desejada.

Os primeiros ensaios foram medidos no comprimento de onda de $\lambda = 540 \text{ nm}$ e depois corrigidos para $\lambda = 600 \text{ nm}$.

4.5.2. Medição de pH

Utilizando de um pHmetro Micronal B474 devidamente calibrado, 5 mL de cada amostra são submetidos à análise de seu potencial hidrogeniônico.

4.5.3. Medição da concentração de glicose e acetato, em g/L

A dosagem de acetato é feita em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC Prominence UFLC da Shimadzu, equipado com coluna Bio-rad HPX-87H), enquanto a concentração da glicose em alguns casos também foi dosada por **(a)** HPLC, e em outros por métodos enzimáticos, utilizando-se para isso uma membrana que contém uma enzima imobilizada no equipamento **(b)** YSI 2700 Select (Yellow Spring Instrument) disponível no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan, bem como o **(c)** kit enzimático colorimétrico para determinação da glicose da Bioliquid.

4.5.4. Medição de massa seca

4.5.4.1. Determinação da umidade da membrana

- a) Anota-se a massa de uma membrana.
- b) Sobre um vidro de relógio, coloca-se a membrana em um forno microondas por 15 minutos com 20% da potência.
- c) Toma-se nota da massa final (seca e sem células).

A massa da umidade é, então, calculada pela equação 1:

$$m_{\text{umidade}} = m_{\text{memb.vazia úmida}} - m_{\text{memb.vazia seca}} \quad (\text{eq. 2})$$

4.5.4.2. Determinação da massa seca

- a) Resfria-se a amostra ao retirar do shaker ou do reator.
- b) Prepara-se o sistema para filtração a vácuo, anotando-se a massa da membrana utilizada (úmida e sem as células).
- c) Homogeneiza-se a amostra e pipeta-se 10 mL da mesma. Ao se ligar a bomba de vácuo, transfere-se o volume pipetado para o copo de filtração e se aguarda até que toda a amostra tenha sido filtrada.
- d) Recolhe-se o filtrado no frasco, quebra-se o vácuo, desliga-se a bomba e retira-se com cuidado o copo de filtração do kitassato, sem soltar a pinça do sistema de filtração.
- e) Remonta-se o sistema de filtração, liga-se a bomba de vácuo e lava-se o pellet de células duas vezes com solução salina. Solta-se a pinça do sistema de filtração e recolhe-se a membrana de células em um vidro de relógio.
- f) Leva-se a amostra para forno de microondas por 15 minutos com 20% de potência.

- g) Ao término da secagem, transfere-se a amostra para o dessecador e aguarda-se o resfriamento por 5 minutos. Depois, determina-se a massa da membrana (seca e com as células).

A concentração celular (X), em g/L, é então calculada pela equação 2:

$$X \left[\frac{g}{L} \right] = \frac{m_{\text{memb.células seca}} - m_{\text{memb.vazia úmida}} + m_{\text{umidade}}}{V_{\text{filtrado}}} \quad (\text{eq. 3})$$

4.6. Protocolo de crescimento em biorreator

Utilizou-se o biorreator do modelo *New Brunswick (atualmente Eppendorf) – BioFlo III*, conforme figura 8. A metodologia para uso do biorreator se divide em quatro principais momentos: montagem do reator para esterilização, esterilização, preparo do reator para inoculação e operação.

Figura 8. Biorreator sendo utilizado para crescimento de *E. coli* e expressão de VHHs

4.6.1. Processo de Reativação da Célula com Meio LB

- a) Preparou-se 90 mL de solução estéril LB Luria Bertani, HiMedi (preferencialmente em erlenmeyer 500 mL chicanado ou erlenmeyer de 1000 mL) pH = 7.

- b) Acrescentou-se 900 μL da suspensão de células congeladas *E. coli* HB 2151.
- c) Colocou-se o erlenmeyer em shaker orbital nas condições 37 °C, 240 rpm, overnight.

4.6.2. Meio de Cultivo M9

Preparou-se 2,0 L de meio M9 (Fluka), que foi suplementado com:

- 12 g/L de bactotripton;
- $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L de CaCl_2 ;
- $2 \cdot 10^{-4}$ mol/L de MgCl_2 ;
- 0,2 g/L de prolina;
- 4,0 mg/L de tiamina (Vitamina B1);
- 10 mg/L de ampicilina;
- 5,0 g/L de glicose (deve ser autoclavado à parte do meio de cultura para evitar reação de Maillard).

Além disso, acrescenta-se cerca de 10 mL de antiespumante ao meio de cultura. Corrige-se pH = 7. A solução (sem a glicose) foi transferida para a dorna do reator.

4.6.3. Montagem do biorreator

- a) Calibrou-se o eletrodo de pH (e verificou-se se o eletrodo de oxigênio estava funcionando corretamente).
- b) Fecharam-se as saídas do biorreator com algodão e jornal, lembrando de deixar uma saída para o vapor e que não entre ar. As mangueiras imersas em líquidos foram pinçadas.
- c) Submeteu-se o reator à esterilização por autoclave, juntamente com as soluções de glicose, de ácido (HCl 2,0 M) e de base (NaOH 2,0 M) a 121 °C por 20 min.
- d) Após esterilização na autoclave, acrescentou-se a solução de glicose ao reator.

4.6.4. Funcionamento do reator

- a) Pós processo de esterilização, calibrou-se o eletrodo de oxigênio do reator, como também calibrou-se um ajuste fino do eletrodo de pH.
- b) O gás de saída do condensador deve passar por uma solução de limpeza (no caso, duas passagens por hipoclorito 50%), antes de ser lançado à atmosfera. Recomenda-se, ainda, colocar outro frasco de segurança caso formem bolhas.
- c) Antes de iniciar o inóculo, liga-se o software BioCommand.
- d) Após a bactéria contida no erlenmeyer do shaker ter crescido overnight, transfere-se seu conteúdo ao reator, com auxílio de uma bomba peristáltica, e assim dá-se início ao cultivo.
- e) Mantém-se o reator à saturação de oxigênio de 50%, alimentado com ar, temperatura de operação 30 °C com o controle ativo de rotação (variação de rotação em função do OD).
- f) Para acionar o controle ativo, deve ser selecionado “set point”, colocar o mínimo do RPM (200 rpm), apertar o botão do controle ativo (verificar se a luz acende no painel) e ajustar o valor máximo do RPM (800 rpm).
- g) Durante as primeiras 12 horas, retiraram-se 10 mL de amostra de hora em hora.
- h) Durante as próximas horas, aumenta-se o tempo de retirada de amostra para 1h30 a 2h.
- i) Caso necessite de mais antiespumante, o mesmo deve ser inserido no reator com seringa, agulha e filtro de seringa.

4.6.5. Alimentação

- a) Durante os ensaios aqui descritos como F1, F2, F3 e F4, o reator foi operacionalizado no modo fed-batch, onde uma solução de alimentação fora adicionada ao cultivo.
- b) A alimentação de glicose para o regime fed-batch foi feita na bomba “nutriente” do biorreator, cujo acionamento está em uma escala de porcentagem de ciclos de 13 segundos nos quais a bomba opera. Uma relação entre a porcentagem da bomba e a vazão que ela opera para uma solução de glicose nesta concentração encontra-se no gráfico a seguir.

Figura 9. Vazão da bomba de nutriente

De acordo com o gráfico, obteve-se a relação exposta na equação 3.

$$Nut[\%] = 406,39 \cdot F \left[\frac{L}{h} \right] \quad (\text{eq. 4})$$

A equação 4 (GOMBERT, 1997) permite obter os valores da vazão de alimentação:

$$F = \frac{X_0 \cdot V \cdot e^{\mu t}}{S_0 \cdot Y_{X/S}} \quad (\text{eq. 5})$$

onde F = vazão de alimentação, V_0 = volume útil do biorreator no instante inicial da alimentação, X_0 = concentração celular inicial, μ = velocidade específica de crescimento adotada, S_0 = concentração de substrato (glicose) na alimentação, $Y_{X/S}$ = fator de conversão substrato a células e t = tempo de alimentação. Nesta equação, X_0 , V e $Y_{X/S}$ são obtidos de cultivos anteriores, S_0 é conhecido e μ é o valor da velocidade máxima de crescimento fixada.

SUÁREZ (1997) mostra um desenvolvimento mais detalhado para esta equação.

4.7. Protocolo de indução

- a) Indica-se que a indução seja feita no final da fase exponencial.
- b) No momento da indução, deve-se acrescentar 100 mL de meio de indução 10X para cada litro de M9 com inóculo presente no reator.
- c) Preparo do meio 10X para indução:
 - 12 g/L bactotripton;
 - 24 g/L extrato de levedura;
 - 4 mL/L de glicerol 97%;
 - $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L de IPTG (Isopropil- β -D-thiogalactopiranosideo)
 - 10 mg/L de ampicilina.
- d) O protocolo inicial determina 60 horas de indução.

4.8. Protocolo de purificação

Este protocolo foi gentilmente cedido pela Dr.^a Soraya dos Santos Pereira (IPEPATRO – FioCruz RO) e adaptado para ser utilizado no GEnBio (Escola Politécnica – USP).

- a) Ressuspendeu-se o precipitado celular com 20 mL de Tris-base 50mM (pH 8,0), contendo 200 μ L de lisozima (100 mg/mL), esta responsável pela lise química, e incubado em gelo por 1 hora, com eventual homogeneização. Para potencializar a lise química, submeteu-se o precipitado a 2 etapas de sonicação em 4 ciclos de 30 segundos e intervalos de 30 segundos, em seguida centrifugado à 10.000 rpm, 20 °C por 30 minutos. Visando o clareamento da amostra, o sobrenadante foi novamente centrifugado sob as mesmas condições e filtrado a 0,44 μ m.
- b) A purificação por afinidade foi realizada em coluna cromatográfica de níquel de 10 mL com 10% de matriz de agarose (GE Healthcare, EUA), utilizando bomba peristáltica com fluxo aproximado de 1 mL por minuto.
- c) Equilibrou-se a coluna com 10 mL de tampão de ligação (fosfato de sódio 50 mM e NaCl 300 mM, pH = 7,4), em seguida foi adicionado 20 mL de amostra, com as mesmas condições de fluxo. Para remoção de ligações inespecíficas foi

utilizado 10 mL de tampão de lavagem (fosfato de sódio 50 mM, NaCl 300 mM e Imidazol 5 mM, pH = 7,4). A proteína de interesse (VHH) purificada foi eluída da coluna com tampão contendo fosfato de sódio 50 mM, NaCl 300 mM e Imidazol 150 mM, com o pH mantido a 7,4.

- d) Para etapa de diálise, utilizou-se tampão PBS (NaCl 1,37 M, Na₂HPO₄.12H₂O 8,5 x 10⁻² M, KH₂PO₄ 1,5 x 10⁻² M, KCl 2,7 x 10⁻² M, pH = 7,4) em colunas *Amicon* 10 kDa (Millipore, EUA), em três ciclos de centrifugação a 4.000 xg por 15 minutos a 20 °C. O rendimento médio de purificação foi calculado após inserção da amostra no equipamento Nanodrop e respectiva leitura automática.

4.9. Análise eletroforética

O protocolo de análise eletroforética também foi gentilmente cedido pela Dr.^a Soraya dos Santos Pereira (IPEPATRO – FioCruz RO) e adaptado para ser utilizado no GENBio (Escola Politécnica – USP).

Submeteram-se os pellets das bactérias purificados em análise eletroforética em gel de poliacrilamida 15%. Para o gel de empacotamento preparou-se, a partir de uma solução contendo 510 µL de solução de Acrilamida/bisacrilamida 37,5 : 1 (volume/volume), 375 µL de Tris-HCl 0,5 M (pH = 6.8), 30 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 %, 30 µL de persulfato de amônia 2%, 10 µL de N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED) e 2,04 mL de água.

O gel de resolução foi constituído de 2,5 mL de solução de acrilamida/bisacrilamida 37,5 : 1 (volume/volume), 1,25 mL de Tris-HCl 1,5 M (pH 8.8), 50 µL de SDS 10 %, 25 µL de persulfato de amônia 2 %, 10 µL de TEMED e 1,15 mL de água.

5 µg de amostra foram homogeneizadas 1:1 (v/v) em tampão de amostra contendo 200 mM Dithiothreitol (DTT), aquecida em bloco térmico a 95 °C por 5 minutos, em seguida aplicadas no gel (15 µL).

A corrida foi estabelecida a 100 V, por 2 horas e 30 minutos. Para coloração foi utilizado o *Coomassie Phast Gel Blue R-350* (GE Healthcare, EUA) e para descoloração uma solução contendo 10% de metanol e 5% de ácido acético glacial em água deionizada. Como referência de peso molecular utilizou-se o marcador Broad Range Protein Molecular Markers (Promega, EUA).

4.10. Cálculo de parâmetros cinéticos

De posse dos resultados, plotaram-se alguns gráficos para obtenção dos principais parâmetros cinéticos, que permitiram caracterizar e comparar os ensaios. Os gráficos, de uma maneira geral, tiveram os seguintes perfis:

a) Crescimento celular com evolução no tempo.

Medidas de absorbância e de massa seca foram obtidas a cada hora. Com este gráfico, é possível obter a velocidade máxima de crescimento do ensaio. A partir de sua definição e fazendo alguns arranjos matemáticos, temos:

$$\begin{aligned}\mu &= \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \\ \mu \, dt &= \frac{1}{X} dX \\ \int_{t_0}^t \mu \, dt &= \int_{X_0}^X \frac{1}{X} dX\end{aligned}\tag{eq. 6}$$

Na hipótese de μ constante, sem limitação de nutrientes e na ausência de inibidores, podemos definir $\mu_{\text{máx}}$ como sendo o μ da fase exponencial e temos:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_{\text{máx}} (t - t_0)\tag{eq. 7}$$

Em um gráfico de $\ln X$ em função do tempo, a fase exponencial será linear e o $\mu_{\text{máx}}$ da fase exponencial deve ser o coeficiente angular desta fase.

b) Consumo de substrato e formação de subproduto evoluindo no tempo.

Em meios onde o substrato era somente a glicose, é possível quantificar a quantidade de glicose (através de três técnicas distintas, conforme descrito no item 4.5.3). A velocidade específica do consumo de substrato durante a fase

exponencial, considerando $\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/S}$ constantes (medidos na fase exponencial), $\mu_S = \frac{1}{X} \left(\frac{dS}{dt} \right)_{\text{consumido}}$, pode ser calculada através de:

$$\mu_S = \frac{\mu_{\text{máx}}}{Y_{X/S}} \quad (\text{eq. 8})$$

A conversão de substrato a células foi realizada de dois modos: $(Y_{X/S})_{\text{global}}$ e $(Y_{X/S})_{\text{exponencial}}$. Para gráficos cuja fonte de carbono seja apenas a glicose, os dois gráficos devem ser retas decrescentes com a mesma inclinação, apesar da diferente quantidade de pontos. Porém, em meios complexos com mais fontes de energia, o $Y_{X/S}$ medido durante a fase exponencial deve ser diferente do $Y_{X/S}$ mensurado ao longo de todo o processo, isto é:

$$(Y_{X/S})_{\text{global}} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (\text{eq. 9})$$

$$(Y_{X/S})_{\text{exponencial}} = \frac{X^{\text{exp}} - X_0^{\text{exp}}}{S_0^{\text{exp}} - S^{\text{exp}}} \quad (\text{eq. 10})$$

onde: X = concentração celular final (g/L), X_0 = concentração celular inicial (g/L), S = concentração de substrato final (g/L), S_0 = concentração de substrato inicial (g/L), X^{exp} = concentração celular ao final da fase exponencial (g/L), X_0^{exp} = concentração celular no início da fase exponencial, S^{exp} = concentração de substrato no fim da fase exponencial e S_0^{exp} = concentração de substrato no início da fase exponencial.

As equações 8 e 9 podem ser aplicadas em ensaios em shaker e reatores com batelada descontínua, onde ocorre consumo de substrato e produção de células (daí a inclinação negativa da reta). Já no tocante aos ensaios em fed-batch, como há alimentação de substrato, foi calculado o $Y_{X/S_{\text{consumido}}}$, restrito durante a fase exponencial.

$$(Y_{X/S})_{\text{fed-batch}} = \frac{X^{\text{exp}} - X_0^{\text{exp}}}{S_{\text{cons},0}^{\text{exp}} - S_{\text{cons}}^{\text{exp}}} \quad (\text{eq. 11})$$

onde $S_{\text{cons}}^{\text{exp}} - S_{\text{cons},0}^{\text{exp}}$ são, a concentração de substrato consumido acumulado durante a fase exponencial final e inicial, respectivamente. No caso da batelada alimentada, o cálculo é feito com base mássica.

c) Produtividade em células, em regime descontínuo:

$$P_X = \frac{X_F - X_0}{t_F} \quad (\text{eq. 12})$$

onde X_F = concentração celular no instante de término da fonte de carbono (glicose); X_0 = concentração celular no início do cultivo e t_F = instante de término da fonte de carbono (glicose).

4.11. Quadro-resumo com ensaios

Os grupos de ensaios estarão descritos no item 5 (Resultados e Discussão) desta dissertação e são resumidos no quadro a seguir. Para melhor organização, utilizou-se a abreviação de S_i para os ensaios realizados em shaker, R_i para os ensaios em reator descontínuo e F_i para os ensaios realizados em reator com regime fed-batch, onde $i = 1, 2, 3, \dots$, é o número do ensaio.

Item	Descrição dos ensaios
5.1	<p>Ensaio S1, S2 e S3: Comparação entre três diferentes clones de HB2151 crescendo em shaker.</p> <p>Cinética em erlenmeyer de 500 mL chicanado com meio M9 + GLC 2,0 g/L + ampicilina, a 180 rpm de agitação (relação meio/erlenmeyer: 2/5).</p> <p>S1: clone 20.</p> <p>S2: clone 30.</p> <p>S3: clone 82.</p>
5.2	<p>Ensaio S4 e S5: Comparação da geometria do frasco para crescimento em shaker.</p>

	<p>Cinética em diferentes tamanhos de erlenmeyers, com meio M9 + GLC 2,0 g/L + ampicilina, a 180 rpm de agitação.</p> <p>S4: erlenmeyer de 500 mL.</p> <p>S5: erlenmeyer de 1000 mL.</p>
5.3	<p>Ensaio S6 e S7: Comparação entre diferentes concentrações iniciais de glicose em crescimento em shaker.</p> <p>Cinética em erlenmeyers de 1 L, com meio M9 + ampicilina, com diferentes concentrações iniciais de glicose e 180 rpm de agitação. Relação meio/erlenmeyer: 1/5.</p> <p>S6: meio 1x (GLC 2,0 g/L).</p> <p>S7: meio 5x (GLC 10,0 g/L).</p>
5.4	<p>Ensaio S8 e S9: Comparação entre diferentes frequências de agitação de shaker.</p> <p>Cinética em erlenmeyers de 1 L, com meio M9 + GLC 5,0 g/L + ampicilina. Relação meio/erlenmeyer: 1/5.</p> <p>S8: realizado a 180 rpm de agitação.</p> <p>S9: realizado a 270 rpm de agitação.</p>
5.5	<p>Ensaio R1 e S10: Comparação entre cinética em shaker e em biorreator descontínuo com meio M9 e ampicilina.</p> <p>R1: reator descontínuo, com meio M9 + GLC 5,0 g/L + ampicilina.</p> <p>S10: shaker 270 rpm, com meio M9 + GLC 5,0 g/L + ampicilina. Relação meio/erlenmeyer: 1/5.</p>
5.6	<p>Ensaio S11, S12 e S13: Comparação em shaker entre crescimentos com diferentes meios de cultura.</p> <p>Cinética em erlenmeyers de 1 L, com meios diversos + GLC 5,0 g/L + ampicilina, todas realizadas a 270 rpm. Relação meio/erlenmeyer: 1/5.</p> <p>S11: meio M4 (Gombert, 1996).</p> <p>S12: meio M5 (Rossi, 2001).</p> <p>S13: meio M2 (M9 – Fiocruz).</p>
5.7	<p>Ensaio R2 e S14: Comparação entre cinética em shaker e biorreator descontínuo com meio o Meio 2 suplementado.</p> <p>R2: reator descontínuo meio M5 + GLC 10,0 g/L + ampicilina.</p>

	S14: shaker 270 rpm, com meio M5 + GLC 10,0 g/L + ampicilina. Relação meio/erlenmeyer: 1/5.
5.8	Ensaio R3: Cultivo descontínuo com meio M9 suplementado com tiamina e L-prolina R3: reator descontínuo meio M9 + GLC 5,0 g/L + ampicilina + tiamina + L-prolina.
5.9	Ensaio F1 e F2: Cultivo descontínuo com meio M9 suplementado com tiamina e L-prolina com alimentação de constante F1: reator fed-batch com M9 + (ampicilina + GLC 5,0 g/L + tiamina + L-prolina) com alimentação linear de 20 g de glicose dissolvidas em 200 mL de solução, ao longo de 5 horas. F2: reator fed-batch com M9 + (ampicilina + GLC 5,0 g/L + tiamina + L-prolina) com alimentação linear 400 g de glicose, dissolvidas em 600 mL de solução, ao longo de 8 horas.
5.10	Ensaio F3 e F4: Cultivo descontínuo com meio M9 suplementado com tiamina e L-prolina com alimentação de exponencial F3: reator fed-batch com M9 + (ampicilina + GLC 5,0 g/L + tiamina + L-prolina) com alimentação exponencial de 400 g de glicose dissolvidas em 600 mL de solução, ao longo de 8 horas. F4: reator fed-batch com M9 + (ampicilina + GLC 5,0 g/L + tiamina + L-prolina) com alimentação exponencial de 400 g de glicose dissolvidas em 400 mL de solução, ao longo de 12 horas.
5.11	Indução Indução com IPTG.
5.12	Purificação Purificação da proteína de interesse.

Tabela 3. Quadro resumo com ensaios

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaios S1, S2 e S3: Comparação entre três diferentes clones de HB2151

Após receber três diferentes cepas de *Escherichia coli* com VHH HB 2151 em meios de criopreservação, identificadas por clone 20, 30 e 82; gentilmente cedidos pela Prof.^a Dr.^a Carla Fernandes (Fundação Oswaldo Cruz, Rondônia), realizou-se a replicação e o congelamento das células. Estes ensaios fazem referência ao grupo **S1**, **S2** e **S3** mencionados na tabela 3.

Após replicação e congelamento das células, iniciou-se o crescimento de um pré-inóculo em shaker orbital overnight por 37 °C e, no dia seguinte, acompanhou-se curva cinética por 30 horas a 30 °C e 180 rpm (condição padrão de cultivo, semelhante à praticada no laboratório de origem) em meio M9 suplementado e usando ampicilina de antibiótico de três amostras, uma de cada clone.

Figura 10. Evolução no tempo da absorbância e concentração celular dos três clones bacterianos no shaker dos ensaios **S1**, **S2** e **S3**.

O gráfico da figura 10 mostra os valores da biomassa, mensurados a partir da densidade óptica a partir de um espectrofotômetro com comprimento de onda a 540 nm. Os resultados obtidos a partir dos três clones (clone 20: ensaio **S1**; clone 30: ensaio **S2** e clone 82: ensaio **S3**) foram muito semelhantes.

A figura 11 mostra a análise da fase exponencial dos ensaios **S1**, **S2** e **S3**.

Figura 11. Análise da fase exponencial na comparação de três diferentes clones dos ensaios **S1**, **S2** e **S3**.

Como sugere a figura 11, houve alguns erros experimentais que fizeram com que o coeficiente de determinação não seja tão próximo de 1,0, mas houve um número suficiente de pontos para se avaliar a presença de uma fase exponencial expressiva cerca de 1 h após o inóculo, durando 5 horas. A velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{MÁX}$, h^{-1}) é obtida do coeficiente angular das retas mostradas no gráfico acima. Como o clone 30 (ensaio **S2**) apresentou maior $\mu_{máx}$ ($0,417 h^{-1}$), decidiu-se utilizá-lo para continuar com outros testes, com natureza exploratória.

A literatura reporta crescimento de *Escherichia coli* recombinante em frascos agitados, utilizando meio LB com glicose como substrato gerando concentração celular máxima da ordem de 1,0 g/L (Escallon, 2009) e 2,2 g/L de massa seca (Rua et al., 1997).

5.2. Ensaios S4 e S5: Comparação da geometria do frasco

Realizaram-se mais alguns experimentos exploratórios para melhor compreensão dos parâmetros cinéticos das células em estudo. Neste momento, comparou-se o crescimento bacteriano em função da geometria do erlenmeyer: de um lado, um frasco chicanado de 500 mL (**ensaio S4**) e de outro, um frasco maior de 1.000 mL, (que é a capacidade máxima do shaker presente no laboratório do GEnBio), porém sem as chicanas (**ensaio S5**).

Os resultados do ensaio foram mostrados no gráfico da figura 12.

Figura 12. Evolução no tempo da absorbância e concentração celular ao se compararem tamanhos de erlenmeyers distintos, referentes aos ensaios S4 e S5.

O shaker menor de 500 mL apresenta chicanas, porém a bactéria atingiu maiores níveis de absorbância e concentrações celulares no recipiente de 1.000 mL sem as chicanas, levando a crer que a maior área superficial deste em relação a aquele foi responsável pela maior transferência de oxigênio, levando a obtenção de maiores concentrações celulares.

A figura 13 mostra uma análise da fase exponencial deste grupo de ensaios.

Figura 13. Análise da fase exponencial nos ensaios S4 e S5.

A análise da figura 13 corrobora a hipótese de que o erlenmeyer com 1000 mL é a melhor escolha, uma vez que a velocidade específica de crescimento desenvolvida pela célula neste ensaio (S5) foi ligeiramente maior do que no recipiente menor (ensaio S4); embora que se considerada a estatística por contas dos erros experimentais, os resultados estão dentro do mesma faixa de erro,

Losen et al. (2004) comparou um crescimento de *E. coli* em baixa rotação (200 rpm) alimentado com ar; com outro, em alta rotação (para 400 rpm) com ar contendo 42% de O₂, obtendo assim um aumento de 4 vezes na capacidade de transferência de oxigênio máxima. Erlenmeyers maiores e com menor quantidade de líquido possuem maior área de troca gasosa e, sendo agitados mais rápidos, favorecem o crescimento celular.

5.3. Ensaio S6 e S7: Comparação entre diferentes concentrações iniciais de glicose em crescimento em shaker

A glicose é a principal fonte de carbono utilizada no metabolismo da *E. coli* para crescer. Nesse sentido, fazer um meio de cultura com concentração inicial maior de glicose (enriquecido 5x, ou seja, 10 g/L), poderia gerar resultados com maior crescimento celular. Nesse conjunto de ensaios, comparou-se o crescimento em shaker em um meio com concentração padrão de glicose (1x, ou 2 g/L), denominado S6 e outro

com concentração rica (5x, ou 10 g/L), denominado **S7**, em erlenmeyers de 1 L e meio M9, com ampicilina, sob agitação de 180 rpm.

Figura 14. Evolução no tempo da absorbância e concentração celular na comparação entre glicose 1x (ensaio **S6**) e glicose 5x (ensaio **S7**).

Por volta de 7,5 h após início do crescimento, ocorre uma diminuição da velocidade específica de crescimento das células do ensaio **S7**, evidenciando o final da fase exponencial, provavelmente resultante do término da concentração de glicose, posterior ao ensaio **S6**, como mostra a figura 15.

Figura 15. Análise da fase exponencial na comparação entre crescimento celular com glicose 1x (ensaio **S6**) e glicose 5x (ensaio **S7**).

Os dados da figura 14 mostram que o meio de cultura formulado com 10 g/L de glicose resultou em concentração celular final (com 30h de cultivo) um pouco superior ao meio de cultura 2 g/L (D.O. = 2,50), mas a figura 15 mostra que o meio com apenas 2 g/L de glicose cresceu mais rápido ($\mu_{\text{máx}} = 0,49 \text{ h}^{-1}$) que o meio com 10 g/L.

Figura 16. Perfil da medida pH durante ensaio, na comparação entre crescimento celular com glicose 1x (ensaio S6) e glicose 5x (ensaio S7).

A figura 16 mostra que o pH do meio enriquecido cresce bruscamente após a fase exponencial e devia ter sido corrigido com base para não atrapalhar as condições de crescimento. Esse fato pode ser associado à produção de ácidos orgânicos oriundos do metabolismo bacteriano. O abaixamento do pH se mostra uma influência negativa para o cultivo, uma vez que pode indicar a formação de subprodutos tóxicos à célula (ácido acético, em sua maioria), além do que pode levar à lise celular em pH inferiores a 5,0 (Kleman et al., 1994).

Figura 17a. Análise da concentração de acetato e glicose, ambos medidos por HPLC, no meio de concentração 1X (S6).

Figura 17b. Análise da concentração de acetato e glicose, ambos medidos por HPLC, no meio de concentração 5X (S7).

Os resultados da figura 16 vão ao encontro de Han et. al (1992), quando mostra que seus resultados experimentais sugerem uma capacidade limitada no metabolismo oxidativo da bactéria por causa da formação de ácido acético.

Já os dados das figuras 17a e 17b mostram que o HPLC não mediu com precisão a quantidade de glicose no meio de referência (ensaio S6, isto é, o meio 1X), mas o nível de acetato tem interpretação válida: começa com zero, vai sendo produzido como

principal subproduto do metabolismo, mas é parcialmente consumido pelas células e seu nível cai novamente após algumas horas.

Calculando a conversão acetato formado por glicose no instante de máxima concentração de acetato, temos: $Y_{ACE/GLC} = 0,26$ g/g para o ensaio **S6** (meio 1X) e $Y_{ACE/GLC} = 0,23$ g/g para o ensaio **S7** (meio 5X), mostrando que apesar de concentrações iniciais diferentes, as conversões de substrato a subproduto são próximas entre si. Para estes cálculos, adotou-se como concentração inicial de glicose aquela em que a solução foi elaborada (teórica) e não a concentração medida por HPLC (a qual acredita-se que há erro). Como o acetato é tóxico para o metabolismo da célula, considera-se que quanto menos acetato for gerado por glicose consumida, melhor será.

A literatura reporta níveis até maiores para essa conversão, quando se utiliza uma mistura de açúcares. Dien et al. (2002), através do crescimento de sua *E. coli* recombinante, chegou a conversão 0,77 g de acetato / g de açúcares (no caso, uma mistura de glicose e xilose).

É notório que a concentração de acetato foi maior no ensaio S7 do que no S6, devido a maior concentração de glicose. Losen (2004) reporta que que cultivos de *E. coli* têm a tendência de terem seu crescimento inibido a partir de 1,6 g/L de acetato.

As análises de ácidos orgânicos (acetato, principalmente) são bem aceitáveis a partir da técnica de HPLC com detector de índice de refração (técnica RID), e são muito melhores do que se analisados pelo UV (técnica PDA), como mostra a figura a seguir.

Figura 18. Resultados de HPLC para amostras crescidas em meio M9, com foco na interpretação dos resultados de ácido acético; pelos métodos RID e PDA.

A figura 18 compara uma mesma amostra analisada no HPLC por dois detectores diferentes. A quantidade de ácido acético é claramente bem melhor determinada se lida através de índice de refração, onde a altura de seu pico e a área de sua curva são muito bem definidas e próximas ao padrão. Já no UV, a curva do ácido perde resolução e a análise não tem tanta significância.

No que concerne à glicose, o HPLC não se mostra uma técnica capaz de quantificá-la precisamente nos meios de utilizados neste trabalho, uma vez que o tempo de retenção de alguma(s) substância(s) (provavelmente o fosfato) acaba se confundindo com o tempo de retenção da glicose nos dois detectores do aparelho, pois as moléculas se deslocam na mesma velocidade e com o mesmo tempo de retenção, fazendo com que o pico que era para ser apenas da glicose acabe distorcido e falso, sendo impossibilitado de ler, tanto por altura, quanto por área sob a curva, não sendo possível nem estabelecer uma linha de base razoável.

O pico de piruvato indica falta de tiamina e prolina, além da presença de acetato, oriundo de uma provável compensação do ciclo de Krebs.

Nesse sentido, a glicose deve ser analisada por reações enzimáticas, como no aparelho YSI (Yellow Spring Instrument) modelo 2700 Select ou o teste enzimático colorimétrico da Bioloquid. Assim será feito nos próximos ensaios.

O ensaio S7, de maior concentração inicial de glicose, tem crescimento em função da concentração de substrato residual, durante a fase exponencial, descrito pelo gráfico a seguir.

Figura 19a. Concentração celular por substrato do meio 5x (ensaio S7).

Como supracitado, a medida da glicose não foi tão bem acurada através do HPLC, provavelmente por isso o R^2 do gráfico da figura 19a aparece bem distante do 1,0. Apesar disso, o valor absoluto de $Y_{X/S}$, através do método exponencial, pode ser mensurado por $Y_{X/S} = 0,33$ g/g para o ensaio S7. Valores de $Y_{X/S}$ mais baixos geralmente estão associados a células estressadas (principalmente por temperatura alta demais e pH fora do adequado).

A análise de HPLC do ensaio S6, por sua vez, mostrou concentrações de glicose muito diferentes das reais. Essa falta de precisão nas medidas de glicose tornou muito difícil a interpretação de alguns de seus parâmetros cinéticos, cuja interpretação fisiológica dos resultados obtidos é questionável ($Y_{X/S} = 0,69$ g/g), como mostra a figura 19b.

Figura 19b. Concentração celular por substrato do meio 1x (ensaio S6).

A velocidade específica de consumo do substrato pode ser calculada, uma vez que este meio usa somente a glicose como fonte de crescimento.

$$\mu_s = \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}}$$

O que nos leva aos resultados:

$$(\mu_s)_{1X} = \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} = \frac{0,488}{0,692} = 0,705$$

$$(\mu_s)_{5X} = \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} = \frac{0,418}{0,328} = 1,274$$

De acordo com os resultados obtidos, a velocidade específica de consumo de substrato no regime com cinco vezes a quantidade de glicose é quase o dobro se comparada ao ensaio com quantidade normal de glicose.

A produtividade em células, foi calculada através equação 11, chegando-se aos valores: ensaio S6 (meio 1X): $P_X = 0,205 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e ensaio S7 (meio 5X): $P_X = 0,282 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Os resultados mostram que tanto a velocidade específica de consumo quanto a produtividade em células ensaio S7 foram superiores às do ensaio S6, devido a maior concentração de fonte de carbono (glicose). Infelizmente, carece de precisão por conta do insucesso obtido no HPLC para a concentração da glicose.

5.4. Ensaios S8 e S9: Comparação entre diferentes frequências de agitação de shaker

Continuando com as experiências exploratórias e já sabendo da influência da transferência de oxigênio no meio de cultural, modificou-se o procedimento padrão aumentando em 50% a frequência de agitação no shaker orbital (de 180 para 270 rpm). Todas as outras condições foram mantidas, crescendo 200 mL de meio de cultura em erlenmeyers de 1 L, utilizando meio M9 com ampicilina.

O ensaio padrão, mantida a agitação de 180 rpm, foi aqui denominado de **S8** e o ensaio formado pelo mesmo meio de cultura, posto a 270 rpm, foi denominado **S9**.

Figura 20. Evolução no tempo da absorbância nos ensaios **S8** e **S9**.

Os resultados do experimento de maior frequência de agitação (ensaio **S9**) mostram concentrações de biomassa (da ordem de D.O. = 8,0) triplamente maiores que as realizadas nas condições de menor frequência (ensaio **S8**), como mostra a figura 20. Num sistema com maior frequência de agitação, há maior transferência de oxigênio, possibilitando às células ficarem mais expostas a maior concentração de oxigênio, apesar de favorecer o cisalhamento. Os resultados experimentais mostraram maior crescimento celular. Com este resultado, definiu-se utilizar a frequência de 270 rpm para os próximos ensaios em shaker orbital.

Figura 21. Análise da fase exponencial dos ensaios S8 e S9.

Em consonância com o resultado anterior, a figura 21 revela que a velocidade máxima específica de crescimento em frequências maiores é duas vezes maior que se comparada a frequências menores: $\mu_{\text{máx}} (180 \text{ rpm}) = 0,40 \text{ h}^{-1}$ e $\mu_{\text{máx}} (270 \text{ rpm}) = 0,66 \text{ h}^{-1}$.

É interessante observar que os experimentos S6 e S8 são equivalentes em termos de condições e meio de cultura utilizados. Para discutir a reprodutibilidade desses experimentos, montou-se a figura 22.

Figura 22. Comparação entre experimentos análogos S6 e S8.

A figura 22 mostra valores muito próximos de absorbância atingida, da ordem ($\text{DO}_{540} = 2,10$ para o ensaio S6 e $\text{DO}_{540} = 2,16$ para o ensaio S8) e igualmente valores

de velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}} = 0,49 \text{ h}^{-1}$ para o ensaio **S6** e $\mu_{\text{máx}} = 0,40 \text{ h}^{-1}$ para o ensaio **S8**). A partir dos resultados muito próximos, conclui-se que os ensaios são bem reproduzíveis.

5.5. Ensaio S10 e R1: Comparação entre cinética em shaker e biorreator descontínuo com meio M9 e ampicilina

Para possível “*scale-up*” da expressão dos nanocorpos de camelídeos (VHHs), decidiu-se utilizar biorreatores, que são dispositivos nos quais os bioprocessos se desenvolvem sob várias condições monitoradas e controladas, tais como: temperatura, pH, frequência de agitação, saturação de oxigênio e eventual fornecimento de nutrientes.

Realizou-se uma comparação de ensaios: um em shaker orbital a 270 rpm, com meio M9, 5,0 g/L de glicose e ampicilina (ensaio **S10**) e outro em reator descontínuo, dorna de 2 L, meio M9, GLC 5,0 g/L e ampicilina (ensaio **R1**).

Figura 23a. Evolução no tempo do pH, da absorbância e da massa seca no shaker (ensaio **S6**).

Figura 23b. Evolução no tempo do pH, da absorvância e da massa seca no reator (ensaio R1).

As figuras 23a e 23b mostram o experimento do shaker e do reator com uma fase exponencial quase que imediata (isto é, praticamente sem fase de adaptação), com um excelente coeficiente de determinação ($R^2 = 0,999$ no reator). Além de manter a fase exponencial por mais tempo, a célula no reator, se comparada ao shaker orbital, cresce com uma velocidade específica maior ($\mu_{\text{máx}} = 0,58 \text{ h}^{-1}$ no reator contra $\mu_{\text{máx}} = 0,54 \text{ h}^{-1}$ no shaker), o que corrobora com a teoria de que o reator é capaz de manter os padrões cinéticos (pH, oxigênio dissolvido e temperatura) melhor que o shaker orbital.

Figura 24. Evolução no tempo da concentração de substrato (glicose medida no YSI) e subprodutos no ensaio S10.

Figura 25. Evolução no tempo da concentração de substrato (glicose medida no YSI) e subprodutos no ensaio **R1**.

A partir das figuras 24 e 25, é notório que o maior subproduto é o acetato, independente do sistema de cultivo onde se cresce a célula (o acetato é oriundo do ácido acético em meio protonado). O máximo de ácido acético coincide com o fim da fase exponencial nos ensaios e o fim da quantidade de glicose no meio, o que pode ser explicado pelo fato do ácido ser tóxico à célula, aliado ao fato da quantidade de substrato ter se esgotado. Ainda, a presença de lactato no ensaio S10 sugere uma auxotrofia celular e o consumo de glicerol sugere o consumo de outras fontes de carbono.

Após a fase exponencial, a concentração de acetato cai e as células continuam crescendo (pouco), consumindo outra fonte de carbono disponível no meio de cultura (o próprio acetato), evidenciando um fenômeno de diauxia.

Como durante a primeira fase exponencial, a principal fonte de carbono é somente a glicose, o $Y_{X/S}$ foi estimado pelo método global, obtendo-se, para o shaker (ensaio **S10**), $Y_{X/S} = 0,33$ g/g, e, para o reator (ensaio **R1**), $Y_{X/S} = 0,38$ g/g.

Sabendo este meio usa a glicose para crescer, calcula-se então a velocidade específica de consumo de substrato através da equação 7, obtendo, para o ensaio **S10**: $\mu_s = 1,38$ h⁻¹ e, para o ensaio **R1**, $\mu_s = 1,39$ h⁻¹. Essas velocidades são muito próximas. Apesar do reator favorecer o crescimento em relação ao shaker (ainda mais por causa da transferência de oxigênio), a quantidade de substrato provavelmente está limitando o crescimento. A literatura reporta valores de μ_s da ordem de 1,42 h⁻¹ para crescimento de *E. coli* limitado pela quantidade de substrato (Schulze et al., 1964).

Como ambos os ensaios foram realizados sem a alimentação de substrato, foi calculada a produtividade, levando em conta o período em que havia glicose no meio de cultura. Para o ensaio em shaker **S10**, obteve-se $P_X = 0,17 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e para o ensaio em reator R1, calcula-se $P_X = 0,20 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Há um aumento de cerca de 17% na produtividade, se considerada a mudança do shaker para o reator operando nas mesmas condições. Em próximos ensaios, o modo de operação do reator será alterada.

Por fim, vale uma comparação entre os ensaios **S9** e **S10**, já que ambos foram feitos a maiores rotações de shaker (270 rpm). Nota-se uma concordância entre os resultados da velocidade específica de crescimento: $\mu_{\text{máx}} = 0,66 \text{ h}^{-1}$ para o ensaio S9 e $\mu_{\text{máx}} = 0,54 \text{ h}^{-1}$ para o ensaio S10, mostrando boa reprodutibilidade.

5.6. Ensaios S11, S12 e S13: Comparação em shaker entre crescimentos com diferentes meios de cultura

A fim de se obter altas concentrações celulares, pesquisou-se em literatura outros meios de cultura e novas soluções de nutrientes que favorecessem o metabolismo da *E. coli* a crescer mais para que, indiretamente, haja maior produção da proteína de interesse após a indução com IPTG ser realizada

Por disponibilidade imediata de reagentes, adotaram-se dois meios de cultura já utilizados em projetos realizados no GEnBio, que satisfizeram às condições iniciais, isto é, foram obtidas altas concentrações celulares com a bactéria utilizada. Esses projetos encontram-se na dissertação de Gombert, A. (1996) e Rossi, M. (2001). Os crescimentos foram realizados em shaker orbital a 270 rpm, utilizando de erlenmeyers de 1 L, sendo nutridos por 5,0 g/L de glicose e utilizando ampicilina de antibiótico. Os ensaios **S11**, **S12** e **S13** se referem aos seguintes meios:

S11: meio M4 (Gombert, 1996)
S12: meio M5 (Rossi, 2001)
S13: meio M2 (meio M9: original da Fiocruz)

Tabela 4. Correspondência entre ensaios e meios de cultura

Em um processo batelada a fonte de carbono presente no meio é dos fatores limitantes para o crescimento, e cada um dos três meios partiam de condições de glicose distintas. Decidiu-se, pois, igualar a concentração de glicose nos três meios de cultura

em 5,0 g/L, mantendo os demais nutrientes na concentração da formulação original. Os resultados foram expressos nos gráficos a seguir:

Figura 26. Evolução no tempo da absorbância e massa seca nos ensaios S11, S12 e S13.

Até aproximadamente 5 h de cultivo (destaque no gráfico da figura 26), nota-se o fim da primeira fase exponencial, correspondente ao consumo preferencial da glicose como fonte de energia e dos nutrientes da bactotripton. O ensaio realizado com o meio M9 apresentou maior concentração celular no final do processo (massa seca cerca 11,3% maior que o ensaio utilizando o meio suplementado 2, que fora inicialmente proposto por Rossi, 2001). A análise da fase exponencial encontra-se a seguir.

Figura 27. Análise da fase exponencial nos ensaios S11, S12 e S13

É possível notar que a velocidade específica de crescimento $\mu_{\text{máx}}$ do ensaio utilizando o meio M9 é cerca de 4% superior ao ensaio que usa do meio formulado por Rossi em sua dissertação (Rossi, 2001).

Figura 28. Evolução de subproduto e substrato nos ensaios **S11**, **S12** e **S13**

Após cerca de 5 h de cultivo (em destaque na figura 28), nota-se que a concentração de glicose no ensaios **S13** (meio M9 suplementado) zerou. O crescimento neste meio resultou em maior crescimento celular e maior velocidade específica de crescimento, e por outro lado mostra pico de acetato pouco maior se comparado com o meio 2 (ensaio **S12**), proposto por Rossi (Rossi, 2001). A diferença entre as concentrações de acetato, contudo, são muito pequenas.

À luz dos resultados obtidos, notou-se que o ensaio **S13** (com o meio M9 suplementado) foi o que proveu maior concentração de células no final do cultivo (4 g/L), e cresceu mais rápido ($\mu_{\text{máx}} = 0,58 \text{ h}^{-1}$). Este é o meio original do trabalho da Fiocruz – RO, mas utilizando 5,0 g/L de glicose. Já foi constatado nesta dissertação que concentrações maiores de glicose (10 g/L) utilizando o meio M9 podem interromper o crescimento, tendo maior produção de subprodutos tóxicos. Em um próximo passo, serão discutidos a possibilidade de controle de pH no biorreator e eventual controle da oferta de glicose. O conjunto das figuras 29 permite um destaque dos dados anteriores, separados por experimento.

Figura 29 a, b, c. Resumos dos ensaios S11, S12 e S13

Figura 30. Conversão de substrato a subproduto dos ensaios **S11**, **S12** e **S13**

A concentração inicial de 5 g/L de glicose, em shaker a altas rotações, se mostra como melhor alternativa para o meio M9 (ensaio **S13**). Evidentemente, a concentração menor de glicose do **M5** (Rossi) resultou em menores valores de concentração celular que em sua composição original (10 g/L). O meio M9 apresenta conversão substrato a subproduto $Y_{sp/s} = 0,29$, cerca de 6% menor que a conversão do meio proposto por Rossi (Rossi, 2001), se mantendo, portanto, como o meio mais adequado.

O meio 1 (ensaio **S11**), proposto por Gombert em sua dissertação, (Gombert, 1996) apresenta menores valores de conversão, mas também valores de concentração celular e velocidade específica de crescimento bem mais baixos, já sendo descartado para futuros ensaios.

Os gráficos de crescimento bacteriano sugerem um crescimento diáuxico neste ensaio. Durante 1 a 5 horas, a bactéria se manteve na primeira fase exponencial, na qual o organismo consome um substrato mais assimilável (no caso, glicose) e, posteriormente, em 9 e 12 horas, existe outra fase exponencial, no qual a célula já consumiu praticamente toda a glicose, restando outro substrato presente no meio de cultura (extrato de levedura, bactotripton ou os próprios subprodutos gerados).

A figura 31 mostra a conversão de substrato a células para os ensaios em questão, cuja conversão $Y_{x/s}$ foi calculada tomando a fase exponencial, já que alguns dos meios são complexos e utilizam de outras fontes, além da glicose, para crescer.

Figura 31. Conversão de substrato a células dos ensaios **S11**, **S12** e **S13**, pelo método exponencial

A partir da figura 31, chegam-se aos resultados: ensaio **S11**: $Y_{X/S} = 0,423$; ensaio **S12**: $Y_{X/S} = 0,437$ e ensaio **S13**: $Y_{X/S} = 0,326$. Os resultados foram muito semelhantes (cerca de 40% da glicose da fase exponencial foi convertida em células, em todos os ensaios).

A produtividade foi calculada obtendo-se os resultados: $P_x = 0,170 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para o ensaio **S11**, $P_x = 0,241 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para o ensaio **S12** e $P_x = 0,435 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para o ensaio **S13**. Os resultados aqui obtidos levam a crer que o meio M9 é bem adequado para prosseguimento do trabalho, quando comparado com os meios **M4** e **M5**.

5.7. Ensaios R2 e S14: Comparação entre cinética em shaker e biorreator descontínuo com o Meio 5 suplementado

Utilizando o mesmo protocolo de crescimento em biorreator (vide 5.5), realizaram-se ensaios de crescimentos em biorreator e shaker agora utilizando o meio de cultura formulado por Rossi (Rossi, 2001). O monitoramento da biomassa foi realizado por absorbância e por massa seca, hora a hora.

Os ensaios foram assim caracterizados:

R2: reator descontínuo meio **M5** + GLC 10,0 g/L + ampicilina.

S14: shaker 270 rpm, com meio **M5** + GLC 10,0 g/L + ampicilina.

Figura 32. Evolução no tempo de absorbância e massa seca, relativos aos ensaios **R2** e **S14**.

A figura 32 mostra que o reator chega em maiores concentrações de células, se comparado ao shaker. Aqui, a maior concentração celular obtida foi 5,59 g/L no reator (ensaio **R2**), contra 4,17 g/L de células no shaker (ensaio **S14**).

Figura 33. Análise da fase exponencial relativa aos ensaios **R2** e **S14**.

Os dados de biomassa obtidos a partir da massa seca não se relacionaram linearmente com a medida da densidade óptica ao longo de todo o ensaio (somente durante alguns trechos, provavelmente por conta de alguns erros experimentais. A

figura 33 compara valores de $\mu_{\text{máx}}$ obtidos por dois diferentes métodos: absorbância e massa seca. Para o ensaio **R2**, obtiveram-se os valores $\mu_{\text{máx}} = 0,607$ (através da absorbância) e $\mu_{\text{máx}} = 0,282$ (através da massa seca). Já para o ensaio me shaker **S14**, chegou-se aos resultados $\mu_{\text{máx}} = 0,452$ (através da absorbância) e $\mu_{\text{máx}} = 0,187$ (através da massa seca).

Na teoria, os resultados de $\mu_{\text{máx}}$ calculados deveriam ser iguais, não importa o método. Considera-se aqui a concentração celular medida por massa seca como sendo um resultado mais preciso e confiável para este meio. Por dificuldades técnicas, talvez causadas pela formulação complexa do meio de cultura, o crescimento via densidade óptica gerou resultados com significado fisiológico questionável.

Figura 34. Perfil do pH nos ensaios **R2** e **S14**

A figura 34 mostra que o controle do reator (ensaio **R2**) com bombas peristálticas de ácido e base é mais eficaz que a adição calculada a mão operante no shaker (ensaio **S14**), mantendo o pH em níveis adequados pré-selecionados, favorecendo à bactéria para crescer na sua condição de pH ótimo. O pH ideal seria entre 6,5 – 7,0, pois em pHs muito ácidos, a célula se estressa e expulsa o plasmídeo.

A figura 35 a seguir mostra a tela do software *BioCommand*, ligado junto ao biorreator durante seu funcionamento. Este programa fornece gráficos com abscissa em horas e ordenada com informações em tempo real sobre agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), pH e temperatura (°C),

Figura 35. Tela do programa BioCommand referente ao ensaio **R2**.

A partir da figura 35, é possível analisar que a temperatura se mantém constante em 30 °C durante todo o crescimento e o pH manteve-se em torno 7,0, com maiores desvios no experimento do shaker (**S14**). Além disso, o nível de oxigênio dissolvido demora algumas horas para se ajustar na faixa dos 50% desejados (CAMPANI, 2014), fazendo para isso alterações na agitação (dentro do intervalo de 200 – 800 rpm). No final do referido experimento, houve uma perda de sinal do eletrodo de oxigênio.

Figura 36. Subproduto e substrato nos ensaios **R2** e **S14**, utilizando meio suplementado 2.

Figura 37. Conversão substrato a subproduto nos ensaios **R2** (reator) e **S14** (shaker).

As figuras 36 e 37 devem ser analisadas em concomitância. O reator em paralelo ao shaker torna uma situação evidente: a produção de acetato (oriundo do metabolismo bacteriano) está bem relacionada com o consumo de glicose e com o fim da fase exponencial, já que cessa a oferta da principal fonte de carbono no meio de cultura.

O momento em que a glicose acaba é o momento em que o acetato é máximo. Se por um lado a glicose faz a bactéria crescer mais, por outro lado produz mais ácido acético, que é tóxico à célula. A literatura mostra que o acúmulo de acetato reduz a velocidade de crescimento celular e a consequente concentração de células ao final (Luli et al, 1990).

Depois desse momento, o meio tende a consumir o próprio acetato (como fonte de carbono secundária) e sua concentração cai. Na conversão de substrato a subproduto, apesar dos pontos não serem tão bem aproximados por uma reta, o fator de conversão do reator e no shaker resultaram muito próximos, da ordem de $Y_{SP/S} = 0,11$ g/g. Tal valor é compatível com Rossi (2001), que calcula $Y_{SP/S} = 0,17$ g/g para seu ensaio, utilizando o mesmo meio de cultura.

A figura 38 mostra resultados da conversão de substrato em células através de uma regressão de dados de todo o cultivo, cuja diferença calculada através valor do método exponencial foi mínima. Isso leva a crer que a glicose é o principal açúcar consumido e utilizado como substrato pela célula.

Figura 38. Conversão substrato a células nos ensaios **R2** (reator) e **S14** (shaker).

Novamente, o experimento em reator se mostra mais vantajoso que o experimento em shaker, ao transformar praticamente o dobro de substrato em células. A produtividade foi calculada $P_X = 0,33 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para o ensaio em shaker (**S14**) e $P_X = 0,45 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para o ensaio em reator (**R2**).

5.8. Ensaio R3: Cultivo descontínuo com meio M9 suplementado com tiamina e L-prolina

Ao se estudar a biologia da cepa HB2151, tem-se a expectativa que ela seja cresça mais na presença de tiamina e L-prolina, por ser auxotrófica em relação a essas substâncias. A partir dos resultados obtidos em 5.6, decidiu-se continuar com o meio M9 com ampicilina, agora suplementado com tiamina e L-prolina, objetivando maiores concentrações celulares. Este ensaio foi denominado **R3** e foi utilizado reator descontínuo, dorna de 2 L, com meio M9 suplementado e 5,0 g/L de glicose.

A prolina está relacionada com reações redox e respiração celular, sendo que a célula para de respirar na falta desta substância. Já a falta de tiamina induz a formação de acetato, e sua presença melhora o ciclo de Krebs.

Figura 39. Evolução no tempo de absorbância e massa seca no ensaio **R3**

Se comparados aos resultados mostrados na figura 23b (concentração celular final 2,26 g/L), em que se trata de um biorreator operando nas mesmas condições exceto a adição de L-prolina e tiamina, a figura 39 revela que a adição desses compostos ao meio de cultura, mantidas as mesmas condições de cultivo, elevaram a concentração celular final a 4,00 g/L, confirmando a hipótese de que a cepa HB 2151 necessita da presença dessas substâncias para crescer.

Figura 40. Análise da fase exponencial do ensaio **R3**

A figura 40 revela que a velocidade específica de crescimento deste processo é da ordem de $\mu_{\text{máx}} = 0,51 \text{ h}^{-1}$, valor este muito semelhante ao ensaio R1 (mesmas condições, sem adição dos compostos auxotróficos), que foi $\mu_{\text{máx}} = 0,53 \text{ h}^{-1}$. Os crescimentos acontecem de maneira muito semelhante durante a fase exponencial, só que a adição de prolina e tiamina permite à célula crescer até atingir maiores concentrações.

Figura 41. Absorbância, massa de base consumida e glicose no ensaio **R3**

A figura 41 sugere um resumo do experimento, onde a glicose é consumida aproximadamente na mesma velocidade que o reator injeta a base para manter o pH igual a 7. No momento $t = 11 \text{ h}$, a célula atinge o máximo, a glicose chega a zero e nenhuma base é então consumida. É notório que a célula precisa de mais fonte de carbono para continuar crescendo.

Para finalizar a análise, foi calculada a conversão de substrato a células, utilizando para isso uma estimativa através do cálculo global com regressão de todo o ensaio, já que a única fonte de carbono de alimentação foi a glicose. A figura 42 mostra o gráfico utilizado para este cálculo, cujo valor de $Y_{X/S} = 0,55 \text{ g/g}$ e cuja produtividade calculada, enquanto havia glicose no sistema, foi de $P_X = 0,257 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Este resultado foi cerca de 28% maior da produtividade medida no ensaio **R1**, que corresponde ao mesmo procedimento sem os suplementos do meio de cultura.

Figura 42. Conversão de substrato a células, pelo método global, do ensaio **R3**

5.9. Ensaios F1 e F2: Cultivo descontínuo alimentado com meio M9 suplementado com tiamina e L-prolina com vazão constante

Com o objetivo de aumentar a concentração celular, evitando a formação excessiva do subproduto acetato, que é tóxico para a célula, passou-se a utilizar ensaios descontínuo alimentados. Num primeiro teste experimental, denominado aqui de **F1**, 2 L de meio de cultura inicialmente com 5 g/L de glicose foi alimentando com uma solução de 20 g de glicose dissolvidas em 200 mL, ao longo de 5 horas, a partir de $t = 7h$, em uma alimentação a vazão constante. A glicose adicionada (100 g/L) estava numa concentração vinte vezes maior que a inicial. O crescimento foi realizado em regime de batelada alimentada, utilizando para isso meio M9 suplementado com tiamina 4,0 mg/L e prolina 0,2 g/L, e utilizando ampicilina de antibiótico.

Figura 43. Evolução no tempo da absorbância e massa seca do ensaio **F1**

A figura 43 revela uma concentração celular ligeiramente superior aos ensaios anterior, onde não havia alimentação extra de glicose: 4,25 g/L de células no ensaio **F1** contra 4,00 g/L no ensaio **R3**.

A fase exponencial foi analisada através da figura 44.

Figura 44. Análise da fase exponencial do ensaio **F1**

Neste processo, as células cresceram a uma velocidade específica máxima de crescimento mais alta, na fase exponencial: $\mu_{\text{máx}} = 0,76 \text{ h}^{-1}$, contra $0,51 \text{ h}^{-1}$ do ensaio sem alimentação adicional de glicose, aparentemente o crescimento utilizou a glicose extra para crescer pouco mais.

Para compreender o processo, foi analisado o balanço da glicose na figura 45. Este gráfico avalia o balanço de massa da glicose consumida dentro no reator no instante de 0 a 15 horas. A massa residual refere-se à quantidade de glicose obtida pela concentração medida com um kit enzimático da Bioloquid; a massa de glicose alimentada se refere ao acúmulo de alimentação do reator (40 mL/h de uma solução 100 g/L = 4 g/h de glicose no reator); já a massa de glicose consumida no instante t foi calculada a partir da diferença entre o total da massa residual e alimentada no instante $(t - 1)$ e a massa residual no instante t , isto é:

$$(\text{massa consumida})_t = (\text{massa residual})_{t-1} + (\text{massa alimentada})_{t-1} - (\text{massa residual})_t \quad (\text{eq. 13})$$

E por massa consumida acumulada define-se:

$$(\text{massa consumida acumulada}) = \sum_{t=1}^{t=15} (\text{massa consumida})_t \quad (\text{eq. 14})$$

Figura 45. Balanço de massa de glicose no reator em regime descontínuo-alimentado

Este gráfico mostra o balanço da solução de 20 g de glicose inserida ao longo de 5 horas que, adicionadas às 10 g iniciais, acumulam 30 g ao todo. No final do processo, toda a glicose adicionada fora consumida.

Figura 46. Conversão substrato consumido a células no ensaio F1

A figura 46 analisa a conversão de substrato a células, mostrando a dependência linear ($R^2 = 0,97$) e o valor da $Y_{X/S} = 0,48$ g/g. Normalmente se analisa concentração celular por substrato residual, como no caso fed-batch há um aporte de substrato, então foi utilizado um gráfico de concentração celular medida por concentração de glicose consumida acumulada, e a medida de $Y_{X/S}$ foi obtida durante a fase exponencial. Assim será feito nos próximos ensaios.

Também durante a fase exponencial foi quantificado o valor de $Y_{SP/S} = 0,10$ g/g, muito compatível com os ensaios em batelada. Por fim, a produtividade calculada enquanto havia glicose no meio foi de $P_X = 0,61$ g.L⁻¹.h⁻¹, a maior já registrada nesse trabalho.

Com relação a esse experimento, nota-se que as células não continuaram a crescer exponencialmente, provavelmente pela adição da glicose não ser suficiente nessa concentração (2 g/L a cada hora não bastou para repor os 5 g/L que haviam inicialmente). Propõe-se um novo teste, denominado agora de **F2**, com alimentação maior de glicose. O novo experimento foi feito com alimentação de 400 g de glicose, dissolvidas em 600 mL de solução, inserida durante 8 horas de cultivo.

A figura 47 mostra a evolução da absorbância e da massa seca neste ensaio.

Figura 47. Evolução no tempo da absorbância e massa seca do ensaio **F2**

Neste caso, a solução de alimentação passou a ser adicionada não no início, mas após 6 horas do início do inóculo, instante este em que estava cessando a fase exponencial.

O gráfico da figura 47 mostra o maior valor de concentração celular obtida até então: 9,24 g/L. De fato, a célula crescendo a partir da glicose adicionada à batelada ao fim da fase exponencial mostra a limitação do crescimento em função da fonte de carbono. A glicose adicionada fornece mais condições de crescimento à célula, prolongando seu crescimento.

Figura 48. Evolução massa seca em função da absorvância no ensaio F2

A figura 48 mostra a massa seca com um comportamento razoavelmente linear em relação à absorvância, especialmente no tocante à fase exponencial. Suas medidas foram consideradas compatíveis.

Figura 49. Evolução no tempo da massa de base consumida no ensaio F2

A figura 49 permite visualizar indiretamente o crescimento celular através da massa que o reator solicita da base (NaOH 1M), através de uma bomba peristáltica, para manter o pH no nível pré-selecionado. Com o avanço do ensaio, ácidos orgânicos são formados (em especial há formação de acetato), o que faz com que a necessidade de base aumente. Existe um comportamento exponencial da curva acima durante a fase exponencial da célula. Nesse sentido, resolveu-se analisar a fase exponencial a partir de três parâmetros: a absorbância, a massa seca e a massa de base consumida pelo reator.

Figura 50. Análise da fase exponencial do ensaio F2

A figura 50 mostra a velocidade específica de crescimento sendo calculada de três maneiras diferentes: pela curva da absorbância ($\mu_{\text{máx}} = 0,681 \text{ h}^{-1}$), pela curva da massa seca ($\mu_{\text{máx}} = 0,6899 \text{ h}^{-1}$) e também pela curva de consumo de massa de base ($\mu_{\text{máx}} = 0,7359 \text{ h}^{-1}$). Isso fornece um valor médio de $\overline{\mu_{\text{máx}}} = (0,702 \pm 0,024) \text{ h}^{-1}$.

Um desvio-padrão de apenas 3% do valor do $\overline{\mu_{\text{máx}}}$ mostra resultados precisos e confiáveis.

Os gráficos a seguir se destinam a estudar a quantidade de substrato no meio de cultura.

Figura 51. Balanço de massa de glicose do ensaio F2

O gráfico da figura 51 mostra uma pequena quantidade de glicose sendo consumida até o momento em que se inicia a alimentação. É evidenciado que, ao se fornecer mais glicose à célula, o substrato é consumido até chegar a um valor máximo (por volta de 14 h), em que a célula não cresce mais, provavelmente aliado a uma alta geração de subprodutos tóxicos.

Figura 52. Conversão de substrato a células do ensaio F2

A figura 52 foi também analisada tomando por base a glicose consumida acumulada que foi transformada em células durante a fase exponencial. Neste gráfico, a concentração de células é um valor teórico calculado a partir da curva de concentração em função da absorbância. O valor determinado foi $Y_{x/s} = 0,40$, muito condizente com todos os demais ensaios, tanto os que foram realizados em shaker quanto os que foram realizados em reator. Infelizmente, os pontos não são tão representativos de uma reta, (R^2 está ligeiramente distante de 1), o que pode ter sido causado por erros experimentais, principalmente no tocante à leitura da concentração de glicose durante a fase exponencial.

Não foi calculada a produtividade para este ensaio, pois a equação 11 leva em conta a diferença entre as concentrações celulares entre o momento inicial e o momento em que se acaba a glicose. No caso, como houve aporte de substrato, não houve consumo absoluto de glicose e outra tentativa de cálculo para essa produtividade não traria um dado numérico comparável fisiologicamente com os ensaios anteriores.

Por fim, a figura 53 mostra um resumo do ensaio, comparando a massa seca com a glicose residual e acrescenta a medida da concentração de acetato.

Figura 53. Resumo do ensaio F2

É perceptível que a concentração de acetato aumenta à medida que mais glicose é adicionada ao reator. O substrato é alimentado de forma linear e a concentração de substrato, durante a alimentação, também cresce razoavelmente linear. Nota-se que a altas concentrações de acetato, a célula já não cresce mais. Espera-se num próximo

gerar a menor quantidade de glicose residual possível durante a fase exponencial, para que a produção de acetato seja minimizada.

5.10. Ensaios F3 e F4: Cultivo descontínuo alimentado com meio M9 suplementado com tiamina e L-prolina com alimentação exponencial

A parte final deste trabalho se destina a otimizar o processo de batelada alimentada, introduzindo a solução de glicose e nutrientes de forma exponencial.

O primeiro experimento com alimentação de glicose e nutrientes em fase exponencial, denominado aqui **F3**, foi realizado em biorreator de 2,0 L, com meio M9 com 5,0 g/L inicial de glicose, adicionado tiamina 4,0 mg/L e prolina 0,2 g/L. A alimentação foi feita com 400 g de glicose, dissolvida em 600 mL de solução, inserida durante 8 horas de cultivo. Este ensaio foi realizado sem uma equação para definir a quantia correta de glicose a ser alimentada (ao contrário de **F4**), apenas aumentando a taxa de adição de substrato. Os resultados de **F3** foram exploratórios e comparativos aos de **F1** e **F2**, onde a solução de substrato sempre fora adicionada à mesma taxa.

O gráfico 54 se destina a observar como a absorbância e a massa seca se desenvolvem no tempo.

Figura 54. Evolução no tempo da massa seca e absorbância no ensaio **F3**

A figura 55 mostra a evolução da massa seca e absorvância no tempo. O final da fase exponencial corresponde ao instante em que as células paravam de crescer nos ensaios anteriores, em batelada. Dessa vez, a maior concentração celular obtida foi 10,22 g/L e a leitura da densidade óptica da ordem de 19 unidades de ABS600.

Figura 55. Comparação da massa seca em função da absorvância do ensaio **F3**

Neste ensaio, o crescimento da biomassa também foi mensurado via massa seca e absorvância, e essas grandezas mostram boa relação de linearidade (R^2 muito próximo a 1), como sugere a figura 55.

Figura 56. Base Consumida, Glicose Residual, Acetato e Massa Seca do ensaio **F3**

O gráfico da figura 56 mostra um resumo do que acontece no ensaio. Observa-se mais uma vez que a alimentação da glicose é primordial para fazer a célula crescer além da fase exponencial (que durava até cerca de 6h após inóculo) e desta vez se mostra limitado pelo acúmulo de acetato, como prevê a literatura (Luli et al., 1990). A concentração de glicose diminui até $t = 5$ h, e depois o residual aumenta, devido a alimentação. Observa-se que por volta do instante $t = 15$ h, a concentração celular já está próxima do valor limite, a glicose consumida é a mesma que está sendo inserida e o acetato mantém níveis tóxicos para a célula, isso acontecendo a valores mais altos de $\mu_{\text{máx}}$.

O balanço de massa do substrato é analisado no gráfico a seguir.

Figura 57. Balanço de massa de glicose no ensaio F3

O gráfico da figura 57 ilustra que a partir das 6 horas, a concentração de glicose residual já começa a crescer e a partir das 12 horas, instante que o acetato já atinge valores críticos para o crescimento (concentrações da ordem de 2 g/L), a célula diminui muito a velocidade de seu crescimento. A massa total residual que sobrou ao final do ensaio, junto com a massa consumida acumulada é igual a toda a massa alimentada acumulada durante o processo.

Figura 58. Conversão de substrato a células do ensaio F3

De acordo com a figura 58, conversão de glicose consumida a células, pode ser bem aproximada por uma reta e o valor de $Y_{X/S}$ calculado pode ser estimado em 0,42 g/g, durante a fase exponencial, condizente com os ensaios em shaker ($\overline{Y_{X/S}} = 0,38 \pm 0,07$ g/g) e em reator ($\overline{Y_{X/S}} = 0,45 \pm 0,08$ g/g).

O próximo ensaio, aqui denominado de **F4**, foi também realizado em dorna de 2 L, com meio M9 enriquecido inicialmente com 5,0 g/L GLC, 4,0 mg/L de tiamina e 0,2 g/L de L-prolina. A vazão da bomba de nutriente foi corrigida de acordo com a equação $F = \frac{X_0 \cdot V \cdot e^{\mu t}}{S_0 \cdot Y_{X/S}}$ (GOMBERT, 1997).

A alimentação foi previamente calculada em 400 g glicose, diluídas em 400 mL de solução de água e nutrientes, inseridas ao longo de 12 horas, a partir de $t = 3$ horas. Adotou-se utilizar mesma quantidade de glicose, porém em solução mais concentrada, para minimizar efeitos de diluição da solução de nutrientes no meio de cultura.

Foram utilizados os parâmetros $X_0 = 0,8$ g/L, $S_0 = 5,0$ g/L, $V = 2$ L, $\mu = 0,4$ e $Y_{X/S} = 0,4$, obtendo-se a função $F(t) = 0,8 e^{0,4 t}$.

Figura 59. Evolução no tempo da absorvância e da massa seca do ensaio **F4**

A evolução da cinética em alimentação exponencial ilustrada pela figura 59 mostrou a maior concentração de células finais que foi obtida neste trabalho: 25,55 g/L. Considera-se o regime de fase exponencial, aproximadamente, das 2h às 9h de cultivo. Rossi (2001) obteve concentração celular final de 9,20 g/L em sua dissertação, usando o que aqui foi chamado de meio suplementado 2, em regime de batelada alimentada.

A maior medição de densidade óptica foi medida, no final do cultivo **F4**, em cerca de $DO_{600} = 31$. Thiel et al. (2001) descreve um fermentador econômico de bancada de 20 L, adequado para a produção de fragmentos de anticorpos recombinantes em sistemas bacterianos, cuja condição de cultivo é muito parecida com as do ensaio aqui descritos: temperatura na faixa de 20 a 37 °C e pH na faixa de 7,0 a 7.5. Em seu artigo também são obtidas culturas de *E. coli* medidas por DO_{600} da ordem de 30 a 32, contra DO_{600} de 4 a 6 em frascos agitados.

Para melhor otimização deste ensaio, sugere-se para um próximo estudo acoplar um glicosímetro para gerar medidas de glicose em tempo real. A partir de cerca de 7 horas de cultivo a velocidade específica de crescimento pode ser reduzida, e a glicose mantida a níveis que gerariam o mínimo de acetato possível.

Figura 60. Massa seca em função da absorbância no ensaio F4

O gráfico 60 ilustra que a evolução da quantidade de células pode ser bem mensurada pela absorbância, justificado pelo bom comportamento linear da curva ($R^2 = 0,96$). Apesar dos resultados da correlação em F3 serem diferente de F4, para cada ensaio existe uma função que relaciona com razoável acurácia a massa seca com a absorbância.

No caso da batelada alimentada, o fenômeno da diauxia é muito minimizado, uma vez que a fonte de carbono preferencial é a glicose (a célula consome o acetato na ausência da glicose). O cálculo da velocidade específica de crescimento durante a fase exponencial está mostrado a seguir, sendo comparada por três métodos diferentes: massa seca, absorbância e através da massa da base consumida.

Figura 61. Massa de base consumida durante o ensaio F4

Para isso, primeiramente, montou-se o gráfico contido na figura 61, que mostra um crescimento exponencial da quantidade de base consumida, durante a fase considerada exponencial.

Figura 62. Análise da fase exponencial do ensaio F4

Neste último ensaio, a alimentação foi calculada de modo a otimizar a redução do $\mu_{\text{máx}}$, para que o crescimento exponencial durasse o maior tempo possível.

A figura 62 mostra a velocidade específica de crescimento na fase exponencial sendo calculada de três maneiras diferentes: pela curva da absorbância ($\mu_{\text{máx}} = 0,467 \text{ h}^{-1}$), pela curva da massa seca ($\mu_{\text{máx}} = 0,400 \text{ h}^{-1}$) e também pela curva de consumo de massa de base ($\mu_{\text{máx}} = 0,385 \text{ h}^{-1}$). Isso fornece um valor médio de $\overline{\mu_{\text{máx}}} = (0,417 \pm 0,043) \text{ h}^{-1}$.

Desta vez, o desvio-padrão foi cerca de 10% do valor do $\overline{\mu_{\text{máx}}}$, mostrando resultados mais distantes da média, causados provavelmente por erros experimentais em alguma medição ou, a julgar mais provável, por alguma diferença na massa de base adicionada (já que seu valor de $\mu_{\text{máx}}$ foi o que mais se distanciou do $\overline{\mu_{\text{máx}}}$).

Figura 63. Balanço de massa de glicose do ensaio F4

A figura 63 mostra o balanço de glicose deste ensaio. Está evidenciado que principalmente durante a fase exponencial, a massa de glicose alimentada foi muito semelhante à massa de glicose consumida, devida à previsão matemática da vazão encontrada em GOMBERT, 1997. Isso acaba gerando acúmulo de glicose menor durante a fase exponencial, evitando a formação de subprodutos tóxicos ao metabolismo, principalmente o acetato, possibilitando à célula crescer mais.

Figura 64. Conversão de substrato consumido em células no ensaio F4

Ainda, a figura 64 mostra a conversão de substrato consumido em células, durante a fase exponencial, como sendo perto de $Y_{X/S} = 0,63$, ligeiramente maior que o valor de $Y_{X/S}$ obtido nos demais ensaios. De fato, o ensaio **F4** foi o que mais permitiu que a célula crescesse. Rossi (2001), em sua dissertação, calcula valores de $Y_{X/S}$ entre 0,36 e 0,48, cuja variação se dá em função da composição do meio de cultura. Os valores aqui obtidos com o meio M9 suplementado de nutrientes são compatíveis com esta literatura.

Figura 65. Resumo do ensaio F4

Por fim, analisa-se o gráfico da figura 65: a adição de glicose aos poucos, realizada na forma de alimentação à vazão exponencial, mantém o acetato a níveis mais baixos e possibilita que a célula cresça mais. É perceptível que enquanto o acetato encontra-se a valores abaixo de 1,6 g/L, valor este reportado como limite de toxicidade por Losen (2004), a célula ainda continua crescendo. Após a adição de glicose ser muito maior do que a célula é capaz de consumir, a concentração de acetato aumenta e as concentrações celulares se mantêm constantes.

Complementa-se com a literatura de Luli et al. (1990), em que se descreve o acúmulo de acetato como fator responsável por diminuir a velocidade de crescimento das células e reduzir a máxima concentração celular ao final do processo.

Ainda segundo Shimizu et al. (1988), o acetato tem maior efeito prejudicial ao crescimento em culturas que utilizam células recombinantes, se comparas às células

selvagens, acarretando numa menor produção de proteínas recombinantes no final do processo.

A figura abaixo compara o crescimento celular dos ensaios **F3** e **F4** com a concentração do acetato ao longo do tempo.

Figura 66. Comparação entre os ensaios **F3** e **F4**

Segundo a literatura supracitada (Losen, 2004), níveis de acetato superiores a 1,6 g/L se tornam tóxicos para o crescimento da *E. coli*. Contudo, como verificado nos ensaios, ainda existe algum crescimento, mesmo que pequeno (se comparado à fase exponencial) após o acetato atingir essa concentração. A figura 66 mostra que após o acetato atingir níveis de 3,0 g/L, tanto em **F3** quanto em **F4**, o crescimento celular para bruscamente, sendo então ser associada a uma concentração limite de crescimento para esta cepa, nas condições deste trabalho.

5.11. Indução

Paralelamente aos ensaios em fed-batch, foi realizado uma indução e purificação de uma amostra de células crescida em cinética em shaker orbital, seguindo o mesmo protocolo utilizado pela Fiocruz.

Para realizar o processo de indução (e posterior purificação), decidiu-se utilizar o mesmo meio sugerido no protocolo (meio M9 suplementado, FLUKA), com as

condições otimizadas: shaker agitado 270 rpm, com meio M9 adicionado com 5,0 g/L de glicose e uso de ampicilina como antibiótico, em frascos de 1 L.

Apesar da quantidade superior de glicose produzir mais acetato (e consequentemente prejudicar a formação de células por ser tóxico), foi nesta quantidade que se obtiveram maiores concentrações celulares e maior velocidade específica de crescimento, dentre os experimentos realizados em shaker.

No que concerne à indução, é interessante que o mínimo possível de células cresça a partir do momento em que é adicionado o IPTG, de modo que o metabolismo seja deslocado para consumir sua energia para síntese da proteína induzida, e não para crescer mais células.

Foi realizado então um ensaio comparativo de um crescimento em shaker sem induzir a um crescimento com indução, nos quais foram medidas as concentrações celulares ao longo do tempo e os resultados encontram-se abaixo:

Figura 67. Comparativo de indução: concentração celular em shaker sem induzir e em shaker com indução com IPTG

A partir da figura 67, nota-se que as células diminuíram seu ritmo de crescimento após adição do indutor na presença de um meio suplementado de açúcar e nutrientes, mas ainda assim permaneceram crescendo, desviando um pouco da energia que poderia ser gasta para síntese da proteína. Por conta disso, em estudos futuros podem ser realizados outros ensaios, induzindo em diferentes momentos, para fim de comparação da velocidade específica de crescimento.

Nesta dissertação, o meio utilizado para a indução foi o mesmo utilizado para a cinética, só que acrescentado de IPTG. Gomide (2001), em sua dissertação, compara

uma troca completa de meio para indução: do meio LB, usado no crescimento, para um meio mais rico, denominado 2x-HKSII (Jensen & Caelsen, 1990) para a indução, conseguindo obter o dobro da densidade óptica daquela gerada com o meio LB. Como estudos futuros, pode ser estudado os efeitos da alteração na formulação no meio de indução na concentração final da proteína.

5.12. Purificação

Seguindo o processo de purificação descrito na metodologia, a amostra foi medida no aparelho Nanodrop, obtendo-se uma concentração de proteínas totais da ordem de 0,327 g/L. Após etapa de purificação, realizou-se uma análise eletroforética.

Figura 68. Eletroforese evoluindo no tempo.

Legenda: Mc = marcador, I = injeção, F = flowthrough, L = lavagem, E = eluição

A figura 68 mostra o resultado da análise eletroforética. A etapa de lavagem prepara a coluna para um novo ciclo, e a eluição retira o que está aderido na coluna, de modo que esta análise consiste em verificar na etapa de eluição (coluna E) apenas uma banda de proteína para seja associada ao tamanho correto da proteína (15 kDa). As imagens mostram a evolução das marcações no gel ao longo do tempo.

Porém, o resultado dessa primeira eletroforese mostra uma coluna de eluição em que é possível identificar várias bandas (o primeiro gel está mais visível, com mais “traços”).

Após a purificação, mediu-se 0,327 g/L de proteínas totais, porém pelo resultado da análise eletroforética, sugere-se que a técnica de purificação carece de melhorias, já que é difícil de se localizar a proteína de interesse durante todas as etapas de purificação, mais especificamente a última.

Provavelmente, a densidade da malha do gel (a porcentagem de poliacrilamida) não foi suficiente para segurar essas proteínas, fazendo com que elas corressem pelo gel muito rápido e fossem perdidas.

5.13. Discussão Geral

A tabela a seguir concentra os principais parâmetros cinéticos obtidos nos conjuntos de ensaios de cinética propostos.

Item	Ensaio	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Abs _{FINAL}	X _{FINAL} (g/L)	R ² [X(abs)]	Δt fase exponencial	Y _{X/S} (g/g)	Y _{S/P/S} (g/g)	P _X (g/L/h)
5.1	S1	0,39	2,09	1,99	0,980	1 – 5	-	-	-
	S2	0,42	2,03	1,92	0,980	1 – 4	-	-	-
	S3	0,33	2,10	2,26	0,850	1 – 6	-	-	-
5.2	S4	0,30	1,90	1,90	0,992	2 – 5	-	-	-
	S5	0,33	2,03	2,35	0,920	2 – 5	-	-	-
5.3	S6	0,49	2,17	3,11	0,936	1 – 5	0,69*	0,05	0,20
	S7	0,42	2,50	3,45	0,974	1 – 5	0,33	0,25	0,28
5.4	S8	0,65	2,10	-	-	2 – 6	-	-	-
	S9	0,33	7,55	-	-	2 – 6	-	-	-
5.5	R1	0,53	2,14	2,26	0,949	1 – 4,5	0,38	-	0,20
	S10	0,46	2,02	1,96	0,990	1 – 4,5	0,33	-	0,17
5.6	S11	0,46	5,15	3,72	0,870	1 – 5	0,42	0,14	0,17
	S12	0,56	10,19	5,20	0,970	1 – 5	0,43	0,31	0,24
	S13	0,59	10,81	6,68	0,990	1 – 5	0,33	0,29	0,44
5.7	R2	0,28	10,30	5,59	0,925	2 – 5	0,42	0,12	0,45
	S14	0,19	8,01	4,17	0,832	2 – 5	0,22	0,11	0,33
5.8	R3	0,51	6,05	4,00	0,933	2 – 6	0,55	-	0,26
5.9	F1	0,77	10,20	4,25	0,989	3 – 8	0,48	0,10	0,61
	F2	0,70	31,46	9,24	0,817	1 – 5	0,40	-	-
5.10	F3	0,59	19,03	10,22	0,988	2 – 5	0,42	-	-
	F4	0,42	31,44	25,55	0,964	2 – 9	0,63	-	-

* a interpretação fisiológica desses resultados é questionável.

Tabela 5. Tabela comparativa com o resultado de todos os ensaios de cinética

A parceria com o laboratório IPEPATRO da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-RO) se mostrou positiva e fundamental para o decorrer do trabalho. Resultados e discussões foram trocados entre os grupos de pesquisa.

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que processo de crescimento da bactéria HB 2151 é fortemente limitado pela formação de acetato, por sua biologia celular e pela carência na transferência de oxigênio. No caso de cinética em shaker orbital, existe uma relação entre o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), a geometria do frasco e a frequência de agitação. Erlenmeyers maiores e com menor quantidade de líquido possuem maior área de troca gasosa relativa ao volume líquido e, sendo agitados mais rápidos, favorecem o crescimento celular.

No caso de biorreator, agitação moderada e temperatura de 30°C mostram-se como condições favoráveis de crescimento das células, com razoável limitação para formação de acetato, o que concorda com o descrito em Sezenov et. al (2007). O acetato, que é proveniente do metabolismo celular, é tóxico para o meio de cultura.

O biorreator consegue, a partir de um controle, variar a agitação do meio e manter um nível pré-estabelecido de oxigênio dissolvido; além de permitir suprir o meio de cultura com mais glicose e nutrientes fundamentais para o crescimento, minimizando o problema da falta de oxigênio e provendo fonte de energia para a célula. Losen et al. (2004) explanam que as densidades celulares no biorreator são maiores que em shakers agitados, por conta da possibilidade de controle de fatores primários às células bacterianas: oxigênio dissolvido, pH e concentração de acetato.

Nos cultivos realizados em batelada, o crescimento caracterizou uma diauxia: a priori, consumo preferencial de glicose; e em seguida fonte de energia oriunda de outras substâncias do meio (bactotripton, extrato de levedura e o próprio acetato).

A batelada com alimentação mostrou-se como a melhor alternativa, uma vez que altas concentrações iniciais de glicose produzem grandes quantidades de ácido acético como subproduto que, além de diminuir o pH do meio, é tóxico para o metabolismo bacteriano e impede o crescimento. A adição exponencial de glicose, a partir do momento em que sua concentração quase zerava, permitiu prolongar a fase exponencial pois limitou o crescimento. A análise da figura 68 mostra maior concentração celular sendo obtida no reator em batelada alimentada do que no reator em batelada a vazão constante e, maior ainda, em relação ao reator em batelada.

Figura 69. Comparação da concentração celular obtida em diferentes formas de condução dos ensaios.

Nesta pesquisa, obteve-se no regime de batelada alimentada com vazão exponencial a maior concentração celular: 25,6 g/L. Riesenber et al. (1991) mostraram que, com correta adição de nutrientes e fornecimento adequado de oxigênio, é possível sair de 12 g/L com $\mu_{max} = 0,45 \text{ h}^{-1}$ em regime descontínuo e se chegar a 110 g/L de bactérias, com $\mu = 0,11 \text{ h}^{-1} < \mu_{max}$ na batelada alimentada.

Rossi (2001), por exemplo, obtém valor máximo de 9,2 g/L de células, utilizando meio suplementado em regime de batelada alimentada com $Y_{X/S}$ variando entre 0,36 e 0,48, valores muito compatíveis com os obtidos nesta dissertação.

O metabolismo da cepa *E. coli* HB 2151 não é necessariamente comparável com as demais cepas, pois modificações em sua estrutura também alteram o metabolismo para formação de células e para obtenção de energia (ATP) oriundo dos consumos de glicose e oxigênio.

Lan et al. (2007) exploraram a produção de um fragmento do clone de *Escherichia coli* HB2151 e obteve, após uma fermentação, a concentração de 23,6 g/L de células, valor este muito próximo ao obtido neste trabalho.

Gomide (2001), ao cultivar *E. coli* HB 2151 em shaker, também comparou a expressão de sua proteína de interesse em função da temperatura, variando de 30 a 45 °C. A temperatura obtida cuja expressão foi máxima foi 42 °C. Pode-se sugerir de estudo para próximos trabalhos o estudo da função da temperatura no reator descontínuo e a consequente produção de proteína.

6. CONCLUSÕES

As conclusões desta dissertação são:

- a concentração de glicose nos meios empregados é melhor medida por métodos enzimáticos e o acetato é melhor mensurado por HPLC;
- o crescimento da *E. coli* HB 2151 em shaker nos meios utilizados é diáuxico, com consumo preferencial de glicose e secundário de acetato ou outros componentes do meio;
- o crescimento da *E. coli* HB 2151 em shaker é fortemente dependente da transferência de oxigênio;
- o crescimento da *E. coli* HB 2151 em reator é dependente da oferta de nutrientes adequados, da limitação de glicose e de uma concentração tóxica de acetato;
- a cepa *E. coli* HB 2151 tem melhor crescimento quando ao meio é adicionado tiamina e L-prolina, por conta da auxotrofia;
- a maior concentração celular obtida foi 25,6 g/L de células em regime de fed-batch, alimentado com glicose em vazão exponencial;
- o crescimento bacteriano aeróbio neste trabalho, nas condições realizadas, apresenta cerca de 40% de seu substrato convertido em células, durante a fase exponencial ($Y_{X/S} \cong 0,4$ g/g).

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para próximos trabalhos, destacam-se:

- aprimorar as técnicas de indução e purificação e associá-las ao regime de batelada alimentada para obtenção da proteína de interesse;
- estimar o melhor momento de adição de IPTG;
- obter a quantidade ótima de IPTG (sua falta ativa pouco o indutor e forma pouco produto, e seu excesso desvia o metabolismo e deixa as células frágeis);
- fazer experimentos com pulso de prolina no reator antes que a mesma seja toda consumida, evitando a auxotrofia e continuando na fase exponencial;
- acoplar algum instrumento que meça a concentração de glicose em tempo real ao ensaio, para que a adição de glicose durante a batelada supra exatamente a necessidade da *E. coli*, sem necessidade de inserir quantia excessiva de glicose (que geraria acetato, tóxico à célula).
- quantificar o anticorpo de interesse;
- repetir alguns experimentos quantificando o CO₂ na saída do reator e realizar um balanço de fluxo desse gás. Uma possível aplicação é a análise da taxa de respiração que, se cair, é indício que a concentração de prolina também caiu e, no caso, talvez seja interessante injetar um pulso desta substância.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Fapesp – A malária já não é uma doença negligenciada. <http://agencia.fapesp.br/a_malaria_ja_nao_e_uma_doenca_negligenciada/19241/>.

Acesso em 2 de fevereiro de 2016.

AKESSON, M., KARLSSON, E. N., HAGANDER, P., AXELSSON, J. P., TOCAJ, A. On-line detection of acetate formation in *Escherichia coli* cultures using dissolved oxygen responses to feed transients. **Biotechnology Bioengineering**. v. 64. p. 590 – 598. 1999.

ARBABI M., TANHA J., MACKENZIE R. Prokaryotic expression of antibodies. **Cancer Metastasis**. v. 24. p. 501–519. 2005.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A., Eds., **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**, 3rd Edition. Marcel Dekker. New York, p. 1 – 67. 2004

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 10. n. 5. p. 411 – 421. 1999.

BIETTELHEIM, F. A., BROWN W. H., CAMPBELL M. K., FARRELL S. O. **Introdução à Química Geral, Orgânica e Bioquímica**. Cengage Learning. p. 264–269.

BOGAERT, J. C. & NAIDU, A. S. Lactic acid. **Natural Food Antimicrobial Systems**. London. CRC Press. p. 613 – 636. 2000.

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. Ed. Edgard Blücher Ltda. v. 1, Fundamentos, ed. 1. São Paulo. 2001.

BROSIUS, J., DULL, J. J., SLEATER, D. D., NOLLER, H. F. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**. n. 148. p. 107 – 127. 1981.

BÜCHS, J. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. **Biochemical Engineering**. v. 7. p. 91 – 98. 2001.

BUCKLAND, S. T., ANDERSON, D. R., BURNHAM, K. P., LAAKE, J. L. **Distance Sampling, estimating abundance of biological populations**. Chapman & Hall. ed. 1. 1993.

CAMPANI, G. Jr. **Reator Airlift Operado em Sobrepressão: Construção, Caracterização da Transferência de Oxigênio e Aplicação em Cultivos de *Escherichia coli* Recombinante**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2014.

CAMPANI, G., SILVA, G., BONOMO, J., ANDRADE, V., JESUS, M., BORGES, C., HORTA, A., GIORDANO, R., BADINI, A., ZANGIROLAMI, T. Cultivo de *Escherichia coli* recombinante em biorreator airlift pressurizado. **Anal XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Processos Biotecnológicos. 2014.

CARUSO, C. **Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes de *Xylella fastidiosa***. 187 f. Tese (Doutorado em Ciências, Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos. 2007.

CAPRONI, P. **Ação da Bothropstoxina-1 do veneno total de *Bothrops jararacussu* irradiados sobre o sistema imune**. 60 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**. v. 30. n. 5. p. 1102 – 1107. 2012.

COLLINS, M. D., RODRIGUES, U., ASH, C., AGUIRRE, M., FARROW, J. A. E., MARTINEZ-MURCIA, A., PHILLIPS, B. A., WILLIAMS, A. M., WALLBANKS, S. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**. n. 77. p. 5 – 12. 1991.

CONTIERO, J., BEATTY, C. M., KUMARI, S., DE SANTI, C. L., STROHL, W. R., WOLFE, A. J. Effects of mutations in acetate metabolism on high-cell-density growth of *Escherichia coli*. **Microbiol. Biotechnol.** v. 24. p. 421 – 430. 2000.

CUNHA, E.M.; MARTINS, O.A.; Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência (REEC)** – ISSN 2237-3462 - Volume 02 – Número 02 – 2012. Disponível em <http://www.fira.edu.br/revista/reec_vol2_num2_pag21.pdf> Acesso em 20 de outubro de 2015.

DILLON, J. R., NASIM, A., NESTMANN, E. R. **Recombinant DNA Methodology**. Wiley. 1 ed. 1985.

EWERT S., CAMBILLAU C., CONRATH K., PLÜCKTUN, A. Biophysical properties of camelid VHH domains compared to those of human VH3 domains. **Biochemistry**. 2002. 41 (11). p. 3628 – 3636.

ESCALLÓN, A. M. V. **Estudo da expressão de lipase BTL2 de *Bacillus thermocatenuatus* em *E. coli* recombinante**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2009.

FERNANDES, C. A. H. *et al.* Structural bases for a complete myotoxic mechanism: crystal structures of two non-catalytic phospholipases A2-like from *Bothrops* brazilian venom. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1834, n. 12, p. 2772-2781. 2013.

FREDERICK, C., NEIDHARDT, R., VANBOGELEN, A. Positive Regulatory Gene For Temperature-Controlled Proteins in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 100. n. 2. p. 894 – 900. 1981.

FRENKEN, L. G. J., LINDEN, R. H. J., HERMANS, P. W. J. J., BOS, J. W., RUULS, R. C., GEUS, B., VERRIPS, T. Isolation of antigen specific Llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**. v. 68. n. 1. 2000.

GOMBERT, A. **Produção de Troponina C em *Escherichia coli*: estudo da indução por lactose e obtenção de alta concentração celular**. 137 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo. 1996.

GREENBERG, S., AVILA D., HUGHES M., HUGHES A., MCKINNEY E., FLAJNIK M. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. **Nature**. v. 374. p. 168–173. 1995.

GOMIDE, F. I. C. Otimização da Expressão Periplasmática do Gene do hGH em *Escherichia coli* utilizando o promor λP_L . 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN. 63 f. 2001.

HARMSSEN, M. M., SOLT, C. B., HOOGENDOORN, A., ZIJDERVELD, F. G., NIEWOLD, T. A., MEULEN, J. *Escherichia coli* F4 fimbriae specific llama single-domain antibody fragments effectively inhibit bacterial adhesion in vitro but poorly protect against diarrhea. **Veterinary Microbiology**. v. 111. n. 1 – 2. P. 89 – 98. 2005.

HARMSSEN, M. M., HAARD H. J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. **Microbiology Biotechnol.** v. 77. p. 13–22. 2007.

HAN, K. LIM, H. HONG, J. Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 39. n. 615. p. 663-671. 1992.

HEWITT, C. J. Studies related to the scale - up of high - cell - density *E. coli* fed - batch fermentations using multiparameter flow cytometry: Effect of a changing

microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 70. n. 4. p. 381. 2000.

HOFVENDAHL, K. & HÄGERDAL, H. B. L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. **Enzyme and Microbial Technology**. n. 20. p. 301 – 307.

HOLLIGER P., HUDSON, P., Engineered antibody fragments and the o frise of single domains. **Nature Biotechnology**. v. 23. p. 1126–1136. 2005.

JENSEN, E. B., CARLSEN, S., Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursor and physiological effects of glucose, acetate, and salts. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 36. n. 1. p. 1 – 11. 1990.

KLEMAN, G., STROHL, W. Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell-density fermentation. **Appl. Environment Microbiology**. v.60. p. 3952 – 3958. 1994.

KLOOSTER, R., MAASSEN, B. T. H., STAM, J. C., HERMANS, P. W., HAAFT M. R., DETMERS, F. J. K., HAARD, H. J., POST, J. A., VERRIPS, C. T. Improved anti-IgG and HAS affinity ligands: Clinical application of VHH antibody technology. **Journal of Immunological Methods**. v. 324. n. 1 – 2. p. 1 – 12. 2007.

KONTERMANN, R., DÜBEL, S. **Antibody Engineering**. Ed. Springer. 2^a ed. v. 1. p. 275. 2010.

KONSTANTINOV, K., KISHIMOTO, M., SEKI, T., YOSHIDA, T. A balanced DO-stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 36. p. 750 – 758. 1990.

KORZ, D. Rinas, U. HELLMUTH, K. SANDERS, E. DECKWER W. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**. v. 39. N. 1. Págs. 59–65. 1995. v. 17. n. 13. p. 3505 – 3795.

LAN, J., LING, T., HAMILTON, G., LYDDIATT, A. Production of an anti-MUC1 C595 dbFv antibody fragment in recombinant *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**. v. 42. N. 1. 2007. p. 77 – 82.

LAUWEREYS, M., GHAHROUDI, M. A., DESMYTER, A., KINNE, J., HÖLZER, W., GENST, E., WYNS, L., MUYLDERMANS, S. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. **The EMBO Journal**.

LAZAR, M. A., BIRNBAUM, M. J. *De-Meaning of Metabolism*. **Science**. v. 336. p. 1651 – 1652. 2012.

LEE, S. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**. v. 14. n. 3. p. 98–105. 1996.

LOSEN, M. FRÖLICH, B., POHL, M. BÜCHS, J. Effect of Oxygen Limitation and Medium Composition on *Escherichia coli* Fermentation in Shake-Flask Cultures. **Biotechnology Progress**. v. 20. n. 4. p. 1062 – 1068. 2004.

LULI, G., STROHL, W. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. **Appl. Environmental Microbiology**. v. 56. p. 1004 – 1011. 1990.

MAASS, D. R., SEPULVEDA, J., PERNTHANER, A., SHOEMAKER, C. B. Alpaca (*Lama pacos*) as a conveniente source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). **Journal of Immunological Methods**. v. 324. n. 1 – 2. p. 13 – 25.

MACNAB, R. M. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Celullar and Molecular Biology. Neidhardt, F.C., ed. **American Society of Microbiology**. v. 1. p. 732 – 759.

MADIGAN, M. T. **Microbiologia de Brock**. 6ª edição. p. 176–204. 2006.

MARR, A. G., INGRAHAM, J. L. Effect of Temperature on the Composition of Fatty Acids in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v. 84. n. 6. 1962.

MASSÉ, E. & GOTTERMAN, S. A Small Regulates the Expression of Genes Involved in Iron Metabolism in *Escherichia coli*. A. **PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)**. v. 99. n. 7. 2002.

MESGARI-SHADI, A., SARRAFZADEH, M. H. Osmotic conditions promote scFv antibody production in the *Escherichia coli* HB2151. **Bioimpacts**. 7(3). p. 199 – 206. 2017.

MITCHELL A. L., BIRNBAUM, M. J. De-Meaning of Metabolism. **Science**. v. 336. n. 6089. p. 1651 – 1652. 2012.

MONOD, J. The Growth of Bacterial Culture. **Annual Review of Microbiology**. v. 3. P. 371 – 394. 1949.

MORAIS, M. S. S., PEREIRA, S. S.; STÁBELI, R. G.; FERNANDES, C. F. C. Engenharia de anticorpos na busca por fragmentos funcionais para insumos de diagnósticos e aplicações terapêuticas. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**. v. 35 n. 4 p. 633-642. 2014.

MUYLDERMANS, S., Single domain camel antibodies: current status. **Journal of Biotechnology**. v. 74. p. 277-302. 2001.

OMS. **Trabalhando para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas**. Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas. Organização Mundial da Saúde. 2010.

OVERTON, T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. **Drug Discovery Today**. v. 19. n. 5. p. 590 – 601. 2014.

PELCZAR Jr, M. J., KRIEG, N. R., CHAN, E. C. S. **Microbiologia. Conceitos e Aplicações**. Ed. Pearson. v. 1. 2ª ed. 1996.

PEREIRA, L. **Clonagem, Expressão, Purificação e Caracterização Estrutural da Proteína Ribossomal L10 Humana Recombinante**. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo. 2009.

PEREIRA, S. S. *et al.* Novel Camelid Antibody Fragments Targeting Recombinant Nucleoprotein of *Araucaria hantavirus*: A Prototype for an Early Diagnosis of Hantavirus Syndrome. **Plos One**. v. 9. n. 9. p. 11-14. 2014.

PINHO, F., PEREIRA, I. **Ofidismo**. Rev. Ass. Med. Brasil. v. 27. n. 1. p. 24-29. 2001.

PRADO, N. **Produção e Caracterização Parcial de Anticorpos do tipo VHH, Selecionados por Phase Display a partir de Lama Glama, ativos contra toxinas BthTX-I e BhTX-II purificadas do veneno de Bothrops jararacussu**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Departamento de Medicina da Universidade Federal de Rondônia em consórcio com a Fundação Oswaldo Cruz Rondônia, Rondônia. 2013.

RAHBARIZADEH, F., RASAEI, M. J., ALLEMEH. A. A. Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. **Molecular Immunology**. v. 43. n. 5. p. 426 – 435. 2006.

REIZER, J., PETERKOFISKY, A. **Sugar Transport and Metabolism in Gram-positive Bacteria**, Ellis Horwood Ltd., Chichester, United Kingdom. 1987.

RIBEIRO, L. A., JORGE, M. T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 30. n. 6. 1997.

RIESENBERG, D. SCHULZ, V. KNORRE, W. POHL, H. KORZ, D. SANDERS, E. ROB, A. DECKWER, W. High cell density of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. **Journal of Biotechnology**. v. 20. n. 1. p. 17 – 27. 1991.

ROCHA, V. **O uso de nanoanticorpos no design de vacinas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa. 2012.

ROSSI, M. **Desenvolvimento do processo de cultivo de *Escherichia coli* RR1**. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2001.

ROUBOS, J. STRATEN, G. BOXTEL, A. An evolutionary strategy for fed-batch bioreactor optimization; concepts and performance. **Journal of Biotechnology**. v. 62. n. 2. p. 173 – 187. 1999.

RUA M. L., ATOMI H., SCHMIDT-DANNERT C. High-level expression of the thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus* in *Escherichia coli*. **Microbiology Biotechnology**. v. 49. p. 405 – 410. 1998.

RUSSELL, J., DIEZ-GONZALEZ, F. The effects of fermentation acids on bacterial growth. **Adv. Microbiology Physiology**. v. 39. p. 205 – 234. 1998.

SARGENT, F., BOGSCH, E., STANLEY, N., WEXLER, M., ROBINSON, C., BERKS, B., PALMER, T. Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. **Embo Journal**. v. 17. p. 3640–3650. 1998.

SCHEIN, C. H. & NOTEBORN, M. H. M. Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia coli* is Favored by Lower Growth Temperatura. **Nature Biotechnology**. Bio/Tecnhnology 6. p. 291 – 294. 1988.

SCHULZE, K., LIPE, R. Relationship between substrate concentration, growth rate, and respiration rate of *Escherichia coli* in continuous culture. **Archives of Microbiology**. v. 48. n. 1. p. 1 – 20. 1964.

SEZONOV, G., JOSELEAU-PETIT, D., D'ARI, R. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. **Journal of Bacteriology**. v. 180. n. 23. 2007.

SHILOACH, J., FASS, R. Growing *E. coli* to high cell density – A historical perspective on method development. **Bitechnology Advances**. v. 23. n. 5. p. 345–357. 2005.

SHIMIZU, N., FUKUSONO, S., FUJIMORI, K., NISHIMURA, N., ODAWARA Y. Fed-batch cultures in recombinant *Escherichia coli* with inhibitory substance concentration monitoring. *J. ferm. Technol.* v. 66. p. 187 – 191. 1988.

SMALL, P. BLANKERNHORN, D., WELTY, D., ZINSER E., SLONCZWESKI, J. L. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *ropS* and growth pH. **Journal of Bacteriology**. v. 176. n. 6. 1994.

STEVENSON, G. B. **Biologia dos Fungos, Bactérias e Vírus**. Editora Polígono. p. 44-46. 1974.

STRYER, L. **Biochemistry**. New York. Freeman and Company. p. 881. 1998.

SUÁREZ, I. D. **Cultivo de *Escherichia coli* recombinante: Desenvolvimento de Estratégia para o Crescimento e Indução à Síntese de Troponina C**. 181 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo. 1997.

SUÁREZ, D., GOMBERT, A., REINACH, F., KILIKIAN, B. The effect of yeast extract in high cell density cultivations of recombinant *Escherichia coli*. **Programas e resumos da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. São Paulo, Sbbq, 1995.

TALAAT, E. S., MARR, A. G. Effect of Nutrient Concentration on the Growth of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v. 107. n. 1. 1971.

THIEL, M. A., COSTER, D. J., MAVRANGELOS, C., ZOLA, H., WILLIAMS, K. An economical 20 litre bench-top fermenter. **Protein Expression and Purification**. V. 26. n. 1. 2002. p. 14 – 18.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiology: Pearson New International Edition: An Introduction**. Paperback. Library. 11 ed. 2013.

WARD, O. P. **Fermentation Biotechnology**. Prentice Hall. 2^a ed. 1991.

XUEFENG, L., VORA H., KHOSLA, C. Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: Implications for biodiesel production. **Metabolic Engineering**. v. 10. n. 6. p. 333-339. 2008.

YEE, L. Blanch, H. **Nature Biotechnology**. v. 10. p. 1550–1556. 1992.

ZABLITH, M. **Vias de sinalização desencadeadas pela estimulação do adrenoceptor b em células secretoras da glândula secretora do veneno da serpente *Bothrops jararaca***. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ZAHA, A., FERREIRA, H. B., PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Celular Básica**. Ed. Artmed. 5^a ed. 2014.

ZHANG, J., KAO, E., WANG, G., BAIDOO, E., CHEN, M., KEASKING, J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* the biosynthesis of 2-pyrrolidone. **Metabolic Engineering Communications**. p. 1–7. 2016.

9. ANEXOS

ANEXO 1

Reportagens sobre atendimento à população brasileira após acidente ofídico

Disponível em: <<https://avozdacidade.com/demora-no-atendimento-as-vitimas-picadas-por-cobras-preocupa/>>

Disponível em: <<http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/jornal-do-almoco/videos/v/mulher-morre-por-demora-em-atendimento-apos-picada-de-cobra/4097851/>>

10. APÊNDICE

Neste apêndice são apresentadas informações complementares da biologia da cepa HB 2151.

A cepa de laboratório *E. coli* HB2151 tem genótipo descrito por: K12 *ara* Δ (lac-proAB) *thi* / F' *proA+B lacIq lacZ* Δ M15. Traduzindo o seu código, pode-se compreender que a cepa é híbrida da *E. coli* K12; “*ara*” indica que a cepa não consegue metabolizar o substrato arabinose, existe uma deleção dos genes da lactose até a prolina; “ Δ (lac-proAB)” mostra que há deleção dos genes de uso da lactose até prolina; “*thi*” mostra necessidade de tiamina; “F’ ” indica ausência de plasmídeo do tipo F; “*proA+B lacIq lacZ* Δ M15” mostra um plasmídeo com superprodução de proteína de lac repressor e que possui o stop códon âmbar. (Kontermann e Dübel, 2010).

Esta cepa é híbrida da K12 (de genótipo F'proA+B+ lacIq Δ (lacZ)M15 zzzf Tn10(TetR) fhuA2 glnV Δ (lac-proAB) thi-1 Δ (hsdS-mcrB)5) e da HB101 (de genótipo F- mcrB mrr hsdS20(r_h⁻ m_h⁻) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm^r) glnV44 λ). (Acessado em 13/02/2017, no endereço eletrônico <https://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes>).