PAOLA RIZZO DE PAIVA

Estabelecimento de um meio quimicamente definido para desenvolvimento de *Haemophilus influenzae* tipo b e produção de polissacarídeo capsular

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

São Paulo
2016

PAOLA RIZZO DE PAIVA

Estabelecimento de um meio quimicamente definido para desenvolvimento de *Haemophilus influenzae* tipo b e produção de polissacarídeo capsular

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof. Dra. Mickie Takagi

São Paulo
2016

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

© reprodução total

Paiva, Paola Rizzo de.
Estabelecimento de um meio quimicamente definido para desenvolvimento de *Haemophilus influenzae* tipo b e produção de polissacarídeo capsular / Paola Rizzo de Paiva. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Mickie Takagi.

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

Versão do título para o inglês: Establishment of a chemically defined medium for development of *Haemophilus influenzae* type b and capsular polysacaride production

1. *Haemophilus influenzae b* 2. Meio quimicamente definido 3. PRP 4. Planejamento de plackett-burman 5. Planejamento experimental 6. Vacina I. Takagi, Prof. Dr. Mickie II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0114/2016

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

---

Candidato(a): Paola Rizzo de Paiva.

Título da Dissertação: Estabelecimento de um meio quimicamente definido para desenvolvimento de *Haemophilus influenzae* tipo b e produção de polissacarídeo capsular.

Orientador(a): Prof. Dr. Mickie Takagi.

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

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

INSTITUTO BUTANTAN

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 – e-mail: ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 10 de setembro de2013.

Ilmo Sr.

Dr. Marcelo L. Santoro

DD. Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan

Ref.: Solicitação de Certificado de Isenção

Venho por meio desta solicitar o Certificado de Isenção da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) para o projeto anexo. Para tanto, encaminho o detalhamento dos procedimentos experimentais que serão utilizados.

Informações sobre o projeto:

Título: Estabelecimento de meio quimicamente definido para desenvolvimento de *Haemophilusinfluenzae* tipo b e produção de polissacarídeo capsular

Responsável: Paola Rizzo de Paiva, Dra. Mickie Takagi

Interessados: Paola Rizzo de Paiva, Dra. Mickie Takagi

Instituições envolvidas: Instituto Butantan, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Vigência: agosto/2013 – agosto 2016

Atenciosamente,

De acordo:

Aluno: _____
Paola Rizzo de Paiva

Orientador: _____
Dra. Mickie Takagi

Mickie Takagi
Pq. Científica
RS 9569388/01
..BIOPROCESSOS-C.BIOTEC.-IBU

Comissão de Ética no Uso de Animais
do Instituto Butantan (CEUAIB)
Recebido em 10 / 09 / 13
Visto: _____

DEDICATÓRIA

Á minha família sempre dedicarei todas as conquistas
da minha vida, pelo amor, apoio, incentivo,
dedicação e pela minha vontade de
retribuir, pelo menos,
um pouco.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, como sempre, agradeço à minha família por me incentivar, me aconselhar e me apoiar em seguir meus planos e tudo que será bom para minha formação tanto profissional quanto pessoal. Mais especificamente para conseguir finalizar esse trabalho, só tenho que agradecer por toda paciência, pelas conversas, desabafos, ajuda, suporte e até orações (né, mãe??) que me trouxeram forças, vontade e coragem para concluir. Tenho certeza que sem vocês eu jamais teria conseguido.

Agradeço muito ao meu namorado Iraê que, com seu jeitinho todo bem-humorado de enxergar a vida, transformou muitas situações pesadas e estressantes em mais leves e positivas ao meu ver. Obrigada pela paciência, pelas conversas sobre futuro, pelo incentivo, pela companhia (que muitas vezes distante, se fez sempre presente), pelos dias ao meu lado escrevendo, por torcer pelos meus cultivos darem certo e por torcer por mim! Além de também ter sido peça fundamental para me dar forças para sempre continuar.

Aos meus amigos, que nem sempre perto fisicamente, me ajudaram de alguma forma, seja para me incentivar ou pra relaxar, e por respeitarem meus momentos alheia ao mundo. Meninas de casa Farofa e Leticia, por me ouvirem, me aguentarem nos momentos difíceis e deixarem, talvez sem saber, minha vida muito mais leve; Família Essakna, algumas mais pertinho outras nem tanto, mas sempre presentes no meu coração e na minha vida; Meninas do CQ mais lindo e Peludos do Segundão da Blau, que me acompanharam nessa etapa final e me ouviram e me incentivaram a seguir em frente. Obrigada!

E agora agradeço àqueles que estavam bem pertinho e que de fato fizeram tudo acontecer. Agradeço à Dona Ana por sempre ser tão materna, amiga e acolhedora, além de fazer de tudo e mais um pouco para nos ajudar; ao Seu Louri e Hélio por nos ajudarem no laboratório, nos ensinarem muito sobre tudo, cantarolarem e contarem piadas, deixando nossos dias mais alegres; ao Máximo por virar um amigo, por me contar tantas histórias, por me ajudar sempre quando precisei, principalmente, quando todo mundo já tinha ido embora e por me fazer companhia nos finais de cultivo; ao Kdu, pelos aprendizados, pelas ajudas com reagentes, soluções, POPs e pelas conversas, e à Cláudia, que chegou um pouco depois, mas já me cativou, me mostrou um lado diferente do Butantan, me ajudou muito e se tornou uma amiga.

Aos meus amigos “de bancada” que viraram amigos para vida toda. Bruno Derrota, já era amigo das antigas, participou um pouco do meu mestrado e sempre me animou com seus

assuntos peculiares e vontade de correr atrás; Anne, minha amiga de fofocas do Butantan, me levou para Blau, continuamos fofocando (rsrs) e me mostrou como era o mundo real; Rafa, amiga de cerveja, de conversas sobre o futuro, de dividir experiências, de vida; Douglas, com seu jeitinho muito diferente do meu, me mostrou e me ensinou muitas coisas novas, jogos, comidas e como ser muito gente boa; Camila, minha filha, amiga de todas a horas, do melhor bem-casado do mundo, que me mostrou como ser fofa e companheira nos mínimos detalhes; Thiara, a menina nova que chegou cativando a todos e cheia de vontade a aprender; Stefanie, coração, uma amiga que transborda sentimentos bons e me trouxe paz em muitos momentos; Fara, a cubana mais gente boa que eu conheci e a mais verdadeira impossível; Luciboy, fez uma passagem breve, mas deixou muitas lembranças boas e momentos engraçados; e Felipe, meu companheiro, amigo, confidente, de inteligência incontestável me ensinou muito! Sem ele, tudo teria sido muito diferente e muito menos feliz.

Agradeço aos pesquisadores Dr. Joaquin Cabrera-Crespo, Dra. Viviane Maimoni e Dra. Elizabeth Sbrogio por todos os ensinamentos e orientações que me serviram tanto para vida acadêmica quanto pessoal.

Á Dra. Mickie Takagi agradeço pela oportunidade e confiança de me orientar como mestranda. Obrigada pelos ensinamentos que me proporcionou e que vou levar por toda a minha vida. Também agradeço à Dra. Maria Isabel Rodrigues que disponibilizou seu tempo, muito me ensinou e me orientou na realização do planejamento estatístico apresentado neste trabalho.

Agradeço muito aos membros que fizeram parte da banca do meu exame de qualificação Dr. José Gregório Gomez, Dra. Elen Perpetuo e Dra. Adriana Lucarini que muito me ensinaram e orientaram com suas sugestões e críticas.

Muito obrigada a todos que participaram indiretamente deste trabalho, professores, funcionários do Instituto e Fundação Butantan, do Instituto de Ciências Biométidas e do Programa Interunidades em Biotecnologia.

Muito obrigada ao apoio financeiro do BNDES e da Fundação Butantan para que este trabalho fosse realizado.

EPÍGRAFE

“De uma vez por todas, não quero saber muitas coisas.
A sabedoria também traz consigo os limites do conhecimento.”

Friedrich Nietzsche

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

RESUMO

PAIVA, P. R. **Estabelecimento de um meio quimicamente definido para desenvolvimento de *Haemophilus influenzae* tipo b e produção de polissacarídeo capsular.** 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Haemophilus influenzae b (Hib) é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa, pleomórfica e agente causador de pneumonia, bacteremia e meningite em crianças menores de cinco anos de idade, idosos e imunodeprimidos. Antes da introdução da vacina conjugada contra Hib no Brasil, o contágio por esta bactéria constituía a causa mais frequente de meningite na infância, com alta incidência e grande impacto na mortalidade infantil. A cápsula polissacarídica de Hib (PRP) é considerada como principal fator de virulência e utilizado como antígeno vacinal. Hib é considerado um microrganismo fastidioso e requer micronutrientes para seu desenvolvimento e, por essa característica nutricional, geralmente, se faz uso de meios complexos em seus estudos. No entanto, meios quimicamente definidos permitem estudar com maior clareza o metabolismo do microrganismo, o papel e as necessidades nutricionais dos componentes para o crescimento e formação do produto de interesse além de tornar o processo mais consistente. Os meios definidos existentes para Hi foram descritos para estudos em desenvolvimento de competência deste microrganismo. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um meio quimicamente definido economicamente viável para crescimento e produção de PRP por Hib, por meio de planejamento experimental de Plackett-Burman (PB) e análise estatística, e análise de custo do meio de cultivo. Nos ensaios prévios foram selecionados os componentes necessários para compor o meio de partida, denominado como Meio 2.2, onde Hib atingiu uma DO_{540nm} de 2,14 UA e 252,16 mg/L de PRP em 10 horas de cultivo. Este meio foi utilizado no preparo do inóculo e como referência para estabelecer as variáveis independentes do PB de 44 ensaios e seus níveis de concentração estudados. No delineamento experimental foram obtidos valores máximos de DO_{540nm} de 5,0 UA, $\mu_{máx}$ 1,1 h^{-1} e 227,7 mg/L de PRP em 10h de cultivo. Através da análise estatística, juntamente com informações metabólicas de Hib, foi verificado que EDTA, NH_4Cl, Cyss e PVA podem ser removidos do meio sem impactar no crescimento e na produção de PRP, por não apresentarem efeitos estatisticamente significativos positivos. Também foi possível verificar que Glutamina, Hipoxantina, Inosina, Tiamina e Hemina apresentaram efeito significativo positivo para a produção de PRP indicando que o metabolismo de Hib esteja direcionado para essa finalidade. A presença de Tween 80 no meio de cultivo também mostrou ser estatisticamente positiva favorecendo a liberação de PRP pela célula. Através da análise de custo dos diferentes meios definidos apresentados, foi possível verificar que a composição do meio E44 mostrou ser o mais apropriado, considerando o custo/benefício para a produção de PRP no valor de US$ 16,50. Portanto, o meio E44 foi considerado o meio quimicamente definido estabelecido neste trabalho para cultivo de Hib.

Palavras-chave: *Haemophilus influenzae* tipo b. Meio quimicamente definido. PRP. Delineamento de Plackett-Burman. Planejamento experimental. Vacina.

ABSTRACT

PAIVA, P. R. **Establishment of a chemically defined medium for development of Haemophilus influenzae type b and capsular polysaccharide production.** 2016. 96 p. Master thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Haemophilus influenzae b (Hib) is a Gram-negative, facultative anaerobic and pleomorphic bacterium that causes pneumonia, bacteremia and meningitis in children under five years old, elderly and immunocompromised. Before the introduction of conjugated vaccine in Brazil, Hib spread was the most common cause of meningitis in children with high incidence and major impact on child mortality. The capsular polysaccharide of Hib (PRP) is considered as a major virulence factor and used as a vaccine antigen. Hib is considered a fastidious organism, requires micronutrients for its development and, due to its nutritional characteristics, generally is made use of complex media in its studies. However, chemically defined media allows to study more clearly the microorganism metabolism, the role and nutritional needs of components for growth, product of interest formation and, in addition, make the process more consistent. The existing defined media for Hi were described for studies in development of competence of this microorganism. The objective of this study was to establish a chemically defined medium economically viable for Hib´s growth and PRP production through experimental design of Plackett-Burman (PB) and statistical analysis, and media culture cost analysis. In preliminary tests, the components necessary to compose the starting medium have been selected, referred to Meio 2.2, in which Hib reached DO_{540nm} of 2.14 AU and 252,16 mg/L of PRP at 10 hours of cultivation. This medium was used for inoculum preparation and as a reference to establish the independent variables of the PB design of 44 trials and their levels of studied concentration. In the experiment, maximum values of DO_{540nm} 5.0 AU, $\mu_{máx}$ 1.1 h^{-1} and 227.7 mg/L of PRP at 10h of culture were obtained. Through statistical analysis, in addition to metabolic information of Hib, was found that EDTA, NH4Cl, Cyss and PVA may be removed without impacting growth and PRP production, and did not present a statistically significant positive effects. It was also observed that Glutamine, Hypoxanthine, Inosine, Thiamine, and Hemin had significant positive effect on the PRP production indicating that metabolism is directed to this goal. The presence of Tween 80 in the culture medium also showed statistically positive favoring PRP release by the cell. Through the cost analysis of different defined media presented, composition of the medium E44 proved to be the most appropriate, considering the cost/benefit to the PRP production of US $ 16.50. Therefore, the E44 medium was considered chemically defined medium determined in this work for Hib cultivation.

Keywords: *Haemophilus influenzae* tipo b. Chemically defined medium. PRP. Plackett-Burman design. Design of experiments. Vaccine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia de *Haemophilus influenzae* tipo b visualizada em microscopia eletrônica em meio com restrição de nutrientes (a) e em meio enriquecido (b).....21

Figura 2 - Esquema das vias metabólicas centrais de *Haemophilus influenzae* 10810 (sorotipo b).....25

Figura 3 - Estrutura química da molécula de PRP 27

Figura 4 - *Lócus cap:* (A) Regiões e funções; (B) Esquema de duplicação.....28

Figura 5 - Perfil de crescimento de Hib em Meio 1 e variações deste Meio.....44

Figura 6 - Metabolização de aminoácidos a intermediários centrais de Hi 10810 (sorotipo b)45

Figura 7 - Perfil cinético de crescimento de Hib em diferentes meios quimicamente definidos 46

Figura 8 - Comparação entre o perfil cinético de crescimento de Hib com diferentes fontes de carbono na composição do Meio 2 48

Figura 9 - Comparação entre os perfil cinético de crescimento de Hib em Meio 2 suplementado em 6 aminoácidos (a) e a ausência individual de cada um deles (b).....50

Figura 10 - Esquema da redução de duas moléculas de cisteína à cistina.....51

Figura 11 - Estrutura molecular do nucleosídeo inosina (esquerda) e sua base nitrogenada hipoxantina (direita) 51

Figura 12 - Comparação do perfil de crescimento de Hib em meio de cultivo com ausência de hipoxantina 52

Figura 13 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib com aumento da concentração de NAD e Hemina 54

Figura 14 - Comparação de perfis de crescimento de Hib em meios individualmente sem PVA, EDTA e Tween 80.....55

Figura 15 - Perfil cinético de crescimento de Hib dos ensaios do PB 44 (continua) 61

Figura 16 - Cinética dos ensaios (a) E34 e (b) E44 do PB 44 de crescimento (DO_{540nm}), produção de acetato e glicerol residual.....63

Figura 17 - Consumo de aminoácidos nos ensaios (a) E34 e (b) E44 do PB 44 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos meios testados 36

Tabela 2 - Comparação de parâmetros cinéticos $DO_{540\ nm}$, velocidade especifica máxima de crescimento e formação de polissacarídeo em diferentes meios testados 47

Tabela 3 - Composição do Meio 2.2 e concentrações de cada variável independente estudada no delineamento PB 44 realizado 57

Tabela 4 - Variáveis dependentes resultantes dos ensaios do delineamento PB 44 60

Tabela 5 – Análise estatística contendo os efeitos das variáveis independentes estudadas no PB 44 68

Tabela 6 - Planejamento experimental sequencial proposto 71

Tabela 7 - Avaliação do valor do grama de PRP produzido em 10h de cultivo nos meios de cultivo estudados que se destacaram em relação a maiores produções de PRP e menores custos de composição 73

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA: ácido α-aminolevulínico
Arg: Arginina
Asn: Asparagina
Asp: Ácido aspártico
Cys: Cistina
Cyss: Cisteína
DTP: difteria, tétano e pertussis
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
GAVI: *Global Alliance for Vaccine Innovation*
Glm: Glutamina
Glu: Ácido Glutâmico
Gly: Glicina
Hi: *Haemophilus influenzae*
Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b
Hidroxipro: Hidroxiprolina
His: Histidina
Ile: Isoleucina
KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
Leu: Leucina
Lys: Lisina
Met: Metionina
NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NES: Não Estatisticamente Significativo
OMS: Organização Mundial da Saúde
PB: Plackett-Burman
Phe: Fenilalanina
Pro: Prolina
PRP: poli-ribosil-ribitol-fosfato
PVA: álcool polivinículo
Ser: Serina
Thr: Treonina
Trp: Triptofano
Tyr: Tirosina
UA: Unidade de Absorbância
Val: Valina
$\mu_{máx}$: Velocidade específica máxima de crescimento

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 17
2. **OBJETIVOS** 19
2.1 **Objetivo geral** 19
2.2 **Objetivos específicos** 19
3 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** 20
3.1 ***Haemophilus influenzae*** 20
3.1.1 Taxonomia 20
3.1.2 Características 21
3.1.3 Requerimento Nutricional 21
3.1.4 Vias metabólicas 23
3.1.5 Doenças causadas por Hi 25
3.1.6 Polissacarídeo capsular 26
3.1.7 Epidemiologia 28
3.1.8 Vacinas contra Hib 29
3.1.9 Meio quimicamente definido 30
3.2 **Planejamento experimental** 32
4 **MATERIAL E MÉTODOS** 35
4.1 **Microrganismo** 35
4.2 **Meio quimicamente definido** 35
4.3 **Cultivos** 38
4.3.1 Inóculo 38
4.3.2 Ensaios 38
4.4 **Planejamento Experimental** 38
4.5 **Metodologia analítica** 39
4.5.1 Crescimento celular 39
4.5.2 Concentração de ácidos orgânicos e carboidratos 39
4.5.3 Concentração de polissacarídeo capsular 40
4.5.4 Concentração de aminoácidos 40
4.6 **Tratamento de dados** 41
4.6.1 Cálculo de $\mu_{máx}$ 41
4.6.2 Cálculo de fatores de conversão 41

4.6.3 Análise Estatística 42
5 **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 43
5.1 **Definição de meio de cultivo** 43
5.1.1 Ensaios prévios 43
5.1.2 Definição de componentes 46
5.1.2.1 Fonte de carbono 47
5.1.2.2 Aminoácidos 49
5.1.2.3 Base nitrogenada 51
5.1.2.4 Vitaminas 52
5.2.1.5 Fatores de crescimento 53
5.1.2.5 Fonte de nitrogênio inorgânico 54
5.1.2.7 Outros componentes 54
5.2 **Delineamento de Plackett-Burman** 56
5.2.1 Ácidos orgânicos e carboidratos 63
5.2.2 Análise de aminoácidos 65
5.2.3 Análise estatística 66
6 **ANÁLISE DE CUSTO** 72
7 **CONCLUSÕES** 74
REFERÊNCIAS 76
ANEXOS 82
A - Matriz Plackett-Burman de 44 ensaios e 3 pontos centrais 83
B - Perfis cinéticos de crescimento, produção de acetato e glicerol residual dos ensaios do PB 44 84
C - **Avaliação dos efeitos de cada variável independente estudada no PB 44** 92
D - Cotação dos reagentes que compõe o meio de cultivo estudado da marca Sigma-Aldrich 94
E - Custo para composição de 1L dos meios estudados e do polissacarídeo capsular produzido em cada meio 95

1 INTRODUÇÃO

Haemophilus influenzae é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa, pleomórfica e patogênica ao homem. As linhagens comensais de *Haemophilus influenzae* raramente apresentam cápsulas, ao contrário das linhagens invasivas que são capsuladas. As linhagens não-capsuladas, também denominadas acapsuladas ou não-tipáveis, podem causar otite média e infecções no trato respiratório. Enquanto as linhagens capsuladas ou tipáveis, diferenciadas em 6 sorotipos (a-f), estão relacionadas com infecções mais severas, sendo o sorotipo b (Hib) o principal agente causador de pneumonia, bacteremia e meningite em crianças menores de cinco anos de idade, idosos e imunodeprimidos. A cápsula polissacarídica do sorotipo b denominada de poliribosilribitolfosfato (PRP) aparece como principal fator de virulência e é utilizada, conjugada a uma proteína carreadora, como antígeno na vacina contra Hib (BREED; MURRAY; SMITH, 1957; LEE, 1987).

Antes da introdução da vacina conjugada no Brasil em 1999, o contágio por Hib constituía a causa mais frequente de meningite na infância, com alta incidência (aproximadamente 5% da população infantil) e grande impacto na mortalidade infantil, além de ocasionar sequelas no sistema nervoso dos infectados (PELTOLA, 2000).

Órgãos internacionais de saúde, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), vem incentivando a vacinação contra Hib em países subdesenvolvidos através da inclusão do componente contra essa bactéria em vacinas polivalentes, como a combinação com a vacinas tríplice de difteria, tétano e pertussis (DTP) e com a vacina de hepatite B (HepB). A vacina conjugada contra Hib é produzida pelas grandes indústrias farmacêuticas e, no Brasil, a vacina combinada tetravalente DTP-Hib é fornecida ao Ministério da Saúde pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Haemophilus influenzae é considerado um microrganismo fastidioso necessitando de micronutrientes presentes no meio de cultivo e, por essa característica nutricional, geralmente se faz uso de meios complexos em seus estudos. Particularmente, apresenta deficiência em seu sistema enzimático, tornando necessário o fornecimento de fatores de crescimento, como NAD e hemina, na composição do meio de cultivo para Hi (BREED; MURRAY; SMITH, 1957).

O meio de cultivo descrito na literatura para produção do polissacarídeo capsular de *H. influenzae* tipo b é composto por peptona de soja, um composto de origem vegetal, como

principal fonte de nitrogênio, e suplementado com extrato de levedura, glicose, hemina, NAD e sais inorgânicos (CARTY et al., 1985). Encontram-se relatados meios contendo compostos de origem animal, como o hidrolisado de caseína, reportado por Merritt et al., (2000). Embora ideal para o seu crescimento, meios complexos contendo componentes de origem animal são inadequados para a produção de vacina devido ao risco de desenvolvimento de doenças causadas por príons (JAYME; SMITH, 2000).

O uso de meios quimicamente definidos oferece vantagens em relação aos meios complexos como a reprodutibilidade do processo, já que os componentes presentes no meio possuem estruturas químicas conhecidas, além da composição ser quantitativa, permitindo uma atuação consistente das células bacterianas no meio de cultivo. Também torna viável o estudo das vias metabólicas das células e das necessidades nutricionais para crescimento e formação do produto de interesse. Além disso, Baltz, Davies e Demain (2010) relatam que o uso de meios quimicamente definidos também oferece vantagem para eventual aumento de escala, no processo de purificação e também na análise dos produtos.

Diferentes composições de meios definidos são reportados para *H. influenzae* para o estudo do desenvolvimento da competência do microrganismo (BUTLER, 1962; COLEMAN; DAINES, 2003; HERRIOTT; MEYER; VOGT, 1970; TALMADGE; HERRIOTT, 1960). Deixando em aberto, portanto, o estabelecimento de um meio que possibilite o estudo das vias metabólicas de Hib e suas necessidades nutricionais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o metabolismo de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), através do estabelecimento de meio quimicamente definido, a fim de melhorar o processo de produção de seu polissacarídeo capsular.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um meio quimicamente definido para Hib;
- Avaliar os componentes do meio quimicamente definido através de planejamento experimental e avaliação estatística;
- Analisar o custo de formulação do meio quimicamente definido para produção do polissacarídeo capsular.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Haemophilus influenzae*

3.1.1 Taxonomia

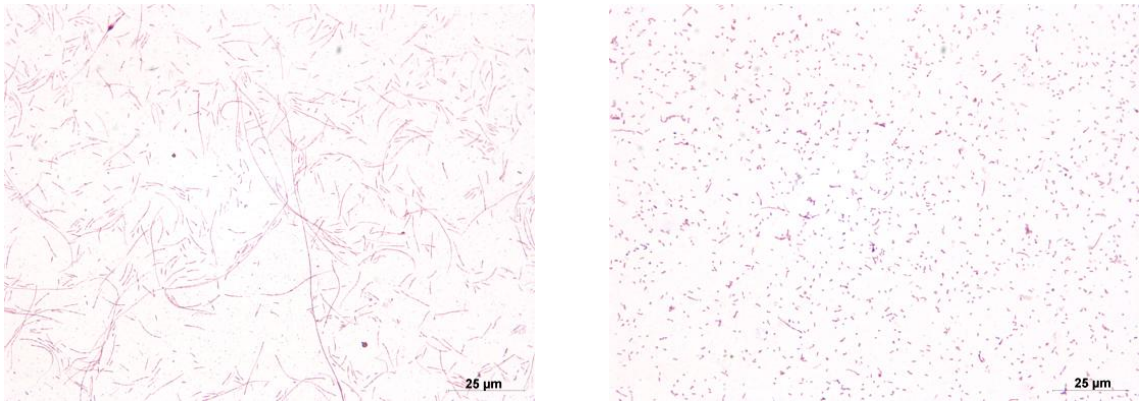
Haemophilus influenzae pertence à família *Pasteurellaceae*, que também engloba os gêneros *Pasteurella* e *Actinobacillus* (BREED; MURRAY; SMITH, 1957), cuja característica principal é a ausência das vias de biossíntese de NAD. Os membros dessa família necessitam obter esse nutriente essencial do ambiente diretamente na forma de NAD ou a partir de um limitado número de precursores (O´REILLY; NIVEN, 1986; NIVEN; O´REILLY, 1990). A necessidade desse nucleotídeo piridina tem sido historicamente importante na identificação e classificação dos membros da *Pasteurellaceae*, com espécies que necessitam de suplementação de NAD para crescimento *in vitro*, descritas como dependentes de fator V (KILIAN, 1976). Porém, entre as espécies descritas como dependentes de fator V, muitas exceções foram identificadas, incluindo algumas espécies do gênero *Haemophilus* como *H. paragallinarum*, *H. parainfluenzae* e *H. ducreyi*, cuja codificação de independência desse fator está presente em um plasmídeo (BRAGG; COETZEE; VERSCHOOR, 1993; WINDSOR; GROMKOVA; KOORNHOF, 1991, 1993). Breed, Murray e Smith (1957) definem o gênero *Haemophilus* como sendo compreendido por microrganismos anaeróbios facultativos que necessitam dos fatores de crescimento Hemina e/ou NAD. Além disso, também definem que os membros do gênero são quimio-organotróficos, possuindo tanto metabolismo respiratório quanto fermentativo.

Pittman (1931) definiu duas categorias de *H. influenzae*: não-capsulada (acapsular) e capsulada, e caracterizou sorologicamente este último grupo em seis sorotipos diferentes denominando-os de a-f, com base na precipitação de soro imune por substância capsular, ou seja, baseado nos diferentes componentes de carboidratos constituintes de cada sorotipo. Essa caracterização também denominou Hi como tipáveis, quando cepas encapsuladas eram reativas em soro, enquanto as não-tipáveis não eram reativas.

3.1.2 Características

Haemophilus influenzae são células bacterianas Gram-negativas, muito pequenas e imóveis, que lembram hastes de 0,2 a 0,3 µm por 0,5 a 2,0 µm, aparecendo sozinhas ou em pares, ocasionalmente em pequenas cadeias e na forma de longos filamentos (BREED; MURRAY; SMITH, 1957). Ou seja, sua morfologia reflete as condições ambientais em que está submetida, como pode ser visualizado na Figura 1.

O genoma de *Haemophilus influenzae* Rd KW20 foi o primeiro a ser completamente sequenciado (FLEISCHMANN; ADAMS; WHITE, 1995). Seu genoma possui apenas 1,83 Mb e possui menos de 1700 regiões codificadoras de proteínas preditas, sendo que aproximadamente 1450 (85%) foram atribuídas a uma função provisória baseada em comparações de sequências homólogas.



(a) (b)

Figura 1 - Morfologia de *Haemophilus influenzae* tipo b visualizada em microscopia eletrônica em meio com restrição de nutrientes (a) e em meio enriquecido (b)

3.1.3 Requerimento Nutricional

Haemophilus influenzae tipo b é uma bactéria fastidiosa e necessita, portanto, de fatores de crescimento específicos para se desenvolver, sendo NAD e a Hemina imprescindíveis, além de aminoácidos e vitaminas (BREED; MURRAY; SMITH, 1957; SCHILLING; PALSSON, 2000).

A primeira etapa da via de biossíntese de heme é a formação de ácido α-aminolevulínico (ALA) a partir de α-cetoglutarato ou de succinato e glicina em um ramo do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. A partir de duas moléculas de ALA, sete reações consecutivas

são responsáveis por gerar o grupo heme e o requerimento de hemina por Hib é justificado pela ausência de cinco das sete enzimas da via de biossíntese deste composto (KEGG, 2016). Devido à possibilidade de substituição de fornecimento de hemina por protoporfirina IX ao Hi, comprova-se a presença da última enzima da via, a ferroquelatase (protoheme ferrolyase, EC 4.99.1.1). Esta enzima forma heme a partir da catálise da inserção de Fe^{2+} no precursor imediato de heme, a protoporfirina IX (GRANICK; GILDER, 1946).

O requerimento de NAD, (nicotinamida adenina dinucleotídeo), NMN (nicotinamida mononucleotídeo) ou ribosídeo nicotinamida é essencial, como foi determinado por Evans (1974) e depois comprovado através da análise genômica de Hi (FLEISCHMANN; ADAMS; WHITE, 1995), por este microrganismo não possuir as enzimas necessárias a biossíntese de NAD e da maioria das vias do ciclo dos nucleotídeos piridina. Além disso, Hi é incapaz de produzir ATP *de novo* e esta característica impossibilita a produção de cofatores como NAD e coenzima A, que requerem a incorporação dos grupos adenil do ATP durante sua biossíntese. Mesmo quando há NAD e pantotenato extracelular, os cofatores não conseguem ser sintetizados devido à necessidade de ATP, agindo como um dreno no estoque de nucleotídeo adenina para os quais não há fornecimento devido à perda de capacidade biossintética. Se nutrientes que contém o grupo adenil forem fornecidos, permitindo a produção de ATP, então a produção desses cofatores poderá ser restaurada, caso contrário, a incorporação do grupo adenil do ATP desequilibraria o estoque do nucleotídeo adenina e violaria as restrições estequiométricas indiretamente alocadas nesse estoque (SCHILLING; PALSSON, 2000).

Análises *in silico* das vias metabólicas de *Haemophilus influenzae* Rd, relatadas por Schilling e Palsson (2000), determinaram os componentes mínimos necessários ao seu crescimento. Como fonte de carbono mais eficaz a frutose, que é possível substituí-la por aspartato, fumarato, malato, ribose, glicose, galactose, glicerol, glicerol-3-fosfato, xilose, ácido siálico e fucose, que muitos estão presentes dentro do meio nicho ambiental ocupado pela bactéria no hospedeiro; glutamato como principal fonte de nitrogênio; cisteína fornecendo o requerimento de enxofre; arginina, pantotenato, hemina, tiamina, uracila, putrescina, espermidina e fosfato.

3.1.4 Vias metabólicas

As vias metabólicas presentes no genoma de *H. influenzae* possibilitam uma versatilidade metabólica em relação às diferentes condições ambientais em que é exposto em seu habitat em relação à disponibilidade de oxigênio, podendo realizar respiração aeróbia e anaeróbia e fermentação (SCHILLING; PALSSON, 2000).

Como pode ser visto na Figura 2, Hib possui a via Embden-Meyerhof-Parnass, também chamada de glicólise, e via das Pentoses, para degradação da glicose completas, porém com deleções de algumas enzimas do ramo oxidativo do Ciclo de Krebs como a citrato sintase, a aconitase e a isocitrato desidrogenase (FLEISCHMANN; ADAMS; WHITE, 1995). Essa configuração metabólica é associada a bactérias fermentativas em que o Ciclo de Krebs é apenas direcionado para produção de precursores para biossíntese.

O piruvato, principal produto da degradação de hexose, pode ser convertido em outros componentes como acetato, lactato e formiato. Acetil-CoA pode ser produzida utilizando as enzimas piruvato desidrogenase ou piruvato formiato liase em condições aeróbicas e anaeróbicas, respectivamente. Além disso, o piruvato também pode ser reduzido a D-lactato pela NAD dependente lactato desidrogenase.

As enzimas do ciclo de Krebs presentes no metabolismo de Hi são somente a malato desidrogenase, fumarato desidrogenase, succinil CoA sintetase e α-cetoglutarato desidrogenase. Essas enzimas são importantes para geração de precursores de biossíntese e o restante do ciclo de Krebs também pode se ligar a cadeia de transporte de elétrons através da ação da fumarato redutase, para obtenção de esqueletos carbônicos (OTHMAN et al., 2014).

As características metabólicas de Hi permitem o uso de aminoácidos, ácidos graxos, lactato e glicerol como fonte de carbono e energia por conseguir desenvolver vias adequadas para utilização de tais substratos. Os aminoácidos podem ser desaminados e transformados em intermediários do Ciclo de Krebs, piruvato, acetoacetil-Coa ou acetil-CoA, conforme o aminoácido. Da mesma forma, ácidos graxos também dão origem a acetil-CoA. A partir de piruvato, a gliconeogênese pode ser acionada, que consiste na conversão desse composto a carboidratos, ou seja, caracterizando o inverso da via glicolítica. A maioria das reações dessa via são reversíveis, entretanto a reação catalisada pela piruvato quinase, que converte fosfoenolpiruvato a piruvato, e a fosfofrutoquinase 1, que converte frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bifosfato, são irreversíveis, mas conseguem ser transpostas. Em bactérias, piruvato pode ser convertido diretamente em fosfoenolpiruvato, além de poder ser formado a partir de oxaloacetato.

Othman et al., (2014) estudaram o metabolismo central do carbono em duas cepas de *H. influenzae*: uma clinicamente isolada de pacientes com COPD (Hi2019) e a cepa de referência Rd KW20 (HiRd). Os autores relataram que, mesmo o ciclo de Krebs incompleto ser característico de bactérias fermentadoras, *H. influenzae* possui uma cadeia de transporte de elétrons versátil com 5 desidrogenases (incluindo NADH, lactato e formiato desidrogenase) transferindo elétrons para menaquinona e 5 redutases terminais transferindo elétrons para uma variedade de aceptores incluindo oxigênio, dimetilsulfoxido (DMSO) e outros componentes, assim como foi verificado no sorotipo b, como pode ser visto na Figura 2. Os componentes da cadeia respiratória são quase completamente conservados, exceto a formiato desidrogenase e a lactato desidrogenase. Essa característica permite a bactéria utilizar essa cadeia de transporte de elétrons versátil para facilmente reoxidar o NADH produzido pela oxidação parcial da fonte de carbono em diferentes condições ambientais. Esses autores também relatam que *H. influenzae* apresenta um tipo de metabolismo especializado, onde a cadeia respiratória serve para suavizar o desequilíbrio redox causado pela oxidação incompleta da glicose e, ao mesmo tempo, fornece meios para converter uma variedade de componentes incluindo nitrito e nitrato que fazem parte do mecanismo de defesa do hospedeiro (OTHMAN et al., 2014).

Conforme os dados obtidos no banco de dados do KEGG, representado na Figura 2, pode-se perceber que a ausência dos três passos iniciais do Ciclo de Krebs resulta no fato de que as estruturas carbônicas provenientes da glicólise nunca chegarem a entrar no ramo oxidativo do ciclo, podendo resultar no acúmulo de moléculas de oxidação incompleta tais como o acetato, lactato e formiato.

O acetato é o metabólito majoritário durante crescimento aeróbico, indicando que a rota dominante do catabolismo do piruvato é a geração de acetil-CoA e posterior conversão a acetato via acetil-fosfato, produzindo 1 ATP. Entretanto, em condições microaerofílicas, ou seja, com baixa disponibilidade de oxigênio, a produção de formiato supera a de acetato. Isso representa uma mudança no metabolismo de piruvato e da atividade da enzima piruvato desidrogenase para um aumento de fluxo através da piruvato formiato liase que, durante crescimento anaeróbico, leva a acumulação de formiato como metabólito majoritário. Essa mudança na quantidade de metabólitos produzida é consequência da habilidade da bactéria em manter a homeostase redox na ausência de aceptores de elétrons externos alternativos quando o oxigênio torna-se limitante (OTHMAN et al., 2014b).

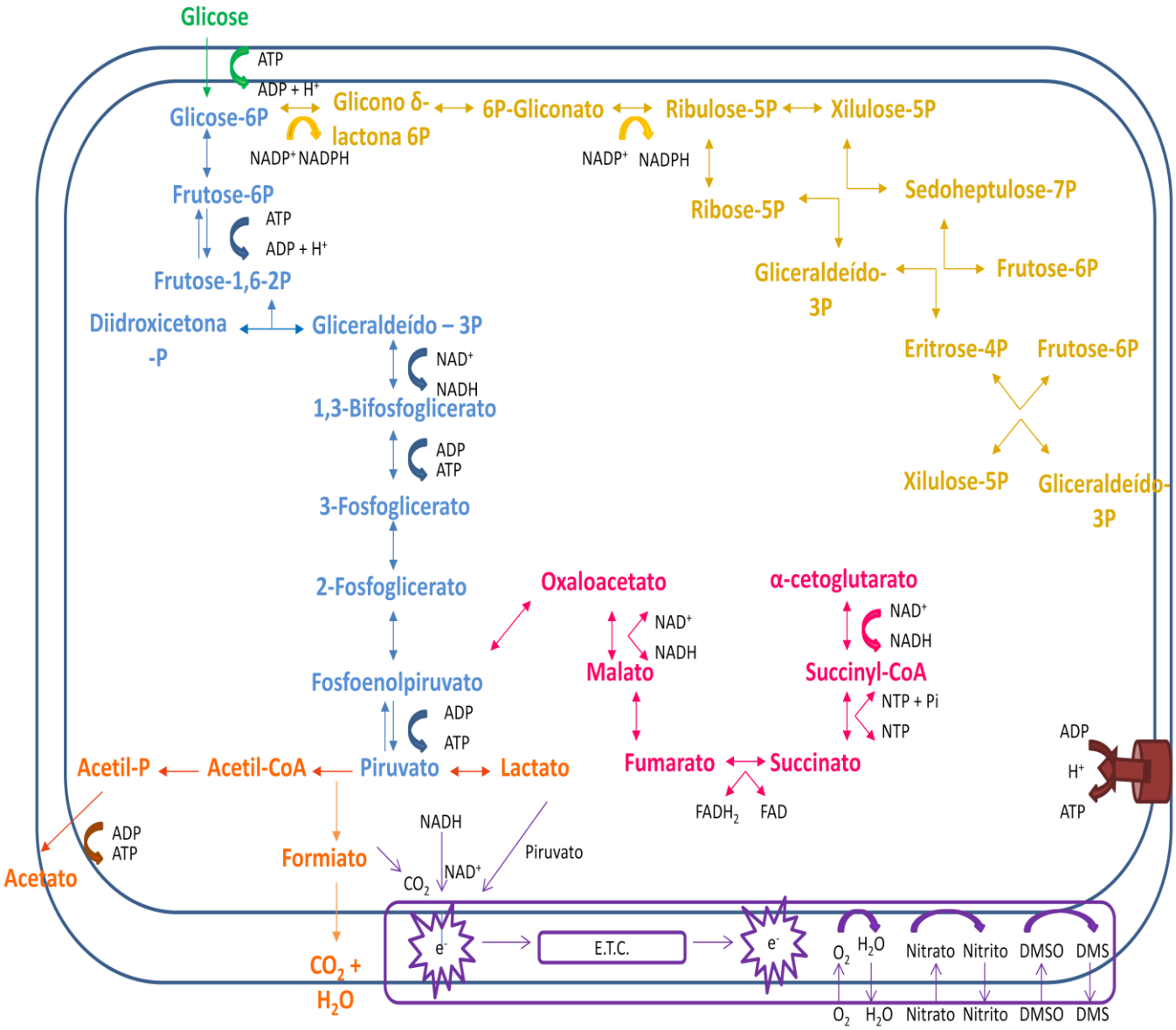


Figura 2 - Esquema das vias metabólicas centrais de *Haemophilus influenzae* 10810 (sorotipo b)
FONTE: Interpretação de fonte literária (KEGG, 2016)

3.1.5 Doenças causadas por Hi

Haemophilus influenzae é uma bactéria patogênica específica do ser humano que coloniza, principalmente, o trato respiratório e é adquirida como comensal nos primeiros meses de vida (BREED; MURRAY; SMITH, 1957). Ao completar 10 meses de idade, 50% das crianças carregam Hi em sua nasofaringe; aos 24 meses de vida, 80% vai abrigar Hi em algum momento. Nos primeiros 5 anos de vida, a taxa de predominância de indivíduos infectados é de 26%, sendo que 75% são por sorotipos não-capsulados (TURK, 1984).

Doenças causadas por Hi não-capsuladas são predominantemente por propagação contígua da nasofaringe para estruturas adjacentes, como sinuses, ouvido médio e traqueia, causando infecção de ouvido, sinusite e infecções respiratórias (NORDEN, 1982).

Segundo Peltola (2000), 90% das infecções invasivas causadas por *H. influenzae* tipo b manifestam-se como meningite, pneumonia bacteriana, epiglotite, septicemia, celulite e infecções osteocarticulares (mais frequente artrite septica do que osteomelite) em crianças até 5 anos de idade. Além disso, meningite representa 52% do espectro total de doenças causadas por Hib. A transmissão é feita através de gotículas de indivíduos infectados (não necessariamente sintomáticos) a susceptíveis. Hib também causa infecções inflamatórias potencialmente graves da face, boca, sangue, epiglote, articulações, coração, ossos, peritônio, e traqueia.

Para invadir o hospedeiro, Hi apresenta fatores de virulência, que podem ser estruturas, produtos ou estratégias que contribuem para os microrganismos consigam se instalar. Dentre eles estão as proteínas de membrana externa, proteínas de adesão, proteases, bacteriocinas, lipopolissacarídeo e o polissacarídeo capsular (KONEMAN et al., 1997).

3.1.6 Polissacarídeo capsular

O polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b foi caracterizado em 1953 como um polímero de D-ribose-fosfato, unido por ligações fosfodiéster entre as riboses e glicosídicas entre as cadeias, chamado de poliribofosfato (ZAMENHOF et al., 1953). Estudos posteriores identificaram ribitol como um constituinte adicional e propuseram sua estrutura baseada em quantidade equimolares de ribose, ribitol e fosfato (CRISEL; BAKER; DORMAN, 1975).

Evidências decorrentes de muitas décadas de pesquisa clínica e experimental de *Haemophilus influenzae* tipo b possibilitaram a identificação do polissacarídeo capsular como pode ser visualizado na Figura 3, poli-ribosil-ribitol-fosfato (PRP), como um fator de virulência crítico em infecções sistêmicas, e tem demonstrado que imunização passiva com anticorpos a esse antígeno é efetiva na prevenção e tratamento dessas infecções (ALEXANDER, 1965). Além disso, pesquisas soroepidemiológicas têm mostrado que a resposta imune humana a infecções clínicas e a carregamento assintomático do organismo geralmente inclui o desenvolvimento de anticorpos ao componente PRP (TURK; GREEN, 1964).

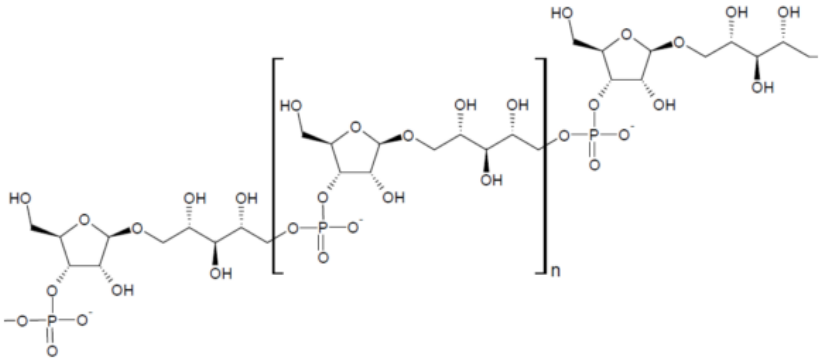


Figura 3 - Estrutura química da molécula de PRP
FONTE: Adaptado de Crisel et al., (1975)

A síntese da cápsula polissacarídica de *H. influenzae* é determinada pela presença de um cassete específico denominado *locus cap* que, entre todos os sorotipos, pode ser dividido em três regiões. Como pode ser visto na Figura 4, na região I, estão presentes quatro genes, chamados de bexA, bexB, bexC e bexD, relacionados com o transporte do polissacarídeo através da membrana celular com gasto de ATP (KROLL; MOXON; RICHARD, 1988). A região II é especifica para cada sorotipo e contém os genes relativos à síntese do polissacarídeo capsular (ELDERE et al., 1995). A região III contém os genes hcsA e hcsB que, assim como na região I, atuam no transporte do polissacarídeo através da membrana externa (SUKUPOLVI-PETTY et al., 2006). No caso do sorotipo b, a região II contém os genes, bcs1, bcs2, bcs3 e bcs4. Entre eles, apenas o primeiro foi extensamente descrito e é responsável pela codificação de uma enzima bifuncional gerada pela união de duas proteínas da via das pentoses fosfato. Essa enzima atua na reação de redução da ribulose-5-fosfato a ribitol-5-fosfato e, em seguida, faz a transferência de um grupo citidilil para dar origem ao CDP-ribitol, que então segue para a biossíntese do polímero de PRP (PEREIRA; BROWN, 2004; ZOLLI et al., 2001). As próximas etapas, apesar de não serem elucidadas, envolvem a ligação alternada dos grupos ribose e ribitol (ELDERE et al., 1995). Assim, é possível que a formação do PRP ocorra a partir da Via das pentoses fosfato.

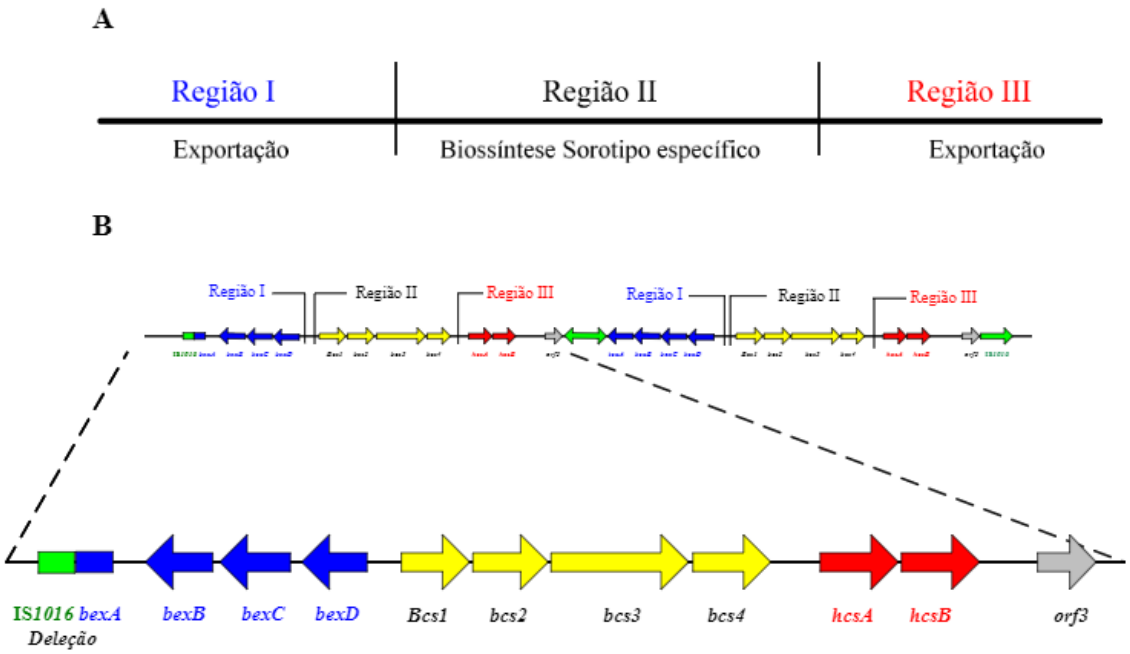


Figura 4 - *Lócus cap:* (A) Regiões e funções; (B) Esquema de duplicação
FONTE: Adaptado de Eldere et al., (1995)

3.1.7 Epidemiologia

Haemophilus influenzae tipo b é responsável por mais de 95% das doenças invasivas causadas por *H. influenzae*, estimado a causar no mínimo 3 milhões de casos de doenças graves no mundo todos os anos, assim como aproximadamente 386000 mortes (OMS, 2007).

Antes da introdução da vacina nos Estados Unidos em 1985, Hib era a causa mais comum de infecção bacteriana invasiva e meningite bacteriana em crianças sendo que, das infectadas, de 3 a 6% morriam e de 20 a 30% dos sobreviventes ficavam com sequelas permanentes, variando entre perda auditiva leve a retardo mental (BISGARD et al., 1998). No Brasil, antes da introdução da vacina, Hib era a segunda causa mais comum de meningite, sendo responsável por 1,7 mil casos por ano, com incidência média anual de 23,4 casos para cada 100 mil crianças menores de um ano. Com a introdução da vacina em 1999, o Brasil registrou uma redução de mais de 90% no número de casos, incidência e óbitos de meningite causada por Hib (PORTAL BRASIL, 2015).

Embora esse problema de saúde pública ocorra no mundo todo, as doenças causadas por Hib tiveram um peso consideravelmente maior em países com poucos recursos atribuído a diversos fatores como licenciamento e disponibilidade de vacinas, falta de dados sobre a doença, impacto da vacina, fornecimento inadequado, limitação devido ao custo da vacina e

falta de investimento político (HAJJEH et al., 2010). Por este motivo, a introdução da vacina de Hib nos países em desenvolvimento vem sendo encorajada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Global Alliance for Vaccine Innovation (GAVI), que a partir de 2005 colocaram em prática um programa denominado *Hib Initiative*, com duração de 4 anos em programas de disseminação de pesquisas e dados científicos sobre a bactéria e a doença a fim de conscientizar os governos e as instituições de saúde pública sobre a necessidade de prevenção desta enfermidade. Atualmente, esta iniciativa tem resultado na inclusão da vacina contra Hib nos países menos desenvolvidos (GLOBAL ALLIANCE FOR VACCINE INNOVATION, 2013).

3.1.8 Vacinas contra Hib

A primeira vacina contra Hib, disponível em 1985 na América do Norte, era composta de polissacarídeo capsular tipo b purificado. Entretanto, a vacina polissacarídica é limitada quanto à imunogenicidade e eficácia quanto a proteção em crianças devido à incapacidade de originar uma resposta imune T-dependente (BOOY et al., 1997). Assim, para aumentar a imunogenicidade da vacina, o polissacarídeo foi conjugado quimicamente a uma proteína.

A primeira vacina conjugada licenciada foi a de PRP ligado ao toxóide diftérico (PRP-D). Em pouco tempo surgiram conjugações com toxina diftérica mutante (PRP-CRM^{197}), com proteína de membrana externa de meningococo (PRP-OMP), e com toxóide tetânico (PRP-T). Todos os produtos conjugados tiveram o mesmo princípio de imunogenicidade que se baseava na combinação com uma proteína carreadora que transforma células T-independentes ao antígeno (PRP) em células T-dependentes, conferindo uma melhor antigenicidade (AVERY; GOEBEL, 1929). A conjugação do polissacarídeo a uma proteína carreadora foi um passo importante para promover respostas imunológicas em lactentes menores do que 2 anos, que é o grupo de risco principal do patógeno (BREUKELS et al., 1999). Além disso, segundo Wenger (1998) o uso de vacina também diminui as células bacterianas circulantes na população através da diminuição do carregamento de Hib na nasofaringe humana. Antes da utilização da vacina, a taxa de colonização de Hib em lactentes e crianças era de 3 a 5% e, após a vacinação generalizada em alguns países, essa taxa caiu para quase zero. A redução das bactérias circulantes na população resulta em um “efeito manada”, contribuindo para eficácia da vacinação.

O uso da vacina conjugada de Hib tem praticamente erradicado as doenças invasivas causadas por Hib, que diminuíram 99% nos países onde foram utilizadas em grande escala, alcançando menos de um caso por 100000 crianças menores do que 5 anos (WENGER, 1998).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a vacina contra Hib foi introduzida em 189 países até o ano de 2013. A cobertura global com três doses da vacina de Hib é estimada em 52%, mas há grande variação entre as regiões. Nas Américas, a cobertura é estimada em 90%, enquanto é somente de 18 e 27% nas regiões do Pacífico Oeste e Sudeste Asiático, respectivamente (OMS, 2015). Esses valores representam a dificuldade de introdução dessa vacina em países em desenvolvimento e a necessidade do programa *Hib iniciative*.

Atualmente, os programas públicos de vacinação não fornecem a vacina de Hib isoladamente, mas na forma combinada com a DTP (Difteria-Tetano-Pertussis), formando a tetravalente infantil. Além disso, pode ser incorporada a vacina de hepatite B (HepB) à tetravalente, formando a pentavalente, ou ainda com a introdução da vacina inativada de poliomielite à pentavalente, formando a hexavalente (OMS, 2015).

No Brasil, a vacina contra Hib é fornecida, desde 1999, pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), vinculada ao Ministério da Saúde. Desde 2001, este imunizante é associado à fração DTP, produzida pelo Instituto Butantan, e faz parte dos imunobiológicos disponíveis na rede pública brasileira (CVE, 2002). Além disso, a partir de 2012, o Ministério da Saúde também implantou no calendário público de vacinação a vacina pentavalente (DTP/HepB/Hib) adquirida da Novartis/Berna (MS,2012).

3.1.9 Meio quimicamente definido

Os meios de cultura descritos na literatura para produção de polissacarídeo capsular de *H. influenzae* tipo b são compostos por peptona de soja, um composto de origem vegetal, como principal fonte de nitrogênio e suplementado com extrato de levedura, glicose, hemina, NAD e sais inorgânicos (CARTY et al., 1985; MAITRE-WILMOTTE; SPECK; ROKBI, 2009; TAKAGI, 2006). Outros meios relatados utilizam composto de origem animal, como o hidrolisado de caseína, reportado por Merritt et al., (2000). Embora ideal para o seu

crescimento, meios complexos contendo componentes de origem animal não são recomendados para a produção de vacina devido ao risco de desenvolvimento de doenças causadas por príons (JAYME; SMITH, 2000).

Meios complexos contêm componentes como, por exemplo, hidrolisados proteicos de origem animal ou de vegetais, extrato de levedura, cuja composição qualitativa e quantitativa não é completamente conhecida nos diferentes lotes de produção. Para Hib, meios complexos apresentam produtividade superior quanto à biomassa e produção de polissacarídeo, enquanto meios sintéticos ou quimicamente definidos descritos na literatura, por sua vez, não geram alta densidade celular *Haemophilus influenzae* (BUTLER, 1962; COLEMAN; DAINES, 2003; HERRIOTT et al., 1970; MERRITT et al., 2000; TAKAGI et al., 2003, 2006; TALMADGE; HERRIOTT, 1960), entretanto suas características são vantajosas quando comparadas as dos meios complexos.

A reprodutibilidade é um grande benefício do meio definido, já que a composição é conhecida, o que permite uma atuação consistente do microrganismo no meio. Além disso, torna-se vantajoso para estudar as vias metabólicas das células e necessidades nutricionais para crescimento e formação de produto de interesse. Outro benefício é a formulação do meio definido poder ser melhorada com foco em rendimento ou atuação do microrganismo através do controle individual dos componentes, especialmente algum possível nutriente limitante. O uso da formulação de um meio quimicamente definido também oferece grande simplicidade para o aumento de escala, no processo de purificação e na análise de pureza dos produtos de interesse (BALTZ; DAVIES; DEMAIN, 2010).

Em última análise, meios definidos permitem maior consistência do processo, pois não estão sujeitos à variação de lote que os meios complexos oferecem e o controle de qualidade e monitoramento são facilitados, pois todos os componentes do meio de cultivo são conhecidos (BALTZ; DAVIES; DEMAIN, 2010).

Meios quimicamente definidos para *Haemophilus influenzae* Rd e *Haemophilus parainfluenzae* foram reportados na literatura para desenvolvimento da competência dessa bactéria, e para Hib, com foco em crescimento (BUTLER, 1962; COLEMAN; DAINES, 2003; HERRIOTT et al., 1970; TALMADGE; HERRIOTT, 1960). Estes meios têm em comum em suas composições a presença de arginina, ácido glutâmico, histidina, leucina, tirosina, NaCl, pantotenato de cálcio, tiamina, NAD e hemina. Entretanto, não se sabe a influência desses componentes na produção de polissacarídeo, já que este parâmetro não foi avaliado nos meios descritos.

No desenvolvimento de um bioprocesso em escala industrial, o estabelecimento do meio de cultivo é de expressiva importância porque sua composição pode afetar significativamente a concentração, rendimento e produtividade volumétrica do produto de interesse (KENNEDY; KROUSE, 1999). Além disso, a composição do meio também pode resultar na facilidade e custo no *downstream*, ou seja, na purificação do produto final. Por outro lado, existem muitos desafios associados à definição do meio de cultivo e, entre eles, destaca-se o fato de ser trabalhoso, custoso e demorado por envolver muitos experimentos para seu estabelecimento (KENNEDY; KROUSE, 1999).

3.2 Planejamento experimental

Muitos trabalhos encontrados na literatura sobre otimização de meios de cultivo iniciam os experimentos com uma composição de meio fixa e têm como objetivo obter a melhor combinação possível entre componentes determinados. Essa estratégia pode ser referida como "estratégia fechada" por, de fato, definir um número e tipo fixo de componentes utilizados nos experimentos de otimização. Essa é a situação mais simples, porém a desvantagem é a não avaliação de outros componentes que poderiam trazer benefícios ao meio. Essa estratégia considera um subconjunto extremamente limitado de possibilidade de delineamentos, assumindo que o pesquisador tenha escolhido os componentes corretos desde o início. A situação contrária, a "estratégia aberta", estuda qual a melhor combinação entre todos os componentes disponíveis. Dessa forma, essa estratégia é muito mais complexa de lidar, porque os delineamentos experimentais são dificultados. A vantagem da "estratégia aberta" é que não são criadas suposições de quais são os componentes mais adequados. O delineamento estratégico ideal seria começar com uma estratégia aberta, e então mudar para uma estratégia fechada quando os melhores componentes estiveram selecionados (KENNEDY; KROUSE, 1999).

Delineamentos experimentais estatísticos têm sido utilizados há muitas décadas e podem ser adotados em várias fases de uma estratégia de otimização, como para experimentos de seleção de variáveis ou para buscar uma condição ótima para uma resposta alvo (BOX; BEHNKEN, 1960).

A otimização das condições de cultivo, particularmente dos parâmetros químicos, são de grande importância no desenvolvimento de qualquer processo biotecnológico devido ao impacto na economia e execução do processo. A diversidade de interações combinatórias dos

componentes do meio com o metabolismo celular, assim como o grande número de constituintes do meio necessário ao metabolismo e produção celular não permitem modelos satisfatoriamente detalhados. A pesquisa unidimensional com variação sucessiva das variáveis ainda é utilizada, apesar de ser visto como praticamente impossível para uma pesquisa unidimensional efetuar um número ótimo finito e apropriado de experimentos (ABDEL-FATTAH et al., 2005). Métodos de avaliação de cada variável não são somente tediosos, como também podem levar a uma interpretação errônea dos resultados, especialmente devido à interação entre os diferentes fatores que é negligenciada (HE et al., 2004).

Uma forma de estudar várias variáveis ao mesmo tempo com menor número de ensaios é o planejamento experimental (KENNEDY; KROUSE, 1999). Esta ferramenta é fundamentada na teoria estatística e é utilizada para obter, por exemplo, a melhor composição de meio de cultivo para um determinado microrganismo. Esta metodologia estabelece correlações entre as variáveis independentes (fatores) e uma ou mais variáveis dependentes (respostas) de forma a observar efeitos sinérgicos ou antagônicos dos fatores sobre as respostas (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Recentemente, os resultados de experimentos analisados por um planejamento estatístico são mais reconhecidos do que aqueles realizados pelo tradicional uma-variável-por-vez (OVAT – *one-variable-at-a-time*). Quando se tem muitas variáveis envolvidas no estudo, como determinação das variáveis na composição de um meio de cultivo, os delineamentos de Plackett-Burman (PB) são os mais adequados como uma estratégia sequencial até a condição que leva ao objetivo desejado (PLACKETT; BURMAN, 1946; RODRIGUES; IEMMA, 2014).

No estabelecimento e otimização de meios de cultivo é muito comum serem listadas um grande número de variáveis a serem avaliadas. Até 8 variáveis independentes, o planejamento fatorial fracionado é uma excelente ferramenta. Entretanto, acima deste número, a utilização da metodologia desenvolvida por Plackett & Burman, se bem utilizada, é muito valiosa para uma seleção prévia das variáveis (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

O delineamento de Plackett-Burman possibilita um bom e rápido processo de seleção de variáveis e matematicamente computa a significância de grande número de fatores em um único experimento, o que economiza tempo e mantém informações confiáveis de cada componente. Abdel-Fattah et al., (2005) confirmaram que o delineamento de Plackett-Burman é uma ferramenta eficaz para elucidar as variáveis mais importantes que afetam a resposta estudada.

Plackett & Burman (1946) apresentam regras para a construção de matrizes de Hadamard de modo a utilizá-las na teoria e na prática da ciência estatística. Sua utilização possibilita e fortalece a elegância das provas algébricas e suas aplicações práticas em áreas como, por exemplo, a do planejamento de experimentos. As propriedades ótimas, inerentes às matrizes de Hadamard, dentre as quais, no contexto desse estudo, destacam-se a ortogonalidade, a precisão e a sensível diminuição no número de ensaios, enfatizam sua importância.

Rodrigues, Kalil e Maugeri (1998) discorrem sobre as vantagens existentes na utilização dos planejamentos de Plackett & Burman, mas argumentam que sua pequena utilização ao longo do tempo é devida, provavelmente, à dificuldade existente na derivatização teórica dos resultados por usuários que são, em sua maioria, não iniciados nos assuntos estatísticos. Além do conhecimento estatístico, esse método exige certo conhecimento de álgebra.

Segundo Rodrigues e Iemma (2014), é fundamental que se escolha um delineamento de PB com um número mínimo de 4 ensaios a mais do que o número de variáveis a serem estudadas no processo para deixar graus de liberdade para cálculo do erro padrão. Além disso, independentemente do delineamento PB escolhido é imprescindível a realização de, no mínimo, 3 repetições na condição do ponto central para estimação do erro puro, sendo possível avaliar a reprodutibilidade do processo. Do ponto de vista prático, essa prática possibilita verificar se o processo está sob controle já que não são feitas replicatas de todos os ensaios. Outra importância da realização do ponto central é que a definição dos níveis inferior (-1) e superior (+1) podem não ser as mais adequadas, checando se há curvatura na região central.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado nos experimentos foi *Haemophilus influenzae* tipo b cepa GB3291, adquirida do Núcleo de Coleção de Culturas do Instituto Adolf Lutz de São Paulo na forma liofilizada. A propagação das células bacterianas para o preparo do lote de trabalho foi realizado no Laboratório de Bioprocessos I conforme reportado por Takagi et al., (2003).

4.2 Meio quimicamente definido

Os meios utilizados para dar início aos experimentos foram baseados nos meios propostos por Coleman e Daines (2003), denominado Meio 1, e por Herriott et al., (1970), denominado Meio 2.

Para compor o Meio 1, utilizou-se o meio sintético RPMI 1640 com L-glutamina e 25 mM de HEPES (cat. no. 31800-022; Gibco), Piruvato de Sódio 0,87% (cat. no. 11360-070; Gibco) e os componentes NAD, Hemina, Uracila, Hipoxantina, Glicose e $NaHCO_3$ foram pesados e solubilizados individualmente. O meio foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm de poro.

Para compor o Meio 2, soluções-estoque de cada componente foram preparadas previamente, com exceção de NAD e Hemina que foram preparadas no momento do uso. As soluções de aminoácidos e vitaminas foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm de poro e estocadas em frascos âmbar em geladeira, com exceção das soluções de tiamina e ácido pantotênico que foram congeladas (HERRIOTT et al., 1970). As outras soluções foram esterilizadas por autoclavação e estocadas em geladeira.

Variações nas composições ou concentrações dos dois meios mencionados foram realizadas, conforme Tabela 1. As células destacadas em cinza são as modificações realizadas dos Meios de partida 1 e 2.

Para compor os meios de cultivo, alíquotas de cada solução foram adicionadas, exceto as de NAD e Hemina, o pH foi ajustado para 6,0 e, então, adicionou-se as soluções restantes e ajustou-se novamente o pH final para 7,0. Os meios foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm de poro.

Tabela 1 - Composição dos meios testados (continua)

Componentes	Concentração (mg/L)																				
	Meio 1	**Meio 1.1**	**Meio 1.2**	**Meio 1.3**	**Meio 1.4**	**Meio 2**	**Meio 2.1**	**Meio 2.2**	**Meio 2.3**	**Meio 2.4**	**Meio 2.5**	**Meio 2.6**	**Meio 2.7**	**Meio 2.8**	**Meio 2.9**	**Meio 2.10**	**Meio 2.11**	**Meio 2.12**	**Meio 2.13**	**Meio 2.14**	**Meio 2.15**
Cys	50	50	50	50	50	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Asn	50	50	50	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trp	5	5	5	5	5	-	-	5	5	5	5	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Pro	20	20	20	20	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Val	20	20	20	20	20	-	-	20	20	20	20	20	-	20	20	20	20	20	20	20	20
Thr	20	20	20	20	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asp	20	20	20	20	20	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Glu	20	20	1300	20	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300
Arg	200	200	200	200	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Gly	10	10	10	10	10	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Lys	40	40	40	40	40	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Met	15	15	15	15	15	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Ser	230	230	230	230	230	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
His	15	15	15	15	15	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Leu	50	50	50	50	50	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Tyr	28	28	28	28	28	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Hidroxipro	20	20	20	20	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	50	50	50	50	50	-	-	50	50	-	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Glm	300	300	300	300	300	-	-	300	-	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Phe	15	15	15	15	15	-	-	15	15	15	-	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Cyss	-	-	-	-	120	-	-	120	120	120	120	120	120	-	120	120	120	120	120	120	120
Glutationa	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	5000	5000	5000	5000	5000	-	5000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piruvato de Na^{+1}	8400	8400	8400	8400	8400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	5000	-	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000
Lactato de Na^{+1} 50%	-	-	-	-	-	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600
Tween 80	-	-	-	-	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	-	20	20
PVA	-	-	-	-	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	-
EDTA	-	-	-	-	-	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	4
Inosina	-	-	-	-	-	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Uracila	87	87	87	87	87	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Hipoxantina	88	-	88	88	88	20	20	20	20	20	20	20	20	20	-	20	20	20	20	20	20
Vitamina B12	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiamina.HCl	1	1	1	1	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Pantotenato de Ca^{+2}	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Biotina	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
Cloreto de colina	3	3	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-
Ácido fólico	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Inositol	35	35	35	35	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nicotinamida	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-

Tabela 2 - Composição dos meios testados (conclusão)

Ácido p-aminobenzóico	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Piridoxina.HCl	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Riboflavina	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
NaCl	6000	6000	6000	6000	6000	5800	5800	5800	5800	5800	5800	5800	5800	5800	5800	5800	5800	5800	5800	5800	5800
$Ca(NO_3)_4.H2O$	100	100	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCl	400	400	400	400	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$MgSO_4.7H_2O$	100	100	100	100	100	430	430	430	430	430	430	430	430	430	430	430	430	430	430	430	430
$NaHCO_3$	2000	2000	2000	2000	2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na_2HPO_4	800	800	800	800	800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K_2HPO_4	-	-	-	-	-	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500
KH_2PO_4	-	-	-	-	-	2700	2700	2700	2700	2700	2700	2700	2700	2700	2700	2700	2700	2700	2700	2700	2700
K_2SO_4	-	-	-	-	-	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
$MgCl_2.6H_2O$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$CaCl_2.2H_2O$	-	-	-	-	-	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
NH_4Cl	-	-	-	220	-	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	-	220	220	220
Vermelho de fenol	5	5	5	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NAD	15	15	15	15	15	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	15	4	4	4	4
Hemina	30	30	30	30	30	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	30	10	10	10	10

4.3 Cultivos

4.3.1 Inóculo

O pré-inóculo foi preparado transferindo 200 µL de suspensão bacteriana (1,0 x 10^9 UFC/mL) para um frasco erlenmeyer de 300 mL contendo 50 mL de meio de cultura estéril. Este foi incubado em jarra de anaerobiose a 37 ºC por 9 horas (Estufa BOD – *Biochemical Oxygen Dema*nd – TE 391 Tecnal). Um volume da suspensão bacteriana que resultasse em DO_{540nm} final de 0,05 UA foi transferido para frasco erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio e incubado em agitador rotativo (*Incubator shaker – Series 25 – New Brunswick Scientific*) a 37 ^{o}C, sob agitação de 250 RPM por aproximadamente 13 horas.

Durante os ensaios prévios foi utilizado, no preparo do inóculo, o Meio 2, enquanto que no delineamento de PB realizado, o meio utilizado para este fim foi o Meio 2.2, cujas composições estão apresentadas na Tabela 1.

4.3.2 Ensaios

Os ensaios foram realizados em agitador rotativo (*Incubator shaker – Series 25 – New Brunswick Scientific*) em 300 RPM a 37ºC, em erlenmeyers de 500 mL com 100 mL de meio e DO_{540nm} inicial de 0,1 UA.

As vidrarias utilizadas nos ensaios foram tratadas com Ácido Nítrico 50% aliquotando cerca de 100 mL do reagente em cada erlenmeyer e deixando em contato por 30 minutos para remover possíveis resíduos de detergente e que poderia provocar inibição no crescimento. Em seguida, cada vidraria foi lavada exaustivamente com água purificada para remover resíduos do ácido e autoclavadas para uso.

4.4 Planejamento Experimental

Os experimentos foram desenvolvidos utilizando o delineamento proposto por Plackett and Burman (1946) devido ao grande número de variáveis estudadas. A definição dos experimentos e a escolha das matrizes a serem utilizadas foram baseadas nos conceitos definidos por Rodrigues e Iemma (2014), que alegam ser fundamental que se escolha um

delineamento de PB com um número mínimo de 4 ensaios a mais do que o número de variáveis a serem estudadas no processo, a realização de, no mínimo, 3 repetições na condição do ponto central e a verificação da curvatura na região central.

A matriz utilizada foi de 44 ensaios, conforme Anexo A. As análises estatísticas foram feitas pelo *software* Statistica 10 (Statsoft) considerando um intervalo de confiança de 90% e p-valor < 0,1.

4.5 Metodologia analítica

4.5.1 Crescimento celular

Para acompanhar o crescimento celular, amostras foram coletadas a cada hora durante o cultivo para medida de Densidade Óptica em 540 nm utilizando Espectrofotômetro (U-1800 Hitachi). As amostras foram diluídas com solução de NaCl 150 mM para que a leitura no comprimento de ondas selecionado não ultrapassasse 0,5 UA e garantisse maior precisão dos resultados.

4.5.2 Concentração de ácidos orgânicos e carboidratos

As concentrações de acetato, lactato e de glicerol foram medidas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *high performance liquid chromatography*). Um volume de 10 μL do sobrenadante de amostra, coletada durante os cultivos, centrifugadas a 4 ºC e 10000 RPM previamente diluído em H_2SO_4 25mM e filtrado em 0,45μm foi injetado na coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H (Bio-Rad) montada no sistema cromatográfico Infinity 1260 (Agilent Technologies). Como fase móvel, foi utilizada solução aquosa de H_2SO_4 5 mM a um fluxo de 0,6 $mL.min^{-1}$ e a temperatura de 60 °C. A aquisição de dados foi feita numa frequência de 2 Hz num detector de absorbância UV-VIS a 210 nm, para ácidos, e num detector de índice de refração para carboidratos pelo software ChemStation (Agilent Technologies).

4.5.3 Concentração de polissacarídeo capsular

A concentração de PRP foi medida por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD – *high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometry detection*). A um volume de 540 µL do sobrenadante de amostra (diluído, se necessário, para concentração de 3 a 12 mg/L de PRP) coletada durante os cultivos, centrifugadas a 4 ºC e 10000 RPM, foram adicionados 180 µL de NaOH 400 mM. A mistura foi incubada a 37 °C por 20 h para a hidrólise alcalina do polímero de PRP até o monômero de ribosil-ribitol-fosfato, e neutralizada com 180 µL de ácido acético 400 mM. Foram adicionados ainda 100 µL de uma solução contendo ribose-5-fosfato a 200 µM e glicose-6-fosfato a 125 µM como padrão interno. Um volume de 10 µL dessa mistura foi injetado na coluna de troca aniônica CarboPac PA-10 acoplada à pré-coluna de retenção de aminoácidos AminoTrap, montadas no sistema cromatográfico ICS5000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). A metodologia de análise incluiu os gradientes de NaOH e acetato de sódio descritos por de Haan et al., (2013), além dos potenciais eletroquímicos definidos pelos mesmos autores para a leitura dos carboidratos no eletrodo de ouro. A curva de calibração foi construída utilizando-se o padrão internacional de PRP (MAWAS et al., 2005, 2007).

4.5.4 Concentração de aminoácidos

A concentração de aminoácidos foi medida por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD – *high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometry detection*). A um volume de 100 µL do sobrenadante de amostra diluído 10 vezes, coletado durante os cultivos e centrifugado a 4 ºC e 10000 RPM, foram adicionados 900 µL de solução de norleucina 4 nM, utilizada como padrão interno. Um volume de 10 µL dessa mistura foi injetado na coluna de troca aniônica AminoPac PA-10 acoplada à pré-coluna AminoPac PA-10, acopladas ao sistema cromatográfico ICS5000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) e detectadas no eletrodo de ouro *AAA-Certified Gold Electrode*. A metodologia de análise incluiu os gradientes de NaOH e acetato de sódio, além da oxidação dos aminoácidos no eletrodo de ouro gerada através de uma rápida sequência de potenciais eletroquímicos entre o eletrodo de ouro e o de referência (pH/Ag/AgCl). A *waveform* utilizada nas análises é a recomendada pelo fabricante para aminoácidos. A curva de calibração foi construída utilizando-se o padrão AAS-18 da Sigma-

Aldrich (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, S.P., Brasil) incorporado com Glutamina 2,5 nM e Triptofano 2,5 nM para possibilitar a análise de todos os aminoácidos que compõem o meio de cultivo estudado.

4.6 Tratamento de dados

4.6.1 Cálculo de $\mu_{máx}$

O cálculo da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) foi realizado a partir da análise da evolução dos valores de absorbância 540 nm em função do tempo de cultivo. A partir desses valores experimentais, foram traçadas as curvas exponenciais de ajuste utilizando o *software* Microsoft Excel 2010 durante a fase exponencial do cultivo. O valor obtido é baseado na equação abaixo, que leva em consideração o logaritmo neperiano da biomassa (X) em função do tempo (t) e medido em h^{-1}.

$$\mu_{máx} = ln\frac{1}{X}.\frac{dX}{dt} \quad (1)$$

4.6.2 Cálculo de fatores de conversão

Os fatores de conversão (Y) de substrato (S) em célula (X), substrato em produto (P) e célula em produto foram calculados levando em consideração as concentrações iniciais (i) e finais (f) do cultivo, segundo as equações 2, 3 e 4. Os valores de S são referentes ao glicerol (g/L), de P ao polissacarídeo capsular (mg/L) e X a biomassa expressa em DO_{540nm} (UA).

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (2)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (3)$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_f - P_i}{X_f - X_i} \quad (4)$$

4.6.3 Análise Estatística

A análise dos resultados obtidos nos ensaios realizados foi feita utilizando o *software* Statistica 10 (Statsoft). Foi escolhido o delineamento de Plackett-Burman como DOE utilizado, cuja significância estatística de cada efeito é determinada pelo teste t-Student e o p-valor determinado, num nível de significância de 0,10 e intervalo de confiança de 90%. A curvatura também foi considerada uma variável independente assim como a média, e os graus de liberdade, calculados com a subtração do número de ensaios realizados pelo número de variáveis independentes avaliadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composições de meios de cultivo relatados na literatura para cultivo de *Haemophilus influenzae* foram estudadas visando abordar, inicialmente, uma estratégia "aberta" para estabelecimento do meio com foco em crescimento e na produção de polissacarídeo capsular de Hib. Nesta etapa foram definidos os componentes que participaram da etapa seguinte, o delineamento de Plackett-Burman (PB), que deu início a uma estratégia "fechada" para otimização deste meio, onde os componentes e suas concentrações foram avaliados estatisticamente. A partir desses experimentos, os meios de cultivo que possibilitaram uma melhor resposta de Hib aos parâmetros medidos foram também estatisticamente avaliados para definir, então, o meio ideal para atingir os objetivos deste trabalho.

5.1 Definição de meio de cultivo

5.1.1 Ensaios prévios

Inicialmente, visando avaliar o desenvolvimento de Hib em meios quimicamente definidos, ensaios prévios foram realizados baseados nos meios descritos nos trabalhos de Herriott et al., (1970) e Coleman e Daines (2003).

O crescimento de Hib foi avaliado primeiramente utilizando como base o meio relatado por Coleman e Daines (2003), denominado Meio 1. Esta composição foi escolhida como meio de partida por conter um maior número de componentes, entre aminoácidos, vitaminas e sais, em relação aos outros meios encontrados na literatura para Hi, garantindo assim o aporte de nutrientes essenciais para o microrganismo estudado.

Algumas modificações foram realizadas na concentração dos componentes do meio proposto por Coleman e Daines (2003) baseadas na concentração de glicose e dos fatores de crescimento NAD e Hemina reportadas por Takagi et al., (2006) em meio complexo. Isso foi feito para garantir que não ocorresse inibição de crescimento por falta de fonte de carboidrato e por nutrientes conhecidos como essenciais ao Hib. Além disso, foram testadas quatro variações do Meio 1 visando avaliar a importância da presença de hipoxantina e cloreto de amônio no meio de cultivo e a concentração dos aminoácidos ácido glutâmico, cistina e arginina.

O crescimento de Hib em Meio 1 atingiu uma DO_{540nm} de 1,8 UA e $\mu_{máx}$ de 0,33 h^{-1}, como pode ser visualizado na Figura 5, mostrando que o meio testado possui todos os nutrientes essenciais para este microrganismo.

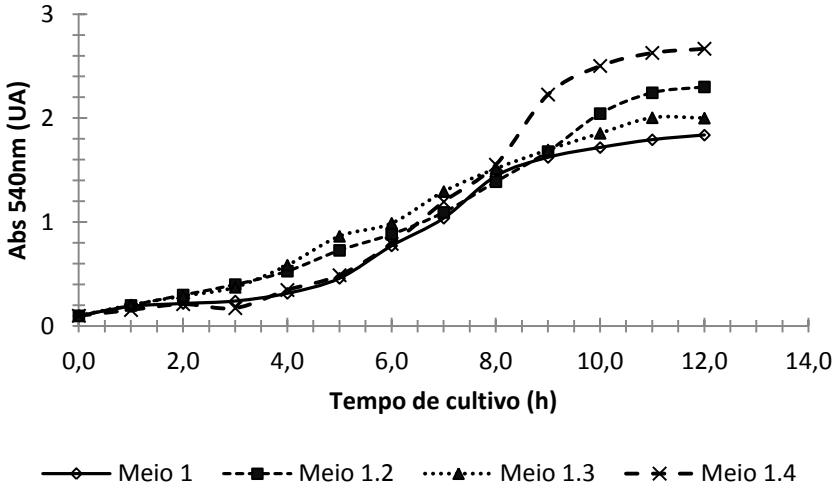


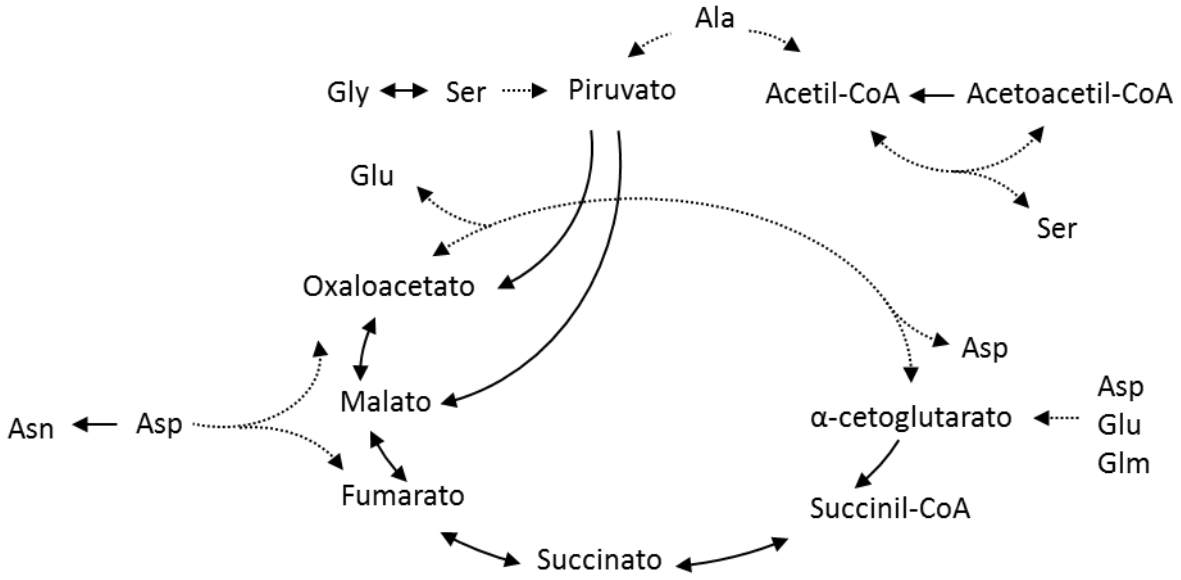
Figura 5 - Perfil de crescimento de Hib em Meio 1 e variações deste Meio

Sabe-se que Hib necessita de bases nitrogenadas, nucleosídeos ou nucleotídeos no meio de cultivo para formação de ácido nucleico, já que é incapaz de produzir todas as bases pirimidinas necessárias *de novo* (WOLIN, 1962). O fornecimento de uracila, presente no meio de cultivo, é essencial para Hib por este microrganismo não possuir a enzima *uridine fosforilase* (EC 2.4.2.3) responsável pela formação dessa base nitrogenada a partir de uridina (KEGG, 2016). Como Hib é capaz de formar as outras bases piridímicas, não há necessidade de inclusão como componentes no meio de cultivo.

Nesse contexto, para confirmar o requerimento de também uma purina no meio de cultivo para Hib, retirou-se a hipoxantina da composição desse meio, formando o Meio 1.1. Como não houve desenvolvimento de Hib no Meio 1.1, é possível admitir que Hib também possui uma deficiência enzimática na formação de purinas *de novo*. Isso pode ser explicado, já que o primeiro nucleotídeo formado é a inosina-5'-fosfato (IMP), cuja base é a hipoxantina e, a partir dessa molécula, são formados o AMP, o GMP e o restante dos nucleotídeos (KEGG, 2016).

Levando em consideração os aminoácidos, o ácido glutâmico é um aminoácido importante por participar da formação de intermediários do Ciclo de Krebs incompleto de Hib, como pode ser visto na Figura 6, e da biossíntese de outros aminoácidos como valina, tirosina, serina, glutamina, fenilalanina, leucina, isoleucina, ácido aspártico e alanina (KEGG, 2016). Por este motivo, formou-se o Meio 1.2, ou seja, o Meio 1 com suplementação desse

aminoácido baseado na concentração encontrada no meio proposto por Herriot et al., (1970). Essa suplementação resultou em um aumento da DO_{540nm} atingida em 12h de 1,8 para 2,3 UA e uma velocidade específica máxima de crescimento de 0,25 h^{-1}. Possivelmente devido à grande diversidade de aminoácidos presentes no Meio 1, a suplementação com ácido glutâmico não gerou efeitos significativos no crescimento de Hib. Assim como a suplementação desse meio com NH_4Cl também baseada no meio proposto por Herriot et al., (1970), visando avaliar a incorporação de nitrogênio inorgânico por Hib, formando o Meio 1.3, que não gerou resultados de crescimento significativamente maiores do que os obtidos no meio sem este componente.



Seta tracejada indica a participação dos aminoácidos na formação de intermediários de biossíntese

Figura 6 - Metabolização de aminoácidos a intermediários centrais de Hi 10810 (sorotipo b)
FONTE: Interpretação de fontes literárias (KEGG, 2016)

Entretanto, baseando-se no destaque dado aos aminoácidos ácido glutâmico, cistina e arginina no estudo metabólico de *Haemophilus influenzae* Rd *in silico* desenvolvido por Schilling e Palsson (2000) para formação de biomassa, esses componentes foram acrescidos ao Meio 1, formando o Meio 1.4. Como pode ser visto na Figura 5, o perfil de crescimento obtido teve fases bem delimitadas e atingiu uma DO_{540nm} de 2,7 UA e $\mu_{máx}$ 0,39 h^{-1}. Esses resultados confirmam a importância de um estudo mais aprofundado dos componentes do meio e suas concentrações, já que estes aminoácidos estão presentes no Meio 1, mas em concentrações reduzidas.

Com os ensaios prévios realizados foi possível verificar que Hib é capaz de se desenvolver nos meios quimicamente definido testados. Assim, continuou-se os estudos

avaliando também a biomolécula de interesse, o polissacarídeo capsular, para definição dos componentes do meio em estudo.

5.1.2 Definição de componentes do meio definido

Primeiramente, foram realizados ensaios utilizando os Meios 1 e 2 com a finalidade de avaliar o crescimento celular e produção de PRP. Como pode ser visto na Figura 7, Hib apresentou um perfil de crescimento linear no Meio 2, ou seja, não apresentou fases exponencial de crescimento microbiano característico, atingiu DO_{540nm} de 4,3 UA na 12ª hora de cultivo e produziu 298,55 mg/L de PRP. Enquanto no Meio 1 mostrado anteriormente, Hib produziu 233,55 mg/L de PRP atingiu uma DO_{540nm} mais baixa, de aproximadamente 1,8 UA, porém um perfil de crescimento com fases de adaptação e exponencial mais delimitadas. Essa diferença de crescimento de Hib nos dois meios testados pode ser justificada tanto pela diferença de fonte de carbono entre os dois meios e pelo Meio 1 ser um meio com maior quantidade de componentes, porém com concentrações mais baixas do que aquelas encontradas no Meio 2, como pode ser visto na Tabela 1. Esse fato foi comprovado com o Meio 1.4, onde o aumento da concentração de três importantes aminoácidos afetaram significativamente o crescimento de Hib.

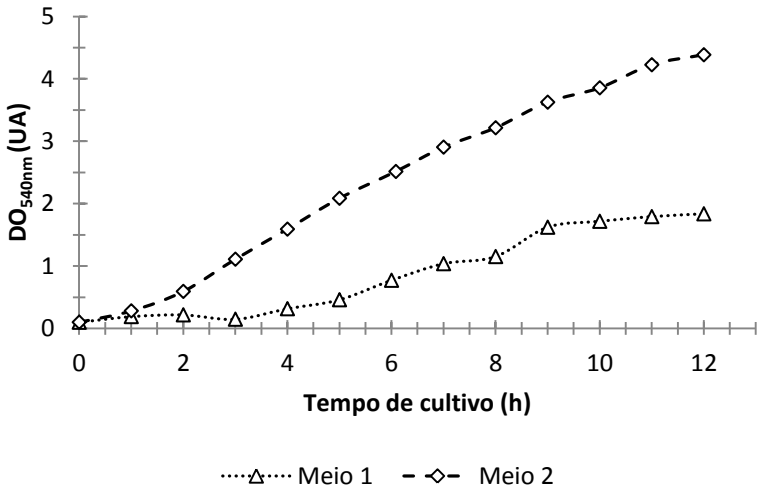


Figura 7 - Perfil cinético de crescimento de Hib em diferentes meios quimicamente definidos

Em relação à produção de PRP, observa-se que os resultados de produção de polissacarídeo capsular obtidos por Hib em meio quimicamente definido estão na mesma faixa de concentração obtida em meios complexos, conforme relatado por Takagi et al.,

(2006) que, em meio MMP, atingiu 252,5 mg/L de PRP. Esse fato demonstra a viabilidade de produção de PRP por Hib utilizando meio quimicamente definido.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados cinéticos obtidos utilizando os Meios 1 e 2 e dos diferentes testes realizados para definição dos componentes do meio definido apresentados adiante.

Comparando o cultivo de Hib nos meios estudados, houve um maior crescimento e produção de PRP no Meio 2 em comparação ao Meio 1, como pode ser visto na Tabela 3 e Figura 7. Entretanto, como o perfil de crescimento obtido neste meio foi linear e esse fenômeno remete a uma possível limitação por nutrientes, experimentos foram realizados utilizando o Meio 2, visando melhores resultados nos parâmetros avaliados.

Tabela 3 - Comparação de parâmetros cinéticos $DO_{540\ nm}$, velocidade especifica máxima de crescimento e formação de polissacarídeo em diferentes meios testados

Meios	**DO_{540nm}^{12h} (UA)**	**$\mu_{máx}$ (h^{-1})**	**PRP (mg/L)**
1	1,7	0,53	233,55
2	4,3	0,39	298,55
2.1	3,9	0,44	216,74
2.2	4	0,82	386,67
2.3	3,9	0,63	305,5
2.4	3,7	0,48	155,27
2.5	4	0,74	274,25
2.6	4	0,73	280,5
2.7	4,1	0,73	279,25
2.8	3,9	0,6	345,27
2.9	3,9	0,93	204,5
2.10	3,9	0,87	393,65
2.11	3,7	0,31	371,31
2.12	4,4	0,94	365,63
2.13	3,9	0,6	358,27
2.14	3,9	0,93	307,38
2.15	4	0,95	199,13

5.1.2.1 Fonte de carbono

A escolha da fonte de carbono é de extrema importância no estabelecimento dos componentes de um meio de cultivo para um organismo heterotrófico, ou seja, que obtém energia a partir da oxidação de compostos orgânicos. Portanto, testou-se substituir o glicerol

por glicose para verificar se haveria diferença nos parâmetros avaliados, já que os meios complexos descritos para Hib (CARTY et al., 1985; MAITRE-WILMOTTE; SPECK, ROKBI, 2009) e os meios definidos estudados (BUTLER, 1962; COLEMAN; DAINES, 2003; TAMADGE; HERRIOTT, 1960) utilizam este componente como fonte de carbono. Entretanto, Hib apresentou uma fase de adaptação maior no Meio 2.1 do que no Meio 2, o que pode ser justificado pela glicose entrar na célula por transporte ativo, enquanto o glicerol tem trânsito livre pela membrana plasmática da célula bacteriana (BARBOSA; TORRES, 1998). Além disso, a diferença entre os perfis pode ter sido gerada devido as vias metabólicas de oxidação dos carboidratos fornecidos serem opostas. Enquanto a glicose é oxidada completamente até piruvato através da via glicolítica, o glicerol, assim como os aminoácidos fornecidos no meio de cultivo, participam da gliconeogênese. Este composto é fosforilado e entra nas vias centrais do metabolismo através da dihidroxicetona-fosfato, que segue duas direções: vai ser transformada em gliceraldeído-3-fosfato e seguir a via glicolítica até piruvato e ciclo de Krebs, e em frutose-1,6-bifosfato, que vai seguir a via glicolítica reversa, como pode ser visto na Figura 2. Portanto, optou-se por manter o glicerol como fonte de carbono, considerando que não houve diferença significativa no crescimento e a produção de PRP foi menor no Meio 2.1, atingindo 216,74 mg/L.

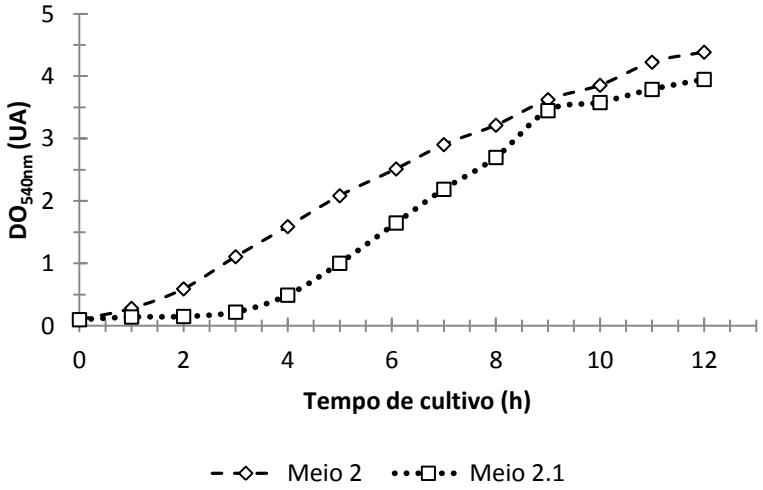


Figura 8 - Comparação entre o perfil cinético de crescimento de Hib com diferentes fontes de carbono na composição do Meio 2

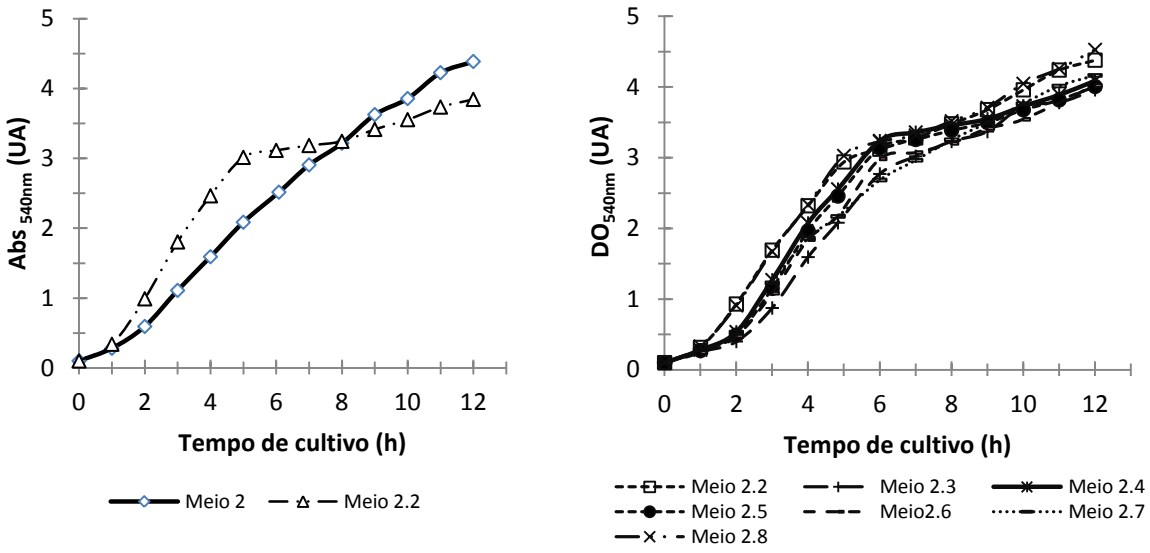
5.1.2.2 Aminoácidos

Para avaliar se os aminoácidos presentes no proposto por Butler (1962) e ausentes no Meio 2 teriam efeito estimulatório para crescimento ou produção de PRP por Hib, glutamina, isoleucina, fenilalanina, triptofano, valina e cisteína foram acrescentados na formulação do Meio 2, formando o Meio 2.2.

Como pode ser visto na Figura 9A, não houve aumento significativo na produção de biomassa de Hib atingindo DO_{540nm} de 4,0 UA, entretanto, essa suplementação mostrou-se favorável à produção de PRP por Hib, aumentando de 298,55 para 386,67 mg PRP/L. Além disso, houve uma melhor delimitação das fases de crescimento e um aumento na velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) de 0,39 a 0,82 h^{-1}, comprovando a falta de nutrientes importantes no Meio 2 para um crescimento exponencial de Hib e para produção de polisscarídeo capsular.

De acordo com o banco de dados do KEGG (2015), glutamina, isoleucina, fenilalanina e valina são produzidas por Hib a partir do ácido glutâmico, enquanto cisteína e triptofano são produzidos a partir da serina, que também depende do ácido glutâmico para ser produzida. Portanto, é possível que a suplementação desses aminoácidos tenha agido tanto como fonte de nitrogênio quanto fonte de carboidrato. Além disso, a glutamina, assim como o próprio ácido glutâmico, pode ser desaminada a α-cetoglutarato, um intermediário do ciclo de Krebs incompleto de Hib. Ou seja, não são aminoácidos essenciais ao Hib, mas seu aporte foi estimulatório e possibilitou um melhor desempenho de Hib e, portanto, serão mantidos na composição do meio de cultivo em estudo. O esquema apresentado na Figura 6 mostra a participação dos esqueletos carbônicos dos aminoácidos na formação de intermediários centrais do metabolismo incompleto de Hib.

Para avaliar quais aminoácidos adicionados influenciaram o desempenho de Hib cultivado no Meio 2.2, esses componentes foram removidos individualmente da composição do meio de cultivo, formando os Meios 2.3 a 2.8.



(a) (b)

Figura 9 - Comparação entre os perfil cinético de crescimento de Hib em Meio 2 suplementado em 6 aminoácidos (a) e a ausência individual de cada um deles (b)

Como pode ser observado na Figura 9B, não houve diferença no crescimento de Hib, como se esperava, já que a formação de biomassa utilizando o Meio 2 e o Meio 2.2 foi similar. Entretanto, houveram diferentes valores de $\mu_{máx}$ e produção de PRP, conforme Tabela 3. A ausência de Cisteína no meio de cultivo não propiciou diferenças nos parâmetros avaliados. Segundo Schilling e Palsson (2000), cisteína é necessária para Hi como fonte de enxofre e está entre os substratos mínimos necessários ao metabolismo da bactéria. Entretanto, estão presentes no Meio 2.2 tanto a cistina, que é um aminoácido formado através da oxidação de duas moléculas de cisteína unidas covalentemente através de uma ponte dissulfeto (Figura 10), quanto a própria cisteína. Visando avaliar se há preferência por Hib entre estes dois compostos, ambos serão mantidos no meio de cultivo estudado e posteriormente avaliados estatisticamente. Além disso, devido às diferenças encontradas nos valores de $\mu_{máx}$ e produção de PRP, a presença e concentração de todos os aminoácidos serão estudados na próxima etapa do estabelecimento do meio de cultivo a fim de verificar a interação entre todos os componentes e evitar possíveis danos nos parâmetros estudados.

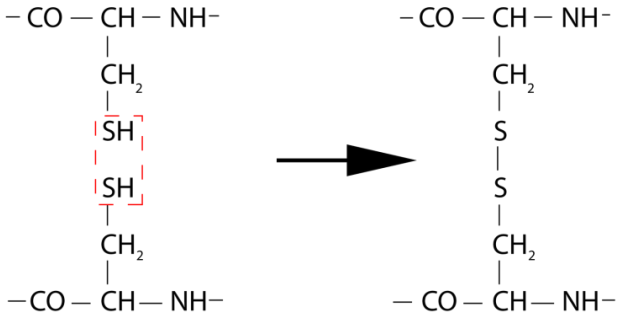


Figura 10 - Esquema da redução de duas moléculas de cisteína à cistina

5.1.2.3 Base nitrogenada

Em 1963, Wolin estabeleceu um meio definido para Hib através de um processo de substituição e deleção de componentes de um meio complexo em que se baseou, determinando componentes essenciais ao crescimento deste microrganismo. Portanto, de acordo com esse trabalho e com estudos prévios apresentados, sabe-se que Hib é incapaz de crescer sem uracila e hipoxantina.

A Hipoxantina é uma base nitrogenada naturalmente derivada de uma purina, que ocasionalmente é encontrada como constituinte de ácidos nucleicos, onde é presente no anticódon do tRNA na forma de seu nucleosídeo, inosina, como pode ser visto na Figura 11. Nucleotídeos purina são hidrolisados por uma via em que perdem seu grupo fosfato através da ação da 5-nucleotidase. Adenilato gera adenosina, que é desaminada a inosina através da adenosina deaminase, e inosina é hidrolisada a hipoxantina, sua base nitrogenada, e D-ribose (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008). Inicialmente, inosina foi incluída na composição de meios de cultivo para *Haemophilus influenzae* devido a sua eficiência no desenvolvimento da competência da bactéria (CARMODY; HERRIOTT, 1970; RANHAND; HERRIOTT, 1966).

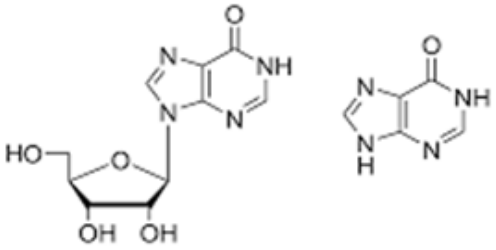


Figura 11 - Estrutura molecular do nucleosídeo inosina (esquerda) e sua base nitrogenada hipoxantina (direita)

Como inosina e hipoxantina estão presentes na composição do Meio 2, testou-se averiguar a importância da presença deste nucleosídeo e de sua base nitrogenada como componentes deste meio. Portanto, retirou-se a hipoxantina do Meio 2.2, formando o Meio 2.9. Conforme a Figura 12 e a Tabela 3, pode-se observar que a ausência de hipoxantina no meio de cultivo para Hib gerou diferenças no perfil de crescimento de Hib, com uma morte celular acentuada a partir da 7ª hora de cultivo, e uma queda de produção de PRP para 204 mg/L. Como esta etapa do estudo está sendo baseada em componentes individualmente, sem levar em consideração a concentração, pode-se inferir que a concentração de inosina no meio esteja sendo complementada com a de hipoxantina. Portanto, não é possível decidir a permanência de hipoxantina como componente do meio de cultivo estudado sem averiguar as concentrações dos outros componentes, principalmente de inosina.

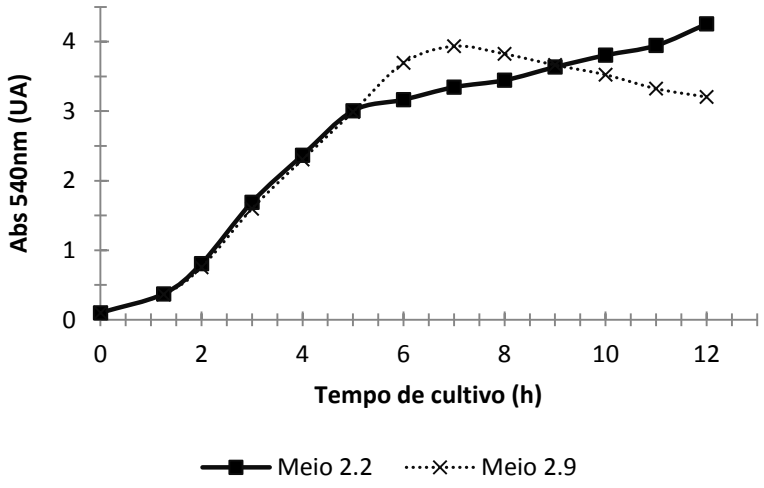


Figura 12 - Comparação do perfil de crescimento de Hib em meio de cultivo com ausência de hipoxantina

5.1.2.4 Vitaminas

Testou-se também a suplementação do Meio 2.2 com algumas vitaminas presentes no Meio 1 e ausentes no Meio 2, formando o Meio 2.10. A Biotina, uma vitamina que funciona como coenzima, Cloreto de Colina, um nutriente considerado essencial aos microrganismos e que se encontra agrupado dentro do complexo de Vitamina B, Ácido Fólico, uma vitamina hidrossolúvel pertencente a vitamina do complexo B, Nicotinamida, uma das formas da vitamina B3, Ácido p-aminobenzóico, um composto orgânico essencial para algumas

bactérias e designado como vitamina B10 e Riboflavina ou vitamina B2, foram adicionadas ao meio em estudo.

Verificou-se que não há necessidade desses componentes no meio de cultivo para os parâmetros avaliados, já que o cultivo realizado com o Meio 2.2 e 2.10 não geraram diferenças entre produção de biomassa e PRP, como pode ser visualizado nos resultados apresentados na Tabela 3. Além disso, Biotina, Riboflavina, Ácido Fólico e Ácido p-aminobenzóico não são vitaminas essenciais ao Hi por este microrganismo produzir as enzimas que participam das vias metabólicas envolvidas em suas sínteses (KEGG, 2016). Esses dados comprovaram os relatos de Butler (1962), já que avaliou tanto a Biotina como o Ácido Fólico como desnecessários ao crescimento de Hi. Ao contrário da Colina, que é um nutriente necessariamente obtido a partir do meio por Hi ser incapaz de sintetizá-lo. Este composto é utilizado para síntese de seu fosforilcolina (ChoP) que compõe a superfície exposta de seu lipopolissacarídeo (LPS). Essa característica permite a aderência da bactéria às células hospedeiras, além de aumentar a resistência a peptídeos antimicrobianos que tem como alvo diferenças estruturais entre o hospedeiro e a célula microbiana. Portanto, a colina usada para síntese de LPS-ChoP é adquirida exclusivamente de fontes ambientais, mas não é necessária para o crescimento de Hi (FAN et al., 2003; WOLIN, 1963) e, por este motivo, não impactou os parâmetros avaliados. O fornecimento obrigatório de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) no meio de cultivo para Hib, garante o aporte da vitamina Nicotinamida, já que Hi possui as vias metabólicas de produção desse composto a partir de NAD (KEGG, 2016), anulando sua influência nos parâmetros avaliados quando presente no meio de cultivo.

5.2.1.5 Fatores de crescimento

Considerando que NAD e Hemina são compostos essenciais ao desenvolvimento de Hib, torna-se importante avaliar se as concentrações desses componentes estavam limitando o crescimento de Hib ao longo dos cultivos. Portanto, aumentou-se os valores de NAD e Hemina baseado na composição do meio complexo MMP (TAKAGI et al., 2006), formando o Meio 2.11.

Através do perfil de crescimento ilustrado na Figura 13 e da análise dos dados apresentados na Tabela 3, pode-se perceber que os fatores de crescimento estão em excesso

no meio MMP, já que o aumento de suas concentrações no meio estudado não interferiu em nenhum parâmetro estudado e serão mantidos conforme a composição inicial.

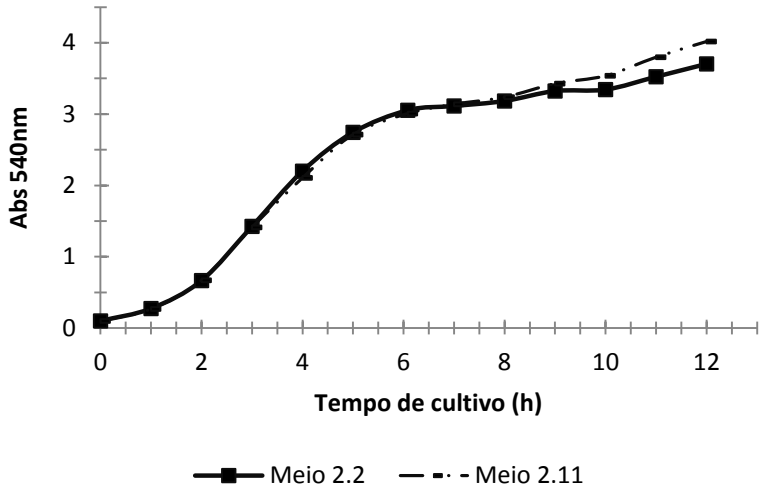


Figura 13 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib com aumento da concentração de NAD e Hemina

5.2.1.6 Fonte de nitrogênio inorgânico

Como testado anteriormente, a suplementação do Meio 1 com Cloreto de Amônio não gerou diferenças significativas nos parâmetros avaliados. Porém, decidiu-se avaliar a influência deste componente no Meio 2.2, retirando-o de sua composição e formando o Meio 2.12.

Como pode ser visto na Tabela 3, novamente não houve diferenças significativas entre a presença e a ausência do Cloreto de Amônio no meio de cultivo para Hib. Através do banco de dados do KEGG (2015), é possível concluir que Hib é incapaz de assimilar nitrogênio inorgânico como fonte de nitrogênio. Entretanto, Yeruva et al., (2010) relatam que este composto tem efeito positivo na produção de PRP por Hib e decide-se avaliar sua concentração antes de retirá-lo da composição do meio em estudo.

5.1.2.7 Outros componentes

Alguns componentes são incluídos em meios de cultivo com diferentes finalidades, ao contrário daqueles que são utilizados para nutrição do microrganismo cultivado. Por isso,

visando verificar a importância de Álcool Polivinílico (PVA), um agente detoxificante, EDTA, um agente quelante, e Tween 80, um detergente, no meio de cultivo, estes componentes foram retirados individualmente da composição do Meio 2.2, formando o Meio 2.13, 2.14 e 2.15, e o crescimento de Hib e produção de PRP foram avaliados.

Através dos dados apresentados na Figura 14 e Tabela 3, não é possível verificar influência desses compostos nos parâmetros avaliados, com exceção do Tween 80 que gerou uma queda de produção de PRP para 199,13 mg/L que, por ser um tensoativo, pode-se inferir que interfira na liberação do polissacarídeo capsular da célula para o sobrenadante do cultivo. Este componente será mantido na composição do meio de cultivo e avaliado posteriormente.

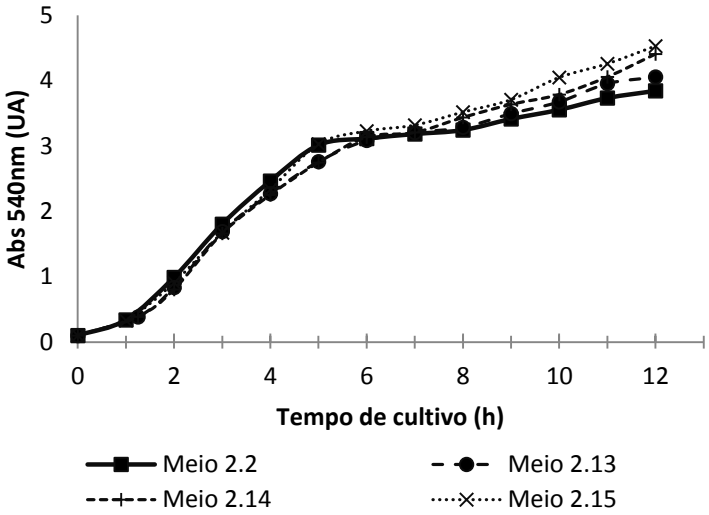


Figura 14 - Comparação de perfis de crescimento de Hib em meios individualmente sem PVA, EDTA e Tween 80

Como a presença de um agente quelante em meios de cultivo previne que íons como cálcio, magnésio e ferro formem compostos insolúveis com fosfato, além de fornecer uma reserva solúvel de cátions que pode ser utilizada pelos microrganismos cultivados (MEYNELL; MEYNELL, 1965), o EDTA também será reavaliado e o PVA por ser considerado um agente detoxificante importante na neutralização de substâncias inibitórias que podem estar presentes no meio de cultivo e metabólitos produzidos, melhorando o crescimento celular de Hib (KLEIN; LUGINBUHL, 1979; MAITRE-WILMOTTE; SPECK; ROKBI, 2009; WOLIN, 1963).

Os resultados obtidos nesta etapa inicial possibilitou definir os componentes do meio de cultivo que serão utilizados no delineamento experimental de Plackett-Burman, onde serão verificadas não somente a influência de um componente, mas as interações entre todos eles.

Além disso, os experimentos desenvolvidos foram importantes para possibilitar inferir as concentrações dos componentes a serem estudadas nesta próxima etapa.

Portanto, de acordo com os dados obtidos, a composição do Meio 2.2, apresentada na Tabela 1, será utilizado na próxima etapa de estabelecimento do meio para o crescimento e produção de polissacarídeo de Hib.

5.2 Delineamento de Plackett-Burman

Tendo definido a composição do meio de partida, Meio 2.2, iniciou-se a avaliação da concentração dos 36 componentes que o compõem.

A Tabela 4 mostra as concentrações dos componentes do meio estudadas, ou seja, a composição dos níveis -1, ponto central e +1, que foram escolhidos inicialmente baseados na composição do Meio 2.2, nos resultados obtidos nos ensaios prévios e nos meios quimicamente definidos encontrados na literatura para Hib. Os menores valores encontrados na literatura foram estudados no nível -1, enquanto os maiores valores, no nível +1, visando obter a concentração ideal sem causar limitação ou inibição por substrato. Para os componentes cuja concentração entre os meios estudados não havia diferença significativa, escolheu-se a concentração do Meio 2.2 como ponto central para avaliar se o valor estudado estava suficiente, em excesso no meio ou em falta.

Tabela 4 - Composição do Meio 2.2 e concentrações de cada variável independente estudada no delineamento PB 44 realizado

Variável	Componentes	Meio 2.2 (g/L)	Níveis (g/L)		
			-1	0	1
x1	Cys	0,2	0,2	0,3	0,4
x2	NaCl	5,8	3,6	5,8	8,0
x3	K_2SO_4	1,0	0,2	1,0	1,8
x4	$MgCl_2,6H_2O$	0,43	0,2	0,4	0,7
x5	$CaCl_2*2H_2O$	0,029	0,01	0,03	0,05
x6	EDTA	0,004	0,0	0,004	0,008
x7	NH_4Cl	0,22	0,0	0,2	0,4
x8	Asp	0,5	0,4	0,8	1,2
x9	Glu	1,3	0,02	0,51	1,0
x10	Arg	0,3	0,1	0,2	0,3
x11	Gly	0,03	0,2	0,4	0,5
x12	Lys	0,05	0,3	0,5	0,6
x13	Met	0,1	0,1	0,2	0,3
x14	Ser	0,1	0,2	0,3	0,4
x15	His	0,01	0,1	0,2	0,3
x16	Leu	0,3	0,3	0,5	0,7
x17	Tyr	0,2	0,015	0,065	0,115
x18	Glm	0,3	0,5	0,75	1,0
x19	Ile	0,05	0,3	0,4	0,5
x20	Trp	0,005	0,03	0,07	0,11
x21	Val	0,02	0,2	0,3	0,4
x22	Phe	0,015	0,3	0,6	1,0
x23	Cyss	0,12	0	0,2	0,3
x24	Tween 80	0,02	0	0,02	0,04
x25	PVA	0,02	0	0,02	0,04
x26	Lactato de Na^{+1} 50%	1,6	0,6	1,6	2,6
x27	Glicerol	5,0	3,0	5,0	7,0
x28	Uracila	0,1	0,1	0,2	0,3
x29	Hipoxantina	0,02	0	0,02	0,03
x30	Inosina	2,0	0,3	1,15	2,0
x31	K_2HPO_4	3,5	2,0	3,5	5,0
x32	KH_2PO_4	2,7	1,4	2,7	4,0
x33	Tiamina,HCl	0,0045	0,005	0,010	0,015
x34	Pantotenato de Ca^{+2}	0,004	0,002	0,003	0,004
x35	NAD	0,004	0,004	0,007	0,010
x36	Hemina	0,01	0,010	0,015	0,020

Os resultados dos parâmetros avaliados nos ensaios do PB 44, utilizados como variáveis dependentes do delineamento aplicado, estão apresentados na Tabela 5. Como pode ser observado, os valores de DO_{540nm} em 10 horas de cultivo, momento em que Hib havia

atingido a fase estacionária em grande parte dos meios estudados, variaram entre 0,19 e 4,96 UA, $\mu_{máx}$ de 0,4 a 1,07 h^{-1}, produção de polissacarídeo de 10,61 a 227,15 mg/L na 10ª hora de cultivo e os fatores de conversão foram: $Y_{X/S}$ de 2,72 UA/g, enquanto $Y_{P/S}$ de 147,55 mg/g e $Y_{P/X}$ de 143,47 mg/UA.

O crescimento obtido por Hib em alguns ensaios do PB44 foi maior do que no meio Meio 2.2 utilizado como controle, entretanto a concentração de PRP obtida foi menor, cuja média obtida entre os ensaios controle realizados com o Meio 2.2 foi de 2,14 UA e 256,34 mg/L na 10ª hora de cultivo. Além disso, como pode ser visto nos perfis cinéticos de crescimento apresentados na Figura 15, Hib atingiu a fase estacionária de crescimento em momentos diferentes, muito provavelmente devido à variação na concentração de nutrientes e, possivelmente, por limitação desses em alguns casos.

O glicerol residual também foi avaliado nos ensaios realizados e, como pode-se observar, o menor valor encontrado foi de 0,05 g /L no E14, mesmo ensaio em que o crescimento de Hib foi um dos maiores entre todos realizados, atingindo uma DO_{540nm}.de 4,65 UA. Enquanto que o maior valor de glicerol residual foi de 6,72 g/L e ocorreu no E22, que chegou a uma DO_{540nm} de 1,35 UA em 10 horas de cultivo e 199 mg/L de PRP.

O glicerol foi fornecido em concentrações diferentes entre ensaios (3 g/L nos ensaios do nível -1, 5 g/L nos ensaios do ponto central e 7 g/L nos ensaios do nível +1) e, como pode ser visto na Tabela 5 e no Anexo B, os ensaios E14, E21, E29, E30 e E44 apresentaram as menores concentrações de glicerol residual. Esses ensaios possuem o glicerol no nível -1, sugerindo, portanto, para evitar uma possível limitação de crescimento por nutrientes, que a concentração desse componente seja mantida, pelo menos, na concentração do ponto central.

Os fatores de conversão obtidos apresentaram valores bastantes distintos entre os ensaios realizados reafirmando que a variação estudada da concentrações dos componentes do meio causam um grande impacto no metabolismo de Hib. O E11 destacou-se obtendo os maiores taxas de conversão de substrato em célula e substrato em produto, ou seja, o glicerol fornecido no meio foi melhor direcionado para produção de biomassa e PRP em relação aos outros ensaios realizados. Enquanto o E22 também se destacou na conversão de biomassa em produto e substrato em produto, favorecendo a produção do polissacarídeo capsular.

Analisando os perfis cinéticos de crescimento foi possível verificar que os ensaios realizados no Ponto Central (PC), tiveram um destaque no crescimento de Hib em relação à maioria dos ensaios realizados no PB44, entretanto a média da produção de polissacarídeo entre os três ensaios realizados foi menor do que o Meio 2.2 e alguns ensaios do PB44,

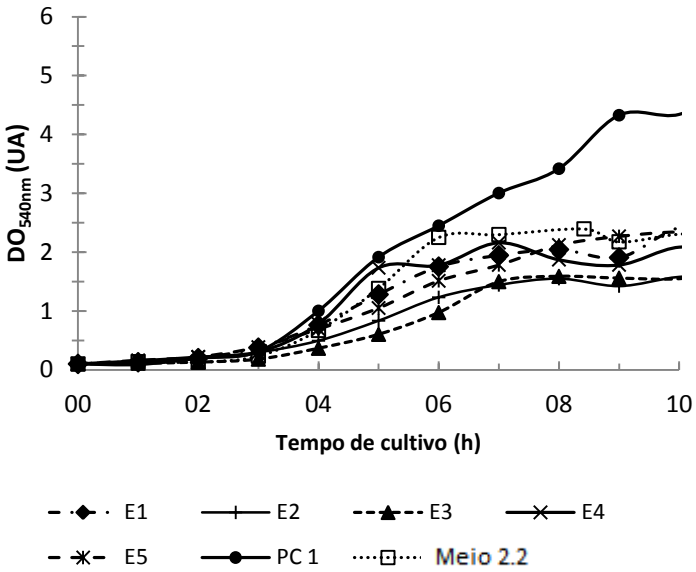
atingindo 147,6 mg PRP/L. Esses resultados condizem com os resultados estatísticos obtidos, que serão discutidos em seguida.

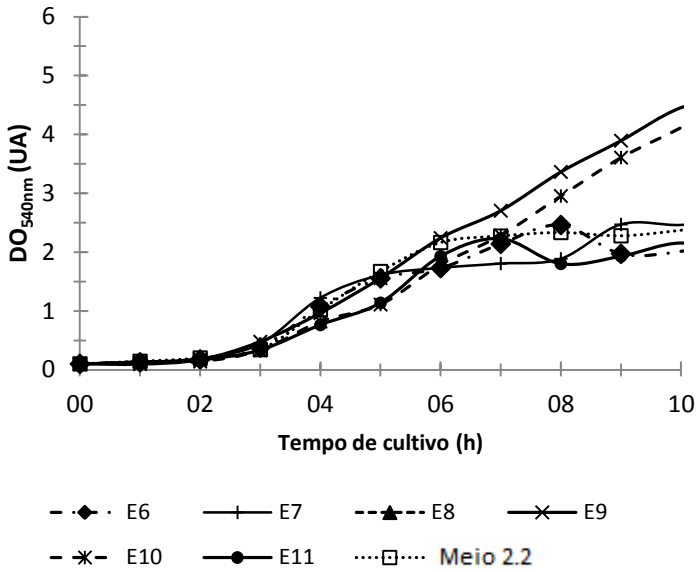
Além disso, os ensaios E1, E5, E7, E8, E9, E10, E12, E14, E18, E21, E24, E26, E28, E29, E30, E31, E34, E40 e E41 do PB 44 também se destacaram em crescimento em relação ao Meio 2.2, nos levando a ver uma não associação de produção de PRP ao crescimento de Hib.

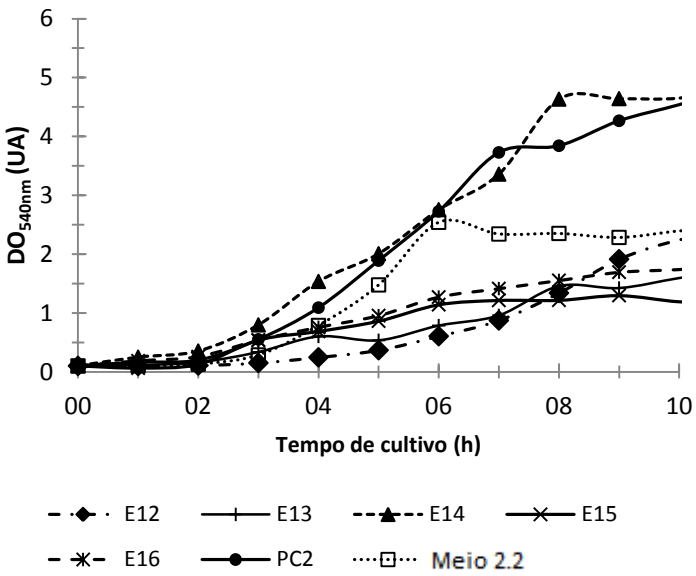
Os ensaios apresentaram perfis cinéticos de crescimento distintos, conforme ilustrado na Figura 15. Nos ensaios E10, E18, E26, E28, E31 e E40, Hib apresentou uma pequena fase exponencial seguida de uma fase linear de crescimento e, em 10 horas, não atingiram a fase estacionária demonstrando uma possível limitação de nutrientes. Já os ensaios E9, E21, E30 e E40 demonstraram duas inclinações diferentes na curva de crescimento, havendo uma possibilidade de troca de consumo de substrato, refletindo na mudança de velocidade de crescimento. Essa troca pode ser observada nos perfis cinéticos de substrato residual e produção de ácido orgânico apresentadas no Anexo B.

Tabela 5 - Variáveis dependentes resultantes dos ensaios do delineamento PB 44

Ensaios	DO_{540nm} 10h (UA)	$\mu_{máx}$ (h^{-1})	Glicerol residual (g/L)	PRP (mg/L)	Yx/s (DO_{540nm}/g)	Yp/x (mg/DO_{540nm})	Yp/s (mg/g)
E1	2,42	0,59	6,45	135,56	0,76	56,1	42,51
E2	1,58	0,48	2,37	122,7	1,05	77,74	81,53
E3	1,56	0,49	2,17	161,74	1,23	103,5	127,24
E4	2,09	0,56	2,13	155,82	0,77	74,67	57,71
E5	2,34	0,47	5,11	78,93	0,7	33,68	23,62
E6	2,01	0,71	1,95	181,67	0,98	90,24	88,13
E7	2,46	0,75	5,97	151,15	1,79	61,43	109,9
E8	2,38	0,74	6,33	123,95	2,12	52,11	110,69
E9	4,46	0,8	3,95	163,02	1,46	36,58	53,3
E10	4,12	0,71	1,35	172,46	1,81	38,7	70,23
E11	2,15	0,61	1,98	217,46	2,72	52,82	143,47
E12	2,24	0,42	2,95	110,69	1,74	49,34	85,73
E13	1,59	0,57	2,02	79,71	0,79	50,04	39,72
E14	4,65	0,66	0,05	148,39	1,1	31,9	35,18
E15	1,19	1,07	6,07	34,2	1,33	28,67	38,16
E16	1,74	0,51	2,40	164,66	0,81	94,6	76,33
E17	1,3	0,4	2,06	122,99	0,58	94,3	54,95
E18	4,44	0,69	1,34	114,95	1,1	25,91	28,57
E19	1,31	0,52	6,06	122,82	0,48	93,92	45,26
E20	0,69	0,41	6,60	33,72	0,75	48,64	36,66
E21	3,31	1,03	0,74	115,64	0,78	34,97	27,13
E22	1,35	0,51	6,72	199,08	0,95	147,55	140,41
E23	1,51	0,75	2,74	72,4	0,98	47,98	46,94
E24	2,32	0,87	6,53	135,2	0,74	58,31	43,27
E25	1,47	0,84	5,85	119,75	1,27	81,59	103,89
E26	2,32	0,88	1,90	94,78	0,68	40,93	27,81
E27	2,01	0,72	6,20	90,22	1,06	44,8	47,35
E28	3,69	0,84	5,21	197,74	0,96	53,59	51,24
E29	2,84	0,59	0,72	142,5	1,02	50,16	51,25
E30	4,96	0,83	0,36	158,46	1,15	31,93	36,63
E31	4,24	0,67	5,52	197,43	1,18	46,54	55,05
E32	0,19	0	3,73	10,61	0,31	56,19	17,4
E33	1,74	0,48	6,71	98,69	0,9	56,7	51,11
E34	4,34	0,67	1,16	227,15	1,28	52,3	67,05
E35	1,88	0,62	1,68	175,72	0,56	93,69	52,27
E36	2,13	0,84	6,42	177,28	0,8	83,38	66,81
E37	2,01	0,63	6,21	121,83	0,7	60,68	42,27
E38	0,74	0,45	6,50	51,74	0,67	70,02	46,63
E39	2,17	0,76	2,44	217,27	0,89	100,22	89,38
E40	4,53	0,61	5,42	153,3	1,08	33,87	36,74
E41	3,81	0,71	6,11	165,35	0,95	43,35	41,38
E42	1,95	0,51	6,41	82,37	0,67	42,27	28,18
E43	1,35	0,47	6,45	104,9	0,66	77,87	51,05
E44	1,75	0,54	0,47	226,36	0,69	129,02	89,37
PC1	4,34	0,77	2,30	129,1	0,91	29,75	27
PC2	4,54	0,74	2,61	150,07	0,96	33,06	31,68
PC3	4,76	0,75	2,37	163,64	0,99	34,4	34,21







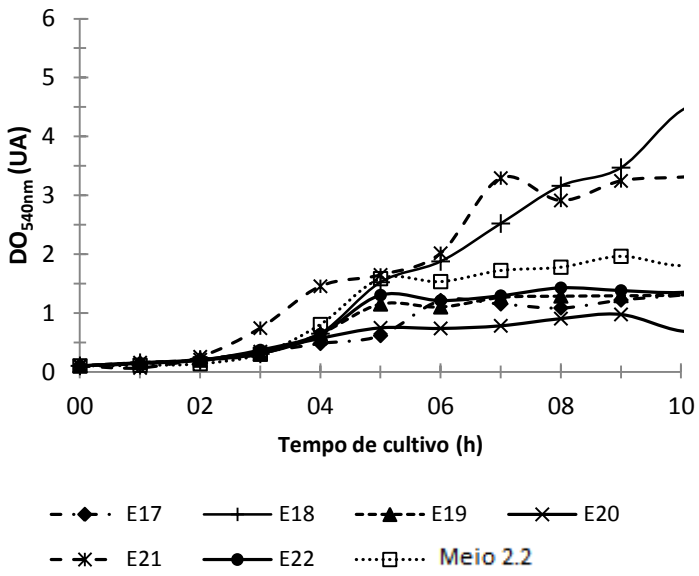


Figura 15 - Perfil cinético de crescimento de Hib dos ensaios do PB 44 (continua)

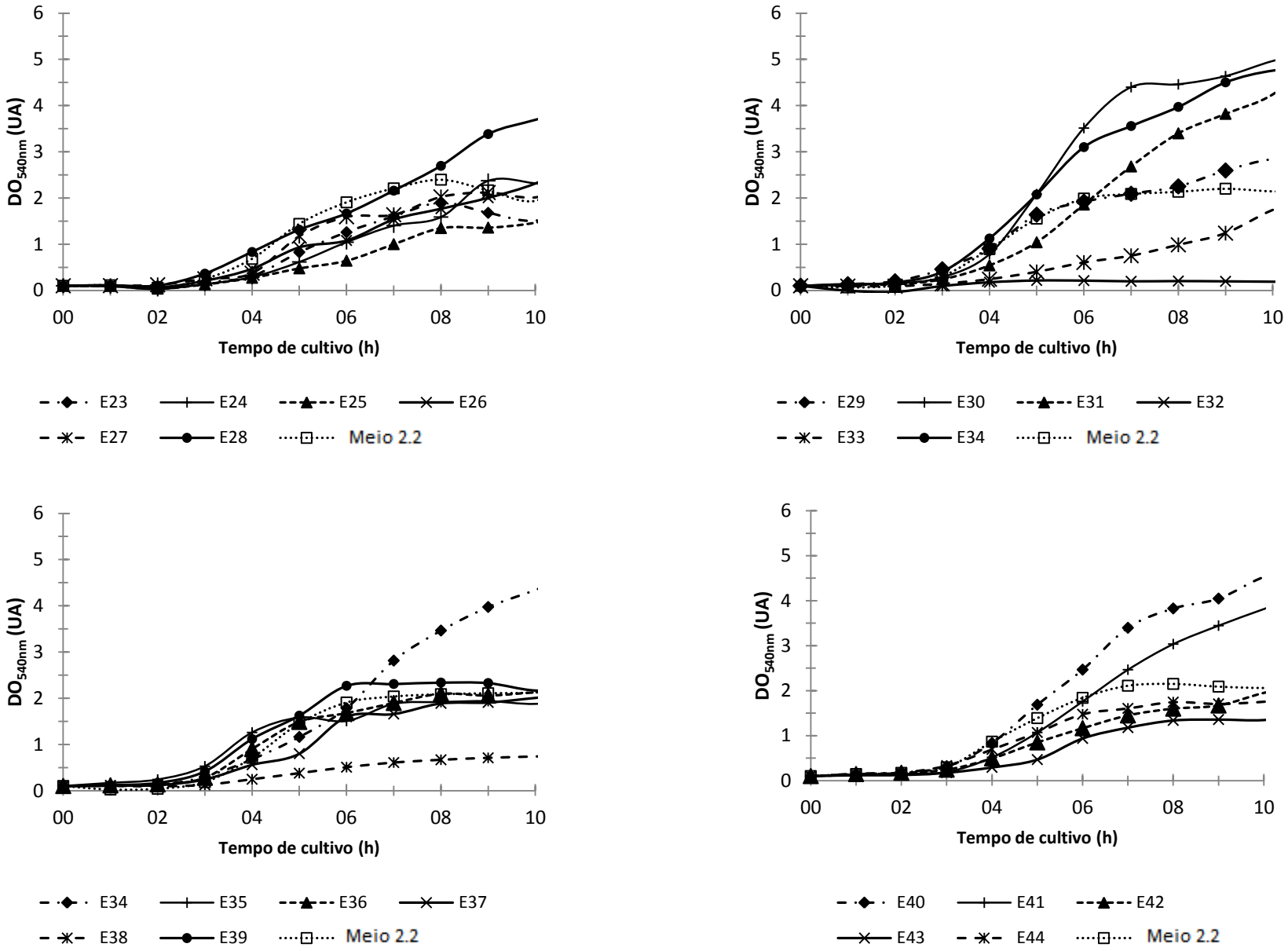
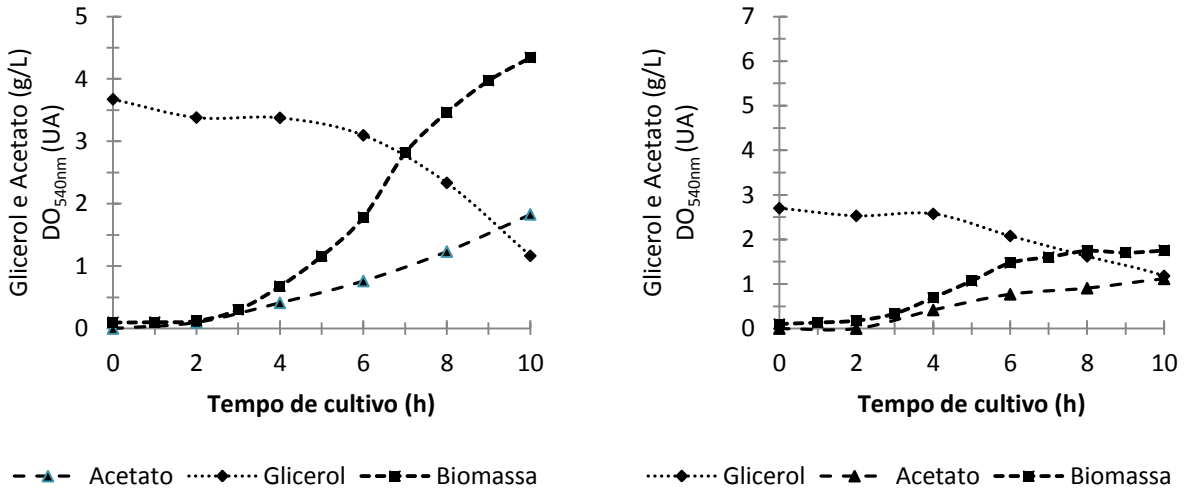


Figura 15 - Perfil cinético de crescimento de Hib dos ensaios do PB 44 (continua) (conclusão)

5.2.1 Ácidos orgânicos e carboidratos

Devido ao grande número de ensaios realizados, escolheu-se avaliar com maior detalhamento, quanto ao consumo de carboidratos e produção de ácidos, dois ensaios que atingiram as melhores concentrações de PRP em relação aos outros, porém DO_{540nm} diferentes: os ensaios E34 e E44. A produção dos dois ensaios foi de 227,15 e 226, 36 mg/L de PRP nos ensaios E34 e E44, respectivamente, entretanto a DO_{540nm} atingida em 10h de cultivo foi de 4,34 e de 1,75, sugerindo que a produção de PRP por Hib não seja associada ao crescimento. Porém, como pode ser visto na Figura 16, em 10 horas de cultivo, Hib no ensaio E34 está tendendo a atingir a fase estacionária, podendo, portanto, aumentar seu crescimento e produção de PRP, ao contrário do que ocorreu com o ensaio E44, que entrou nesta fase na 6ª hora de cultivo. Assim, juntamente com uma menor biomassa produzida, houve uma menor produção de acetato, que diferiu entre 1,8 e 1,25 g/L nos ensaios E34 e E44, respectivamente.



(a) (b)

Figura 16 - Cinética dos ensaios (a) E34 e (b) E44 do PB 44 de crescimento (DO_{540nm}), produção de acetato e glicerol residual

Além disso, os fatores de conversão estão de acordo com os resultados obtidos, já que o ensaio E34 teve uma taxa de conversão de substrato em célula de 1,28 g/UA e de substrato em PRP de 67,05 g/mg, ao contrário do que foi obtido no ensaio E44, que teve $Y_{X/S}$ de 0,69 g/UA e $Y_{P/S}$ de 89,37 g/mg. Esses resultados demonstram que o glicerol foi direcionado em maior proporção para produção de biomassa do que para PRP no ensaio E44 do que o ensaio E34, confirmando a diferença de crescimentos nos dois ensaios.

Durante o crescimento aeróbico de Hib, o acetato é o principal produto do seu metabolismo derivado do seu ciclo de Krebs incompleto onde estão ausentes a citrato sintase, a aconitase e a isocitrato desidrogenase (FLEISCHMANN; ADAMS; WHITE, 1995), como pode ser visualizado na Figura 2. A ausência dos três passos iniciais desse ciclo resulta no fato de que as estruturas carbônicas provenientes da glicólise nunca chegam a entrar no ramo oxidativo do ciclo, podendo resultar no acúmulo de moléculas de oxidação incompleta tais como o acetato, lactato e formiato. Dessa forma, a acetil-CoA produzida pela piruvato desidrogenase é convertida a acetato, produzindo um ATP. Mesmo com o benefício do ganho enérgico, o acetato liberado no meio de cultura pode causar intolerância à célula bacteriana. Silva (2010) mostrou que o acúmulo de acetato produzido por Hib causa efeitos de inibição sobre a célula. No mesmo trabalho, ficou evidente que a concentração de acetato muito elevada pode afetar o metabolismo até o ponto onde a bactéria se torna incapaz de até mesmo assimilar a fonte de carbono fornecida. Esses resultados condizem com relatos de Cintra (2015), que estudou a maximização de PRP através de um modelo cinético considerando o crescimento celular, a formação de acetato e PRP. Neste trabalho, foi estabelecido um modelo cinético que prevê a inibição da concentração de acetato tanto sobre o crescimento celular quanto sobre a formação de PRP. No caso dos ácidos orgânicos, que possuem constantes de dissociação relativamente altas, a sua solução aquosa apresentará uma quantidade considerável de moléculas não dissociadas. Em bactérias Gram negativas, a presença da membrana externa constituída de LPS confere uma carga negativa à superfície da célula. A forma ionizada do ácido apresenta baixa permeabilidade à membrana, por também apresentar carga negativa. Já a forma protonada tem maior permeabilidade, migrando do meio extracelular para o citoplasma, o ocasionando a inibição (BRUL; COOTE, 1999). Portanto, a formação de acetato é um importante fator a ser levado em consideração no desenvolvimento do processo.

Além disso, o lactato, inicialmente em 0,6 g/L nos dois ensaios, foi consumido totalmente nas primeiras 4 horas de cultivo em ambos os ensaios e 2,5 g/L de glicerol no ensaio E34 e 2,3 g/L, no ensaio E44. Entretanto, além desses dois componentes, os aminoácidos presentes nos meio de cultivo também são utilizados como fonte de carbono pelo microrganismo.

A diferença de consumo entre o glicerol e o lactato por Hib pode ser explicada pelo fato do lactato ser oxidado diretamente a piruvato e, portanto, a gliconeogênese ser desencadeada integralmente para a formação de glicose-6-fosfato. Entretanto, se a substância precursora da gliconeogênese for o glicerol, esta via é parcialmente desenvolvida, necessitando utilizar

outros componentes presentes no meio para complementar a formação dos precursores. Por este motivo, além de ter aparecido como estatisticamente significativo para o crescimento de Hib nas análises, no próximo delineamento realizado serão aumentadas as concentrações de trabalho de lactato para verificar se há influência nos parâmetros avaliados. Como não houve consumo de grande parte do glicerol adicionado no meio E34 (3g/L) e nesta situação foi obtido crescimento e produção de PRP significativos em relação aos outros ensaios, sua concentração no nível (+1) será diminuída no próximo delineamento.

5.2.2 Análise de aminoácidos

O consumo de aminoácidos também foi avaliado nestes mesmos ensaios E34 e E44, que se destacaram quanto à produção de polissacarídeo capsular. É comum o uso, por bactérias, de aminoácidos, ácidos graxos, lactato e glicerol como fonte de carbono e energia. Entretanto, devido ao sistema enzimático deficiente de Hib, poucos aminoácidos conseguem formar componentes do metabolismo energético central de Hib, como pode ser visto na Figura 6.

Quanto aos aminoácidos fornecidos para Hib no meio estudado, estes podem ser desaminados, transformando-os em intermediários do seu ciclo de Krebs incompleto, piruvato, acetoacetil-CoA ou acetil-CoA, dependendo do aminoácido. Como pode ser visto na Figura 17, houve um destaque no consumo dos aminoácidos Serina, Leucina, Ácido Aspártico, Triptofano e Glutamina, cujas faixas de concentração estudadas foram aumentadas no próximo delineamento para evitar limitação de substrato. A serina pode ser transformada em piruvato, glutamina em α-cetoglutarato, ácido aspártico em fumarato e oxaloacetato, conforme Figura 6. Já o Ácido Glutâmico foi pouco consumido neste ensaio, possivelmente porque Hib é capaz de produzi-lo a partir de diversos outros compostos, como glutamina, fenilalanina, tirosina, prolina, isoleucina, valina, α-cetoglutarato, ácido aspártico, alanina (KEGG, 2016).

Não foi possível detectar a Arginina na análise cromatográfica com precisão, mas sabe-se que é um aminoácido essencial para Hib (KEGG, 2016) e, portanto, testou-se aumentar sua concentração de estudo e avaliar sua importância para produção de PRP.

Glicina e Fenilalanina, além de não serem muito consumidas nos ensaios estudados, apresentaram-se como estatisticamente significativas com efeitos negativos para crescimento de Hib e, portanto, testou-se retirá-las do meio estudado, assim como Metionina e Histidina,

que não geraram efeitos e foram pouco consumidas. A glicina produz serina e esta, por sua vez, produz piruvato. Como a serina está presente no meio de cultivo, a retirada desse componente do meio não implicará em prejuízos na produção dos precursores de biossíntese de Hib. Lisina e Isoleucina foram pouco consumidas e não geraram efeitos estatísticos e, dessa forma, diminuiu-se as concentrações estudadas.

Valina foi analisada de uma forma diferenciada por não ter demonstrado efeito nos parâmetros estudados, mas ter sido bastante consumida no ensaio E34 e, portanto, preferiu-se manter a mesma concentração estudada para evitar que a diminuição desse aminoácido pudesse causar limitação de substrato em meios que produzem um maior crescimento.

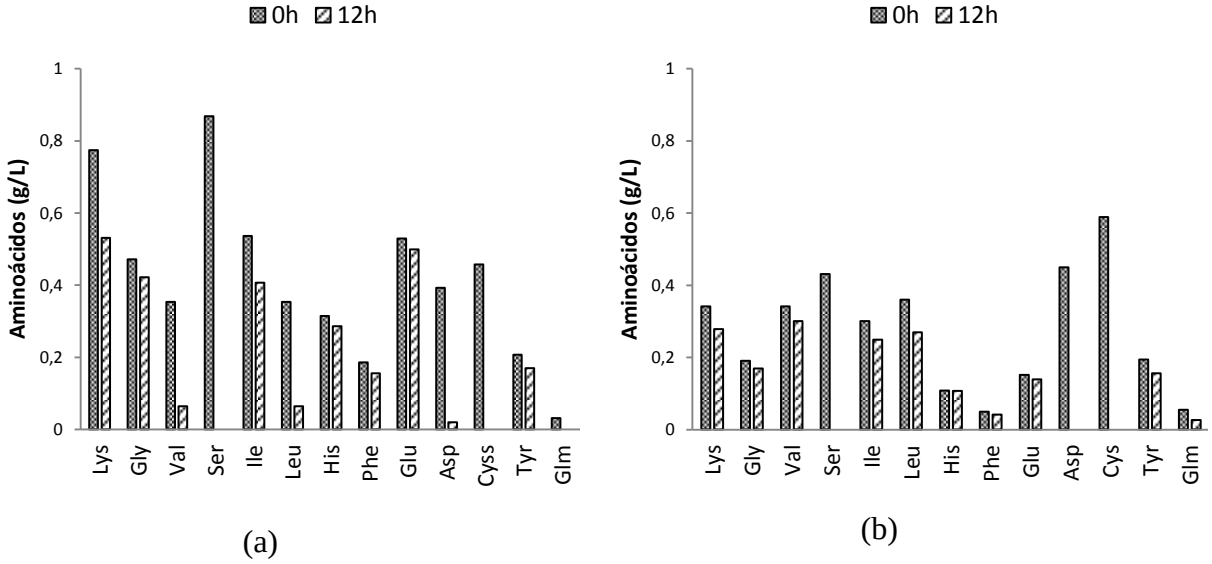


Figura 17 - Consumo de aminoácidos nos ensaios (a) E34 e (b) E44 do PB 44

5.2.3 Análise estatística

A partir da realização da análise estatística dos dados, apresentada na Tabela 6, foi feita uma análise individual de cada componente no intervalo de concentração trabalhado. Portanto, NaCl, Glicina, Fenilalanina, KH_2PO_4 e NAD foram estatisticamente significativos e tiveram efeito negativo à produção de biomassa de Hib, ou seja, o aumento de suas concentrações gerou um menor crescimento de Hib. Enquanto o aumento das concentrações de $CaCl_2.2H_2O$, Serina, Tirosina, Inosina, Tiamina e Hemina gerou um efeito positivo na formação de biomassa. Assim como Serina, Histidina e Tiamina foram estatisticamente significativos e favoreceram a velocidade máxima específica de crescimento e KH_2PO_4,

desfavoreceu. Os outros componentes do meio de cultivo não foram estatisticamente significativos na faixa de concentração estudada em relação a formação de biomassa de Hib.

Em relação à produção de PRP, pode-se inferir que o aumento de NaCl, $MgCl_2.6H_2O$, NH_4Cl, Ácido glutâmico, Tirosina, Triptofano, Fenilalanina, Cisteína, Glicerol, Uracila, KH_2PO_4 e Pantotenato de Cálcio, desviaram as rotas metabólicas de Hib da produção de PRP, já que estes componentes apresentaram efeitos negativos estatisticamente significativos para este parâmetro. Enquanto Glutamina, Hipoxantina, Inosina, Tiamina e Hemina que apresentaram efeito positivo, direcionaram, provavelmente, o metabolismo de Hib para estas vias. Além disso, a presença de Tween 80 no meio de cultivo, por ser um tensoativo, parece favorecer a liberação do polissacarídeo capsular da célula para o sobrenadante do cultivo. Esse fato pode ser interessante para facilitar o *downstream*, na recuperação e purificação do produto de interesse.

O aumento das concentrações de Tirosina, Triptofano, Lactato de Sódio, K_2HPO_4, Tiamina e Hemina geraram efeito positivo para o glicerol residual, tendo em vista que essas variáveis independentes apresentaram efeito estatisticamente significativo positivo para esse parâmetro. Ou seja, o aumento desses componentes no meio de cultivo gerou um aumento do glicerol residual, sugerindo a utilização dos esqueletos carbônicos de compostos diferentes do glicerol para serem utilizados no metabolismo central de Hib. Pelo contrário, o consumo de glicerol foi favorecido por NaCl, Glicina, Fenilalanina, KH_2PO_4 e NAD, que apareceram com efeitos estatisticamente negativos para essa variável dependente.

Para os fatores de conversão, a análise estatística revelou a Inosina com efeito estatisticamente significativo positivo para $Y_{X/S}$ e fenilalanina, negativo. Para $Y_{P/X}$, o aumento de Fenilalanina e o Tween 80 apresentou efeitos estatisticamente significativos positivo e $MgCl_2.6H_2O$, Ácido Glutâmico, Arginina, Serina, Tirosina, Triptofano, Cisteína, Lactato de Sódio, K_2HPO_4 e Tiamina, negativo. Além disso, para $Y_{P/S}$, Glicina e Inosina geraram efeitos positivo, enquanto $MgCl_2.6H_2O$, Tirosina, Triptofano, Cisteína, Lactato de Sódio e K_2HPO_4, negativo.

Tabela 6 – Análise estatística contendo os efeitos das variáveis independentes estudadas no PB 44

Variáveis independentes	DO_{540nm} 10h		$\mu_{máx}$ h^{-1}		Glicerol Residual (g/L)		PRP 10h (mg/L)		Yx/s (DO_{540nm}/g)		Yp/x (mg/DO_{540nm})		Yp/s (mg/g)	
	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
Média	2,5	0,0	0,6	0,0	2,6	0,0	134,8	0,0	1,0	0,0	62,1	0,0	60,4	0,0
Curvatura	4,2	0,0	0,2	0,3	4,3	0,0	25,6	0,2	-0,1	0,8	-59,4	0,0	-59,0	0,0
Cys	-0,1	0,6	0,0	0,8	-0,1	0,4	-6,2	0,2	0,1	0,6	-0,6	0,9	5,6	0,3
NaCl	-0,8	0,0	-0,1	0,4	-0,6	0,0	-38,1	0,0	0,1	0,5	0,3	0,9	6,6	0,3
K_2SO_4	0,0	1,0	0,0	0,6	0,2	0,4	-1,5	0,8	-0,1	0,4	-0,4	0,9	-6,5	0,3
$MgCl_2.6H_2O$	0,0	0,8	0,0	0,6	0,3	0,1	-20,5	0,0	-0,1	0,6	-11,4	0,0	-16,1	0,0
$CaCl_2.2H_2O$	0,6	0,0	0,1	0,3	0,4	0,2	7,9	0,1	0,0	0,9	-4,6	0,3	-2,0	0,7
EDTA	-0,2	0,3	0,0	0,8	-0,1	0,4	-6,7	0,2	0,0	1,0	1,6	0,7	1,8	0,8
NH_4Cl	-0,3	0,1	-0,1	0,2	-0,2	0,2	-25,0	0,0	0,0	0,9	-3,0	0,5	-2,1	0,7
Asp	-0,2	0,3	-0,1	0,3	-0,2	0,5	-8,0	0,1	-0,1	0,7	5,4	0,2	3,9	0,5
Glu	0,0	0,9	0,0	0,7	-0,2	0,2	-20,8	0,0	0,0	1,0	-7,0	0,1	-6,1	0,3
Arg	0,2	0,3	0,1	0,3	0,0	0,8	2,2	0,7	0,2	0,1	-6,9	0,1	8,5	0,2
Gly	-0,4	0,0	0,1	0,3	-0,6	0,0	-3,2	0,5	0,1	0,4	4,9	0,2	12,7	0,0
Lys	0,0	0,9	0,1	0,3	0,2	0,7	-5,8	0,3	0,0	0,9	-2,5	0,5	-2,3	0,7
Met	0,3	0,2	0,1	0,3	0,3	0,3	7,8	0,1	0,1	0,7	-2,8	0,5	-0,8	0,9
Ser	0,4	0,1	0,1	0,1	-0,3	0,4	-0,7	0,9	0,3	0,1	-11,2	0,0	3,4	0,5
His	0,0	1,0	0,1	0,1	-0,3	0,4	-6,7	0,2	0,1	0,5	-4,8	0,3	2,4	0,7
Leu	0,3	0,2	0,0	0,5	0,0	0,9	1,2	0,8	0,1	0,6	-3,3	0,4	1,7	0,8
Tyr	1,0	0,0	0,0	0,6	0,8	0,0	-27,7	0,0	0,0	1,0	-33,8	0,0	-32,7	0,0
Glm	0,1	0,7	0,0	0,7	0,0	0,8	15,1	0,0	0,0	0,8	2,9	0,5	-1,2	0,8
Ile	0,0	0,9	-0,1	0,1	0,0	0,9	-3,4	0,5	0,0	0,9	-2,0	0,6	-3,6	0,5
Trp	0,1	0,6	0,1	0,3	0,4	0,1	-15,7	0,0	-0,1	0,6	-13,9	0,0	-18,0	0,0
Val	0,1	0,8	0,0	0,5	0,2	0,2	-2,3	0,7	-0,2	0,2	4,5	0,3	-6,3	0,3
Phe	-0,9	0,0	-0,1	0,3	-0,6	0,0	-15,6	0,0	-0,3	0,1	14,6	0,0	-4,0	0,5
Cyss	-0,3	0,1	0,0	0,7	-0,2	0,4	-23,2	0,0	-0,1	0,5	-8,9	0,1	-11,1	0,1
Tween 80	-0,1	0,7	0,0	1,0	0,3	0,2	21,0	0,0	-0,2	0,1	14,6	0,0	1,2	0,8
PVA	-0,2	0,3	0,0	0,8	0,0	0,8	3,2	0,5	-0,2	0,3	6,8	0,1	3,0	0,6
Lactato Na^{+1} 50%	0,2	0,4	0,1	0,2	0,5	0,0	-8,4	0,1	-0,2	0,2	-7,8	0,1	-18,2	0,0
Glicerol	-0,3	0,1	0,1	0,4	-0,1	0,5	-20,7	0,0	-0,1	0,7	-5,0	0,2	-5,8	0,3
Uracila	-0,2	0,3	0,0	0,8	-0,2	0,4	-13,1	0,0	-0,1	0,6	-5,4	0,2	-7,2	0,2
Hipoxantina	0,2	0,3	0,0	0,7	0,1	0,6	9,2	0,1	0,1	0,7	3,5	0,4	7,5	0,2
Inosina	0,8	0,0	0,0	0,5	0,1	0,7	39,0	0,0	0,4	0,0	0,9	0,8	22,9	0,0
K_2HPO_4	0,1	0,6	-0,1	0,2	0,5	0,1	-6,2	0,2	-0,1	0,5	-10,0	0,0	-12,4	0,1
KH_2PO_4	-0,5	0,0	-0,1	0,1	-0,5	0,1	-34,8	0,0	-0,1	0,4	-6,5	0,1	-9,0	0,1
Tiamina,HCl	0,4	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	10,4	0,1	0,1	0,6	-9,4	0,0	0,6	0,9
Pantotenato Ca^{+2}	-0,3	0,2	-0,1	0,2	-0,4	0,2	-10,1	0,1	0,0	1,0	-0,2	1,0	1,2	0,8
NAD	-0,4	0,0	0,0	0,7	-0,4	0,1	-7,5	0,2	0,0	0,8	2,2	0,6	1,5	0,8
Hemina	0,8	0,0	0,0	0,8	0,5	0,0	0,2	0,3	-4,3	0,3	5,2	0,4	5,2	0,4

As células em cinza representam os valores estatisticamente significativos ($p<0,1$).

A análise da curvatura, obtida com a realização do ponto central, foi estatisticamente significativa somente para formação de biomassa, enquanto para $Y_{P/X}$ e $Y_{P/S}$ foi negativa. Isto indica que nas condições dos pontos centrais, os valores de respostas obtidos de DO_{540nm} são da mesma ordem de grandeza de ensaios em outras combinações de estudo que deram as maiores respostas obtidas e que o contrário ocorreu com os fatores de conversão.

Com as informações obtidas, torna-se possível avaliar quais componentes devem ter suas concentrações aumentadas e diminuídas para um próximo ensaio, visando um melhor resultado em crescimento e em produção de polissacarídeo capsular por Hib. Inicialmente, pode-se verificar que EDTA, NH_4Cl, PVA e Cisteína podem ser removidos da composição do meio de cultivo sem causar danos aos parâmetros avaliados, já que o aumento de suas concentrações estudadas não geraram efeitos estatisticamente significativos ou geraram efeitos negativos para os parâmetros avaliados.

Nos ensaios prévios, foi possível verificar que a presença de EDTA no meio de cultivo não influenciava no crescimento e produção de PRP de Hib e este fato foi comprovado através do planejamento experimental, já que a presença desse componente no meio de cultivo não gerou efeitos estatisticamente significativos para as variáveis estudadas. Além do mais, os aminoácidos Cistina, Histidina e Glicina, presentes no meio de cultivo estudado, são exemplos de compostos que podem substituir a função do EDTA como agente quelante, já que também são utilizados por este motivo em meios de cultivo (MEYNELL; MEYNELL, 1965). Portanto, poderá ser retirado da composição do meio estudado.

O mesmo ocorreu com a retirada de NH_4Cl do meio de estudo nos ensaios prévios e no delineamento experimental, já que a ausência desse composto não gerou efeitos estatisticamente significativos nos parâmetros estudados, apenas seu aumento gerou efeito negativo para produção de PRP. Além disso, analisando o mapa metabólico de Hib disponível no KEGG (2015), é possível verificar que Hib não incorpora amônia livre como fonte de nitrogênio. Seu aporte deste nutriente é suprido pelos aminoácidos presentes no meio de cultivo explicando, possivelmente, a ausência de NH_4Cl não impactar os parâmetros estudados, principalmente o crescimento de Hib. Dessa forma, NH_4Cl também foi eliminado da composição do meio de cultivo estudado.

Assim como o PVA, que apesar de não ter afetado o crescimento e produção de PRP de Hib nos ensaios prévios, foi mantido na composição do Meio 2.2 por ser considerado um agente detoxificante importante na neutralização de substâncias inibitórias que podem estar presentes no meio de cultivo e metabólitos produzidos, melhorando o crescimento celular de Hib (KLEIN; LUGINBUHL, 1979; MAITRE-WILMOTTE; SPECK; ROKBI, 2009;

WOLIN, 1963). Apesar dos relatos dos benefícios deste componente, não foram observados efeitos estatisticamente significativos para nenhum parâmetro avaliado e, por este motivo, também foi retirado do meio de cultivo para Hib.

Em relação a retirada de Cisteína do meio em estudo, pode-se afirmar que o aumento da concentração desse componente no meio cultivo para Hib gerou resultados com efeitos estatisticamente significativos negativos para produção de PRP e para os fatores de conversão Yp/x e Yp/s, sendo não significativo para os outros parâmetros avaliados. Ou seja, o aumento de Cisteína pode ter desviado as rotas metabólicas de Hib, diminuindo a produção de PRP. Portanto, esse componente será retirado ao meio de cultivo em estudo.

Tendo como base o contexto e a metodologia estatística apresentados, para obtenção de resultados ainda mais satisfatórios para o estudo do metabolismo de Hib e de um meio de cultivo ainda mais direcionado para o crescimento e produção de PBP, seria interessante a realização de, pelo menos, mais um delineamento experimental.

O mesmo raciocínio utilizado para analisar os 4 componentes retirados da composição do meio de cultivo em estudo foi utilizado para os outros 32 componentes, apresentado no Anexo C, e o resultado está apresentado na Tabela 7. Ou seja, avaliou-se individualmente cada componente do meio e as respostas estatísticas geradas através do PB 44, focando sempre nos efeitos positivos e negativos de cada variável em relação a produção de biomassa e PRP. Ou seja, se na faixa de concentração estudada, uma variável independente obteve efeitos positivos para os parâmetros avaliados, sua concentração no próximo delineamento poderá ser aumentada para verificar uma concentração ótima para esse componente. Mas se alguma variável obteve efeito negativo ou não estatisticamente significativo (NES) para os parâmetros estudados, sua concentração poderá ser diminuída. A partir disso, foram escolhidas as faixas de concentração de cada componente que ainda necessita ser estudado definindo, sempre, que um dos níveis (+1 ou -1) esteja dentro na faixa estudada no delineamento anterior para garantir que nenhuma faixa de concentração fique sem ser estudada, conforme apresentado no ANEXO C.

Portanto, sugere-se que 32 componentes ainda necessitam ser estudados através de um delineamento experimental PB de 36 ensaios. Trata-se, dessa forma, de um planejamento experimental sequencial, onde os resultados obtidos em um DOE seriam utilizados no próximo e, assim por adiante, até definir a concentração ideal dos componentes com foco em produção de biomassa e PRP por Hib.

Tabela 7 - Planejamento experimental sequencial proposto

			DOE - PB 44			DOE - PB 36		
Variável	**Componentes**	**Meio 2.2 (g/L)**	**Níveis (g/L)**			**Níveis (g/L)**		
			-1	**0**	**1**	**-1**	**0**	**1**
x1	Cys	0,2	0,2	0,3	0,4	0,1	0,2	0,3
x2	NaCl	5,8	3,6	5,8	8	1	3	5
x3	K_2SO_4	1	0,2	1	1,8	0	0,25	0,5
x4	$MgCl_2,6H_2O$	0,43	0,2	0,4	0,7	0,1	0,2	0,3
x5	$CaCl_2*2H_2O$	0,029	0,01	0,03	0,05	0,04	0,06	0,08
x6	EDTA	0,004	0	0,004	0,008		0	
x7	NH_4Cl	0,22	0	0,2	0,4		0	
x8	Asp	0,5	0,4	0,8	1,2	0,1	0,3	0,5
x9	Glu	1,3	0,02	0,51	1	0,01	0,03	0,05
x10	Arg	0,3	0,1	0,2	0,3	0,05	0,1	0,15
x11	Gly	0,03	0,2	0,4	0,5	0,1	0,15	0,2
x12	Lys	0,05	0,3	0,5	0,6	0,1	0,2	0,3
x13	Met	0,1	0,1	0,2	0,3	0,05	0,1	0,15
x14	Ser	0,1	0,2	0,3	0,4	0,3	0,45	0,6
x15	His	0,01	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3	0,4
x16	Leu	0,3	0,3	0,5	0,7	0,1	0,2	0,3
x17	Tyr	0,2	0,015	0,065	0,115	0,01	0,035	0,06
x18	Glm	0,3	0,5	0,75	1	0,75	1	1,25
x19	Ile	0,05	0,3	0,4	0,5	0,1	0,2	0,3
x20	Trp	0,005	0,03	0,07	0,11	0,01	0,03	0,05
x21	Val	0,02	0,2	0,3	0,4	0	0,15	0,3
x22	Phe	0,015	0,3	0,6	1	0	0,15	0,3
x23	Cyss	0,12	0	0,2	0,3		0	
x24	Tween 80	0,02	0	0,02	0,04	0,04	0,06	0,08
x25	PVA	0,02	0	0,02	0,04		0	
x26	Lactato de Na^{+1} 50%	1,6	0,6	1,6	2,6	0,5	1	1,5
x27	Glicerol	5	3	5	7	2	3,5	5
x28	Uracila	0,1	0,1	0,2	0,3	0,05	0,1	0,15
x29	Hipoxantina	0,02	0	0,02	0,03	0,015	0,0375	0,06
x30	Inosina	2	0,3	1,15	2	0,5	1,5	2,5
x31	K_2HPO_4	3,5	2	3,5	5	1	2,5	4
x32	KH_2PO_4	2,7	1,4	2,7	4	0	0,75	1,5
x33	Tiamina,HCl	0,0045	0,005	0,01	0,015	0,01	0,015	0,02
x34	Pantotenato de Ca^{+2}	0,004	0,002	0,003	0,004	0,001	0,002	0,003
x35	NAD	0,004	0,004	0,007	0,01	0,002	0,004	0,006
x36	Hemina	0,01	0,01	0,015	0,02	0,015	0,0225	0,03

6 ANÁLISE DE CUSTO

Considerando que meios de cultivo quimicamente definidos possuem alto custo de produção devido a pureza necessária de seus componentes, uma análise do custo da formulação dos meios estudados vinculada à produção do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b obtida foi realizada.

Os valores apresentados na Tabela 8 são referentes ao custo, em dólares, do grama de cada componente dos meios de cultivo estudados da marca Sigma-Aldrich, cotadas no mês de julho de 2016. A marca dos reagentes foi escolhida por ser uma marca certificada por atender às especificações das principais farmacopeias mundialmente vigentes (USP, BP e EP), fato considerado extremamente importante na produção de injetáveis. Além disso, a Tabela 8 apresenta os meios de cultivo estudados que tiveram os menores custos de composição por litro e os que proporcionaram as maiores produções de PRP por litro. Os valores da cotação completa dos reagentes e da composição de cada meio de cultivo estudado estão apresentados nos ANEXOS C e D, respectivamente.

Como já observado anteriormente, a produção de PRP do Meio 2.2 não foi superada por nenhum meio que constituiu o delineamento PB 44. Entretanto, a análise de custo nos proporcionou verificar que o menor valor obtido do grama de PRP foi alcançado com a composição do E44 que, como pode ser observado no Anexo A, corresponde ao meio em que todos os componentes estão com suas concentrações no nível -1. Dessa forma, o custo do meio desse ensaio sempre será o menor em qualquer delineamento PB, entretanto o valor do produto de interesse depende de quanto foi produzido em todos os ensaios. Como pode ser visto na Tabela 8, a produção de PRP neste ensaio foi de 226, 36 mg/L enquanto que o maior resultado obtido neste delineamento foi de 227,15 mg/L no E34, ou seja, uma diferença que pode ser desconsiderada. Conferindo, portanto, a esse meio de cultivo, a melhor condição de custo/benefício para produção de polissacarídeo capsular de Hib em meio quimicamente definido relatado até o momento, já que possui o menor custo de composição de meio e uma das maiores produções de PRP.

Além disso, os resultados obtidos reforçam a importância de um estudo detalhado para definição de um meio de cultivo para produção de um produto de interesse. O valor do grama de PRP produzido no meio E44 corresponde a uma economia de 52% em relação ao Meio 2.2, o que em larga escala se torna ainda mais significativo.

Tabela 8 - Avaliação do valor do grama de PRP produzido em 10h de cultivo nos meios de cultivo estudados que se destacaram em relação a maiores produções de PRP e menores custos de composição

Componentes	**Custo**	**Concentração (g/L)**							
	US$/g	**Meio 2.2**	**E6**	**E11**	**E16**	**E34**	**E35**	**E39**	**E44**
L-Cistina	0,50	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2	0,2	0,4	0,2
NaCl	0,04	5,8	8	8	8	3,6	3,6	3,6	3,6
K_2SO_4	0,22	1	0,2	0,2	1,8	1,8	0,2	1,8	0,2
$MgCl_2.6H_2O$	0,13	0,43	0,2	0,2	0,2	0,2	0,66	0,66	0,2
$CaCl_2.2H_2O$	0,09	0,029	0,3	0,3	0,3	0,03	0,03	0,03	0,03
EDTA	0,17	0,004	0,008	0	0,008	0	0	0	0
NH_4Cl	0,14	0,22	0	0,44	0,44	0	0	0	0
Ácido aspártico	0,22	0,5	1,2	0,42	0,42	0,42	0,42	1,2	0,42
Ácido glutâmico	0,08	1,3	1	0,02	0,02	1	0,02	0,02	0,02
Arginina	0,29	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1
Glicina	0,09	0,03	0,5	0,5	0,2	0,5	0,5	0,2	0,2
Lisina	0,14	0,05	0,3	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,3
Metionina	0,47	0,1	0,3	0,3	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1
Serina	0,82	0,1	0,4	0,4	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2
Histidina	0,52	0,01	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,3	0,1
Leucina	0,65	0,3	0,3	0,7	0,7	0,3	0,3	0,7	0,3
Tirosina	0,61	0,2	0,015	0,015	0,015	0,115	0,015	0,015	0,015
Glutamina	0,43	0,3	1	1	1	1	1	1	0,5
Isoleucina	1,32	0,05	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3
Triptofano	0,81	0,005	0,03	0,03	0,03	0,11	0,11	0,03	0,03
Valina	0,66	0,02	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2
Fenilalanina	0,62	0,015	0,25	0,25	0,25	0,25	1	1	0,25
Cisteína.HCl.H2O	0,55	0,12	0	0,3	0,3	0,3	0	0,3	0
Tween 80	0,12	0,02	0,04	0	0,04	0,04	0,04	0,04	0
PVA	0,13	0,02	0,04	0	0	0,04	0,04	0,04	0
Lactato de sódio 50%	0,13	1,6	2,6	0,6	0,6	0,6	2,6	2,6	0,6
Glicerol	0,14	5	3	3	3	3	3	3	3
Uracila	0,74	0,1	0,3	0,1	0,3	0,3	0,1	0,3	0,1
Hipoxantina	3,82	0,02	0	0,03	0	0	0,03	0,03	0
Inosina	2,33	2	0,25	2	0,25	2	0,25	2	0,25
K_2HPO_4	0,19	3,5	2	5	2	2	5	2	2
KH_2PO_4	0,13	2,7	4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Tiamina.HCl	0,94	0,0045	0,015	0,015	0,005	0,015	0,005	0,015	0,005
Pantotenato de cálcio	2,58	0,004	0,004	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002
NAD	11,75	0,0095	0,01	0,004	0,01	0,004	0,01	0,01	0,004
Hemina	5,35	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01
PRP (mg/L)		252,16	181,67	217,46	164,66	227,15	175,72	217,27	226,36
Meio (US$/1L)		8,69	5,59	10,11	5,98	9,54	6,26	10,48	3,73
PRP (US$/g)		34,45	30,74	46,49	36,29	41,99	35,65	48,22	16,48

7 CONCLUSÕES

Visando estudar o metabolismo de *Haemophilus influenzae* tipo b e estabelecer um meio quimicamente definido a fim de melhorar o processo de produção de seu polissacarídeo capsular, foram realizados experimentos baseados em meios quimicamente definidos relatados na literatura para este microrganismo. Estes experimentos foram considerados ensaios prévios pela necessidade de avaliar o desenvolvimento de Hib em meios quimicamente definidos, verificar respostas metabólicas sugeridas por relatos literários e, dessa forma, definir uma composição de meio basal que proporcionasse um crescimento e produção de PRP significativa. Como foi possível verificar, a produção de PRP por Hib em meio quimicamente definido é da mesma ordem de grandeza do que em meios complexos. Dessa forma, obteve-se a composição do Meio 2.2 que foi avaliado através de planejamento de experimento PB.

O delineamento experimental PB de 44 ensaios realizado possibilitou verificar os efeitos de cada componente do meio de cultivo na faixa de concentração estudada em relação ao parâmetros avaliados. Com o Meio 2.2 utilizado como referência, Hib atingiu em média uma DO_{540nm} de 2,14 UA e 252,16 mg/ L de PRP em 10 horas de cultivo. Enquanto que os meios de cultivos gerados a partir do PB 44 possibilitaram obter valores de DO_{540nm} em 10 horas de cultivo que variaram entre 0,19 e 4,96 UA, $\mu_{máx}$ de 0,4 a 1,07 $h^{-1,}$ produção de polissacarídeo de 10,61 a 227,15 mg/L na 10ª hora de cultivo e os fatores de conversão $Y_{X/S}$ atingiu valores máximos de 2,72 UA/g, enquanto $Y_{P/S}$ 147,55 mg/g e $Y_{P/X}$ 143,47 mg/UA. Portanto, o valor de produção de PRP obtido no Meio 2.2 não foi superado pelos ensaios do PB, mas em alguns ensaios Hib teve destaque em crescimento.

Também com o delineamento experimental aplicado, que possibilita avaliar a interação entre todos os componentes, foi possível comprovar alguns resultados obtidos nos ensaios prévios e a eliminação de quatro componentes do meio de cultivo em estudo sem ocasionar danos nos parâmetros avaliados: EDTA, NH_4Cl, Cisteína e PVA. Além disso, $CaCl_2.2H_2O$, Serina, Tirosina, Inosina, Tiamina e Hemina gerou um efeito positivo na formação de biomassa. Em relação à produção de PRP, Glutamina, Hipoxantina, Inosina, Tiamina e Hemina apresentaram efeito positivo, direcionaram, provavelmente, o metabolismo de Hib para estas vias. Além disso, a presença de Tween 80 no meio de cultivo, por ser um tensoativo, parece favorecer a liberação do polissacarídeo capsular da célula para o sobrenadante do cultivo.

Com os resultados obtidos com o delineamento de PB 44, foi possível avaliar cada componente do meio de cultivo estudado individualmente novamente e sugeriu-se continuar a avaliação desses componentes visando um resultado ainda mais robusto de um meio quimicamente definido otimizado para crescimento e produção de polissacarídeo capsular de Hib através de um PB de 36 ensaios.

Analisando todos os meios de cultivo apresentados, foi possível verificar que a composição do E44 gerou um melhor custo/benefício para cultivo e produção de PRP por Hib no valor de US$ 16,50 o grama do produto de interesse. Assim, o E44 torna-se o meio quimicamente definido estabelecido neste trabalho com melhores resultados para os parâmetros analisados.

REFERÊNCIAS*

ABDEL-FATTAH, Y. R. et al. Improved production of Pseudomonas aeruginosa uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1707–1714, abr. 2005.

AGRAWAL, A.; MURPHY, T. F. Haemophilus influenzae infections in the H. influenzae type b conjugate vaccine era. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3728–3732, nov. 2011.

ALBANI, S. M. F. et al. Improvement in the purification process of the capsular polysaccharide from haemophilus influenzae type b by using tangential ultrafiltration and diafiltration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 7, p. 2068–2075, 2012.

ALBANI, S. M. F. et al. Polysaccharide purification from Haemophilus influenzae type b through tangential microfiltration. **Carbohydrate Polymers**, n. June, 2014.

ALEXANDER, H. E. Bacterial and Mycotic Infections of Man. In: **The haemophilus group**. [s.l: s.n.] v. 39, p. 727–741, 1965.

AVERY, O. T., GOEBEL, W. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins. **Exp. Med.**, v. 50, n. 4, p. 533–550, 1929.

BALTZ, R. H.; DAVIES, J. E.; DEMAIN, A. L. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology (3rd Edition)**. [s.l.] Washington: ASM, 2010.

BIGGERS, J. D.; SUMMERS, M. C.; MCGINNIS, L. K. Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos. **Human reproduction update**, v. 3, n. 2, p. 125–135, 1997.

BISGARD, K.M. et al. Haemophilus influenzae invasive disease in the United States, 1994-1995: Near disappearence of a Vaccine-Preventable childhood disease. **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 2, p. 229 - 237, 1998.

BOOY, R. et al. Vaccine failures after primary immunisation with Haemophilus influenzae type-b conjugate vaccine without booster. **Lancet**, v. 349, n. 9060, p. 1197–1202, 1997.

*De acordo com:

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

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455–475, nov. 1960.

BRAGA, L. . et al. Mathematical model for simultaneous microfiltration and ultrafiltration of Haemophilus influenzae type b to cell separation and polysaccharide recovery. **Journal of Membrane Science**, v. 481, n. June, p. 188–194, 2015.

BRAGG, R. R.; COETZEE, L.; VERSCHOOR, J. A. Plasmid-encoded NAD independence in some South African isolates of Haemophilus paragallinarum. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, v. 60, n. 2, p. 147–152, 1993.

BREED, R. S., MURRAY, E. G. D., SMITH, N. R. **Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology**. 7th. ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1957.

BREUKELS, M. A., RIJKERS, G. T., VOORHORST-OGINK, M. M., ZEGER, B. J. M. Regulatory T cells in the antibody response to Haemophilus influenzae type b polysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 789 - 793, 1999.

BUTLER, L. A defined medium for Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae. **Journal of general microbiology**, v. 27, p. 51–60, 1962.

CARMODY, J.; HERRIOTT, R. Thymine and thymidine uptake by Haemophilus influenzae and the labeling of deoxyribonucleic acid. **Journal of bacteriology**, v. 101, n. 2, 1970.

CINTRA, F. O. **Modelagem Matemática e Otimizaçao da Produção de Exopolissacarídeo de Haemophilus influenzae tipo b**. [s.l: s.n.], 2015.

COLEMAN, H.; DAINES, D. Chemically defined media for growth of Haemophilus influenzae strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4408–4410, 2003.

CRISEL, R. M., BAKER, R. S., DORMAN, D. E. Capsular polymer of Haemophilus influenzae, Type b. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 13, p. 4926–4930, 1975.

EVANS, N. Haemin and nicotinamide adenine dinucleotide requirements of Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae. **Journal of medical microbiology**, v. 7, p. 359–365, 1974.

FAN, X. et al. Multiple mechanisms for choline transport and utilization in Haemophilus influenzae. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 537–548, 2003.

FINNEY, L. J. et al. Lower airway colonization and inflammatory response in COPD: a focus on Haemophilus influenzae. **International journal of chronic obstructive pulmonary**

disease, v. 9, p. 1119–1132, jan. 2014.

FLEISCHMANN, R.; ADAMS, M.; WHITE, O. Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 496–512, 1995.

GRANICK, S.; GILDER, H. The porphyrin requirements of Haemophilus influenzae and some functions of the vinyl and propionic acid side chains of heme. **The Journal of general physiology**, v. 30, n. 1, p. 1–13, 1946.

HAJJEH, R. A. et al. Supporting new vaccine introduction decisions: Lessons learned from the Hib Initiative experience. **Vaccine**, v. 28, n. 43, p. 7123–7129, 2010.

HE, G. et al. Improved elastase production by Bacillus sp. EL31410--further optimization and kinetics studies of culture medium for batch fermentation. **Journal of Zhejiang University. Science**, v. 5, n. 2, p. 149–156, fev. 2004.

HERRIOTT, R. et al. Defined medium for growth of Haemophilus influenzae. **Journal of bacteriology**, v. 101, n. 2, p. 513–516, 1970.

HERRIOTT, R.; MEYER, E.; VOGT, M. Defined nongrowth media for stage II development of competence in Haemophilus influenzae. **Journal of bacteriology**, v. 101, n. 2, p. 517–524, 1970.

JAYME, D. W.; SMITH, S. R. Media formulation options and manufacturing process controls to safeguard against introduction of animal origin contaminants in animal cell culture. **Cytotechnology**, v. 33, n. 1-3, p. 27–36, jul. 2000.

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Disponível em < www.genome.jp/kegg/ >. Acesso em 20 jun. 2016.

KENNEDY, M.; KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. **Journal of Industrial Microbiology and …**, v. 2, n. 3, p. 201–208, 1 mar. 1999.

KILIAN, M. A taxonomic study of the genus Haemophilus, with the proposal of a new species. **Journal of general microbiology**, v. 93, n. 1, p. 9–62, 1976.

KLEIN, R.; LUGINBUHL, G. Simplified media for the growth of Haemophilus influenzae from clinical and normal flora sources. **Journal of general microbiology**, v. 04, n. 1979, p. 409–411, 1979.

KOLKER, E.; PURVINE, S. H. influenzae consortium: integrative study of H. influenzae-human interactions. **Omics: a journal of Integrative Biology**, v. 6, n. 4, p. 341–348, 2002.

KROLL, J. S.; MOXON, E. R. Capsulation and Gene Copy Number at the cap Locus of Haemophilus influenzae Type b. **Journal of bacteriology**, v. 170, n. 5, p. 2418, 1988.

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

MAITRE-WILMOTTE, G.; SPECK, D.; ROKBI, B. **Culture medium for Haemophilus influenzae type BUS Patent 8,673,617**, 2009. Disponível em: <http://www.google.com/patents/US8673617>. Acesso em: 12 nov. 2014

MERRITT, J. et al. Development and scale-up of a fed-batch process for the production of capsular polysaccharide from Haemophilus influenzae. **Journal of Biotechnology**, v. 81, n. 2-3, p. 189–197, 2000.

NELSON, D.; LEHNINGER, A.; COX, M. **Lehninger principles of biochemistry**. [s.l: s.n.]. 2008.

NIVEN, D. F.; O'REILLY, T. Significance of V-factor dependency in the taxonomy of Haemophilus species and related organisms. **International journal of systematic bacteriology**, v. 40, n. 1, p. 1–4, 1990.

NORDEN, C. W. Haemophilus influenzae type b. **Bacterial infections of humans**. Ed. Evans, A.S. e Feldman, H. A. Plenum, New York, p. 259 – 273, 1982.

O'REILLY, T.; NIVEN, D. F. Defining the metabolic and growth responses of porcine haemophili to exogenous pyridine nucleotides and precursors. **Journal of general microbiology**, v. 132, n. 3, p. 807–818, 1986.

OMS. Weekly epidemiological record. **World Health Organ**, v. 81, n. 47, p. 445–452, 2007.

OTHMAN, D. S. M. P. et al. Metabolic versatility in Haemophilus influenzae: a metabolomic and genomic analysis. **Frontiers in microbiology**, v. 5, n. March, p. 69, jan. 2014.

OTHMAN, S. M. P. et al. Metabolic versatility in Haemophilus influenzae: a metabolomic and genomic analysis. **Frontiers in microbiology**, v. 5, n. March, p. 69, jan. 2014.

PELTOLA, H. Worldwide Haemophilus influenzae type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 2, p. 302–317, abr. 2000.

PITTMAN, M. Variation and Type Specificity in the Bacterial Species Hemophilus Influenzae. **The Journal of experimental medicine**, v. 53, n. 4, p. 471–492, 1931.

PLACKETT, R.; BURMAN, J. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305–325, 1946.

RANHAND, J.; HERRIOTT, R. Inosine and lactate: factors critical during growth for development of competence in Haemophilus influenzae. **Biochemical and biophysical research …**, v. 22, n. 5, p. 591–596, 1966.

RIBEIRO, M.; SILVA. **Estratégias de cultivo para a produção de polissacarídeo capsular por Haemophilus influenzae tipo b e determinação de parâmetros de qualidade para o produto**. [s.l: s.n.], 2010.

SCHILLING, C. H.; PALSSON, B. O. Assessment of the metabolic capabilities of Haemophilus influenzae Rd through a genome-scale pathway analysis. **Journal of theoretical biology**, v. 203, n. 3, p. 249–283, 7 abr. 2000.

TAKAGI, M. et al. Characterization of polysaccharide production of haemophilus influenzae Type b and its relationship to bacterial cell growth. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 110, n. 2, p. 91–100, 2003.

TAKAGI, M. et al. Improved cultivation conditions for polysaccharide production byH. influenzae type b. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 182–188, 2006.

TAKAGI, M. et al. Purification of capsular polysaccharide produced by Haemophilus influenzae type b through a simple, efficient and suitable method for scale-up. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1217–1222, 2008.

TALMADGE, M.; HERRIOTT, R. A chemically defined medium for growth, transformation, and isolation of nutritional mutants of Hemophilusinfluenzae. **Biochemical and Biophysical Research …**, v. 2, n. 3, p. 203–206, 1960.

TURK, D. C.; GREEN, C. A. Measurement of Antibodies Reacting With Capsular Antigens of Haemophilus Influenzae. **Journal of clinical pathology**, v. 17, p. 294–296, 1964.

TURK, D. C. The pathogenicity of Haemophilus influenzae. **Journal Medical Microbiology**, v. 18, p. 1 - 16, 1982.

WENGER, J. D. Epidemiology of Haemophilus influenzae type b and impact of Haemophilus influenzae type b conjuted vaccines in the United States and Canada. **Pediactric Infectious**

Disease Journal, v. 17, p. 132 - 136, 1998.

WINDSOR, H. M.; GROMKOVA, R. C.; KOORNHOF, H. J. Plasmid-mediated NAD independence in Haemophilus parainfluenzae. **Journal of general microbiology**, v. 137, n. 10, p. 2415–2421, 1991.

WINDSOR, H. M., GROMKOVA, R. C., KOORNHOF, H. J. Growth characteristics of V factor-independent transformants of Haemophilus influenzae. **International journal of systematic bacteriology**, v. 43, n. 4, p. 799–804, 1993.

WOLIN, H. Defined medium for Haemophilus influenzae type b. **Journal of bacteriology**, v. 85, p. 253–254, 1963.

YERUVA, S. et al. SCREENING OF MEDIUM COMPONENTS FOR POLYRIBOSYL RIBITOL PHOSPHATE PRODUCTION BY HAEMOPHILUS INFLUENZAE TYPE-B USING. **Journal of Cell & Tissue Research**, v. 10, n. 3, p. 2349–2352, 2010.

ZAMENHOF, S. et al. Polyribophosphate, the type-specific substance of Hemophilus influenzae, type b. **The Journal of biological chemistry**, v. 203, n. 2, p. 695–704, ago. 1953.

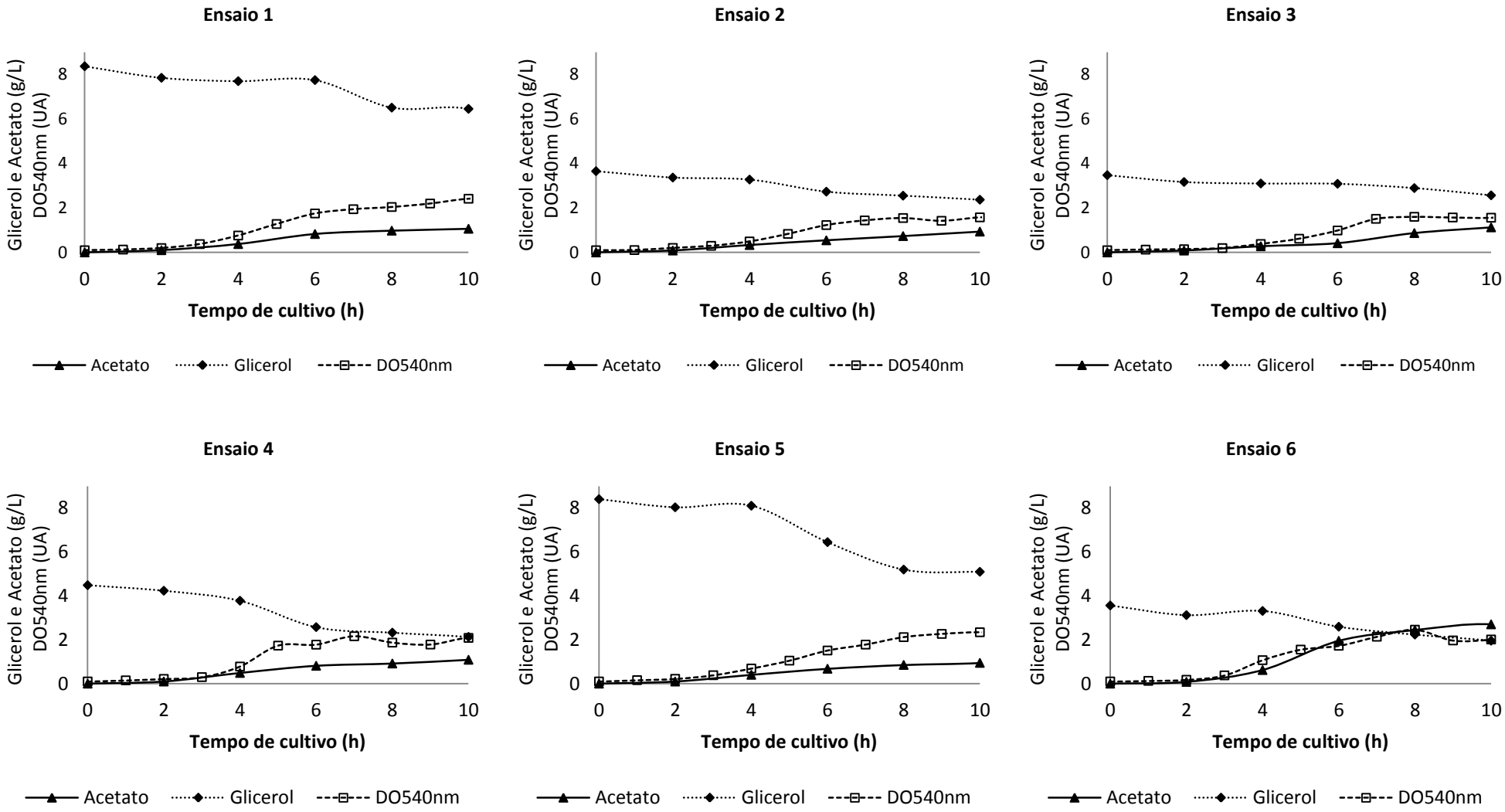
ZOLLI, M., KOBRIC, D.J., BROWN, E.D. Reduction Precedes Cytidylyl Transfer without Substrate Channeling in Distinct Active Sites of the Bifunctional CDP-Ribitol Synthase from Haemophilus influenzae. **Biochemistry**, v. 40, n.16, p. 5041-5048, 2001.

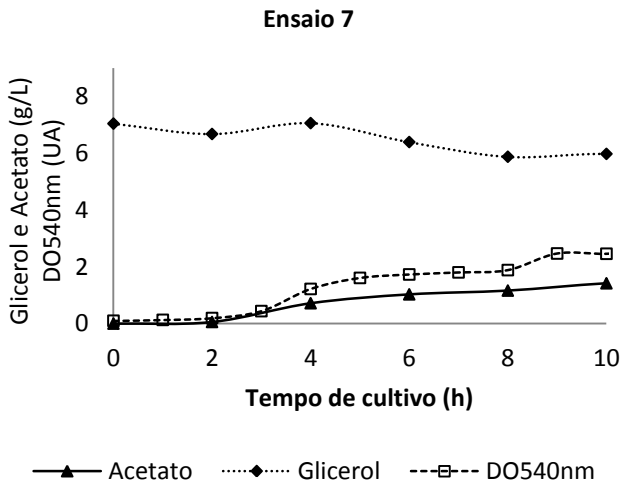
ANEXOS

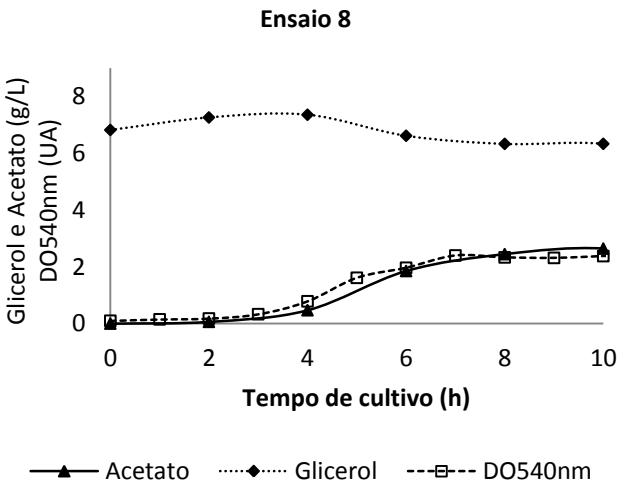
A - Matriz Plackett-Burman de 44 ensaios e 3 pontos centrais

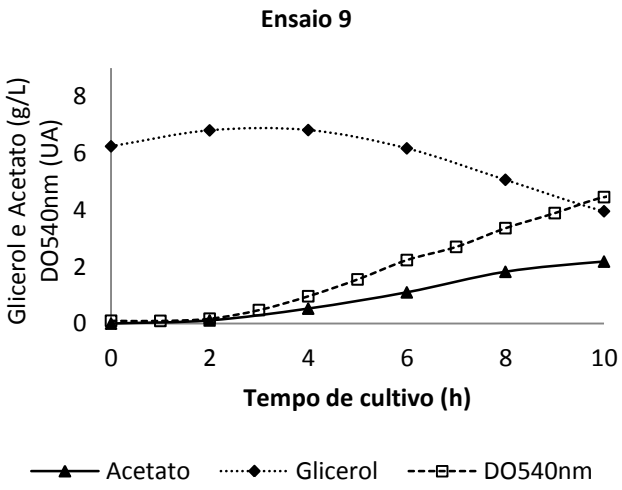
Ensaios	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7	x8	x9	x10	x11	x12	x13	x14	x15	x16	x17	x18	x19	x20	x21	x22	x23	x24	x25	x26	x27	x28	x29	x30	x31	x32	x33	x34	x35	x36	x37	x38	x39	x40
1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1
2	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1
4	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1
5	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1
6	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1
7	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1
8	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1
9	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1
10	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1
11	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1
12	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
13	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
15	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
16	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1
17	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1
18	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
19	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
20	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
21	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1
22	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1
23	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1
24	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1
25	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1
26	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1
27	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
28	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1
29	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1
30	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1
31	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1
32	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1
33	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1
34	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
35	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1
36	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1
37	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1
38	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1
39	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1
40	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1
41	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1
42	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1
43	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1
44	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
PC 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PC 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PC 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

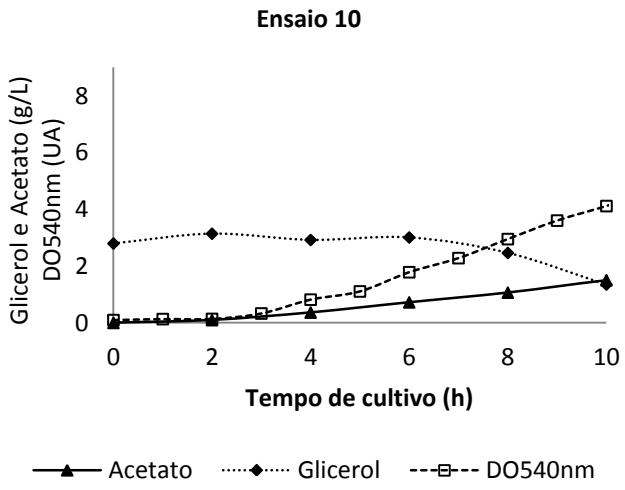
B - Perfis cinéticos de crescimento, produção de acetato e glicerol residual dos ensaios do PB 44

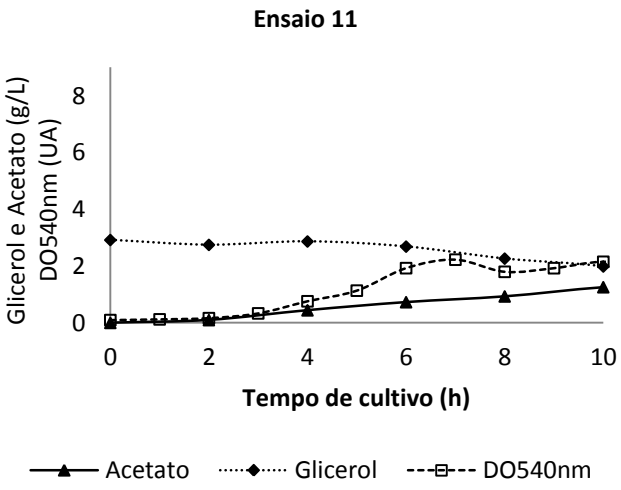


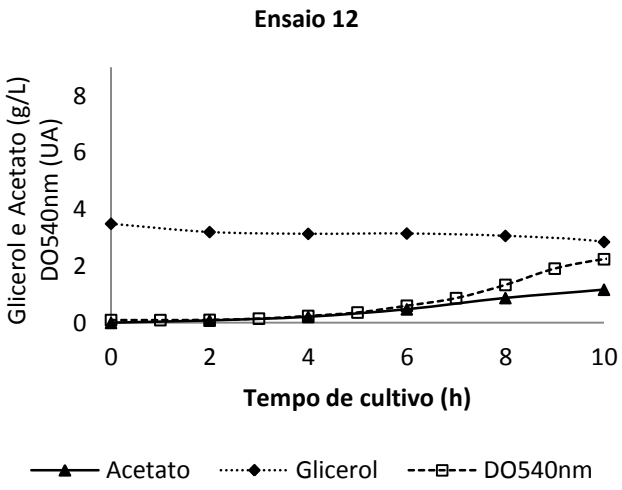

Ensaio 7
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

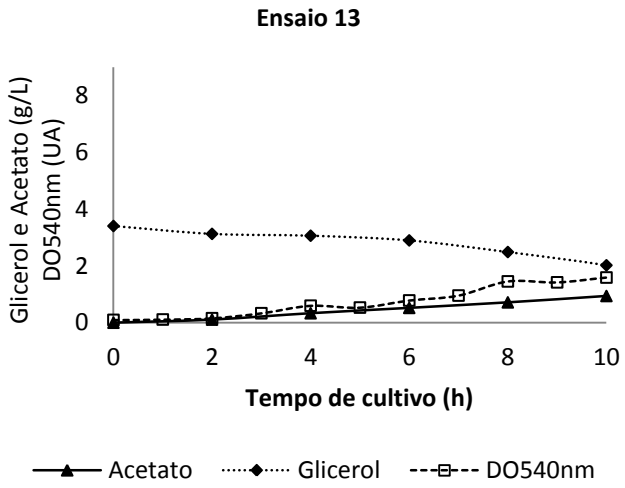

Ensaio 8
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

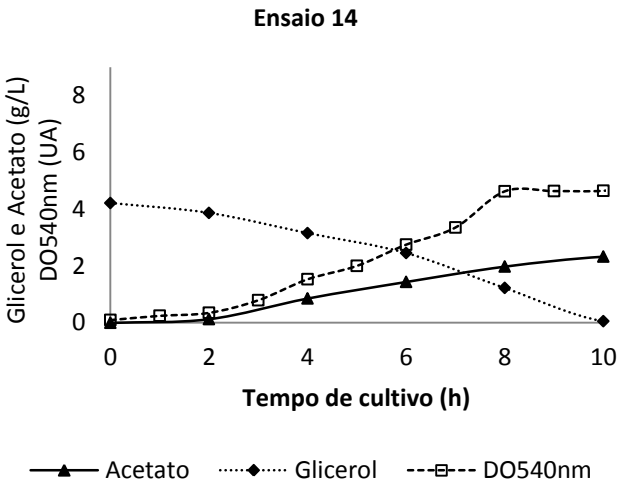

Ensaio 9
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

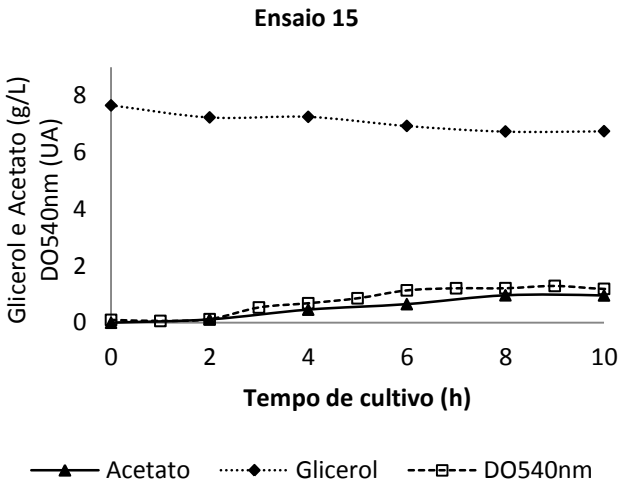

Ensaio 10
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

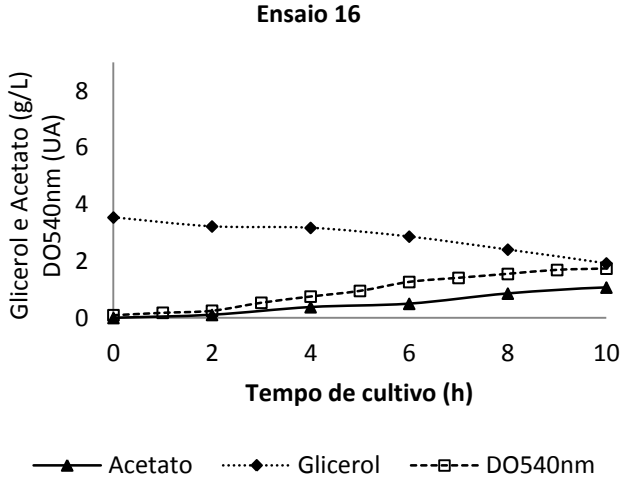

Ensaio 11
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

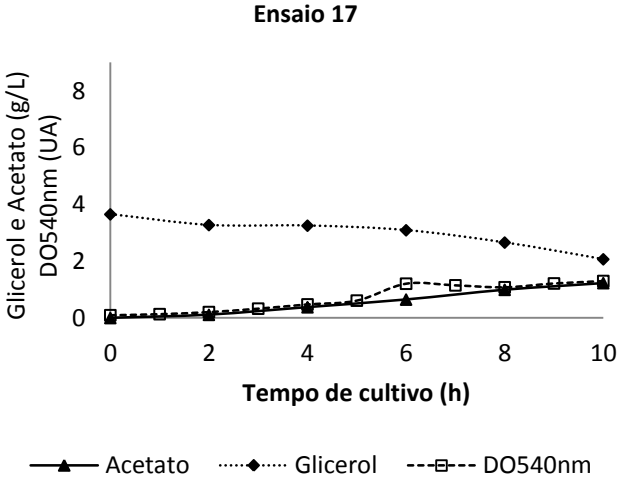

Ensaio 12
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

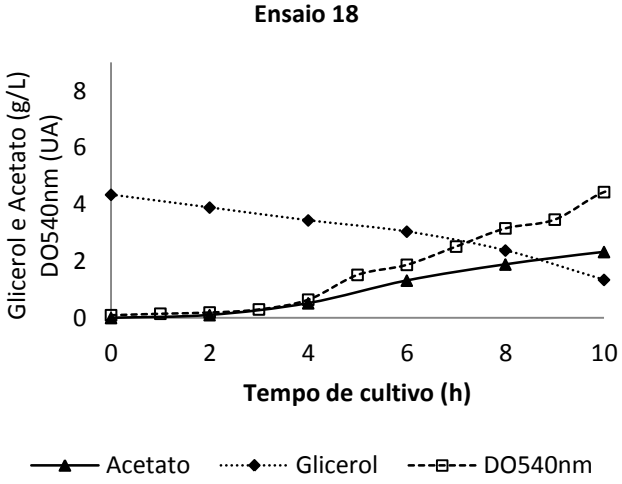

Ensaio 13
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

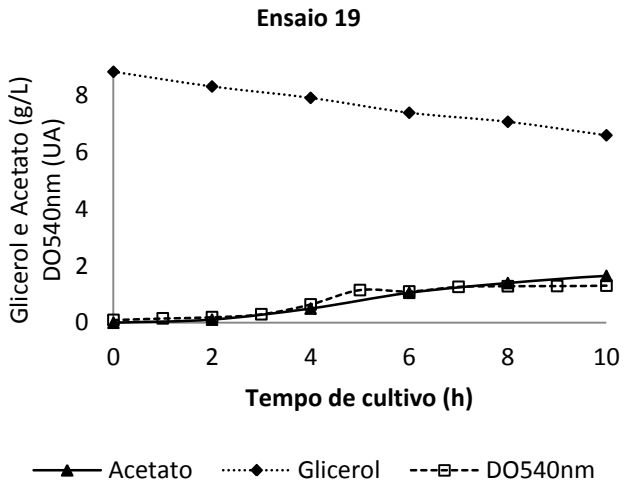

Ensaio 14
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

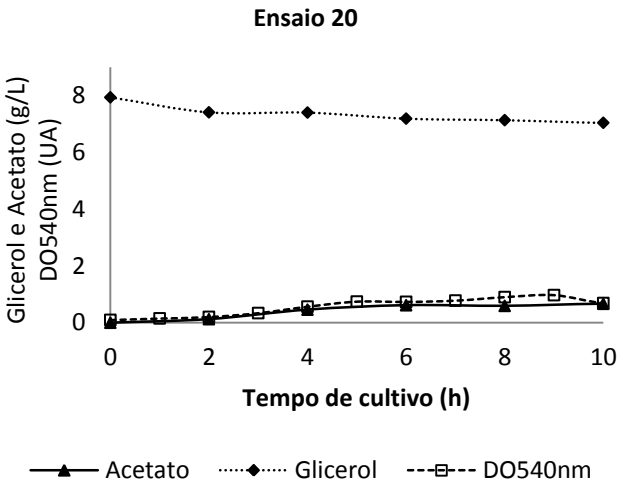

Ensaio 15
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

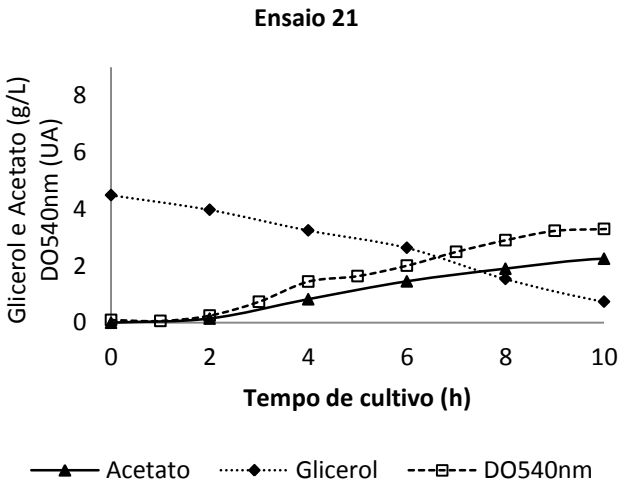

Ensaio 16
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

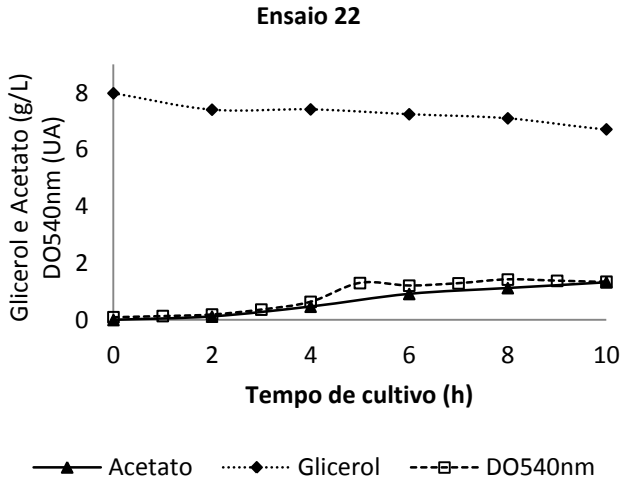

Ensaio 17
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

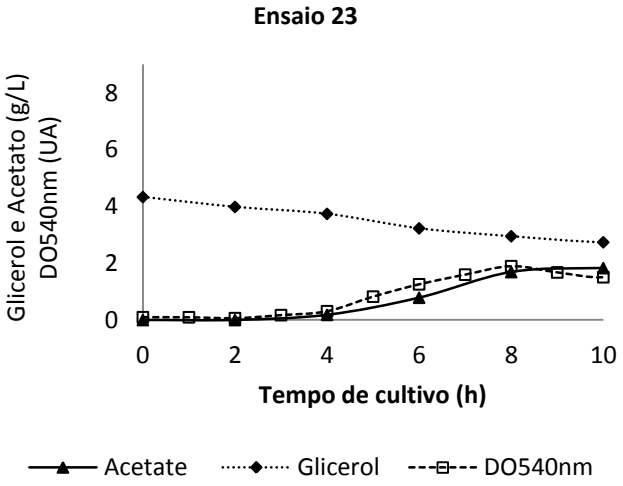

Ensaio 18
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

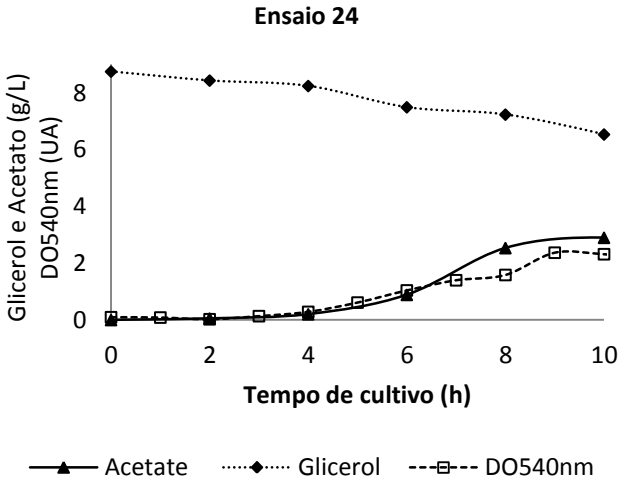

Ensaio 19
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

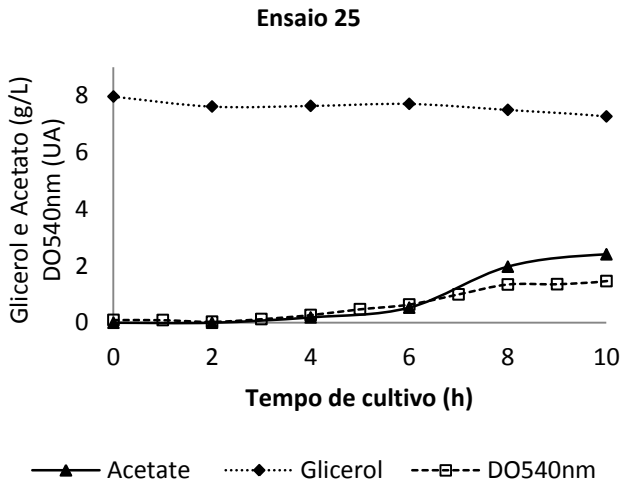

Ensaio 20
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

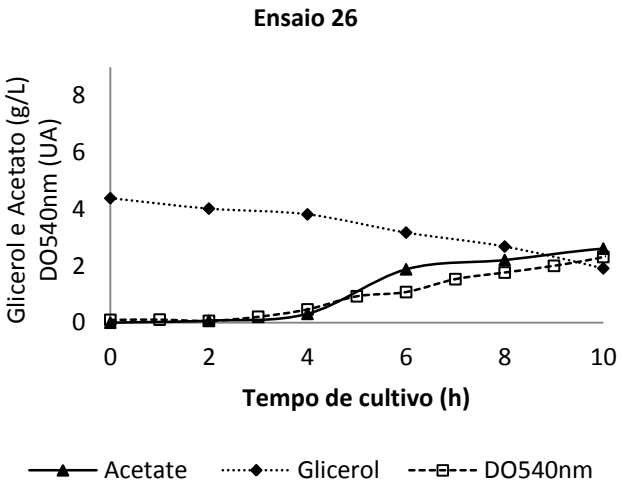

Ensaio 21
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

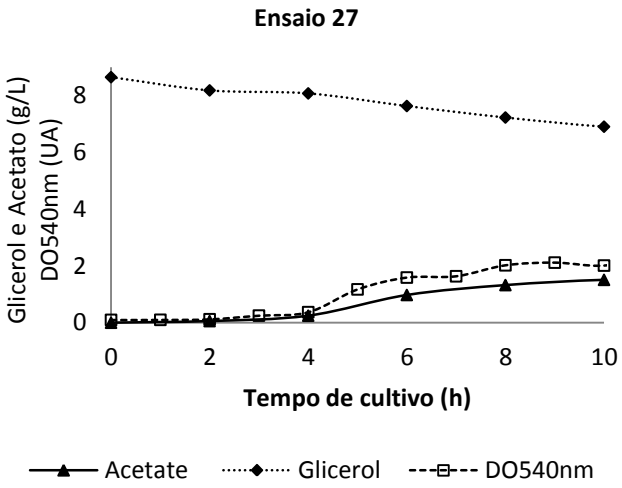

Ensaio 22
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

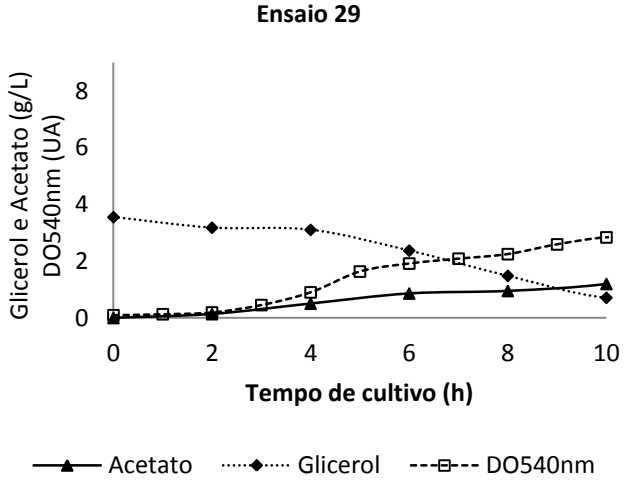

Ensaio 23
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetate
Glicerol
DO540nm

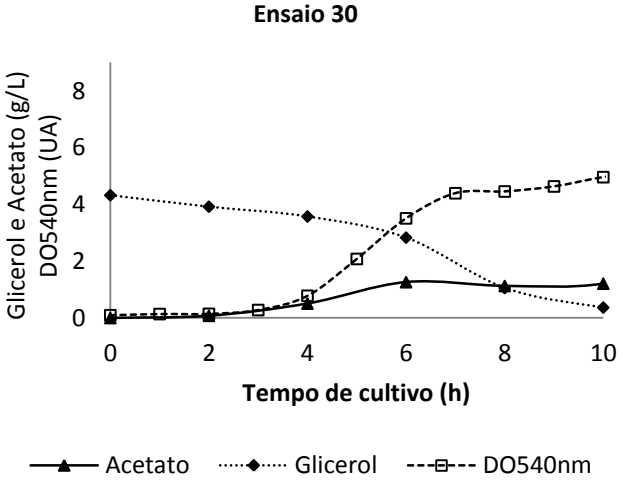

Ensaio 24
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetate
Glicerol
DO540nm

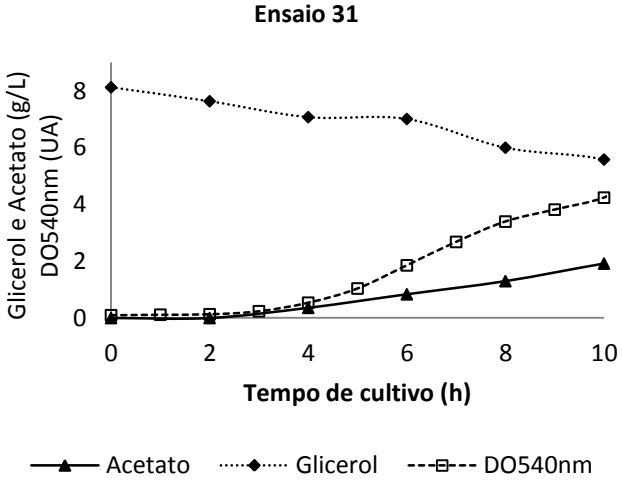

Ensaio 25
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetate
Glicerol
DO540nm

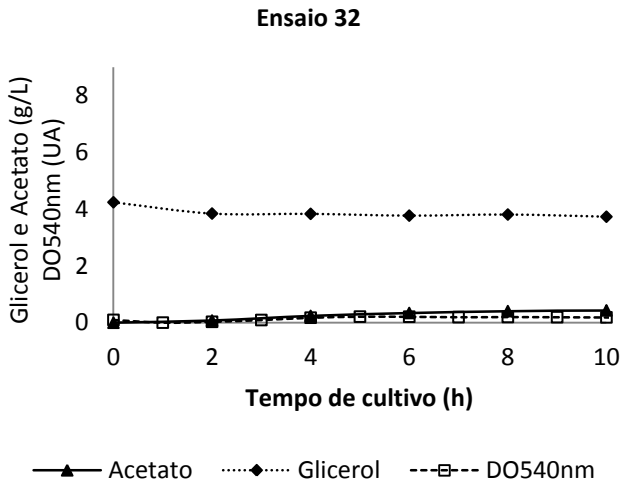

Ensaio 26
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetate
Glicerol
DO540nm

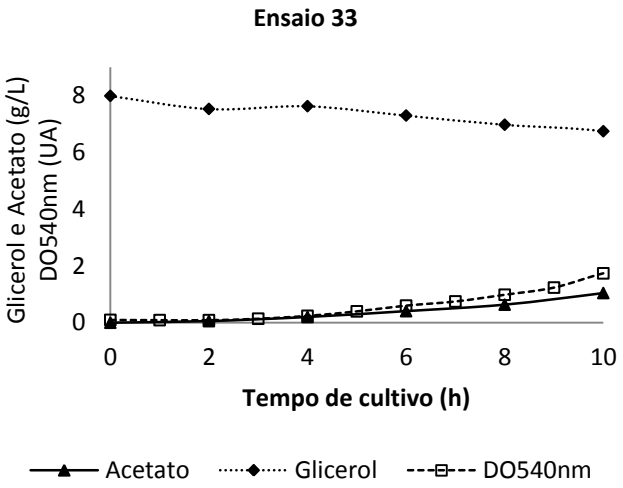

Ensaio 27
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetate
Glicerol
DO540nm

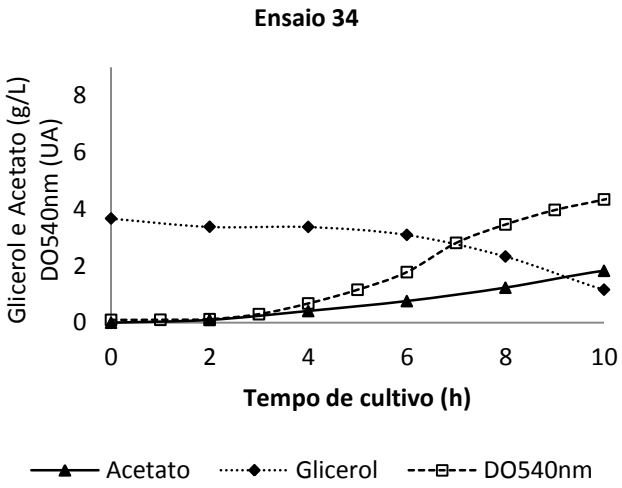

Ensaio 29
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

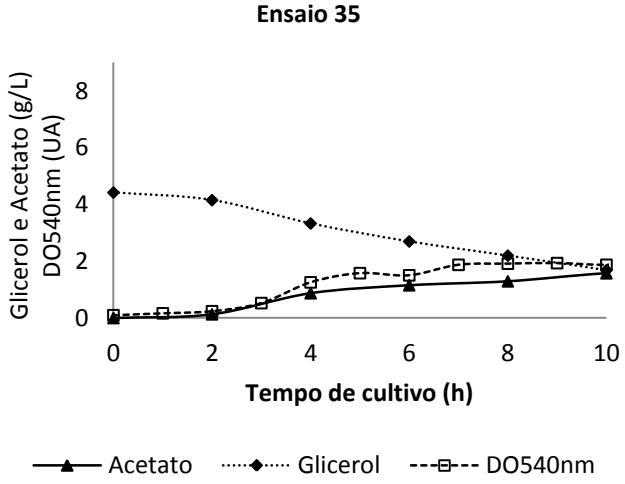

Ensaio 30
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

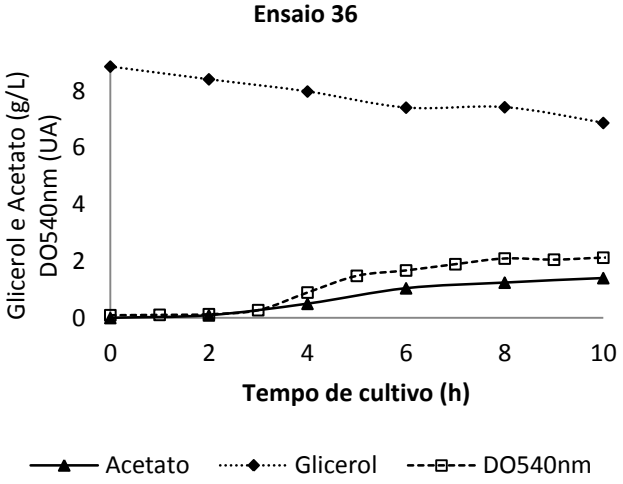

Ensaio 31
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

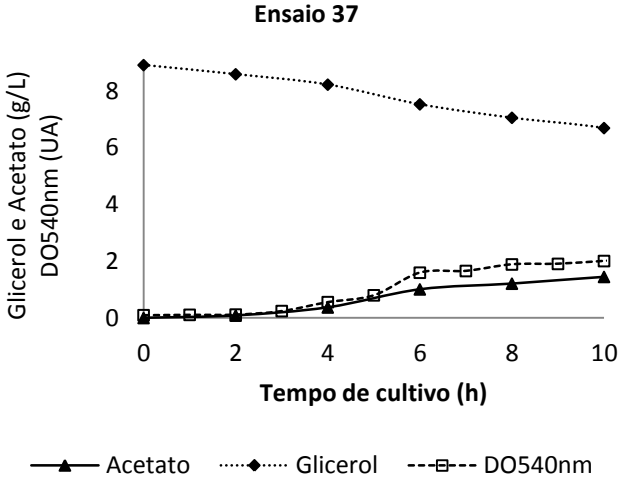

Ensaio 32
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

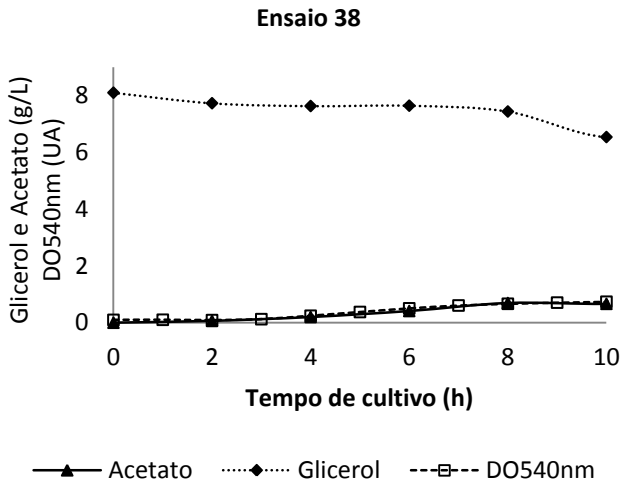

Ensaio 33
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

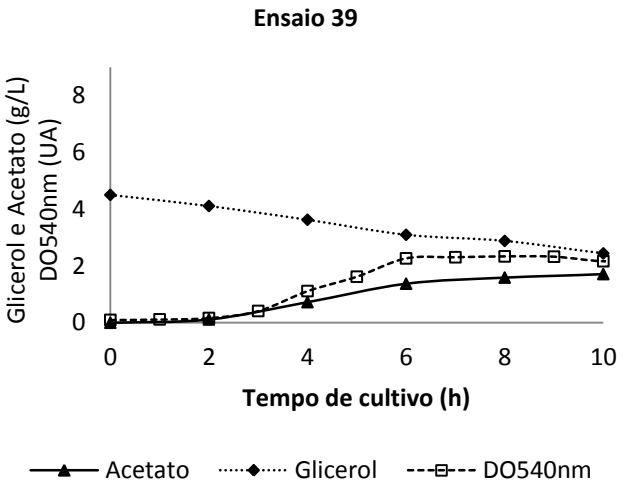

Ensaio 34
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

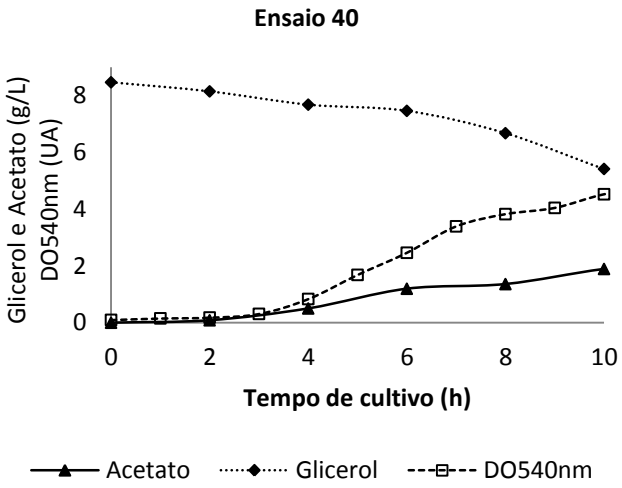

Ensaio 35
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

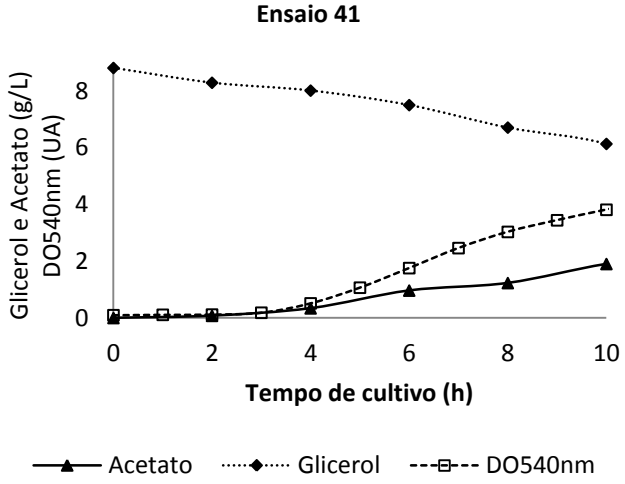

Ensaio 36
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

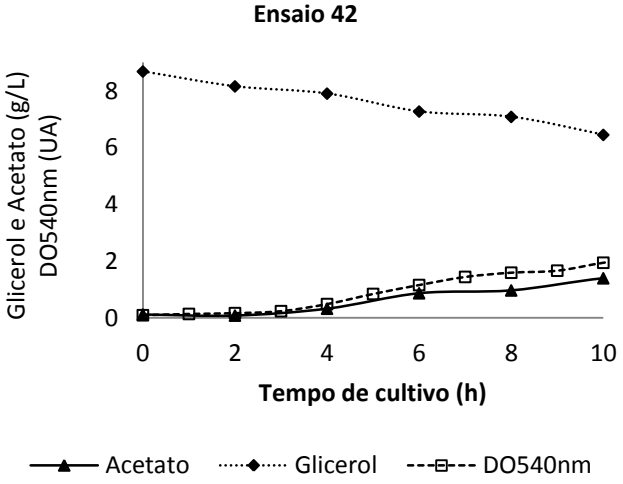

Ensaio 37
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

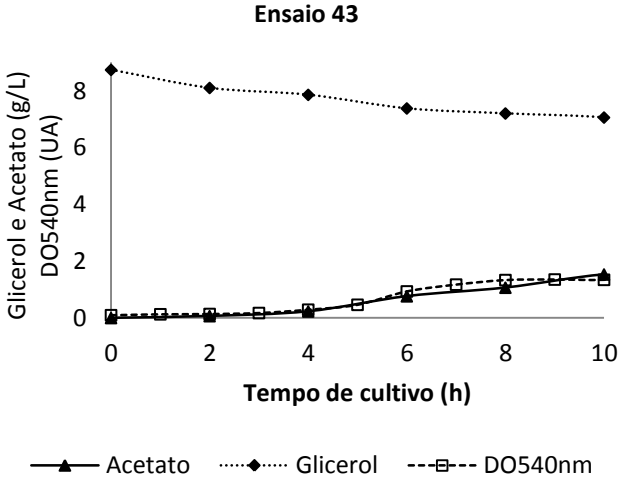

Ensaio 38
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

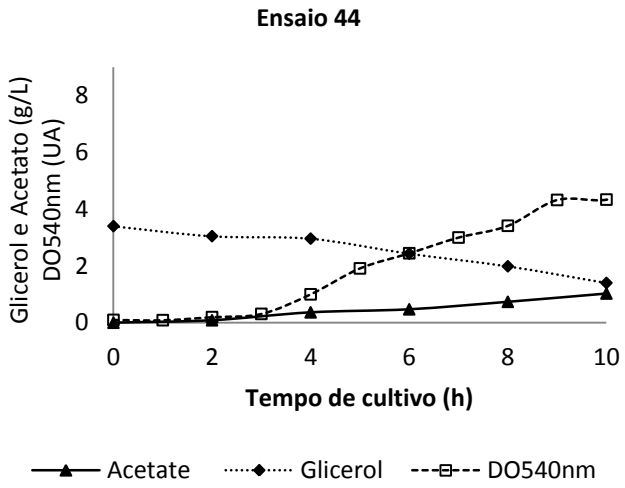

Ensaio 39
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

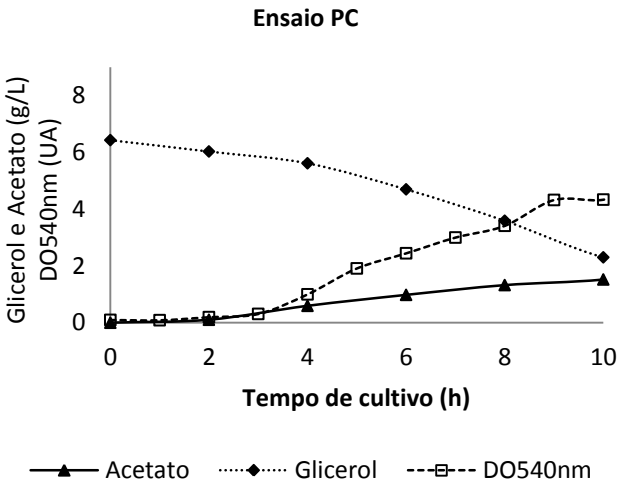

Ensaio 40
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

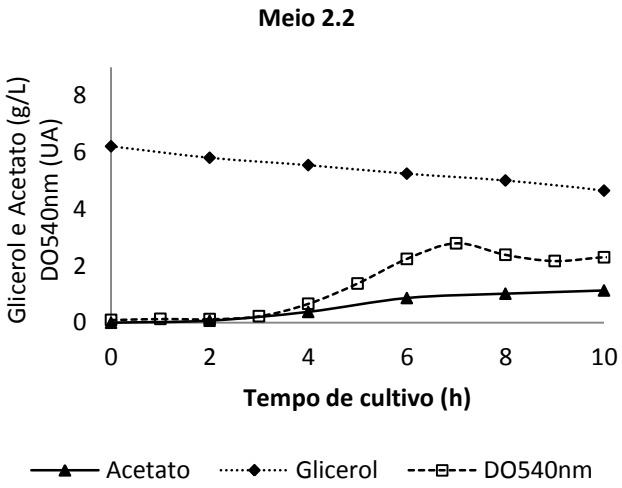

Ensaio 41
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm


Ensaio 42
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm


Ensaio 43
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm


Ensaio 44
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetate
Glicerol
DO540nm


Ensaio PC
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm


Meio 2.2
Glicerol e Acetato (g/L)
DO540nm (UA)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
Tempo de cultivo (h)
Acetato
Glicerol
DO540nm

C - Avaliação dos efeitos de cada variável independente estudada no PB 44 (continua)

Variáveis	Níveis estudados			DO_{540nm} 10h		$\mu_{máx}$		Glicerol Residual		PRP 10h		Yx/s		Yp/x		Yp/s		Avaliação dos efeitos
	-1	0	1	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	
Cys	0,2	0,3	0,4	-0,1	0,6	0,0	0,8	-0,2	0,4	-6,2	0,2	0,1	0,5	-0,6	0,9	5,6	0,3	↑ Cys NES para as respostas
NaCl	3,6	5,8	8,00	-0,8	0,0	0,0	0,4	-0,8	0,0	-38,1	0,0	0,1	0,5	0,3	0,9	6,5	0,3	↑ NaCl ↓ DO, PRP, Glic. Res. e NES para outras respostas
K_2SO_4	0,2	1	1,8	0,0	1,0	0,0	0,6	0,2	0,4	-1,5	0,8	-0,1	0,4	-0,4	0,9	-6,5	0,3	↑ K2SO4 NES para as respostas
$MgCl_2,6H_2O$	0,2	0,43	0,66	0,0	0,8	0,0	0,6	0,3	0,1	-20,5	0,0	-0,1	0,6	-11,4	0,0	-16,1	0,0	↑ MgCl2 ↓ PRP e Yp/x e Yp/s. E NES para outras respostas
$CaCl_2*2H_2O$	0,01	0,03	0,05	0,6	0,0	0,1	0,3	0,5	0,2	7,9	0,1	0,0	0,9	-4,6	0,3	-2,0	0,7	↑ CaCl2 ↑ DO e NES para outras respostas
EDTA	0	0,004	0,008	-0,2	0,3	0,0	0,8	-0,2	0,4	-6,7	0,2	0,0	1,0	1,6	0,7	1,8	0,7	↑ EDTA NES para as respostas
NH_4Cl	0	0,22	0,44	-0,3	0,1	-0,1	0,1	-0,3	0,2	-25,0	0,0	0,0	0,9	-3,0	0,5	-2,1	0,7	↑ NH4Cl ↓ PRP E NES para outras respostas
Asp	0,42	0,81	1,2	-0,2	0,3	-0,1	0,3	-0,1	0,5	-8,0	0,1	-0,1	0,7	5,4	0,2	3,8	0,5	↑ Asp NES para as respostas
Glu	0,02	0,51	1	0,0	0,9	0,0	0,7	-0,3	0,2	-20,8	0,0	0,0	1,0	-6,9	0,1	-6,1	0,3	↑ Glu ↓ PRP e Yp/x E NES para outras respostas
Arg	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3	0,1	0,3	0,0	0,8	2,2	0,7	0,2	0,1	-6,9	0,1	8,5	0,1	↑ Arg ↓ Yp/x E NES para outras respostas
Gly	0,2	0,35	0,5	-0,4	0,0	0,1	0,3	-0,5	0,0	-3,2	0,5	0,1	0,4	4,9	0,2	12,6	0,0	↑ Gly ↓ DO e Glic. Res.↑ Yp/s e NES para outras respostas
Lys	0,3	0,45	0,6	0,0	0,9	0,1	0,3	0,1	0,7	-5,8	0,3	0,0	0,9	-2,5	0,5	-2,3	0,7	↑ Lys NES para as respostas
Met	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2	0,3	7,8	0,1	0,0	0,7	-2,8	0,5	-0,8	0,9	↑ Met NES para as respostas
Ser	0,2	0,3	0,4	0,4	0,1	0,1	0,1	-0,2	0,4	-0,7	0,9	0,2	0,1	-11,2	0,0	3,4	0,5	↑ Ser ↑ DO e umáx ↓ Y p/x E NES para outras respostas
His	0,1	0,2	0,3	0,0	1,0	0,1	0,1	-0,2	0,4	-6,6	0,2	0,1	0,5	-4,8	0,3	2,4	0,7	↑ His ↑ umáx. E NES para outras respostas
Leu	0,3	0,5	0,7	0,3	0,2	0,0	0,5	0,0	0,9	1,2	0,8	0,1	0,6	-3,3	0,4	1,7	0,8	↑ Leu NES para as respostas
Tyr	0,015	0,065	0,115	1,0	0,0	0,0	0,6	0,7	0,0	-27,7	0,0	0,0	1,0	-33,8	0,0	-32,7	0,0	↑ Tyr ↓ PRP, Yp/x e Yp/s ↑ DO, Glic. Res. e NES para outras respostas
Glm	0,5	0,75	1	0,1	0,7	0,0	0,6	0,0	0,8	15,1	0,0	0,0	0,8	2,9	0,5	-1,2	0,8	↑ Glm ↑ PRP e NES para outras respostas
Ile	0,3	0,4	0,5	0,0	0,9	-0,1	0,1	0,0	0,9	-3,4	0,5	0,0	0,9	-2,0	0,6	-3,6	0,5	↑ Ile NES para as respostas
Trp	0,03	0,07	0,11	0,1	0,5	0,1	0,3	0,4	0,1	-15,7	0,0	-0,1	0,6	-13,9	0,0	-18,0	0,0	↑ Trp ↑ Glic. Res. ↓ PRP Yp/x e Yp/s e NES para outras respostas
Val	0,2	0,3	0,4	0,0	0,8	0,0	0,5	0,3	0,2	-2,3	0,6	-0,2	0,2	4,5	0,3	-6,3	0,3	↑ Val NES para as respostas
Phe	0,25	0,625	1	-0,9	0,0	-0,1	0,2	-0,5	0,0	-15,6	0,0	-0,3	0,1	14,6	0,0	-4,0	0,5	↑ Phe ↓ DO, PRP, Glic. Res. Yx/s ↑ Yp/x e NES para outras respostas
Cyss	0	0,15	0,3	-0,3	0,1	0,0	0,7	-0,2	0,4	-23,2	0,0	-0,1	0,5	-8,9	0,0	-11,1	0,1	↑ Cyss ↓ PRP, Yp/x e Yp/s e NES para outras respostas
Tween 80	0	0,02	0,04	-0,1	0,7	0,0	1,0	0,4	0,2	21,0	0,0	-0,2	0,1	14,6	0,0	1,2	0,8	↑ Tween ↑ PRP, Yp/x e NES para outras respostas

C - Avaliação dos efeitos de cada variável independente estudada no PB 44 (conclusão)

PVA	0	0,02	0,04	-0,2	0,3	0,0	0,8	0,0	0,8	3,2	0,5	-0,1	0,3	6,8	0,1	3,0	0,6	↑ PVA NES para as respostas
Lactato de Na^{+1} 50%	0,6	1,6	2,6	0,2	0,4	0,1	0,2	0,6	0,0	-8,4	0,1	-0,2	0,2	-7,8	0,1	-18,2	0,0	↑ Lactato ↑ Glic. Res. ↓ Yp/x e Yp/s e NES para outras respostas
Glicerol	3	5	7	-0,3	0,1	0,1	0,4	-0,1	0,5	-20,7	0,0	0,0	0,7	-5,0	0,2	-5,8	0,3	↑ Glicerol ↓ PRP e NES para outras respostas
Uracila	0,1	0,2	0,3	-0,2	0,3	0,0	0,8	-0,2	0,4	-13,1	0,0	-0,1	0,6	-5,4	0,2	-7,2	0,2	↑ Uracila ↓ PRP e NES para outras respostas
Hipoxantina	0	0,015	0,03	0,2	0,3	0,0	0,7	0,1	0,6	9,2	0,1	0,1	0,7	3,5	0,4	7,5	0,2	↑ Hipoxantina ↑ PRP e NES para outras respostas
Inosina	0,25	1,125	2	0,8	0,0	0,0	0,5	0,1	0,7	39,0	0,0	0,4	0,0	0,9	0,8	22,9	0,0	↑ Inosina ↑ DO PRP Yx/s e Yp/s e NES para outras respostas
K_2HPO_4	2	3,5	5	0,1	0,6	-0,1	0,2	0,4	0,1	-6,2	0,2	-0,1	0,5	-10,0	0,0	-12,4	0,0	↑ K2HPO4 ↑ Glic. Res. ↓ Yp/x e Yp/s e NES para outras respostas
KH_2PO_4	1,4	2,7	4	-0,5	0,0	-0,1	0,1	-0,4	0,1	-34,8	0,0	-0,1	0,4	-6,5	0,1	-9,0	0,1	↑ KH2PO4 ↓ DO, umáx, Glic. Res., PRP e NES para outras respostas
Tiamina,HCl	0,005	0,01	0,015	0,4	0,1	0,1	0,1	0,4	0,1	10,4	0,1	0,1	0,6	-9,4	0,0	0,6	0,9	↑ Tiamina ↑ DO, umáx, Glic. Res., PRP ↓Yp/x e NES para outras respostas
Pantotenato de Ca^{+2}	0,002	0,003	0,004	-0,3	0,2	-0,1	0,2	-0,3	0,2	-10,1	0,1	0,0	0,9	-0,2	1,0	1,2	0,8	↑ Pantotenato de Ca ↓ PRP e NES para outras respostas
NAD	0,004	0,007	0,01	-0,4	0,0	0,0	0,7	-0,4	0,1	-7,5	0,2	0,0	0,8	2,2	0,6	1,5	0,8	↑ NAD ↓ DO, Glic. Res. e NES para outras respostas
Hemina	0,01	0,015	0,02	0,8	0,0	0,0	0,8	0,4	0,0	31,9	0,0	0,1	0,3	-4,3	0,3	5,2	0,4	↑ Hemina ↑ DO, PRP, Glic. Res. e NES para outras respostas

As células em cinza representam os valores estatisticamente significativos ($p<0,1$)

D - Cotação dos reagentes que compõe o meio de cultivo estudado da marca Sigma-Aldrich

Componentes	Preço do frasco (US$)				US$/frasco	US$/g
	1kg	0,5kg	0,1kg	0,025kg		
L-Cystine	499	-	-	-	499	0,499
NaCl	41,2	-	-	-	41,2	0,0412
K_2SO_4	-	111	-	-	111	0,222
$MgCl_2.6H_2O$	-	65,2	-	-	65,2	0,1304
$CaCl_2.2H_2O$	92,6	-	-	-	92,6	0,0926
EDTA	-	83,1	-	-	83,1	0,1662
NH_4Cl	140,5	-	-	-	140,5	0,1405
Ácido aspártico	215,5	-	-	-	215,5	0,2155
Ácido glutâmico	82,7	-	-	-	82,7	0,0827
Arginina	290	-	-	-	290	0,29
Glicina	86,2	-	-	-	86,2	0,0862
Lisina	142,5	-	-	-	142,5	0,1425
Metionina	471,5	-	-	-	471,5	0,4715
Serina	823	-	-	-	823	0,823
Histidina	522	-	-	-	522	0,522
Leucina	654	-	-	-	654	0,654
Tirosina	-	609	-	-	304,5	0,609
Glutamina	428	-	-	-	428	0,428
Isoleucina	1315	-	-	-	1315	1,315
Triptofano	806	-	-	-	806	0,806
Valina	660	-	-	-	660	0,66
Fenilalanina	623	-	-	-	623	0,623
Cisteína.HCl.H2O	546	-	-	-	546	0,546
Tween 80	117,5	-	-	-	117,5	0,1175
PVA	129,5	-	-	-	129,5	0,1295
Lactato de sódio 50%	134	-	-	-	134	0,134
Glicerol	142,5	-	-	-	142,5	0,1425
Uracila	-	-	74,2	-	74,2	0,742
Hipoxantina	-	-	-	95,4	95,4	3,816
Inosina	-	-	232,5	-	232,5	2,325
K_2HPO_4	191,5	-	-	-	191,5	0,1915
KH_2PO_4	129	-	-	-	129	0,129
Tiamina.HCl	-	-	94,2	-	94,2	0,942
Pantotenato de cálcio	2575	-	-	-	2575	2,575
NAD	-	-	1175	-	1175	11,75
Hemina	-	-	535	-	535	5,35

E - Custo para composição de 1L dos meios estudados e do polissacarídeo capsular produzido em cada meio (continua)

Componentes	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	E23
x1	0,4	0,4	0,2	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2
x2	3,6	8	8	3,6	3,6	8	3,6	8	3,6	3,6	8	8	8	3,6	8	8	8	8	8	3,6	3,6	3,6	8
x3	1,8	0,2	1,8	1,8	0,2	0,2	1,8	0,2	1,8	0,2	0,2	1,8	1,8	1,8	0,2	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	0,2	0,2	0,2
x4	0,66	0,66	0,2	0,66	0,66	0,2	0,2	0,66	0,2	0,66	0,2	0,2	0,66	0,66	0,66	0,2	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,2	0,2
x5	0,03	0,3	0,3	0,03	0,3	0,3	0,03	0,03	0,3	0,03	0,3	0,03	0,03	0,3	0,3	0,3	0,03	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,03
x6	0,008	0	0,008	0,008	0	0,008	0,008	0	0	0,008	0	0,008	0	0	0,008	0,008	0,008	0	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
x7	0	0,44	0	0,44	0,44	0	0,44	0,44	0	0	0,44	0	0,44	0	0	0,44	0,44	0,44	0	0,44	0,44	0,44	0,44
x8	1,2	0,42	1,2	0,42	1,2	1,2	0,42	1,2	1,2	0,42	0,42	1,2	0,42	1,2	0,42	0,42	1,2	1,2	1,2	0,42	1,2	1,2	1,2
x9	1	1	0,02	1	0,02	1	1	0,02	1	1	0,02	0,02	1	0,02	1	0,02	0,02	1	1	1	0,02	1	1
x10	0,1	0,3	0,3	0,1	0,3	0,1	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3	0,1	0,3
x11	0,2	0,2	0,5	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5	0,5	0,2	0,5	0,5	0,2	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5	0,2
x12	0,3	0,3	0,3	0,6	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6	0,6	0,3	0,6	0,6	0,3	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,3	0,6	0,6	0,6
x13	0,3	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,1	0,3	0,1	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,1	0,3	0,3
x14	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2	0,4	0,2	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	0,2	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	0,2	0,4
x15	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,1	0,3	0,1	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,1
x16	0,3	0,3	0,3	0,7	0,3	0,3	0,3	0,7	0,7	0,3	0,7	0,3	0,7	0,7	0,3	0,7	0,7	0,3	0,3	0,7	0,3	0,7	0,3
x17	0,015	0,015	0,015	0,015	0,115	0,015	0,015	0,015	0,115	0,115	0,015	0,115	0,015	0,115	0,115	0,015	0,115	0,115	0,015	0,015	0,115	0,015	0,115
x18	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	1	0,5	1	1	0,5	1	1	0,5	0,5	1	0,5
x19	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,3	0,5
x20	0,11	0,11	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,11	0,03	0,03	0,03	0,11	0,11	0,03	0,11	0,03	0,11	0,11	0,03	0,11	0,11	0,03	0,03
x21	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2	0,4	0,2	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	0,2
x22	0,25	1	1	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	1	0,25	0,25	0,25	1	1	0,25	1	0,25	1	1	0,25	1	1
x23	0,3	0	0,3	0,3	0,3	0	0	0	0	0	0,3	0	0	0	0,3	0,3	0	0,3	0	0,3	0,3	0	0,3
x24	0	0,04	0	0,04	0,04	0,04	0	0	0	0	0	0,04	0	0	0	0,04	0,04	0	0,04	0	0,04	0,04	0
x25	0	0	0,04	0	0,04	0,04	0,04	0	0	0	0	0	0,04	0	0	0	0,04	0,04	0	0,04	0	0,04	0,04
x26	0,6	0,6	0,6	2,6	0,6	2,6	2,6	2,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	2,6	0,6	0,6	0,6	2,6	2,6	0,6	2,6	0,6	2,6
x27	7	3	3	3	7	3	7	7	7	3	3	3	3	3	7	3	3	3	7	7	3	7	3
x28	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,1	0,3
x29	0,03	0,03	0,03	0	0	0	0,03	0	0,03	0,03	0,03	0	0	0	0	0	0,03	0	0	0	0,03	0,03	0
x30	2	2	2	2	0,25	0,25	0,25	2	0,25	2	2	2	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	2	0,25	0,25	0,25	2	2
x31	5	5	5	5	5	2	2	2	5	2	5	5	5	2	2	2	2	2	5	2	2	2	5
x32	1,4	4	4	4	4	4	1,4	1,4	1,4	4	1,4	4	4	4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	4	1,4	1,4	1,4
x33	0,015	0,005	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,005	0,005	0,005	0,015	0,005	0,015	0,015	0,015	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,015	0,005	0,005
x34	0,004	0,004	0,002	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002
x35	0,01	0,01	0,01	0,004	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,004	0,004	0,004	0,01	0,004	0,01	0,01	0,01	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,01
x36	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
PRP (mg/L)	135,6	122,7	161,7	155,8	78,9	181,7	151,1	124,0	163,0	172,5	217,5	110,7	79,7	148,4	34,2	164,7	123,0	114,9	122,8	33,7	115,6	199,1	72,4
Meio (US$/L)	10,8	10,5	10,6	10,6	6,1	5,6	6,1	10,0	6,6	9,7	10,1	10,2	6,4	6,6	6,1	6,0	6,1	10,0	7,4	6,8	5,2	10,2	10,7
PRP (US$/g)	79,5	85,6	65,8	67,8	77,8	30,7	40,1	80,6	40,4	56,4	46,5	92,6	80,0	44,6	178,3	36,3	49,9	87,0	59,9	202,9	45,3	51,1	147,4

ANEXO E - Custo para composição de 1L dos meios estudados e do polissacarídeo capsular produzido em cada meio (conclusão)

Componentes	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E30	E31	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E41	E42	E43	E44	PC	Meio 2.2
x1	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2	0,4	0,2	0,4	0,4	0,2	0,2	0,3	0,2
x2	3,6	8	8	8	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	8	3,6	3,6	3,6	8	8	3,6	8	3,6	8	8	3,6	5,8	5,8
x3	1,8	0,2	1,8	1,8	1,8	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	1,8	0,2	0,2	0,2	1,8	1,8	0,2	1,8	0,2	1,8	0,2	1	1
x4	0,2	0,66	0,2	0,66	0,66	0,66	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,66	0,2	0,2	0,2	0,66	0,66	0,2	0,66	0,2	0,2	0,43	0,43
x5	0,03	0,03	0,3	0,03	0,3	0,3	0,3	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,3	0,03	0,03	0,03	0,3	0,3	0,03	0,3	0,03	0,165	0,029
x6	0	0	0	0,008	0	0,008	0,008	0,008	0	0	0	0	0	0,008	0	0	0	0,008	0,008	0	0	0,004	0,004
x7	0,44	0	0	0	0,44	0	0,44	0,44	0,44	0	0	0	0	0	0,44	0	0	0	0,44	0,44	0	0,22	0,22
x8	1,2	1,2	0,42	0,42	0,42	1,2	0,42	1,2	1,2	1,2	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	1,2	0,42	0,42	0,42	1,2	0,42	0,81	0,5
x9	1	1	1	0,02	0,02	0,02	1	0,02	1	1	1	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	1	0,02	0,02	0,02	0,02	0,51	1,3
x10	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3
x11	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,2	0,35	0,03
x12	0,3	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,3	0,3	0,3	0,6	0,3	0,6	0,6	0,6	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,6	0,3	0,45	0,05
x13	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
x14	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1
x15	0,3	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,01
x16	0,3	0,7	0,7	0,7	0,3	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,3	0,3	0,3	0,7	0,3	0,7	0,7	0,7	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3
x17	0,015	0,015	0,115	0,115	0,115	0,015	0,115	0,115	0,115	0,115	0,115	0,015	0,015	0,015	0,115	0,015	0,115	0,115	0,115	0,015	0,015	0,065	0,2
x18	1	0,5	0,5	1	1	1	0,5	1	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1	1	1	0,5	0,75	0,3
x19	0,3	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,4	0,05
x20	0,11	0,03	0,11	0,03	0,03	0,11	0,11	0,11	0,03	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,03	0,03	0,03	0,11	0,03	0,11	0,03	0,07	0,005
x21	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,3	0,02
x22	0,25	0,25	1	0,25	1	0,25	0,25	1	1	1	0,25	1	1	1	1	1	0,25	0,25	0,25	1	0,25	0,625	0,015
x23	0,3	0	0	0,3	0	0,3	0	0	0,3	0,3	0,3	0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0	0	0	0	0,15	0,12
x24	0,04	0,04	0	0	0,04	0	0,04	0	0	0,04	0,04	0,04	0	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0	0	0	0,02	0,02
x25	0	0,04	0,04	0	0	0,04	0	0,04	0	0	0,04	0,04	0,04	0	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0	0	0,02	0,02
x26	2,6	0,6	2,6	2,6	0,6	0,6	2,6	0,6	2,6	0,6	0,6	2,6	2,6	2,6	0,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	0,6	1,6	1,6
x27	7	7	3	7	7	3	3	7	3	7	3	3	7	7	7	3	7	7	7	7	3	5	5
x28	0,1	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2	0,1
x29	0,03	0	0,03	0,03	0	0,03	0,03	0	0	0,03	0	0,03	0	0	0,03	0,03	0,03	0	0,03	0,03	0	0,015	0,02
x30	0,25	2	0,25	2	2	0,25	2	2	0,25	0,25	2	0,25	2	0,25	0,25	2	2	2	0,25	2	0,25	1,125	2
x31	5	2	5	2	5	5	2	5	5	2	2	5	2	5	2	2	5	5	5	2	2	3,5	3,5
x32	4	4	1,4	4	1,4	4	4	1,4	4	4	1,4	1,4	4	1,4	4	1,4	1,4	4	4	4	1,4	2,7	2,7
x33	0,005	0,015	0,015	0,005	0,015	0,005	0,015	0,015	0,005	0,015	0,015	0,005	0,005	0,015	0,005	0,015	0,005	0,005	0,015	0,015	0,005	0,01	0,0045
x34	0,002	0,002	0,004	0,004	0,002	0,004	0,002	0,004	0,004	0,002	0,004	0,004	0,002	0,002	0,004	0,002	0,004	0,002	0,002	0,004	0,002	0,003	0,004
x35	0,004	0,004	0,004	0,01	0,01	0,004	0,01	0,004	0,01	0,01	0,004	0,01	0,01	0,004	0,004	0,01	0,004	0,01	0,004	0,004	0,004	0,007	0,0095
x36	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,015	0,02
PRP (mg/L)	135,2	119,7	94,8	90,2	197,7	142,5	158,5	197,4	10,6	98,7	227,1	175,7	177,3	121,8	51,7	217,3	153,3	165,3	82,4	104,9	226,4	147,6	252,2
Meio (US$/L)	7,3	10,5	6,8	11,0	11,2	6,6	9,9	10,8	7,2	6,9	9,5	6,3	10,6	7,0	6,7	10,5	10,6	10,9	6,9	11,1	3,7	8,4	8,7
PRP (US$/g)	54,0	87,8	71,5	121,7	56,5	46,3	62,6	54,6	681,6	70,1	42,0	35,6	59,7	57,7	129,5	48,2	69,1	66,0	83,9	105,7	16,5	57,0	34,4