Talita Souza Carmo

Otimização da produção de polissacarídeo capsular do *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 6B em biorreator.

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

Talita Souza Carmo

Otimização da produção de polissacarídeo capsular do *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 6B em biorreator.

Tese apresentada ao Programa de Pós - Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP / Instituto Butantan / IPT), para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Bioprocessos

Orientadora: Dra. Martha Massako Tanizaki Co-orientadora: Dra. Viviane Maimoni Gonçalves

São Paulo 2010

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

Iti reprodução total

Carmo, Talita Souza.

Otimização da produção de polissacarideo capsular do Streptococcus pneumoniae sorotipo 6B em biorreator / Talita Souza Carmo. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Martha Massako Tanizaki,

Tese (Doutorado) – 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: Produção de antigeno vacinal.

Versão do título para o inglês: Optimization of polysaccharide production of Streptococcus pneumoniae serotype 6B in bioreactor.

Descritores: 1. Polissacarideos bacterianos 2. Streptococcus 3. Bioreatores 4. Vacinas I. Tanizaki, Martha Massako II. Universidade de São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB021/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Candidato(a):	Talita Souza Carmo.
Título da Tese:	Otimização da produção de polissacarídeo capsular do Streptococcus pneumoniae sorotipo 6B em biorreator.
Orientador(a):	Martha Massako Tanizaki.
	Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão lica realizada a
	() Aprovado(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura:
Presidente:	Assinatura:

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela inspiração.

À Martha Tanizaki e Viviane Gonçalves, pela orientação, dedicação e por me mostrarem quão bonita e trabalhosa é a vida de pesquisador.

Aos amigos dos laboratórios de Fermentação e de Vacinas Conjugadas que me acolheram com tanto carinho: Adriana, Paula, Ana Paula Gonçalves, Sílvia Santos, Lola, Daniel, Rimenys, Carol, Cátia, Giovana, Mateus, Sílvia, Natalia, Jéssica, Bruno, Douglas, Mickie, Bete, Joaquin, Ana, D. Inês, Sr. Louri, Máximo e Sr. Hélio.

À Verônica, pela parceria dentro e fora do laboratório, pelo apoio e pelos momentos de muita diversão e trabalho.

À Dra. Teresa Zangirolami e ao Antônio Carlos Horta (Departamento de Engenharia Química da UFSCar), pela colaboração nos experimentos e pelas inúmeras sugestões desta tese.

.À Luana, Juliana, Paula, Aline, Patrícia, Ludmila, Carlinha, Alex, Nilda, Fabiana e Paulo. Vocês são parte essencial da minha vida e tornam meus dias muito mais felizes.

Aos meus pais – Luís Alberto e Edna – meus anjos maiores, pelo amor incondicional. Sem vocês nada seria possível!

Ao meu irmão Bruno, por me aturar nos últimos meses da tese e mostrar que o amor supera todas as distâncias.

À Teresa, minha segunda mãe, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

À minha avó Terezinha, aos meus tios e primos, pela experiência de vida.

À FAPESP, pelo financiamento da pesquisa.

"A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada." Albert Einstein

RESUMO

Carmo, T. S. Otimização da produção de polissacarídeo capsular do *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 6B em biorreator. 128f. [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O *Streptococcus pneumoniae*, também conhecido como pneumococo, é um importante agente etiológico causador de pneumonia, bacteremia, meningite e otite aguda do ouvido médio, acometendo especialmente crianças e idosos. A cápsula polissacarídica (PS) é o fator de virulência mais importante e localiza-se na superfície do microrganismo e tem ação anti-fagocítica "in vivo". O pneumococo expressa pelo menos 91 cápsulas diferentes, que são química e sorologicamente distintas. Usualmente, a cápsula é o antígeno das vacinas anti-pneumocócicas, tanto como polissacarídeo livre ou conjugado a proteínas. O sorotipo 6B acomete principalmente crianças e é o segundo mais prevalente no Brasil, e a otimização das condições de cultivo buscando maior produtividade em PS é o alvo desta tese. Simultaneamente, também foi investigada a influência do inóculo e da glicose residual no instante do pulso ou do início da alimentação em cultivos descontínuos alimentados.

Nos cultivos descontínuos alimentados foi observado que quanto menor a densidade óptica da cultura do inóculo, maior a concentração de PS obtida. A concentração da glicose residual no momento do pulso provavelmente influenciou a produção de PS: a produção foi maior quando o pulso foi dado ainda em altas concentrações de substrato. Por isso, obteve-se uma produção de PS ~390 mg/L em cultivo descontínuo alimentado com pulso, quando DO 600 nm da cultura do inóculo ~1,6 e o pulso de glicose e acetato de amônio ~15 g/L. Observou-se também que, mesmo com DO do inóculo ~1,65, a produção de PS foi somente 248 mg/L, devido à aplicação do pulso quando a concentração de glicose residual era ~4,5 g/L. A menor produção de PS foi obtida quando a DO da cultura do inóculo foi ~2,6 e a concentração de glicose residual ~3,4 g/L, gerando somente 194 mg/L de PS.

Assim, cultivos descontínuos alimentados com pulso renderam melhores resultados que os cultivos descontínuos alimentados. A alimentação constante rendeu maior quantidade de PS quando comparada à alimentação exponencial. E tanto os

ensaios descontínuos com ou sem pulso e os descontínuos alimentados foram melhores do que os cultivos contínuos, principalmente se considerarmos a facilidade de operação.

O efeito da concentração residual da glicose no instante da alimentação na produção de PS é provavelmente influenciado pela presença de outros componentes do meio, devido aos requerimentos nutricionais do pneumococo.

O estado fisiológico do inóculo determinou uma importante correlação entre a produção de PS nos cultivos descontínuos alimentados do sorotipo 6B: cultura do inóculo no meio da fase exponencial rendeu maior produção de PS. Esta correlação poderia ser conseqüência do perfil de crescimento do microrganismo "in vitro" e da ação de enzimas líticas após a fase exponencial. Foi observado, portanto, um efeito sinérgico entre a DO da cultura do inóculo, a concentração de glicose residual no momento de alimentação e produção de PS nos cultivos descontínuos alimentados.

ABSTRACT

Carmo, T. S. Optimization of polysaccharide production of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B in bioreactor. 128p. [Thesis]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Streptococcus pneumoniae is a major pathogen commonly responsible for pneumonia, bacteraemia, meningitis and otitis media, especially among young children and older adults. The most prominent pneumococcal virulence factor is the capsular polysaccharide (PS), which coats the surface of the bacterium and acts as an antiphagocytic factor "in vivo". S. pneumoniae express at least 91 distinct capsules which are chemically and serologically distinct. The capsule is currently used as antigen in pneumococcal vaccines, either as free polysaccharide or conjugated to proteins. Pneumococcal serotype 6B is the second most prevalent in Brazil and the optimization of cultivation conditions is part of this study. Simultaneously we investigated the influence of the growth phase of the inoculum and the residual glucose concentration at the instant of the pulse or the start of feeding on PS production in batch and fed-batch cultivation.

Streptococcus pneumoniae serotype 6B strain ST 433/03 was used. Bench scale experiments were carried out using a variant of the Hoeprich medium, containing glucose, acid-hydrolyzed casein, dialyzed yeast extract, L-glutamine and asparagine as nitrogen sources, choline as a growth factor and salts. The experiments were conducted in bioreactors monitored by the LabView 7.1program.

It was observed in fed-batch cultivation, that the lower was the OD of the starter culture, the higher was the PS concentration obtained. The residual glucose concentration at the moment of the pulse also influenced the PS production: the PS production was higher when the pulse was given at higher residual glucose concentration. Hence, in fed-batch culture the highest PS production (387 mg/L) was obtained using an OD=1.6 of the starter culture and giving the pulse when the residual glucose was ~15 g/L. Using a similar inoculum (OD=1.65), the PS concentration reached 248 mg/L after giving the pulse when the residual glucose was 4.5 g/L. The lowest PS production was obtained when a culture with an OD=2.6 was inoculated into

the reactor and the pulse was given when the residual glucose was 3.4 g/L (PS=194 mg/L).

The effect of the residual glucose concentration at the instant of the start of feeding on PS production was probably influenced by the presence of other components in the concentrated feeding medium, which could better fit the nutritional requirements of the microorganism.

The physiological state of the inoculum showed an important correlation to the PS production in batch and fed-batch cultivation of *S. pneumoniae* serotype 6B: mid-log phase inocula yielded high PS production. This correlation is consequence of the "in vitro" growth profile, the action of lytic enzymes after the log phase. In fed-batch cultivation, it was also observed a synergic effect of the inoculum OD and the residual glucose concentration in the moment of the pulse on PS production.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do meio ágar chocolate
Tabela 2: Composição do meio ágar sangue
Tabela 3: Composição do meio Greaves
Tabela 4: Meio Hoeprich modificado (Gonçalves et al., 2002)
Tabela 5: Composição da solução de ácido tioglicólico
Tabela 6: Composição da solução de sais
Tabela 7: Composição dos meios de cultura modificados
Tabela 8: Ensaios realizados em biorreator, agrupados de acordo com as condições de cultivo
Tabela 9: Variáveis da simulação. O Termo 1.3859 é para calibrar a equação da vazão
devido ao fato da bomba não ter sido calibrada com meio de cultivo (mas sim con
água)84
Tabela 10: Parâmetros do cultivo de S. pneumoniae sorotipo 6B calculados a partir do
dados experimentais dos ensaios realizados em diferentes condições
Tabela 11: Análise das variáveis em dois cultivos descontínuos com alimentação
diferenciada. Ensaio 12: alimentação constante e ensaio 14: alimentação exponencial. 93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas da cápsula e parede celular e seus fatores de virulência (KADIOGLU et al., 2008).
Figura 2: Esquema da biossíntese do polissacarídeo capsular (Kadioglu et al., 2008) 24
Figura 3: Unidade monomérica do polissacarídeo capsular de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 6B.
Figura 4: Metabolismo da glicose em <i>S. pneumoniae</i> em condição aeróbica (adaptado de Taniai et al., 2008).
Figura 5: Metabolismo anaeróbio do S. pneumoniae.
Figura 6: <i>S. pneumoniae 23F.</i> A) Anaerobiose, fase exponencial após 4 h; B Anaerobiose, fase estacionária após 12 h; C) Aerobiose, fase estacionária após 12 h (GONÇALVES et al., 2006).
Figura 7: Fermentação: sistema de aquisição de dados ligado a fermentador
Figura 8: Ensaio descontínuo em duplicata. 1) fermentador; 2) balança; 3) hidróxido de sódio, para controle de pH; 4) tubo para retirada de amostra
Figura 9: Sistema de membranas acopladas ao fermentador. 1- NaOH 5 M; 2- Sistema de membranas Durapore; 3- Meio para alimentação; 4- Balança e recipiente con permeado; 5-Fermentador
Figura 10: Perfil de crescimento celular de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 6B em frascos estáticos. Meio Hoeprich modificado inoculado com diferentes volumes do estoque congelado: azul – $100~\mu\text{L}$, $rosa$ – $150~\mu\text{L}$ e verde – $200~\mu\text{L}$.
Figura 11: Curvas para o cálculo da velocidade de crescimento do <i>S. pneumoniae</i> 6B Cinética a partir de estoque congelado (100 μL, 150 μL e 200 μL).
Figura 12: Perfil de crescimento celular de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 6B em frasco estático. Meio Hoeprich modificado com 400 μL de estoque congelado. Azul - absorbância a 600 nm: rosa – concentração de células viáveis (LIFC/ml)

Figura 13: Perfil de crescimento celular de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 6B em frasco estático. Meio Hoeprich modificado com 500 μL de estoque congelado. Azul – absorbância a 600 nm; rosa – concentração de células viáveis (UFC/ml)
Figura 14: Cinética de crescimento de <i>S. pneumoniae</i> e de produção de PS6B em frascos estáticos. Comparação entre meios contendo diferentes proporções de glicose (C) e extrato de levedura (N) em meio de Hoeprich modificado: C/N=0,5 – 25 g/L de glicose e 50 g/L de extrato de levedura; controle – 25 g/L de glicose e 25 g/L de extrato de levedura; C/N=2 – 25 g/L de glicose e 12,5 g/L de extrato de levedura
Figura 16: Efeito da adição de vitaminas e tirosina sobre a produção de polissacarídeo 6B em 6 e 10 h de cultura de <i>S. pneumoniae</i>
Figura 17: Relação entre a absorbância 600 nm da suspensão de células de <i>S. pneumoniae</i> lida em espectrofotômetro e a biomassa seca (g/L). Dados de dois experimentos independentes
Figura 18: Cálculo de Y _{X/S} . Relação Massa Seca e Concentração de glicose durante o cultivo
Figura 19: Relação entre a concentração de glicose na cultura de Streptococcus pneumoniae 6B e a formação de lactato, como produto final da metabolização da glicose.
Figura 20: Relação entre a concentração de glicose na cultura e a liberação de polissacarídeo capsular no sobrenadante.
Figura 21: Ensaio 1. Cultivo descontínuo. Anaerobiose mantida por N ₂ 0,15 vvm 66
Figura 22: Ensaio 2. Cultivo descontínuo. Anaerobiose mantida por N ₂ 0,15 vvm 67
Figura 23: Ensaio 3. Cultivo descontínuo alimentado com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N ₂ 0,15 vvm
Figura 24: Ensaio 4. Cultivo descontínuo alimentado com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N ₂ 0,15 vvm

Figura 25: Ensaio 5. Cultivo descontínuo alimentado com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N_2 0,15 vvm
Figura 26: Ensaio 6. Cultivo descontínuo alimentado com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N ₂ 0,15 vvm
Figura 27: Ensaio 7. Cultivo descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N ₂ 0,15 vvm
Figura 28: Ensaio 8. Cultivo descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N ₂ 0,15 vvm
Figura 29: Ensaio 9. Cultivo descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio. Aumento da concentração de Extrato de Levedura para 50,0 g/L. Anaerobiose mantida por N ₂ 0,15 vvm
Figura 30: Ensaio 10. Cultivo descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N ₂ 0,15vvm até o fim da fase exponencial (5ª hora). Após, adição de ar comprimido 0,1 vvm. Adição de 50 g de glicose na 6ª hora de cultivo 76
Figura 31: Comparação entre o ensaio 8 e o ensaio 10 (anaerobiose seguida de aerobiose 0,1 vvm). Em preto são apresentadas as curvas do ensaio 8. Em cores estão representados os dados do ensaio 11
Figura 32: Ensaio 11. Cultivo descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N ₂ 0,15 vvm até o fim da fase exponencial (5ª hora). Após, adição de ar comprimido 0,5 vvm
Figura 33: Comparação entre o ensaio 8 e o ensaio 11 (anaerobiose seguida de aerobiose 0,5 vvm). Em preto são apresentadas as curvas do cultivo descontínuo. Em cores estão representados os dados do ensaio 12
Figura 34: Ensaio 12. Cultivo descontínuo alimentado (alimentação constante— vazão: 0,14 L/h)
Figura 35: Ensaio 13. Cultivo descontínuo alimentado (alimentação constante— vazão: 0,14 L/h)
Figura 36: Ensaio 14. Cultivo descontínuo alimentado (alimentação exponencial - vazão: 0.48e ^{0,08t} L/h)

Figura 37: Simulação. Modelo matemático ajustado com os dados do ensaio 14 84
Figura 38: Ensaio 15. Cultivo descontínuo alimentado (alimentação exponencial -vazão: 0,48e ^{0,08t} L/h)
Figura 39: Ensaio 16. Cultivo descontínuo alimentado (alimentação exponencial -vazão: 0,48e ^{0,08t} L/h)
Figura 40: Ensaio 17. Cultivo contínuo com reciclo de células. Membrana de perfusão acoplada ao fermentador. Anaerobiose mantida por N ₂ 0,25 vvm até o fim do cultivo. 87
Figura 41: Comparação entre os ensaios 1 e 2 e o ensaio 17 (membrana de perfusão acoplada ao fermentador). Em preto são apresentadas as curvas médias obtidas e seus respectivos desvios padrão. Em cores estão representados os dados do ensaio teste 88
Figura 42: Ensaio 18. Cultivo contínuo com reciclo de células. Membrana de perfusão acoplada ao fermentador. Anaerobiose mantida por $N_20,25$ vvm até o fim do cultivo . 90
Figura 43: Curvas médias de ensaios descontínuos com pulso de glicose e acetato de amônio. Gráfico 1 – média dos ensaios 3, 4 e 5. Gráfico 2 – média dos ensaios 6 e 7. Laranja – DO 600nm; preto – glicose (g/L); azul – PS (mg/mL); rosa – lactato (g/L)94
Figura 44: Produção de PS em função da glicose residual no momento do pulso e em função da DO do inóculo em cultivos de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 6B
Figura 45: <i>S. pneumoniae</i> 6B. Imunoeletromicroscopia da cápsula polissacarídica do <i>S. pneumoniae</i> da cepa P324, sorotipo 6B, mais densa. Material capsular opaco (A e B)
comparado à variante transparente (C e D). Barra: 1,0 μm (A e C) e 0,3 μm (B e D). (WEISER et al., 1999)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 EPIDEMIOLOGIA	18
1.2 CÁPSULA POLISSACARÍDICA E FATORES DE VIRULÊNCIA	21
1.2.1 POLISSACARÍDEO CAPSULAR	22
1.2.2 PROCESSO DE PATOGÊNESE	25
1.3 METABOLISMO	27
1.4 EFEITO DO OXIGÊNIO NA EXPRESSÃO DO POLISSACARÍDEO CAPSUI	LAR
(PS)	30
1.5 BIOPROCESSOS	32
1.5.1 MODELAGEM	33
1.6 CULTIVO DE S. PNEUMONIAE	34
1.6.1 INÓCULO	35
1.6.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO	
1.7 VACINAS	37
2 JUSTIFICATIVA	40
2.1 OBJETIVO GERAL	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 CEPA	42
3.2 ESTABELECIMENTO DO ESTOQUE CONGELADO	42
3.3 MEIOS DE CULTURA	42
3.3.1 MEIOS SEMI-SÓLIDOS	43
3.3.1.1 ÁGAR CHOCOLATE	43
3.3.1.2 ÁGAR SANGUE	43
3.3.2 MEIO PARA CONGELAMENTO	44
3.3.3 MEIO LÍQUIDO	44
3.3.4 PREPARO DO EXTRATO DE LEVEDURA ULTRAFILTRADO	45
3.3.5 MODIFICAÇÕES DO MEIO DE CULTIVO EM REATOR	46
3.3.6 PROCEDIMENTO DE LIMPEZA E ESTERILIZAÇÃO DO SISTEMA	DE
MEMBRANAS DO CULTIVO CONTÍNUO COM RECICLO CELULAR	46

3.4 CULTIVO	47
3.4.1 PREPARO DO INÓCULO	47
3.4.2 ENSAIOS EM FRASCOS	47
3.4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO EM REATOR	48
3.4.4 CULTIVO CONTÍNUO COM RECICLO CELULAR	50
3.5 AQUISIÇÃO DE DADOS	51
3.6 MODELAGEM	51
3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	52
3.7.1 CONCENTRAÇÃO CELULAR: DO 600 nm E CONCENTRAÇÃO	DE
CÉLULAS VIÁVEIS (UFC/mL).	52
3.7.2 CONCENTRAÇÃO CELULAR: BIOMASSA SECA	53
3.7.3 DOSAGEM DE POLISSACARÍDEO	53
3.7.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS E AÇÚCARES	55
4 RESULTADOS	56
4.1 PREPARO DO INÓCULO	56
4.2 ENSAIOS EM FRASCOS	59
4.3 ENSAIOS EM FERMENTADOR	61
4.3.1 OBTENÇÃO DA RELAÇÃO ABSORBÂNCIA 600 nm E BIOMASSA SE	ECA
(g/L)	62
4.3.2 CÁLCULO DE RENDIMENTO (Y _{X/S} , Y _{P/S} , Y _{PS/S})	63
4.3.3 CÁLCULO DO μs NO MOMENTO DO PULSO DE GLICOSE/ACETATO	DE
AMÔNIO OU INÍCIO DA ALIMENTAÇÃO.	65
4.3.4 ENSAIOS DESCONTÍNUOS	65
4.3.5 ENSAIOS DESCONTÍNUOS ALIMENTADOS	67
4.3.5.1 ENSAIOS DESCONTÍNUOS ALIMENTADOS COM PULSO DE GLICO	OSE
E ACETATO DE AMÔNIO	67
4.3.5.2 ENSAIO DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM PULSO DE GLICO	SE/
ACETATO DE AMÔNIO E MODIFICAÇÃO DO MEIO DE CULTURA	74
4.3.5.3 ENSAIOS DESCONTÍNUOS ALIMENTADOS COM PULSO	Е
INTRODUÇÃO DE AR NA FASE ESTACIONÁRIA.	75
4.3.5.4 CULTIVO DESCONTÍNUO COM ALIMENTAÇÃO CONSTANTE	80
4.3.5.5 ENSAIOS DESCONTÍNUOS COM ALIMENTAÇÃO EXPONENCIAL	82
4.3.6 ENSAIOS CONTÍNUOS COM RECICLO CELULAR	86

6 CONCLUSÃO	10
5 DISCUSSÃO	96
4.4 ANÁLISE DO CONJUNTO DE RESULTADOS OBTIDOS	93
4.3.7 CÁLCULO DOS PARÂMETROS DOS CULTIVOS EM BIORREATO)R91

1 INTRODUÇÃO

O *Streptococcus pneumoniae*, também conhecido como pneumococo, é um importante agente etiológico das infecções do trato respiratório e apresenta morbidade e mortalidade elevadas em indivíduos de todas as idades (KIM; WEISER, 1998; WEISER et al., 1994; KIM et al. 1999); habitualmente, coloniza a nasofaringe de pessoas sadias, consideradas portadores assintomáticos. Embora a colonização neste local pareça ser assintomática, se o microrganismo ganha acesso a locais normalmente estéreis das vias aéreas, sucede uma rápida resposta inflamatória que resulta em doença (KADIOGLU et al., 2008). As manifestações comuns da doença pneumocócica incluem otite aguda do ouvido médio e pneumonia. A meningite e a septicemia, que são associadas à grande morbidade e mortalidade, ocorrem tipicamente como uma complicação de uma pneumonia (KADIOGLU et al., 2008).

Este microrganismo pertence então à microbiota da nasofaringe, que consiste de inúmeros microrganismos com propriedades fisiológicas e genéticas convenientes para a colonização e multiplicação neste nicho. A propagação pessoa-pessoa do pneumococo ocorre através do contato direto com secreções de indivíduos colonizados. A colonização pelo pneumococo é comum em crianças a partir dos seis meses de idade, menos freqüente em adultos e se eleva novamente em idades mais avançadas (HAUSDORFF et al., 2000). Os mecanismos de patogênese que levam esse "quase" comensal humano a tornar-se virulento não estão completamente elucidados. Acredita-se, porém, haver uma série de fatores ligados à relação patógeno-hospedeiro (BERGMANN; HAMMERSCHIMIDT, 2006; JEDRZEJAS, 2001; KIM et al., 1999).

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Os aspectos epidemiológicos da doença pneumocócica variam de um país a outro, ao longo do tempo e de acordo com a faixa etária da população afetada, o que determina a necessidade de avaliações locais periódicas para o estabelecimento de estratégias de controle (MANTESE et al, 2003; OSELKA, 2003). De acordo com a estrutura química do polissacarídeo capsular, são reconhecidos, até o momento, 91 sorotipos de pneumococo (PARK et al, 2007), sendo que as decisões acerca da formulação e da aplicação de vacinas

dependem das informações regionais e temporais de quais desses sorotipos causam doenças. Estudos sobre a distribuição destes sorotipos em diferentes países têm demonstrado que a prevalência destes pode variar conforme a idade, região geográfica, período de tempo e tipo de infecção. Por exemplo, os sorotipos 1 e 5, raramente encontrados nos Estados Unidos da América (EUA), Canadá e alguns países da Europa, são causa freqüente de doença invasiva nos países latino-americanos e outros países como Israel, África e Índia (DAGAN et al., 2000; GONZALEZ et al., 2004).

Indivíduos portadores podem ser colonizados simultaneamente por múltiplos sorotipos. Em geral, as infecções iniciam-se pela colonização da nasofaringe por uma cepa mais virulenta recentemente adquirida. De modo geral, os sorotipos mais comumente encontrados em nasofaringe de crianças sadias são, conseqüentemente, os que mais causam doenças pediátricas e estão associados à resistência aos antimicrobianos. Os sorotipos 1 e 5 são raramente detectados em amostras de nasofaringe, estando assim menos expostos aos antimicrobianos (HAUSDORFF et al., 2005).

Adicionalmente, o monitoramento da resistência aos antimicrobianos é de grande importância aos clínicos, propiciando racionalidade na escolha do tratamento empírico inicial de doenças pneumocócicas.

Os sorotipos 6A, 6B, 9V, 14, 19F, 19A e 23F, estão mais freqüentemente associados à resistência antimicrobiana, devido a sua facilidade em adquirir os genes de resistência e incorporá-los em seu cromossomo pelo processo de transformação genética. No Brasil, a resistência do pneumococo aos antimicrobianos tem aumentado ao longo dos anos, encontrando-se em percentuais de 27,9% em 2004, correspondendo a 22% das amostras à resistência intermediária e 5,9% das amostras à resistência total. Os principais sorotipos associados com resistência à penicilina no Brasil são os sorotipos 14, 6B, 23F, 19A, 19F, 23B, 6A e 9V (BRANDILEONE et al., 2006).

Os sorotipos responsáveis pela maior parte das infecções pneumocócicas são: 14, 3, 9V, 19A, 1, 6A, 23F e 7 em adultos e 1, 5, 6B, 14, 19F, 7, 9V, 12, 23F em crianças (MANTESE et al., 2003). Os sorotipos 6A, 6B, 14, 19F, e 23F são pouco imunogênicos e, por isso, são denominados sorotipos pediátricos. De fato, a distribuição de sorotipos é um processo dinâmico, dado pelo aparecimento de sorotipos multirresistentes, novos sorotipos e trocas de cápsula entre pneumococos (JANSEN, 2000).

Dos 91 sorotipos capsulares identificados, 12 sorotipos (14, 1, 6B, 18C, 5, 3, 6A, 23F, 9V, 19F, 4, 19A) são prevalentes no Brasil, correspondendo a aproximadamente 80% do total das cepas isoladas clinicamente (MANTESE et al., 2003; BRANDILEONE et al., 1999).

Poucos trabalhos tratam da incidência da doença pneumocócica, porém sua importância pode ser avaliada pelos dados de mortalidade por pneumonia, situação em que o pneumococo é o agente etiológico mais freqüente. Os maiores coeficientes de incidência de meningite pneumocócica são registrados em lactentes menores de um ano, e a resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos vem aumentando progressivamente. De 1983 a 2003, o número de casos de meningite por pneumococo foi de 29600, com 8554 óbitos (BRICKS; BEREZIN, 2006).

As infecções causadas por S. pneumoniae podem ser divididas em duas categorias:

- Doenças invasivas: bacteremia, pneumonia bacterêmica, empiema pleural, meningite, sepse, peritonite, artrite e osteomielite;
- Doenças não-invasivas: otite aguda do ouvido médio, sinusite, conjuntivite, bronquite e pneumonia. (BRICKS; BEREZIN, 2006).

Há também a delimitação de grupos de risco para doenças invasivas causadas por *S. pneumoniae*, a seguir:

- Crianças menores de 5 anos;
- Idosos (maiores de 65 anos);
- Pessoas que apresentam comprometimento da resposta imune por doença congênita ou adquirida (incluindo portadores do HIV sintomáticos e assintomáticos) ou que estão em uso de tratamentos imunossupressores;
- Portadores de asplenia anatômica ou funcional (inclui anemias hemolíticas, como anemia falciforme e esferocitose);
- Portadores de doenças crônicas (nefropatias, doenças cardiorrespiratórias, diabetes, alcoolismo, cirrose, asma e trissomias);
- Indivíduos com fratura de crânio, fístula liquórica e submetidos à cirurgia de crânio, incluindo colocação de implante coclear;
- Alguns grupos étnicos (índios Navajos, Apaches, nativos do Alasca e Austrália, raça negra);
- Pessoas que vivem em ambientes aglomerados (creches, escolas) ou que têm contato com crianças;
- Pessoas expostas à fumaça de cigarro;
- Após infecções virais, particularmente pós- influenza e infecção pelo vírus sincicial respiratório.

Estima-se que o pneumococo seja o principal agente de pneumonias em quase todas as faixas etárias. No Brasil, em 2004, a freqüência de internações por pneumonia em crianças abaixo de cinco anos foi de 2.500/100.000, e a taxa de mortalidade por doença respiratória atingiu 25/100.000 nesta faixa etária (BRICKS; BEREZIN, 2006).

1.2 CÁPSULA POLISSACARÍDICA E FATORES DE VIRULÊNCIA

A membrana celular do pneumococo é uma bi-camada lipídica típica, composta de fosfolipídios, glicolipídios e proteínas. Mudanças na composição dos lipídios, como o grau de insaturação das cadeias acil e os comprimentos e graus de atividade, resultam em alterações nas características biofísicas da membrana.

A parede celular do microrganismo é composta por: peptidioglicana, ácidos teicóico (TA) e lipoteicóico (LTA), que se diferenciam somente na ligação à parede celular; e fosforilcolina (*PCho*). A fosforilcolina não somente é reconhecida pelo domínio de ligação de proteínas ligantes de colina (CBP), mas funciona também como adesina no reconhecimento do receptor do fator de ativação plaquetária (rPAF) das células do hospedeiro. (BERGMANN; HAMMESCHMIDT, 2006).

A cápsula polissacarídica é essencial para a virulência, e a regulação de seu tamanho é crítica para a sobrevivência em diferentes ambientes no hospedeiro; ela é reconhecidamente o fator de virulência mais expressivo do pneumococo, que o protege contra a ação dos mecanismos de defesa inespecíficos do hospedeiro durante a infecção (MORONA et al., 1999). Alguns estudos demonstraram que altas quantidades de polissacarídeo impedem a adesão às células do hospedeiro, provavelmente pelo mascaramento dos outros determinantes de virulência, como: hialuronato liase (Hyl), pneumolisina (Ply), NanA e NanB, LytA, CbpA, PsaA e PspA (JEDRZEJAS, 2001), como mostra a Figura 1. A expressão do polissacarídeo torna o microrganismo resistente aos mecanismos de "clearance" do hospedeiro (lise mediada pelo sistema complemento) e opsonofagocitose (KIM; WEISER, 1998; KIM et al., 1999). Já as cepas acapsuladas não são virulentas.

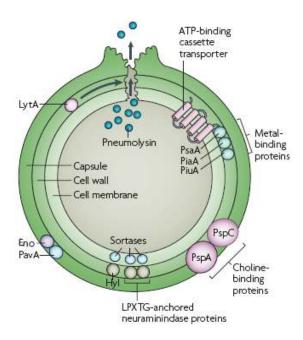


Figura 1: Estruturas da cápsula e parede celular e seus fatores de virulência (KADIOGLU et al., 2008).

1.2.1 POLISSACARÍDEO CAPSULAR

Como explicado acima, a cápsula polissacarídica do *S. pneumoniae* desempenha um importante papel na patogênese microbiana, incluindo a inibição da fagocitose, a prevenção da deposição e da lise mediada pelo complemento, a inibição da aderência às células do hospedeiro e além de contribuir para o processo inflamatório. Da mesma forma, os polissacarídeos são importantes em uma variedade de processos fisiológicos do microrganismo, incluindo a integridade estrutural, sinalização e desenvolvimento (VENTURA et al., 2006). Para ambos, a habilidade de alterar a quantidade de polissacarídeo produzido pode ser essencial para a funcionalidade e sobrevivência em diferentes nichos.

Com exceção do sorotipo 3, o polissacarídeo da cápsula é covalentemente ligado à superfície externa da peptideoglicana da parede celular. A maior parte dos polissacarídeos são altamente carregados em pH fisiológico e isto interfere diretamente na interação com fagócitos. A cápsula forma um escudo inerte que parece prevenir a região Fc do IgG ou o componente do sistema complemento (iC3b) – que, sem a presença da cápsula, poderia se ligar às estruturas mais profundas da superfície celular (por exemplo, ácido teicóico e proteínas de superfície) – de interagir com receptores importantes das células fagocíticas.

Dados mais recentes indicam que a cápsula pode reduzir a quantidade total de complemento que é depositado na superfície bacteriana (KADIOGLU et al., 2008). Fernebro et al. relataram que a cápsula fornece um grau de resistência à autólise espontânea ou induzida por antibióticos, contribuindo assim para a tolerância à antibióticos em isolados clínicos.

O polissacarídeo desta cápsula é responsável pela diferenciação do pneumococo em 91 tipos sorológicos, ou sorotipos, baseados nas suas diferenças químicas e imunogênicas (PARK et al, 2008). Além disso, a virulência do *S. pneumoniae* está relacionada com o sorotipo e a espessura da cápsula numa cepa específica. Logo, a virulência desta bactéria difere entre os sorotipos, sendo alguns considerados mais virulentos por estarem mais freqüentemente associados às doenças (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 19A), enquanto outros sorotipos são freqüentemente isolados de portadores sadios (PORAT et al., 2001). Há também um reflexo na capacidade relativa de cada sorotipo em resistir à fagocitose, bem como diferenças em suas habilidades de desencadear resposta imune humoral. Assim, a produção da cápsula é indispensável para a virulência pneumocócica, além de inibir fortemente a fagocitose em indivíduos não imunizados (KADIOGLU et al., 2008).

Os polissacarídeos capsulares (PS) são compostos por unidades repetitivas de oligossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. A produção do CPS requer uma importante via complexa, que inclui: síntese de monossacarídeos ativados – precursores de nucleotídeos; transferência seqüencial de açúcares através de lipídeos carreadores para formar as unidades repetitivas de PS capsular; polimerização subseqüente, exportação e ligação à superfície celular, como mostra a

Figura 2. Estudos de genética clássica feitos por Austrian et al (KADIOGLU et al., 2008) demonstraram que os genes que codificam o CPS estão intimamente ligados ao cromossomo do *S. pneumoniae*.

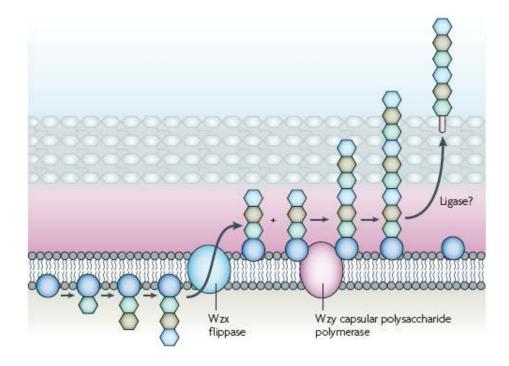


Figura 2: Esquema da biossíntese do polissacarídeo capsular (Kadioglu et al., 2008)

Na Figura 3 está representada a estrutura química da unidade monomérica do polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 6B, objeto de estudo desta tese.

Figura 3: Unidade monomérica do polissacarídeo capsular de S. pneumoniae sorotipo 6B.

Para os diferentes sorotipos capsulares de *S. pneumoniae*, dois mecanismos distintos de síntese foram descritos (YOTHER, 2004) e cada um parece utilizar mecanismos diferentes para controlar a produção da cápsula. A maioria das cápsulas é sintetizada pelo mecanismo

dependente de Wzy-polimerase, no qual as unidades repetitivas são sintetizadas na face interior da membrana citoplasmática por múltiplas glicosiltransferases e, em seguida, essas unidades repetitivas são polimerizadas na face externa da membrana (

Figura 2). O comprimento da cadeia e a quantidade de unidades repetitivas são afetados, ao menos em parte, pela ação do sistema fosfo-regulatório dependente de tirosina, codificado pela região "upstream" do locus da cápsula (VENTURA et al., 2006).

O segundo mecanismo de síntese ocorre nos sorotipos 3 e 37, e é catalisada por uma glicosiltransferase simples (sintase). Nestes sorotipos, o sistema fosfo-regulatório não está presente (sorotipo 37) ou não é funcional (sorotipo 3), indicando que outros mecanismos podem ser responsáveis pela quantidade de cápsula e comprimento de cadeia. A cápsula do sorotipo 3 não é ligada à parede celular, mas se mantém associada via fosfaditilglicerol da membrana (VENTURA et al., 2006).

1.2.2 PROCESSO DE PATOGÊNESE

A ocorrência de variantes de colônia, com fenótipo opaco e transparente, resultante da variação de fase é associada a diferentes níveis de expressão da cápsula. A variação espontânea da morfologia da colônia para o fenótipo transparente é relacionada com expressão reduzida de PS e capacidade de colonização da nasofaringe aumentada. Este mecanismo de modulação da cápsula é importante no processo de transição entre colonização e doença invasiva (WEISER et al., 1999). S. pneumoniae produz uma ampla variedade de proteínas de superfície especializadas e algumas delas estão adaptadas para interagir com componentes celulares do hospedeiro durante os estágios de colonização ou disseminação da bactéria (BERGMANN; HAMMERSCHMIDT, 2006); participam da patogênese da doença tanto como mediadores de inflamação, como para o ataque direto aos tecidos do hospedeiro (JANSEN, 2000). Tal adaptação do microrganismo aos diferentes nichos ecológicos do hospedeiro é o ponto crucial do seu mecanismo de patogênese (OVERWEG et al. 2000). E, para isto, se torna necessário a regulação e síntese de estruturas-chave de superfície, principalmente de proteínas de superfície como LytA, PspA, PspC e CbpA, além de ácido teicóico, fosfatidilcolina e PS capsular, o que leva à variação espontânea de fase, a qual pode ser detectada pela mudança da morfologia da colônia.

A variante transparente (T) possui menores quantidades de PS e altas quantidades de fosfatidilcolina, Lyt A e PspC, que auxiliam na adesão à mucosa. Já a variante opaca (O) expressa maior quantidade de PS capsular e da proteína PspA (KIM; WEISER, 1998; MAGEE; YOTHER, 2001; WEISER et al., 1994).

Proteínas ligantes de colina (CBPs) possuem uma organização modular que consiste em um peptídeo líder, um domínio N-terminal biologicamente ativo e um domínio de ligação à colina (CBD) que se une à fosforilcolina (*PCho*). O pneumococo produz de 13 a 16 diferentes CBPs, incluindo quatro hidrolases de parede celular, importantes para a virulência: a autolisina LytA (amidase N-acetil-muramoil-L-alanina), LytB (β-N-acetilglucosaminidase), LytC ou lisozima (β-N-acetilmuramidase) e a fosforilcolina esterase (BERGMANN; HAMMERSCHMIDT, 2006).

Além disso, o pneumococo produz algumas proteases relacionadas com a virulência que estão expostas na superfície. Como exemplo importante tem-se a HtrA, uma chaperonina (serinoprotease "heat-shock") dependente de temperatura. HtrA está envolvida na resistência ao estresse oxidativo, na colonização da nasofaringe de ratos e na pneumonia pneumocócica. Foi demonstrado que lipoproteínas, incluindo permeases, são essenciais para o transporte de substrato e adaptação do microrganismo aos diversos nichos no hospedeiro (BERGMAN; HAMMERSCHMIDT, 2006).

O conhecimento das funções das proteínas de superfície e das proteínas secretadas durante estágios específicos de colonização e invasão permanece ainda pouco explorado.

A transição da colonização da nasofaringe para a doença invasiva é claramente um divisor de águas na relação entre o *S. pneumoniae* e seu hospedeiro e envolve uma mudança importante na expressão de importantes fatores de virulência, conforme o patógeno se adapta a este microambiente alterado. A expressão máxima da cápsula é essencial para a virulência sistêmica, mas a extensão da exposição de outras estruturas pneumocócicas de superfície – como as proteínas acima citadas – é também influenciada pela espessura da cápsula.

Estas descobertas acerca da variação de fase ilustram como a fisiologia do pneumococo é complexa e ainda não se sabe bem o que estimula a mudança de fase "in vitro", o que pode ser um problema, do ponto de vista do processo, caso o microrganismo de opaco passe a transparente, ou seja, produza menos PS. Por outro lado, se fosse possível modificar o microrganismo de transparente para opaco, haveria maior produção de PS.

1.3 METABOLISMO

S. pneumoniae apresentam-se como microrganismos Gram-positivos com morfologia de cocos, diplococos lanceolados ou cadeias (KLEIN; ELLIS, 1997). Crescem tipicamente de modo difuso em caldo e são considerados anaeróbios facultativos (KIM; WEISER, 1998) ou aerotolerantes (AUZAT et al, 1999) e algumas cepas são dependentes de CO₂ para o seu isolamento em material clínico; são α-hemolíticos e a identificação é baseada na morfologia da colônia em placa de ágar-sangue, sensibilidade à optoquina, solubilidade em bile e presença de cápsula; são sensíveis ao calor e ao ressecamento; são catalase e citocromo-oxidase negativos e com o envelhecimento da cultura ocorre rápida diminuição da concentração de células viáveis devido ao acúmulo de peróxido de hidrogênio (BRANDILEONE et al. 1994, TANIAI et al., 2008) e à atividade de suas enzimas líticas (LÓPEZ et al. 2000)

O *S. pneumoniae* é membro do grupo de bactérias produtoras de ácido lático e sob condições anaeróbias, acredita-se que seja dependente da fermentação homolática para obtenção da energia necessária para o crescimento, onde a glicose é metabolizada a piruvato e o lactato é o produto final do metabolismo (TANIAI et al., 2008).

Sob aerobiose, no entanto, o piruvato é convertido a acetato, sendo que o acetil-fosfato é um intermediário capaz de fosforilar ADP gerando ATP pela ação da enzima acetato quinase (AK). Consequentemente há formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), CO₂ e acetil-fosfato a partir de piruvato, ortofosfato e O₂, como demonstrado na Figura 4.

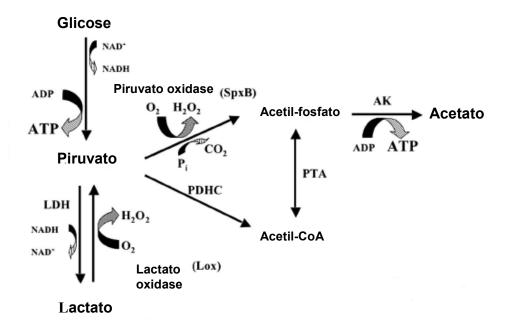


Figura 4: Metabolismo da glicose em *S. pneumoniae* em condição aeróbica (adaptado de Taniai et al., 2008). Lox: lactato oxidase; PTA: fosfotransacetilase; PDHC: complexo piruvato desidrogenase; AK: acetatoquinase; SpxB: Piruvato oxidase; LDH: lactato desidrogenase

A variação nas condições de cultivo pode levar a mudanças nas propriedades e no metabolismo do microrganismo.

Análises do genoma sugerem que o pneumococo tem vias metabólicas para catabolismo de pentatióis, bem como para celobiose, frutose, galactose, galactitol, glicose, glicerol, lactose, manitol, manose, rafinose, sacarose, trealose e maltossacarídeos. Adicionalmente, dez (10) aminoácidos e N-acetilglicosamina podem ser usados como fontes de carbono e nitrogênio (TANIAI et al., 2008).

Glicose, manitol, gluconato ou piruvato são utilizados exclusivamente como fonte de energia. Todos os átomos de carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O) estão envolvidos na redução da fonte de energia (neutralidade redox). Quando há oxigênio presente, alguns streptococci são capazes de oxidar o NADH gerado na glicólise com NADH oxidase (AUZAT et al., 1999), o que também foi descrito para o pneumococo.

Um balanço completo de uma fermentação contém balanço redox entre fontes de energia e produtos e geração de energia (NEIJSSEL et al 1997).

O catabolismo da glicose pelo pneumococo ocorre pela via clássica (Embden-Meyerhof):

1 glicose + 2 NAD⁺+ 2ADP + 2Pi \rightarrow 2 piruvatos + 2NADH + 2H⁺+ 2ATPs

Uma vez que o piruvato é formado, o NADH gerado na glicólise necessita ser reoxidado e isto pode ocorrer por vias distintas:

- Catálise por lactato desidrogenase (LDH). A completa conversão do piruvato a lactato resolve o problema de neutralidade redox da célula e esta via é a mais simples;
- 2. Catálise por piruvato-formato-liase (PFL) gerando acetil-CoA e formiato. Esta reação ocorre somente em condições estritas de anaerobiose, porque a PFL é extremamente sensível à presença de oxigênio e sua síntese é reprimida em condições de aerobiose. A enzima é inibida também pelas baixas concentrações de gliceraldeído-3-fosfato ou dihidroxiacetona-fosfato; possui baixa atividade quando a glicose está presente em altas concentrações. O formiato não é favorecido à metabolização, porém a acetil-CoA pode ser convertida a acetato via fosfotransacetilase (PTA) e acetato-quinase (AK), produzindo ATP (Figura 5).

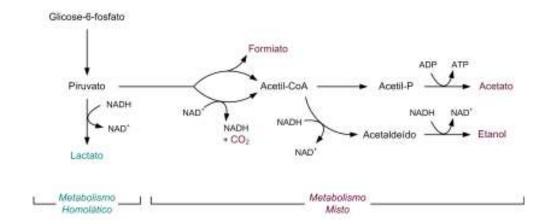


Figura 5: Metabolismo anaeróbio do S. pneumoniae.

A produção de acetato ao invés de lactato a partir de piruvato é, portanto, um processo energeticamente favorável.

A cada piruvato convertido em acetil-CoA e formiato, um (01) NADH formado na glicólise necessita ser oxidado; tem-se a conversão adicional de piruvato a acetil-CoA e formiato, seguido de redução do acetato até etanol (via acetaldeído-desidrogenase e etanol-desidrogenase).

Organismos homofermentativos convertem glicose quase que exclusivamente a lactato. Porém, diferentes vias metabólicas fermentativas são requeridas quando os microrganismos crescem em baixas quantidades de glicose.

Altas concentrações de glicose no meio levam a altos níveis de intermediários glicolíticos como frutose 1,6-bifosfato (FBP), dihidroxiacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído 3-fosfato (GAP). FBP ativa a lactato-desidrogenase (LDH) e altos níveis de DHAP ou GAP inibem a atividade de PFL. O efeito combinado gera um maior fluxo direcionado ao lactato. Sob condições limitadas de glicose, a concentração intracelular destes intermediários glicolíticos é baixa, que resulta na diferente separação do fluxo metabólico a partir do piruvato.

- 3. Em condições aeróbicas o piruvato é reduzido a lactato, porém a maior quantidade é oxidada a acetil-CoA e CO₂, gerando 1 NADH + 1 H⁺. Esta reação é catalisada pelo complexo piruvato-desidrogenase (PDHC), que é conhecidamente inativo sob condições anaeróbicas de crescimento. Acetil-CoA é, então, convertida a acetato que é secretado para o meio de cultura gerando 1 ATP (Figura 5)
- 4. Em aerobiose, o piruvato pode ser metabolizado a α-acetolactato, que subseqüentemente pode ser convertido a diacetil, acetoína e butanodiol. A primeira enzima, α-acetolactato sintase, tem baixa afinidade ao piruvato, portanto esta via metabólica somente será utilizada quando altos índices de piruvato estão presentes no meio intracelular.

1.4 EFEITO DO OXIGÊNIO NA EXPRESSÃO DO POLISSACARÍDEO CAPSULAR (PS)

A concentração de oxigênio no ambiente parece ser um fator importante na habilidade do pneumococo, um microrganismo aerotolerante, de regular as características de sua superfície celular. Foi verificado que há uma produção acentuada de PS na variante opaca (O) sob anaerobiose, enquanto a síntese de PS na variante transparente (T) se mantém comparativamente em baixos níveis sob condições aeróbias ou anaeróbias (WEISER, 2001).

A concentração de O₂ no ambiente afetaria então a regulação da síntese de PS capsular. Sugere-se que a disponibilidade de O₂ suprima a produção de PS, enquanto facilita a aderência do pneumococo à mucosa durante o estágio comensal, enquanto que sob ambiente com menor tensão de O₂, como na corrente sangüínea, há um aumento da virulência pelo

aumento da expressão de PS (WEISER et al., 2001).

Weiser et al. demonstraram que a expressão da piruvato-oxidase (SpxB), o fator mais presente na alta produção de peróxido de hidrogênio, é regulada diferentemente nas variantes opaca e transparente num ambiente aeróbio. A geração de H_2O_2 sob condições aeróbias causa efeitos citotóxicos nas células, assim como em outros microrganismos que competem pelo mesmo nicho no trato respiratório superior (WEISER et al., 2001). Mudanças importantes nas condições ambientais levam à indução de competência, que pode contribuir na patogênese da doença pneumocócica. É possível que o oxigênio aja como fator essencial na regulação da competência e da transformação natural (MORRISON et al. 1997).

Gonçalves et al. (2006) demonstrou que o estresse ambiental causado pela mudança na atmosfera de nitrogênio para ar comprimido no final da fase exponencial de crescimento induziu um pequeno aumento na morte celular (queda de concentração de células viáveis – UFC/mL e diminuição da biomassa), mas um grande aumento da quantidade de PS capsular no sobrenadante. Este comportamento foi atribuído a uma mudança morfológica da cápsula do microrganismo, evidenciada pela microscopia eletrônica que provavelmente se refletiria na virulência (Figura 6), hipótese que deveria ser testada com o sorotipo 6B, cujos modelos animais de colonização (PIMENTA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006) e letalidade estão estabelecidos (AMORY-RIVIER, 1999; KIM et al., 1999).

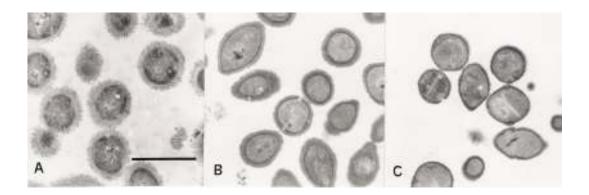


Figura 6: *S. pneumoniae 23F*. A) Anaerobiose, fase exponencial após 4 h; B) Anaerobiose, fase estacionária após 12 h; C) Aerobiose, fase estacionária após 12 h. (GONÇALVES et al., 2006).

1.5 BIOPROCESSOS

Os biorreatores podem ser operados em três modos principais: descontínuo, descontínuo alimentado e cultivo contínuo. A escolha da estratégia operacional influencia na conversão do substrato, concentração do produto, susceptibilidade à contaminação e confiabilidade no processo (DORAN, 1995).

Características como concentrações finais de substrato, produto e biomassa e o tempo necessário para a conversão podem ser determinadas por esquemas operacionais diferentes, utilizando balanço de massa.

Abaixo, tem-se uma breve descrição dos três modos principais de operação em biorreatores:

- Cultivo Descontínuo.

Os ensaios descontínuos ocorrem em sistemas fechados. Durante o processo não há entrada ou saída de material do biorreator, sendo o término do cultivo associado ao esgotamento de substrato limitante.

A maior parte dos biorreatores comerciais é operada em batelada. O reator clássico também é denominado tanque agitado. O custo advindo do processo em batelada é dependente do tempo levado para atingir a concentração de produto desejado ou o nível ideal de conversão do substrato; os custos operacionais são reduzidos se a formação do produto é desencadeada rapidamente (DORAN, 1995).

- Cultivo Descontínuo Alimentado.

Nos ensaios descontínuos alimentados, a alimentação intermitente ou contínua de nutrientes é utilizada para suplementar os conteúdos presentes no reator e fornecer controle sobre a concentração de substrato, enquanto os produtos permanecem em seu interior até o final do processo. Partindo-se com uma menor quantidade de substrato e adicionando-se mais nutrientes enquanto o processo de conversão se inicia, altas taxas de crescimento são evitadas. Isto é importante, por exemplo, em culturas onde a demanda de oxigênio durante a fase exponencial é muito grande para as capacidades do reator para transferência de massa. Além disso, se altas concentrações de substrato foram usada desde o início, elas podem inibir ou provocar o desencadeamento de caminhos metabólicos indesejáveis (DORAN, 1995).

Esta condição de cultivo apresenta vantagens em termos de produtividade (a quantidade do que se produz por litro de cultivo por tempo) em células e em metabólitos secundários, além de ser interessante por possibilitar a manutenção da velocidade de crescimento em valores controlados, já que a alimentação garante um controle das fontes necessárias ao crescimento (KIM *et al.*, 2001).

- Cultivo Contínuo.

Utilizado em alguns processos industriais (preparação de bebidas fermentadas, produção de levedo de pão e tratamento de esgoto). Uma vazão de entrada contendo substrato é alimentada ao tanque, que contém um dado volume de meio e um fluxo de saída, contendo células e produtos gerados e substrato não consumido. Portanto, as vazões de entrada e de saída são iguais e constantes (Fe=Fs=F) ao longo do tempo (regime permanente), fazendo com que o volume de cultivo seja constante.

- Cultivo Contínuo com Reciclo de Células (ou cultivo em perfusão).

O cultivo contínuo com reciclo opera com uma vazão de entrada, que alimenta substrato para o biorreator, e um fluxo de saída, que retira material de dentro do reator contendo células, produto e substrato não consumido. O líquido retirado passa por um sistema onde as células (uma parte ou o todo) podem ser recicladas, isto é, retornar para o biorreator. Para esta separação, as células podem ser centrifugadas, sedimentadas num tanque cônico ou filtradas; este último processo é o mais largamente utilizado (DORAN, 1995; PÖRTNER; MÄRKL, 1998; KWON et al., 2001). A operação permanece no estado estacionário e o volume total dentro do reator é constante. A maior barreira ao uso extensivo de membranas para filtração é a redução contínua do fluxo de permeado pela polarização e obstrução da membrana; esta obstrução é atribuída à adsorção de espécies orgânicas, precipitação de moléculas inorgânicas pouco solúveis e adesão dos microrganismos à superfície da membrana. A determinação da velocidade tangencial ideal da membrana torna-se necessária para evitar tal acontecimento.

1.5.1 MODELAGEM

A modelagem é bastante utilizada para definir as condições de operação em biorreatores. A implementação de modelos cinéticos e o controle de bioprocessos surgiram

para aprimorar as condições de cultivo, podendo assim, aumentar a produtividade. Portanto, a construção de modelos que descrevam adequadamente os bioprocessos e o monitoramento dos mesmos em tempo real são fundamentais tanto para a inferência de importantes variáveis de estado de difícil determinação em tempo real, quanto para otimização das condições de cultivo ou desenvolvimento e implementação de estratégias de controle.

Há, portanto, um forte incentivo econômico para o desenvolvimento e o aprimoramento de ferramentas e técnicas relacionadas aos bioprocessos, particularmente o de fermentação.

A Figura 7 demonstra a ligação de reatores a equipamentos de controle e obtenção de dados reais, para simulação de melhores condições de operação.

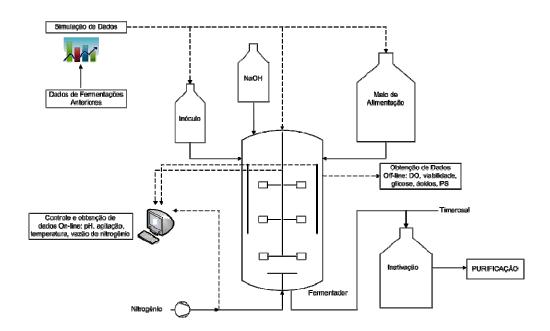


Figura 7: Fermentação: sistema de aquisição de dados ligado a fermentador.

1.6 CULTIVO DE S. PNEUMONIAE

Os dados sobre o cultivo do *S. pneumoniae* em biorreatores se mostram muito escassos na literatura. Supõe-se que as indústrias que detêm as patentes não tenham interesse em divulgá-los. O meio de cultura descrito pelo Instituto Mérieux (INSTITUT MÉRIEUX, 1980) para a produção de vacina é o mesmo descrito por Hoeprich em 1955. Há ainda outra patente

disponível, que substitui o hidrolisado ácido de caseína pelo hidrolisado pancreático de caseína (YAVORDIOS; COUSIN, 1983).

Os meios utilizados para o cultivo de *S. pneumoniae* em laboratórios clínicos e de pesquisa contêm extratos de tecidos animais, tais como BHI (Brain and heart infusion), Columbia e Todd-Hewitt, suplementados com extrato de levedura. Entretanto, meios com extratos animais são inadequados para a produção de vacinas devido aos impedimentos regulatórios (Note for Guidance on Minimising the Risk of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents via Human and Veterinary Medicinal Products, 2008) e à dificuldade de purificação posterior do polissacarídeo.

É possível que haja requerimentos nutricionais específicos para cada sorotipo, já verificados por Kim et al. (1996) para os sorotipos 1 e 4. Além das patentes largamente conhecidas, alguns artigos tratam do cultivo para produção de polissacarídeo capsular. Relatou-se que as melhores condições para cultivo do *S. pneumoniae* e obtenção de polissacarídeo capsular (PS) foram: pH neutro, mínimo conteúdo de O₂ dissolvido e 5-11% de CO₂ na mistura gasosa (GRUBER et al., 1986). Sabe-se também que quando o inóculo foi tomado ao final da fase exponencial de crescimento, obtiveram-se os melhores resultados no reator em termos de velocidade específica de crescimento, produtividade e fator de conversão de substrato a células (GRUBER et al., 1986).

Muitos ajustes foram necessários até a obtenção de um meio de cultura que proporcionasse altas densidades celulares e produção dos fatores de virulência. Gonçalves et al (2002) otimizaram o meio de cultura descrito por Hoeperich para o cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F em biorreatores e Restrepo et al (2005) descreveram o comportamento de alguns sorotipos em meios de cultura modificados.

1.6.1 INÓCULO

Na literatura, há poucos estudos que abordam a influência do estado fisiológico do inóculo visando maior produtividade; a maior parte deles descrevem o efeito do pH, temperatura, composição do meio de cultura e condições de crescimento microbiano (LEAL-SÁNCHES et al., 2002).

A preparação do inóculo é parte do processo de desenvolvimento fermentativo que assegura o fenótipo microbiano para propósitos experimentais e produtivos, fornecendo uma

biomassa de alta produtividade. Esta preparação afetará a expressão do fenótipo e genótipo, qualitativamente, quantitativamente e temporalmente. Por isso, o desenvolvimento do inóculo é um problema fundamental.

Os fatores que influenciam o inóculo e, conseqüentemente a fase final de produção são bastante heterogêneos e dependentes da especificidade da cepa de trabalho. A estratégia de preparação do inóculo inclui: meio de cultura, condições de incubação, dinâmica de crescimento microbiano, qualidade do inóculo e volume de inóculo transferido.

1.6.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

S. pneumoniae necessita de colina para o crescimento em meio de cultura definido, e agentes redutores são essenciais. A maior parte das cepas requer complexo vitamínico B (biotina, nicotinamida, pantotenato, piridoxal, riboflavina e tiamina), adenina, guanina, uracila e 7-10 aminoácidos. O metabolismo energético é fermentativo, com pH ótimo situado entre 6,5-8,3 (RESTREPO et al., 2005). No entanto, a grande limitação para aumentar a biomassa e a produção de PS deve-se ao fato de o pneumococo ter o metabolismo restrito à fosforilação ao nível do substrato e de que os produtos da fermentação inibem o crescimento.

Há duas características adicionais que influenciam o crescimento do *S. pneumoniae*: autólise e competência, sendo que ambas têm grande influência no crescimento em biorreator, sendo que a competência é mais difícil de ser estudada. O processo de autólise se inicia no fim da fase logarítmica (exponencial), é mediada por ferormônios liberados por um sistema de *quorum sensing* e caracterizada por altos índices de morte celular. A competência, ou capacidade para transformação genética, é bem definida, mas não é afetada pelo crescimento, tanto "*in vivo*" quanto "*in vitro*". Existe uma relação entre autólise e competência, porém esta relação não é direta. Mutações nos sítios de ligação à colina presentes nas autolisinas promovem crescimento anormal, formação de longas cadeias, perda de competência para transformação, resistência à autólise e resistência a antibióticos que atuam sobre a parede celular. Supõe-se que a supressão da autólise possa aumentar a produção de células viáveis ainda na fase exponencial de crescimento bacteriano (RESTREPO et al., 2005).

1.7 VACINAS

Atualmente, encontram-se disponíveis no mercado, duas vacinas de pneumococo: a vacina polissacarídica 23-valente, constituída por uma mistura de 23 polissacarídeos capsulares, e a vacina conjugada 7-valente, a qual contempla os sete (7) sorotipos mais freqüentes como causa de doença invasiva em crianças com até cinco anos nos EUA e países da Europa (CDC, 1989).

A vacina contendo os vinte e três (23) antígenos polissacarídeos purificados (vacina 23-valente) é eficaz em indivíduo adulto jovem, imunologicamente competente (SIMS et al., 1988; SHAPIRO et al., 1991). Esta vacina polissacarídica contém os polissacarídeos capsulares 1, 2, 3, 4, 5,6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F, sendo que cerca de 94% das cepas isoladas de pacientes no Brasil estão representados na vacina, ou estão sorologicamente relacionados com os sorotipos da vacina (BRANDILEONE et al., 1997).

A vacina 23-valente é recomendada para crianças com mais de dois anos, adultos em condição de risco à infecção pneumocócica e indivíduos acima de 65 anos (CDC, 1989). Pelo fato do polissacarídeo ser um antígeno timo-independente apresenta várias características desfavoráveis: (1) não ativa células de memória; (2) induz níveis variáveis de anticorpos sendo estes predominantemente IgM; (3) produz baixa resposta imune em crianças principalmente os menores de dois anos por não estimular a maturação clonal; (4) os anticorpos produzidos são de baixa avidez.

Na década de 80, concentraram-se esforços para se controlar a doença pneumocócica com o desenvolvimento de vacinas novas, as vacinas conjugadas polissacarídeos-proteínas (COHEN, 1994, AHMAD & CHAPNICK, 1999). A vacina conjugada atualmente em uso contra pneumococo foi licenciada em 2000, sob o nome comercial de Prevenar (Wyeth) e contém PS de 7 sorotipos – 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F – conjugados à toxina diftérica mutada, CRM₁₉₇. Esta formulação mostrou-se eficaz contra doença invasiva em crianças abaixo de dois anos, porém a proteção continua sendo sorotipo-específica (KADIOGLU et al., 2008). Ademais, o reduzido número de PS incluídos nesta formulação – uma limitação imposta pelo processo de conjugação e seu alto custo – aliado à ausência de reatividade cruzada entre sorotipos torna sua cobertura reduzida, por não incluir sorotipos prevalentes em diversas partes do globo, como a ausência dos sorotipos 1 e 5 do Brasil (BRANDILEONE et al., 2006). Assim, a utilização da vacina pode acarretar, após algum tempo, a alteração do

espectro de prevalência dos isolados na população, com o surgimento de sorotipos mais raros, e redução na eficácia vacinal.

Em 2001, esta vacina conjugada foi introduzida no Brasil e atualmente encontra-se disponível em clínicas privadas ou nos Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais (CRIES) para os grupos de risco às infecções pneumocócicas. Esta vacina é pediátrica sendo eficaz em crianças com menos de dois anos de idade, pois o conjugado proteína-polissacarídeo induz uma resposta imunológica mais duradoura dependente de célula T e com resposta ao reforço vacinal (BRILES et al., 1998).

A variação regional na distribuição dos sorotipos representa um problema na elaboração de vacinas conjugadas, pois a formulação vacinal engloba múltiplos, porém poucos sorotipos. Conseqüentemente, diferentes taxas de impacto potencial da vacina conjugada 7-valente são estimadas para regiões geográficas diferentes. No Brasil, os sorotipos prevalentes de pneumococo isolados de doença invasiva são 14 (15,6%), 1 (9,4%), 6B (7,3%), 5 (6,1%) 18C (6,0%), 6A (5,0%), 3 (4,9%), 23F (4,7%), 19F (4,4%), 9V (3,2%), 4 (2,9%), 19A (2,5%) e 10A (2,4%) estimando-se um impacto potencial de aproximadamente 69,6% sobre as cepas isoladas de crianças com até cinco anos de idade com doença invasiva (BRANDILEONE et al., 2006). Esta taxa de cobertura da vacina 7-valente é menor quando comparada às taxas estimadas para os países do hemisfério norte, as quais estão ao redor de 97% (DI FABIO et al., 2001). A baixa cobertura da vacina conjugada 7-valente estimada para o Brasil deve-se principalmente às prevalências dos sorotipos 1 e 5 no país, os quais não estão incluídos na vacina.

Um estudo mais recente realizado por Garcia et al., (2006) sobre a vacinação nas Américas apontou dados sobre os 6 países (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, México e Uruguai) que compõem o projeto SIREVA coordenado pelo OPAS2/OMS3 (DI FABIO, 2001). Dados sobre os sorotipos prevalentes nesses países mostram que o impacto da vacina conjugada 7- valente seria de 65%.

O custo da vacina conjugada é alto, e é pouco provável que esta seja utilizada extensivamente em países em desenvolvimento, onde a taxa de morte de crianças por doença pneumocócica invasiva é maior (KADIOGLU et al., 2008).

Em 2009 mais duas vacinas foram licenciadas: a vacina conjugada 10-valente (PCV-10 – PhiD-CV, GlaxoSmithKline), que inclui os sorotipos da 7-valente mais o sorotipo 1, 5 e 7F, e a vacina conjugada 13-valente (PCV-13, Wyeth).

Claramente, há uma urgência para o desenvolvimento de vacinas pneumocócicas alternativas. A abordagem mais promissora até o momento é o desenvolvimento de vacinas

baseadas em proteínas pneumocócicas que contribuem na virulência e são comuns para todos os sorotipos. As proteínas mais estudadas para este fim são: o PspA, PspC e a pneumolisina.

Esta tese é parte de um projeto maior, desenvolvido no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, que consiste no desenvolvimento de uma vacina conjugada adequada para o Brasil no qual os três polissacarídeos das cepas mais prevalentes no Brasil (14, 6B e 1) serão conjugados com uma proteína do próprio pneumococo (PspA - Pneumococcal surface protein A). Assim, além da proteção dada pelos PS mais importantes no Brasil, a vacina deverá ter uma ampla cobertura dada pela PspA e, pelo fato de apenas três PS estarem presentes, esta vacina conjugada seria bem mais barata que as atuais.

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, o sorotipo 6B é freqüentemente encontrado na população pediátrica e apresenta um elevado número de cepas isoladas resistentes à penicilina, devido à pressão seletiva e ao uso contínuo ou repetitivo de antibióticos. Detém a segunda posição na incidência da doença pneumocócica em crianças, causando morte ou colonização da oro e nasofaringe (LUCAREVSCHI et al., 2003).

O presente projeto é parte de um projeto maior, desenvolvido no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, que consiste no desenvolvimento de uma vacina conjugada adequada para o Brasil no qual os três polissacarídeos prevalentes no Brasil (14, 6B e 1) serão conjugados com a proteína PspA (Pneumococcal surface protein A).

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desta tese foi estudar o cultivo de Streptococcus pneumoniae sorotipo 6B em biorreator, procurando aumentar a sua produtividade e rendimento em polissacarídeo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o comportamento do microrganismo submetido a diferentes condições de cultivo em biorreator:
 - a. Cultivos descontínuos:
 - b. Cultivos descontínuos alimentados com pulso de glicose e acetato de amônio.
 A influência do momento do pulso na liberação de polissacarídeo capsular para o sobrenadante.
 - c. Cultivos descontínuos alimentados (dois tipos de alimentação exponencial e constante), com concentrações de substratos diferentes, tanto no meio do fermentador quanto no meio de alimentação.
 - d. Cultivos contínuos com reciclo de células por perfusão/microfiltração para

- minimizar o efeito inibitório da presença do lactato, manter a viabilidade e aumentar a densidade celular e a produção de polissacarídeo capsular (PS).
- Estudar o efeito do "estado fisiológico" do inóculo e do momento de pulso na produção de polissacarídeo capsular nos ensaios descontínuos alimentados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CEPA

A cepa ST 433/03 do sorotipo 6B liofilizada foi fornecida pelo Serviço de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, laboratório de referência.

3.2 ESTABELECIMENTO DO ESTOQUE CONGELADO

O lote de trabalho do sorotipo 6B foi obtido a partir da cepa liofilizada. Esta foi ressuspensa em solução salina 0,9% estéril e cultivada em quatro tubos contendo meio ágar chocolate inclinado. Estes tubos foram incubados por 12–14 h, em lata fechada, a 37 °C, e atmosfera anaeróbia. A pureza da cultura foi verificada por Método de Gram. As bactérias foram repassadas para oito novos tubos de ágar chocolate e novamente incubadas sob mesmas condições por, no máximo 6 h, verificando-se em seguida novamente a pureza da cultura. As culturas celulares foram ressuspensas com meio de Greaves (LUND; HENRICHSEN, 1978), e posteriormente armazenadas em criotubos estéreis, levadas ao congelamento, primeiramente a –20 °C, por 12 h, e posteriormente a –70 °C (em freezer). O último lote estoque foi armazenado em Nitrogênio Líquido (botijão criogênico – Taylor Wharton ® - 35 VHC). Quando armazenado em nitrogênio líquido, o estoque apresentou maior estabilidade, mantendo o número de células viáveis (UFC/mL) por um período maior que 12 meses, diferente do observado com os criotubos armazenados em freezer (-70 °C).

3.3 MEIOS DE CULTURA

O meio semi-sólido ágar chocolate foi utilizado para multiplicação das células liofilizadas para preparo do estoque congelado. O meio ágar sangue foi empregado para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL). O meio Greaves foi utilizado para

congelamento e conservação de bactérias. Para o cultivo em meio líquido, foi usado o meio Hoeprich modificado. A composição de cada meio é descrita a seguir.

3.3.1 MEIOS SEMI-SÓLIDOS

3.3.1.1 ÁGAR CHOCOLATE

Tabela 1: Composição do meio ágar chocolate

Reagente	Concentração
Sangue de Cavalo	10% 37,0 g/L 20,0 g/L
Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Difco)	37,0 g/L
Bacto-Ágar (Difco)	20,0 g/L

O meio base foi autoclavado por 20 minutos a 120 °C. O sangue foi acrescentado e o meio aquecido em banho-maria até que as hemáceas fossem lisadas, conferindo ao meio coloração marrom-avermelhada.

3.3.1.2 ÁGAR SANGUE

Tabela 2: Composição do meio ágar sangue

Reagente	Concentração
Sangue de Carneiro	5%
Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Difco)	37,0 g/L
Bacto Ágar	20,0 g/L

O meio base foi autoclavado por 20 minutos a 120 °C e o sangue acrescentado à temperatura de aproximadamente 50 °C, de maneira que as hemáceas não sofressem lise (coloração vermelha intensa).

3.3.2 MEIO PARA CONGELAMENTO

Proposto por Lund e Henrichsen (1978), o meio Greaves foi utilizado para a produção do estoque congelado, acrescido de 30% de glicerol. Abaixo, tem-se a descrição deste meio.

Tabela 3: Composição do meio Greaves

Reagente	Concentração
Ácido glutâmico (sal monossódico) Glicerina PA	50,00 g/L 100,00 g/L 50,00 g/L
Albumina bovina (fração V)	50,00 g/L

Posterior esterilização por filtração em membrana 0,22 µm também estéril.

3.3.3 MEIO LÍQUIDO

A escolha do meio de cultura foi feita a partir de estudo anterior, proposto por Gonçalves et al. (2002). Para os ensaios descontínuos foi utilizada uma variante do meio de Hoeprich.

Tabela 4: Meio Hoeprich modificado (Gonçalves et al., 2002)

Reagente	Concentração
Hidrolisado ácido de caseína	37,50 g/L
Glicose Anidra	25,00 g/L
Extrato de Levedura ultrafiltrado	25,00 g/L
Fosfato bipotássico	6,25 g/L
Bicarbonato de sódio	1,00 g/L
L-glutamina	0,780 g/L
Asparagina	0,125 g/L
Colina	0,012 g/L
Solução de Sais	2,00mL/L
Ácido Tioglicólico 10%	1,00mL/L
рН	7,4

Tabela 5: Composição da solução de ácido tioglicólico

Reagente	Concentração
Bicarbonato de sódio	40,00 g/L
Ácido tioglicólico 10%	40,00 mL/L

Tabela 6: Composição da solução de sais

Reagente	Concentração
Sulfato de magnésio	250,00 g/L 2,50 g/L 0,40 g/L 0,18 g/L 10,00 mL/L
Sulfato ferroso	2,50 g/L
Sulfato de zinco	0,40 g/L
Sulfato de manganês	0,18 g/L
Ácido clorídrico	10,00 mL/L

O meio foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm e prontamente usado.

Para evitar uma suposta inibição pelo substrato, foram aplicados pulsos de glicose 50% e acetato de amônio 46,2% em alguns ensaios descontínuos alimentados.

3.3.4 PREPARO DO EXTRATO DE LEVEDURA ULTRAFILTRADO

O extrato de levedura foi dissolvido no menor volume possível de água destilada previamente aquecida e submetido à ultrafiltração em membrana PREP SCALE (cartucho TFF PLHK, poro de 100 kDa, celulose regenerada - Millipore®, cat. no. CDUF001LH e lote no. P0CN9773), em seguida foi feita uma diafiltração com quantidade abundante de água destilada. O ultrafiltrado, composto por moléculas menores que 100 kDa, foi recolhido e utilizado na composição do meio de cultura. Para o início do processo, o extrato de levedura total foi dissolvido em 2 L de água quente (concentração de 10 vezes) e o diafiltrado com 4-5 volumes de água.

A partir do segundo semestre de 2007, passamos a utilizar Extrato de Levedura Ultrafiltrado (BD, DifcoTM).

3.3.5 MODIFICAÇÕES DO MEIO DE CULTIVO EM REATOR.

Modificações no meio de cultivo foram propostas para alguns ensaios (9, 12 e 13, 14, 15, 16 e 17 e 18, ver abaixo, item 3.4.3 a descrição dos ensaios). A fim de otimizar a produção de polissacarídeo capsular, modelos baseados em dados reais foram desenhados para realização dos ensaios descontínuos alimentados (12 a 16) e contínuos com reciclo (17 e 18). Os ensaios com meio de cultura modificado estão na Tabela 7. Em todos os outros ensaios foi utilizado o meio cuja composição está na Tabela 4 (item 3.3.3).

Tabela 7: Composição dos meios de cultura modificados.

	Meio Batelada		Meio Alimentação			
Ensaio	Caseína	Extrato de	Glicose	Caseína	Extrato de	Glicose
	(g/L)	Levedura (g/L)	(g/L)	(g/L)	Levedura (g/L)	(g/L)
9	37,5	50,0	25,0	n/a	n/a	n/a
12 e 13	15,0	10,0	10,0	150,0	100,0	100,0
14	37,5	25,0	25,0	82,0	60,0	25,0
15 e 16	37,5	25,0	25,0	52,5	25,0	35,0
17 e 18	37,5	25,0	15,0	37,5	25,0	15,0

Todos os demais componentes do meio permaneceram nas mesmas concentrações indicadas na Tabela 4. N/a: não se aplica ao ensaio proposto.

3.3.6 PROCEDIMENTO DE LIMPEZA E ESTERILIZAÇÃO DO SISTEMA DE MEMBRANAS DO CULTIVO CONTÍNUO COM RECICLO CELULAR.

Para ensaios contínuos com reciclo de células foi necessário cuidado especial para manter a esterilidade do sistema. As membranas foram lavadas primeiramente por solução de NaOCl com 250 ppm de cloro ativo por 2 h, com auxílio de bomba peristáltica, seguida de 6 L de água destilada estéril, para retirada do NaOCl residual. Uma solução de PBS (tampão fosfato - pH 7,8) estéril preparou as membranas para a passagem da cultura celular (XU et al., 2006). A solução de enxagüe foi recolhida em recipiente estéril e enviada à Seção de Controle Microbiológico do Instituto Butantan para verificação da esterilidade.

3.4 CULTIVO

Um protocolo de cultivo para *S. pneumoniae* sorotipo 23F foi estabelecido no nosso laboratório (GONÇALVES et al., 2002; GONÇALVES et al., 2004). Optou-se por adotar este protocolo como ponto de partida para o desenho dos bioprocessos para o sorotipo 6B, sendo que foi modificado quando necessário.

3.4.1 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado a partir do estoque congelado e semeado em frascos contendo meio Hoeprich modificado (Tabela 4). Os frascos foram incubados por 12-14 h a 37 °C e atmosfera anaeróbica. Um volume deste cultivo, calculado de acordo com a equação 1, suficiente para prover uma densidade ótica inicial de 0,1 a 600 nm, foi utilizado como inóculo para os ensaios.

$$V_{in}=V_{cult} \times 0,1/DO_{in}$$
 equação (1)

Onde: V_{in} = volume da cultura do inóculo a ser transferido para o meio de cultivo,

 V_{cult} = volume de meio de cultivo,

DO_{in} = densidade ótica a 600 nm da cultura do inóculo.

3.4.2 ENSAIOS EM FRASCOS

Em frascos, um volume do inóculo (feito como em 3.4.1) foi adicionado ao meio de cultura e novamente incubado, a 37 °C e atmosfera anaeróbica. Os ensaios foram feitos em tubos de 50 mL contendo 50 mL de meio. Amostras foram tomadas a cada hora para leitura de densidade ótica a 600 nm e quantificação de polissacarídeo capsular livre no sobrenadante.

3.4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO EM REATOR

Procederam-se dezenove (18) ensaios em fermentador BioFlo 2000 (New Brunswick Scientific Inc., NJ, USA) sendo quinze (14) em dornas com capacidade para 5 L de cultivo e três (3) em dornas com capacidade para 10 L de cultura bacteriana. Soma-se também um (1) ensaio em BioFlo 3000 (New Brunswick Scientific Inc., NJ, USA) com capacidade de 3 L. Em todos os ensaios o pH foi controlado automaticamente pela adição de NaOH 5 M e polipropilenoglicol (PPG) foi utilizado como agente antiespumante quando necessário. A Figura 8 mostra cultivo descontínuo em duplicata em BioFlo 2000.



Figura 8: Ensaio descontínuo em duplicata. 1) fermentador; 2) balança; 3) hidróxido de sódio, para controle de pH; 4) tubo para retirada de amostra.

Segue uma descrição sucinta dos ensaios realizados:

Tabela 8: Ensaios realizados em biorreator, agrupados de acordo com as condições de cultivo.

	Tabela 8: Ensaios realizados em biorreator, agrupados de acordo com as condições de cultivo.			
Ensaio	Descrição	Condições de cultivo		
1	Cultivo descontínuo	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm). pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 200 rpm. Dorna de 5 L – 4 L de meio de cultura		
2	Cultivo descontínuo	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm). pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 200 rpm. Dorna de 5 L – 4 L de meio de cultura		
3	Cultivo descontínuo alimentado - pulso de glicose e acetato de amônio	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm) pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 200 rpm. Dorna de 5 L – 4,5 L de meio de cultura		
4	Cultivo descontínuo alimentado - pulso de glicose e acetato de amônio	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm). pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 200 rpm. Dorna de 5 L – 4,5 L de meio de cultura		
5	Cultivo descontínuo alimentado - pulso de glicose e acetato de amônio	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm). pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 200 rpm. Dorna de 5 L – 4,5 L de meio de cultura		
6	Cultivo descontínuo alimentado - pulso de glicose e acetato de amônio	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm). pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 200 rpm. Dorna de 5 L – 4 L de meio de cultura		
7	Cultivo descontínuo alimentado - pulso de glicose e acetato de amônio	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm). pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 200 rpm. Dorna de 5 L – 4 L de meio de cultura		
8	Cultivo descontínuo alimentado - pulso de glicose e acetato de amônio	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm) pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 250 rpm. Dorna de 10 L – 8 L de meio de cultura		
9	Cultivo descontínuo alimentado (pulso de glicose e acetato de amônio) – Meio com 2X extrato de levedura. (50,0g/L)	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm) pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 200 rpm. Dorna de 5 L – 4,5 L de meio de cultura		
10	Cultivo descontínuo alimentado (pulso de glicose e acetato de amônio) – Anaerobiose seguida de aerobiose	N ₂ 0,15 vvm, seguido de ar comprimido 0,1 vvm. pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação:250 rpm. Dorna de 10 L – 8 L de meio de cultura		
11	Cultivo descontínuo alimentado (pulso de glicose e acetato de amônio) – Anaerobiose seguida de aerobiose	N ₂ 0,15 vvm, seguido de ar comprimido 0,5 vvm. pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 250 rpm. Dorna de 10 L – 8 L de meio de cultura		
12	Cultivo descontínuo alimentado – alimentação constante	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm). pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 200 rpm. Dorna de 5 L - 2 L de meio de cultura. Alimentação constante - vazão: 0,14 L/h Meio alimentação: Caseína 150 g/L, YE 100 g/L, Glicose 100 g/L		
13	Cultivo descontínuo alimentado – alimentação constante	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm). pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 200 rpm. Dorna de 5 L - 2 L de meio de cultura. Alimentação constante - vazão: 0,14 L/h Meio alimentação: Caseína 150 g/L, YE 100 g/L, Glicose 100g/L		

Continuação.

14	Cultivo descontínuo alimentado – alimentação exponencial	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm). pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 200 rpm. Dorna de 5 L – 2 L de meio de cultura. Alimentação exponencial – vazão: 0,48e ^{0,08t} L/h Meio alimentação: Caseína 82 g/L, YE 25 g/L, Glicose 60 g/L
15	Cultivo descontínuo alimentado – alimentação exponencial	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm). pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 200 rpm. Dorna de 5 L - 2 L de meio de cultura. Alimentação exponencial - vazão: 0,48e ⁰ ·08t L/h Meio alimentação: Caseína 52,5 g/L, YE 25 g/L, Glicose 35 g/L
16	Cultivo descontínuo alimentado – alimentação exponencial	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm). pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 200 rpm. Dorna de 5 L – 2 L de meio de cultura. Alimentação exponencial – vazão: 0,48e ⁰ ·08t L/h Meio alimentação: Caseína 52,5 g/L, YE 25 g/L, Glicose 35g/L
17	Cultivo contínuo com recirculação de células	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm). pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação: 100 rpm. Vazão: 10 mL/min Dorna de 3 L – 1,5 L de meio de cultura.
18	Cultivo contínuo com recirculação de células	Anaerobiose (N ₂ 0,15 vvm) pH=7,0, temperatura: 37 °C, agitação:250 rpm. Vazão: 15 mL/min Dorna de 5 L – 4 L de meio de cultura.

3.4.4 CULTIVO CONTÍNUO COM RECICLO CELULAR

Utilizou-se fermentador BioFlo 3000 (New Brunswick Scientific Inc.), com capacidade para 3 L de cultura bacteriana. A ele, foi acoplado um sistema de três (3) membranas Durapore de poro 0,22 μm, 50 cm² (Millipore ® / PelliconXL, lote nº P2JN6608-27, cat. nº PXGVPPC50). O permeado foi coletado em recipiente de 4 L, previamente tarado por balança. Após quatro horas de cultivo, o sistema foi acionado e, simultaneamente e sob mesmo fluxo (10 mL/min), foi adicionado meio de cultura fresco, de modo a manter o volume do reator aproximadamente constante. O fluxo do permeado foi variável ao longo do cultivo, devido ao aumento da densidade celular. Esta variação foi devida à obstrução dos poros da membrana pelas células (DORAN, 1995; XU et al., 2006).

Segue-se o sistema de perfusão montado em nosso laboratório (Figura 9).

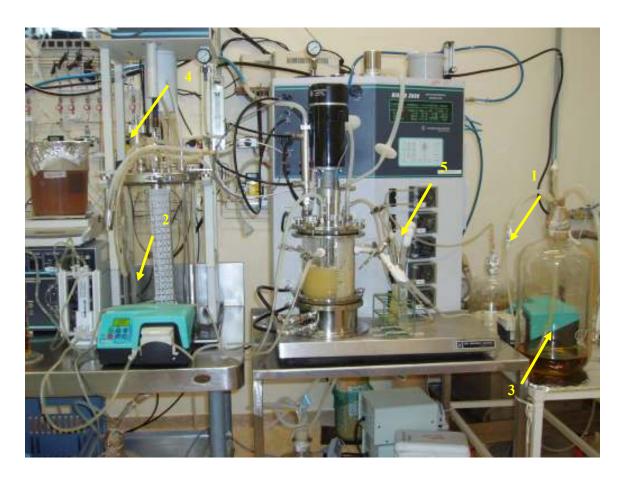


Figura 9: Sistema de membranas acopladas ao fermentador. 1- NaOH 5 M; 2- Sistema de membranas Durapore; 3- Meio para alimentação; 4- Balança e recipiente com permeado; 5-Fermentador.

3.5 AQUISIÇÃO DE DADOS

O controle, monitoramento e aquisição de dados obtidos em tempo real foram feitos por meio de interface com o software LabView 7.1 (National Instruments).

3.6 MODELAGEM

Dados experimentais foram utilizados para gerar modelos cinéticos, com a finalidade de simular condições de cultivo, que foram então empregadas para realização dos ensaios descontínuos alimentados com alimentação exponencial (ensaios 14, 15 e 16) e constante

(ensaios 12 e 13). Todo o trabalho foi desenvolvido no Departamento de Engenharia Química da UFSCar pelo doutorando Antônio Carlos Horta, sob supervisão da Dra. Maria do Carmo Nicoletti e Dra. Teresa Zangirolami. A descrição detalhada do modelo está no Anexo I.

Resumidamente, os modelos basearam-se na cinética do crescimento celular, como descrito por Hoppe e Hansford, com inibição não competitiva pelo produto. Como os dados disponíveis foram obtidos em cultivo conduzido em baixa concentração de glicose, a inibição do crescimento pelo substrato não foi incluída no modelo proposto. A expressão cinética escolhida para representar o crescimento celular e as equações diferenciais presentes no modelo estão descritas nas equações (1) a (5).

$$\mu = \frac{\mu_{MAX}}{\left(1 + \frac{K_S}{C_S}\right) \left(1 + \frac{C_L}{Clacter}\right)} \tag{1}$$

$$\frac{dCx}{dt} = (\mu - kd)Cx \tag{2}$$

$$\frac{dC_S}{dt} = \left(S_F - C_S\right) \cdot \frac{F}{V} - \left(\frac{\mu}{Yxs} + m\right) Cx \tag{3}$$

$$\frac{dC_L}{dt} = \left(C_X \cdot \frac{\mu}{Y_{VI}} - C_L \cdot \frac{F}{V}\right) \tag{4}$$

$$\frac{dC_{PS}}{dt} = \left(\frac{\mu}{Y_{VP}} + \beta\right) Cx - C_{PS} \cdot \frac{F}{V}$$
 (5)

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.7.1 CONCENTRAÇÃO CELULAR: DO 600 nm E CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS (UFC/mL).

A densidade ótica (DO) da cultura celular a 600 nm foi medida por espectrofotômetro (Hitachi U-1800 Spectrophotometer). Solução salina (NaCl 0,9%) foi utilizada como branco e para diluição das amostras quando a DO da cultura foi maior que 0,5. Amostras de cultura celular retiradas a cada hora foram centrifugadas a 3824 g, 4 °C por 45 min. O sobrenadante

foi utilizado para medidas de ácidos e carboidratos e concentração de polissacarídeo capsular livre no sobrenadante. A cada 2 horas, amostras de suspensão bacteriana originadas do biorreator foram submetidas a diluições seriadas em solução salina estéril e oito (8) diferentes diluições foram espalhadas em duplicata em placas de ágar-sangue enriquecidas com BHI (*Brain-heart infusion*) e incubadas em atmosfera anaeróbica a 37 °C por 16-18 h. Após o tempo de incubação, foi calculado o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

3.7.2 CONCENTRAÇÃO CELULAR: BIOMASSA SECA

Uma alíquota de 40 mL de cultura foi retirada do reator no fim da fase exponencial de crescimento e a mesma foi inativada com 2% de formaldeído e incubada a temperatura ambiente por 24 h. Após o tempo de incubação, a amostra foi centrifugada por 45 min, a 3824 g e o sobrenadante foi descartado. O pellet celular foi então ressuspendido em 20 mL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*, pH = 7,2) para manter as propriedades das células. A absorbância 600 nm foi medida antes e depois de proceder às diluições seriadas para obter suspensões com diferentes densidades óticas. As amostras já diluídas foram centrifugadas em tubos Falcon® previamente pesados e o sobrenadante descartado. Os tubos com pellet foram colocados em estufa a 57 °C até peso constante e pesados novamente.

O coeficiente angular obtido a partir da relação direta DO 600 nm x biomassa seca (g/L) foi utilizado para os cálculos de concentração de biomassa seca em todos os ensaios realizados.

3.7.3 DOSAGEM DE POLISSACARÍDEO

O método espectrofotométrico de Metilpentoses (proposto por Dische e Shetller, 1948) adequa-se à quantificação do polissacarídeo do *S. pneumoniae* sorotipo 6B por ter em sua estrutura um resíduo de metilpentose, a ramnose (rha).

Reagentes:

- Ácido sulfúrico 6:1 em água destilada
- Solução de cisteína 3%

- Ramnose 0,2 mg/mL
- Glicose 1,0 mg/mL

Procedimento:

Distribuir as amostras e os pontos das curvas-padrão em tubos numerados. Estes tubos são colocados em banho de gelo, enquanto se prepara um Banho-Maria. Acrescenta-se 4 mL de ácido sulfúrico, mantendo-os em banho de gelo. Agita-se vigorosamente e, em seguida, são submetidos a banho fervente por 3 minutos. Os tubos são resfriados em banho de gelo. Acrescenta-se 100 µL de solução de cisteína a todos os tubos; nova agitação. Os tubos devem repousar por duas (2) horas. Posteriormente, faz-se a leitura.

A leitura para metilpentose (no caso do PS 6B, a ramnose) deve ser realizada a 396 nm, enquanto que a leitura das hexoses a 430 nm deve ser descontada da primeira para se obter a concentração de metilpentoses em solução. O método foi aprimorado por meio de um sistema de duas equações e duas incógnitas, construído a partir das curvas de calibração para ramnose a 396 nm e para glicose a 396 e 430 nm (DISCHE; SHETTLES, 1948; GONÇALVES et al., 2002).

$$A 396 nm = [rha]\rho + [glc]\sigma \tag{1}$$

$$A 430 nm = [glc]\theta \rightarrow [glc] = \frac{A 430 nm}{\theta}$$
 (2)

Substituindo (2) em (1) tem-se:

$$[rha] = \frac{A\,396\,nm}{\rho} - \frac{A\,430\,nm\,\sigma}{\rho\sigma}$$
 (3)

Sendo: ρ = coeficiente angular da curva de calibração de ramnose a 396 nm,

 σ = coeficiente angular da curva de calibração de glicose a 396 nm,

 θ = coeficiente angular da curva de calibração de glicose a 430 nm.

Para calcular a quantidade de polissacarídeo presente no sobrenadante basta multiplicar [rha] pelo fator correspondente ao polissacarídeo linear do sorotipo 6B, que é 3,5 (razão da massa molar da unidade repetida do oligossacarídeo pela massa molar da ramnose presente no polissacarídeo).

3.7.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS E AÇÚCARES

A glicose residual foi medida diretamente pelo método colorimétrico de Glicose Oxidase (Enz-Color Biodiagnostica, Brazil) e por HPLC – *High Performance Liquid Cromatography* (Shimadzu, cat. No. 228-34350-92, com detector de índice de refração- IR); a produção dos metabólitos - lactato, formato e acetato - foi quantificada por HPLC. A coluna Aminex HPX87H (Biorad®), foi utilizada com solução 0,005 M ácido sulfúrico como fase móvel sob fluxo de 0,6 mL/min, enquanto a temperatura foi mantida a 60 °C. O volume de injeção na coluna foi de 20 μL.

4 RESULTADOS

4.1 PREPARO DO INÓCULO

Levando-se em consideração que o inóculo determina a trajetória dos ensaios (descontínuos, descontínuos alimentados e contínuos) e que o estado fisiológico do inóculo é parte crucial em processos fermentativos, um estudo foi desenhado para determinar o tempo de incubação e a fase de crescimento ideal deste inóculo.

Primeiramente, foi estimado o tempo ideal de incubação para posterior repasse para o reator. Três alíquotas ($100 \, \mu L$, $150 \, \mu L$ e $200 \, \mu L$) do estoque bacteriano congelado foram semeadas em um volume fixo de meio de cultura ($500 \, \text{mL}$) em frascos estáticos, atmosfera anaeróbica e $37 \, ^{\circ}\text{C}$. A cada hora a densidade óptica foi lida e a curva de crescimento foi posteriormente desenhada, como mostra a Figura 10.

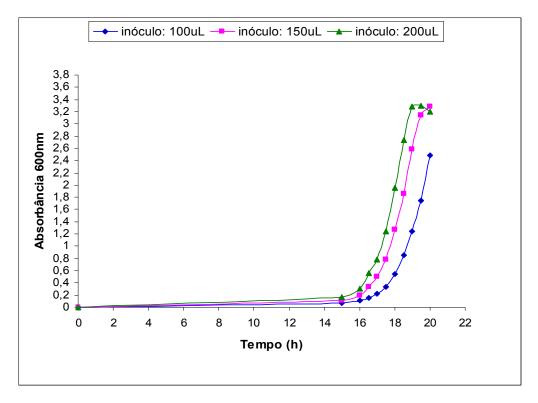


Figura 10: Perfil de crescimento celular de *S. pneumoniae* sorotipo 6B em frascos estáticos. Meio Hoeprich modificado inoculado com diferentes volumes do estoque congelado: azul $-100~\mu$ L, rosa $-150~\mu$ L e verde $-200~\mu$ L.

As curvas de crescimento são essencialmente paralelas, o que varia é o tempo para que cada cultura atinja a fase estacionária, consequentemente os valores de µmax são semelhantes para a fase exponencial dos três cultivos (0,83; 0,81; 0,80 h⁻¹ respectivamente) (Figura 11).

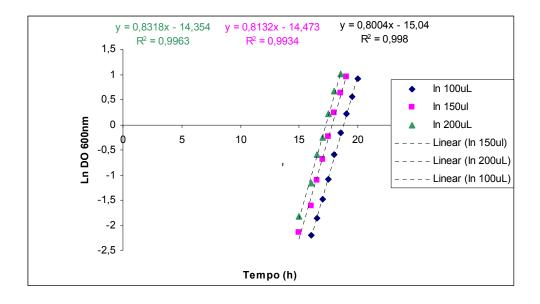


Figura 11: Curvas para o cálculo da velocidade de crescimento do *S. pneumoniae* 6B. Cinética a partir de estoque congelado ($100~\mu L$, $150~\mu L$ e $200~\mu L$).

Realizamos outra cinética de inóculo para relacionar a absorbância lida em espectrofotômetro e a concentração de células viáveis (diluições seriadas de cada amostra do cultivo espalhadas em duplicata em placas de ágar-sangue enriquecidas com BHI - *Brainheart infusion*), para contagem de unidades formadoras de colônia por mL de cultivo (UFC/mL). Para esta cinética, foram utilizados os volumes 400 μL e 500 μL de estoque congelado em 500 mL de meio de cultura (Figuras 12 e 13).

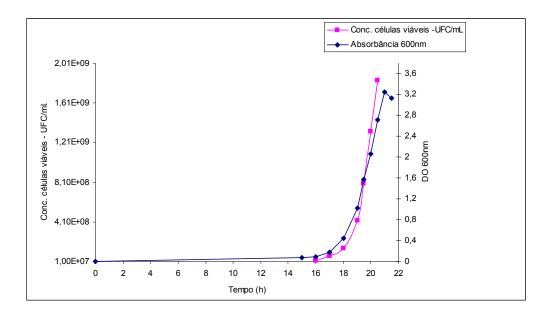


Figura 12: Perfil de crescimento celular de *S. pneumoniae* sorotipo 6B em frasco estático. Meio Hoeprich modificado com 400 μL de estoque congelado. Azul – absorbância a 600 nm; rosa – concentração de células viáveis (UFC/ml).

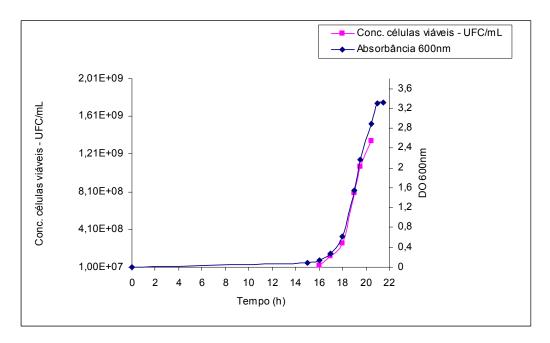


Figura 13: Perfil de crescimento celular de *S. pneumoniae* sorotipo 6B em frasco estático. Meio Hoeprich modificado com 500 μL de estoque congelado. Azul – absorbância a 600 nm; rosa – concentração de células viáveis (UFC/ml).

Pode-se notar que a concentração de células viáveis (UFC/mL) acompanha o crescimento celular na fase exponencial.

4.2 ENSAIOS EM FRASCOS

Os ensaios em frascos estáticos foram preliminares aos ensaios em biorreator. Um estudo prévio em frasco estático buscou modificar a proporcionalidade entre as fontes de carbono e nitrogênio e verificar o comportamento da cultura. Para o ensaio foi fixado um volume total de 250 mL de meio para *S. pneumoniae*. Escolheu-se o dialisado de extrato de levedura como fonte de nitrogênio e vitaminas a ser alterada e a glicose, principal fonte de carbono, segundo estudo de otimização de meio de cultivo para *S. pneumoniae* sorotipo 23F (GONÇALVES et al., 2002). Dois meios foram modificados em sua concentração de Extrato de Levedura (50 g/L e 12,5 g/L), obedecendo a razão C/N= 0,5 e C/N=2 em relação à glicose 25 g/L; como controle, tem-se C/N=1 (25 g/L de extrato de levedura e 25 g/L de glicose).

Cada frasco foi semeado com o mesmo inóculo e incubado a 37 °C, em atmosfera anaeróbica. A cada intervalo de tempo, os frascos foram tomados como amostra e a concentração celular foi medida por absorbância em espectrofotômetro e foi realizada a quantificação de polissacarídeo capsular livre no sobrenadante.

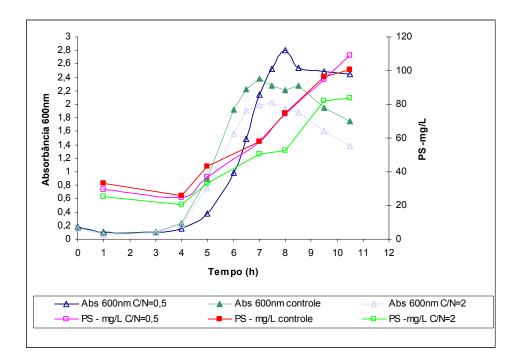


Figura 14: Cinética de crescimento de *S. pneumoniae* e de produção de PS6B em frascos estáticos. Comparação entre meios contendo diferentes proporções de glicose (C) e extrato de levedura (N) em meio de Hoeprich modificado: C/N=0,5 - 25 g/L de glicose e 50 g/L de extrato de levedura; controle - 25 g/L de glicose e 25 g/L de extrato de levedura; C/N=2 - 25 g/L de glicose e 12,5 g/L de extrato de levedura.

Em frasco estático, quando a relação Glicose – Extrato de Levedura era 0,5 (C/N=0,5), houve um pequeno aumento na produção de polissacarídeo e aumento no crescimento celular, dado pelo aumento da absorbância 600 nm.

A necessidade de vitaminas e aminoácidos, além daqueles já contidos no meio de Hoeprich modificado também foi testada, com o acréscimo de ácido nicotínico (1,0 mg), biotina (1,5 μg), piridoxal (1,0 mg), riboflavina (1,0 mg), tiamina (1,0 mg) e tirosina (200,0 mg). Cada frasco recebeu 100 mL de meio de Hoeprich, acrescido de uma (1) vitamina ou aminoácido, totalizando seis (6) frascos, além de dois (2) frascos contendo somente o meio de Hoeprich (ensaio controle).

Cada frasco foi semeado com o mesmo inóculo e incubado a 37 °C, em atmosfera anaeróbica. A cada intervalo de tempo, os frascos foram tomados como amostra, para medida de densidade óptica (DO 600 nm). Amostras recolhidas na sexta (6ª) e décima (10ª) hora de cultivo foram utilizadas para quantificar PS pelo Método de Metilpentoses. As curvas de crescimento dos ensaios em frasco estão mostradas na Figura 15.

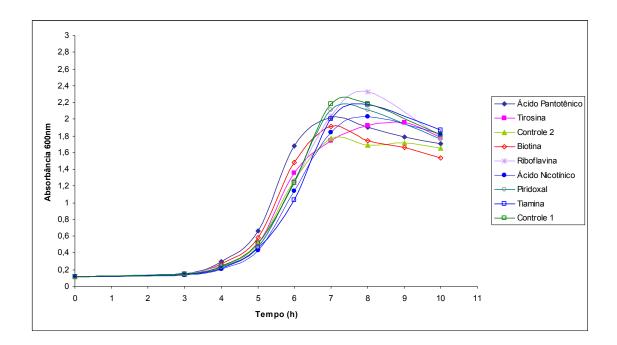


Figura 15: Cinética de crescimento de *S. pneumoniae* sorotipo 6B com adição de vitaminas e aminoácido. Controles 1 e 2, somente meio de Hoeprich modificado.

Apesar de apresentar perfis de crescimento bacteriano semelhantes, a adição de vitaminas e aminoácidos - ácido pantotênico, biotina, ácido nicotínico e tirosina - levaram a

um aumento de aproximadamente 22,0%, 18,0%, 9,0% e 9,0%, respectivamente, na quantificação de polissacarídeo capsular livre no sobrenadante da cultura após 10 h quando comparados aos ensaios controle (Figura16).

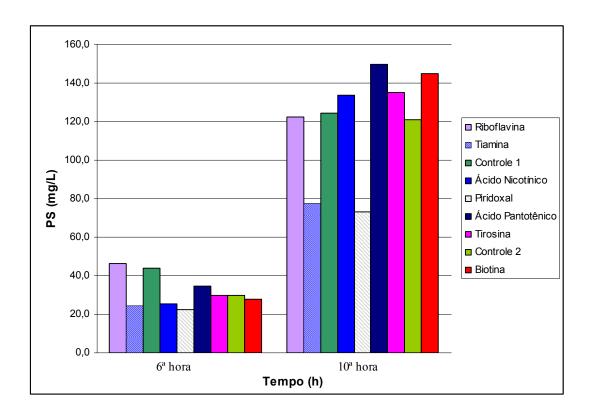


Figura 16: Efeito da adição de vitaminas e tirosina sobre a produção de polissacarídeo 6B em 6 e 10 h de cultura de *S. pneumoniae*.

4.3 ENSAIOS EM FERMENTADOR

Após a fase de estabelecimento da semente de trabalho do *S. pneumoniae* cepa ST 433/03, ensaios visando uma melhor produção de polissacarídeo capsular foram propostos.

Considerando que o *S. pneumoniae* foi descrito como anaeróbio aerotolerante, e que o estudo anterior (GONÇALVES et al., 2002; GONÇALVES et al., 2004) mostrou que o microrganismo cresce na presença de N₂. Foram realizados ensaios em diferentes condições, tal como descrito na Tabela 8 (item 3.4.3).

As variáveis: massa seca, concentração de células viáveis, turbidez (absorbância lida em

600 nm) e produção de polissacarídeo capsular foram avaliadas. Também foram medidos por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) o consumo de glicose e a produção de ácido lático ao longo do tempo de cultivo.

4.3.1 OBTENÇÃO DA RELAÇÃO ABSORBÂNCIA 600NM E BIOMASSA SECA (G/L).

A fim de determinar a relação entre massa seca e a absorbância 600 nm lida em espectrofotômetro, uma alíquota de 40 mL foi retirada de um cultivo, no fim da fase exponencial de crescimento. Procedeu-se então como relatado em 3.7.2 (Material e Métodos). Resumidamente, uma alíquota de cultivo no fim da fase exponencial de crescimento foi retirada, centrifugada e ressuspendida - de forma concentrada - em tampão salino. Posteriormente, foram feitas diluições da amostra e cada uma foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado e as células foram secas em estufa a 57 °C.

Optou-se por se utilizar as leituras de DO 600 nm como medida indireta de crescimento celular, já que a relação absorbância e biomassa seca (g/L) se mostrou linear, como mostra a Figura 17, com dados de dois experimentos independentes. A equação da reta foi usada para converter os valores de DO 600 nm em massa seca, quando necessário.

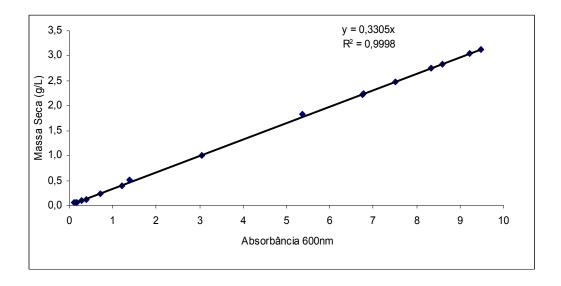


Figura 17: Relação entre a absorbância 600 nm da suspensão de células de *S. pneumoniae* lida em espectrofotômetro e a biomassa seca (g/L). Dados de dois experimentos independentes.

4.3.2 CÁLCULO DE RENDIMENTO (Y $_{\text{X/S}}$, $_{\text{P/S}}$, Y $_{\text{PS/S}}$)

Todos os cálculos de rendimento foram feitos para a fase descontínua dos ensaios - antes de alimentações constantes ou intermitentes ou início de cultivo com perfusão. Como exemplo para os cálculos de Y $_{\text{X/S}}$, $\text{Y}_{\text{L/S}}$, $\text{Y}_{\text{PS/S}}$ tomou-se como exemplo o ensaio 1, conforme Tabela XXq.

Para o cálculo de Y _{X/S} a variável Massa Seca foi calculada a partir da Abs600nm, multiplicada pelo fator 0,33, conforme relação obtida em 4.3.1 (Resultados). O coeficiente angular da Figura 18 é o rendimento de células em relação ao substrato (glicose).

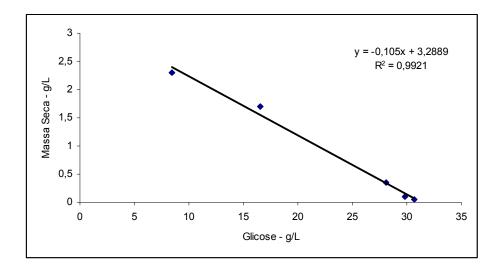


Figura 18: Cálculo de Y X/S. Relação Massa Seca e Concentração de glicose durante o cultivo.

Já para o cálculo de Y_{P/S} tomaram-se as medidas de lactato (g/L) como produto final do metabolismo da glicose. Abaixo, tem-se o gráfico resultante da relação entre a concentração de glicose na cultura e a formação de lactato (Figura 19).



Figura 19: Relação entre a concentração de glicose na cultura de Streptococcus pneumoniae 6B e a formação de lactato, como produto final da metabolização da glicose.

Encontrou-se uma relação direta entre PS liberado e concentração de glicose no meio de cultivo (Y $_{PS/S}$). Y $_{PS/S}$ é dado pelo coeficiente angular da Figura 20.

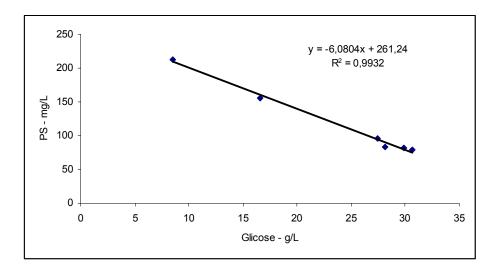


Figura 20: Relação entre a concentração de glicose na cultura e a liberação de polissacarídeo capsular no sobrenadante.

4.3.3 CÁLCULO DO μs NO MOMENTO DO PULSO DE GLICOSE/ACETATO DE AMÔNIO OU INÍCIO DA ALIMENTAÇÃO.

O cálculo do µs é feito para avaliar o rendimento instantâneo de substrato (no caso, glicose) em células, ou seja, a quantidade de glicose utilizada para a geração de um (1) grama de células num período de tempo, de acordo com a equação (6) (SCHMIDELL et al., 2001).

$$\mu_s = \frac{1}{X} \cdot \frac{\left(-dS\right)}{dt}$$
 Equação (1)

Para exemplificar, tem-se o ensaio 6 (cultivo descontínuo com pulso de glicose/ acetato de amônio, Tabela 8 – Materiais e Métodos). O pulso de glicose/acetato de amônio foi dado na quarta hora de cultivo, quando Abs 600nnm = 5,05 (*X*= 1,667 g/L). Portanto,

$$\mu s = \frac{1}{1,667} \cdot \frac{-(11,153 - 20,755)}{2} = 2,88 \text{ g glicose} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{c\'elulas}} \cdot \text{h}^{-1}.$$

4.3.4 ENSAIOS DESCONTÍNUOS

O ensaio descontínuo é um método usual para a produção de polissacarídeo, no entanto, há poucos estudos que tratam do aprimoramento de condições de cultivo. Sabe-se que há limitação da produção de metabólitos pela forte inibição causada por substrato, se colocado em altas concentrações.

Inicialmente, dois ensaios descontínuos foram feitos, para observar o comportamento do microrganismo na cultura (meio Hoeprich modificado), sob atmosfera de N₂, 37 °C e 200 rpm de agitação. Na sétima hora de cultivo, já não havia substrato disponível.

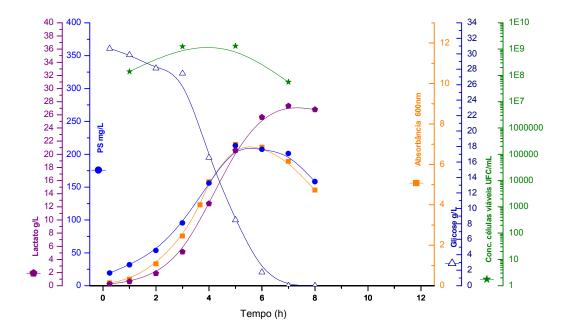


Figura 21: Ensaio 1. Cultivo descontínuo. Anaerobiose mantida por N₂ 0,15 vvm.
 —●— PS no sobrenadante (mg/L); -*— concentração de células viáveis (UFC/mL); -■— Absorbância 600 nm; -◆— produção de lactato (g/L); - Δ — consumo de glicose (g/L).

A concentração de células viáveis se manteve entre 10^8 e 10^9 na fase exponencial de crescimento - quando houve máxima liberação de polissacarídeo capsular no sobrenadante (213,0 mg/L) - apresentando uma queda somente na fase de morte celular. O ponto máximo de formação de lactato foi $\sim 28,0$ g/L, na sétima hora de cultivo.

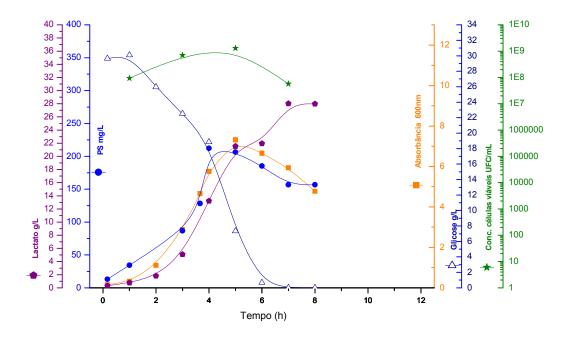


Figura 22: Ensaio 2. Cultivo descontínuo. Anaerobiose mantida por N₂ 0,15 vvm.
 —●— PS no sobrenadante (mg/L); -*— concentração de células viáveis (UFC/mL); -■— Absorbância 600 nm; -◆— produção de lactato (g/L); - Δ — consumo de glicose (g/L).

4.3.5 ENSAIOS DESCONTÍNUOS ALIMENTADOS

O cultivo descontínuo alimentado é um método eficaz e simples para aumentar a produtividade, pois a concentração do substrato pode ser mantida em níveis não-inibitórios através da alimentação e consequentemente há aumento de concentração celular. Três tipos de alimentação foram avaliados: pulsos de glicose e acetato de amônio, alimentação de meio à vazão constante e alimentação exponencial. Comparados ao cultivo contínuo com reciclo, os descontínuos alimentados são bem mais fáceis de operar.

4.3.5.1 ENSAIOS DESCONTÍNUOS ALIMENTADOS COM PULSO DE GLICOSE E ACETATO DE AMÔNIO

Para evitar a inibição por altas concentrações iniciais de substrato, optou-se pelo cultivo

descontínuo alimentado com pulsos de fontes de carbono (glicose 50%) e nitrogênio (acetato de amônio 46,2%) quando necessário. A concentração de glicose presente no meio de cultura foi aferida por método colorimétrico (Glicose Oxidase - Enz Color Biodiagnostica) ao longo do tempo.

Considerando-se que a concentração da fonte de nitrogênio no meio é bastante elevada e não deveria ser limitante, a introdução de nitrogênio inorgânico (no caso, acetato de amônio 46,2%) agiria como estímulo à produção de polissacarídeo e não como uma fonte de nitrogênio. Outra possibilidade seria a utilização do acetato pelo microrganismo, semelhante ao que ocorre em outras bactérias láticas, e isto poderia permitir o desvio do metabolismo da glicose para formação de PS.

Deste modo, um pulso de solução de glicose 50% e acetato de amônio 46,2% foi dado no fim da fase exponencial de crescimento no intuito de solucionar a limitação de glicose (substrato). Este pulso supostamente promoveria maior crescimento celular e conseqüentemente, maior liberação de polissacarídeo capsular para o sobrenadante da cultura.

Os ensaios 3, 4 e 5 foram feitos sob a mesma condição de cultivo:

- Anaerobiose (N₂ 0,15 vvm);
- pH=7,0, temperatura: 37 °C;
- Agitação: 200 rpm;
- Dorna de 5L 4,5 L de meio de cultura

O ensaio 3 (Figura 23) teve pulso de glicose/acetato de amônio na quinta hora de cultivo, quando a concentração de glicose era 4,0 g/L; o que elevou a concentração de glicose na cultura em 190%. A concentração de células viáveis aumentou com o incremento celular na fase exponencial (até o momento do pulso). A liberação de PS foi 237,0 mg/L. Não houve recuperação do crescimento celular após o pulso, pois o perfil de biomassa e densidade óptica já se mostrara descendente (fase de morte celular).

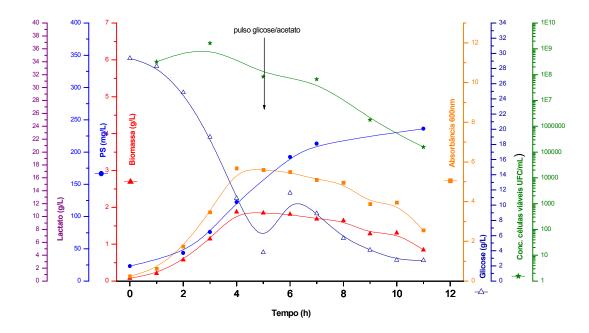


Figura 23: Ensaio 3. Cultivo descontínuo alimentado com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N₂ 0,15 vvm.
 —▲— biomassa (g massa seca/L); —●— PS no sobrenadante (mg/L);—*- concentração de células viáveis (UFC/mL); —■— Absorbância 600 nm; —◆— produção de ácido lático (g/L); —△— consumo de glicose (g/L). A seta indica pulso de glicose e acetato de amônio.

Os ensaios 4 e 5 (Figuras 24 e 25) são duplicatas. É interessante notar que estes ensaios apresentaram perfis semelhantes, tanto de crescimento celular, concentração de glicose no meio de cultura, absorbância 600 nm, como de liberação de PS para o sobrenadante. Somente o perfil da curva de produção de lactato se diferenciou (com produção máxima de lactato de 29,5 g/L para o ensaio 4 e 34,5 g/L para o ensaio 5).

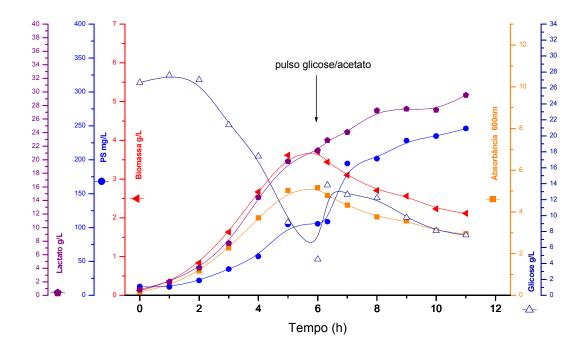


Figura 24: Ensaio 4. Cultivo descontínuo alimentado com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N₂ 0,15 vvm.
 —▲— biomassa (g massa seca/L); —•— PS no sobrenadante (mg/L);-*— concentração de células viáveis (UFC/mL);-■— Absorbância 600 nm; —•— produção de ácido lático (g/L); — Δ — consumo de glicose (g/L). A seta indica pulso de glicose e acetato de amônio.

A produção máxima média de PS nesses três ensaios é 250,0 mg/L, com velocidade de crescimento máximo (μmáx) de 0,79 h⁻¹ por quatro (4) horas. O pulso de glicose/acetato de amônio foi dado na sexta hora de cultivo, quando a concentração de glicose residual era 4,4 g/L. Também não houve recuperação do crescimento celular após o pulso.

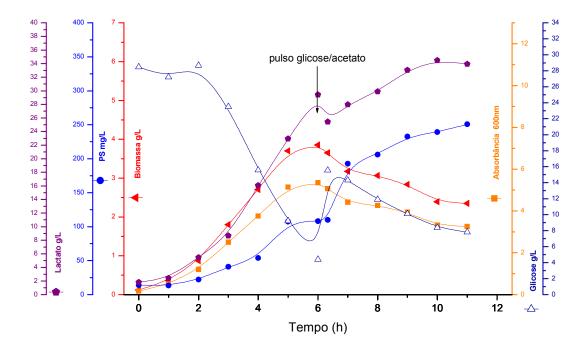


Figura 25: Ensaio 5. Cultivo descontínuo alimentado com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N₂ 0,15 vvm.

-▲— biomassa (g massa seca/L);
 -◆— PS no sobrenadante (mg/L);
 -♦— produção de ácido lático (g/L);
 - Δ — consumo de glicose (g/L). A seta indica pulso de glicose e acetato de amônio.

Os ensaios 6 e 7 (Figuras 26 e 27) foram feitos sob a mesma condição de cultivo:

- Anaerobiose (N₂ 0,15 vvm);
- pH=7,0, temperatura: 37 °C;
- Agitação: 200 rpm;
- Dorna de 5L 4,0 L de meio de cultura

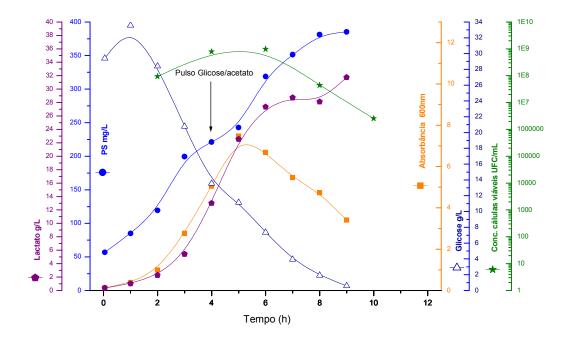


Figura 26: Ensaio 6. Cultivo descontínuo alimentado com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N₂ 0,15 vvm.
 -▲- biomassa (g massa seca/L); -●- PS no sobrenadante (mg/L); -*- concentração de células viáveis (UFC/mL); -■- Absorbância 600nm; -◆- produção de ácido lático (g/L); - Δ - consumo de glicose (g/L). A seta indica pulso de glicose e acetato de amônio.

O inóculo foi transferido para o reator de forma a se obter DO 600 nm inicial de 0,1, porém a DO da cultura do inóculo estava mais baixa do que o usual, (1,6 ao invés de 2,5). O pulso de glicose/acetato de amônio foi dado quando da concentração de glicose ~15 g/L. Provavelmente a soma desses dois fatores — a cultura do inóculo transferida para o reator exatamente quando estava no meio da fase exponencial e o momento de pulso quando a glicose ainda estava elevada — influenciaram na liberação de PS para o sobrenadante, aproximadamente 390 mg/L.

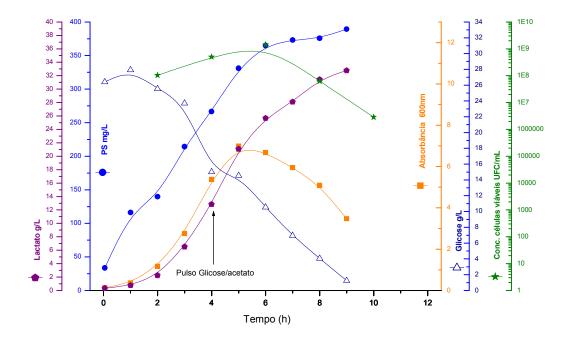


Figura 27: Ensaio 7. Cultivo descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N₂ 0,15 vvm.
 -▲ - biomassa (g massa seca/L); -● - PS no sobrenadante (mg/L); -*- concentração de células viáveis (UFC/mL); -■ - Absorbância 600 nm; -◆ - produção de ácido lático (g/L); - Δ - consumo de glicose (g/L). A seta indica pulso de glicose e acetato de amônio.

Uma dorna com capacidade de dez (10) litros foi utilizada para o ensaio 8 (Figura 28). Anaerobiose mantida por N_2 0,15 vvm, pH = 7,0, temperatura 37 °C e 250 rpm de agitação. O pulso de glicose/acetato de amônio foi dado na sexta hora de cultivo (concentração de glicose - 5 g/L). A liberação do PS no sobrenadante foi de 231 mg/L e o μ máx = 0,75 h⁻¹.

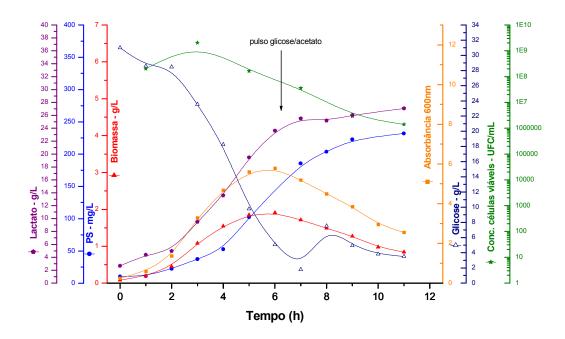


Figura 28: Ensaio 8. Cultivo descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N₂ 0,15 vvm.
 —▲— biomassa (g massa seca/L); —●— PS no sobrenadante (mg/L); -*— concentração de células viáveis (UFC/mL); -■— Absorbância 600 nm; -◆— produção de ácido lático (g/L); — Δ — consumo de glicose (g/L). A seta indica pulso de glicose e acetato de amônio.

4.3.5.2 ENSAIO DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM PULSO DE GLICOSE/ ACETATO DE AMÔNIO E MODIFICAÇÃO DO MEIO DE CULTURA.

Visando obter ao fim da fermentação uma maior quantidade de polissacarídeo capsular livre no sobrenadante, decidiu-se por aumentar a concentração de Extrato de Levedura de 25 para 50 g/L no reator, uma vez que em frascos houve um aumento da biomassa produzida (Figura 14). O perfil do experimento em reator está mostrado na (Figura 29). Este aumento no crescimento celular não se refletiu num conseqüente aumento da produção de polissacarídeo capsular significativo (216 mg/L). O controle de pH parece ser importante no ensaio em reator. Supõe-se que no frasco, uma maior quantidade de extrato acabou fornecendo um poder tamponante maior ao meio; porém, no reator, o controle de pH pela adição de base é muito mais eficiente e este efeito tamponante acaba sendo anulado.

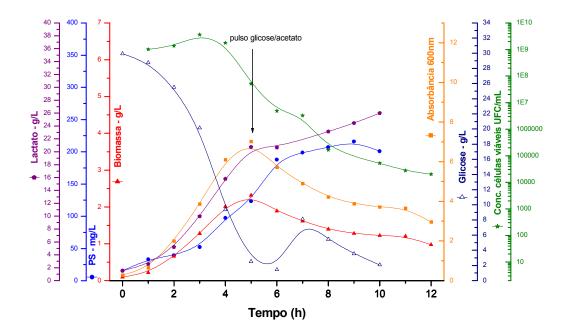


Figura 29: Ensaio 9. Cultivo descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio. Aumento da concentração de Extrato de Levedura para 50,0 g/L. Anaerobiose mantida por N₂ 0,15 vvm.
 —▲— biomassa (g massa seca/L); —●— PS no sobrenadante (mg/L); –*— concentração de células viáveis (UFC/mL); –■— Absorbância 600 nm; –◆— produção de ácido lático (g/L); — Δ — consumo de glicose (g/L). A seta indica pulso de glicose e acetato de amônio.

4.3.5.3 ENSAIOS DESCONTÍNUOS ALIMENTADOS COM PULSO E INTRODUÇÃO DE AR NA FASE ESTACIONÁRIA.

Neste ensaio, a fase exponencial de crescimento ocorreu sob anaerobiose (N₂ 0,15 vvm) e após a quinta hora de cultivo foi adicionado ar comprimido a uma vazão baixa (0,1 vvm). Com este ensaio pretendeu-se verificar se a presença de uma porcentagem de O₂ na cultura provocaria mudanças metabólicas e fisiológicas que fossem intrinsecamente ligadas à variação fenotípica, levando assim a uma maior liberação de polissacarídeo capsular no sobrenadante da cultura, além de outras mudanças nos perfis de biomassa, concentração de células viáveis e absorbância 600nm, conforme ocorrido com o sorotipo 23F (GONÇALVES et al., 2006).

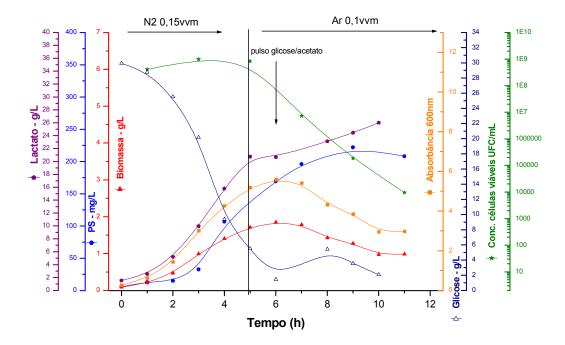


Figura 30: Ensaio 10. Cultivo descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N₂ 0,15vvm até o fim da fase exponencial (5ª hora). Após, adição de ar comprimido 0,1 vvm. Adição de 50 g de glicose na 6ª hora de cultivo.
 —▲— biomassa (g massa seca/L); —●— PS no sobrenadante (mg/L); -*— concentração de células viáveis (UFC/mL); -■— Absorbância 600 nm; -◆— produção de ácido lático (g/L); — Δ — consumo de glicose (g/L).

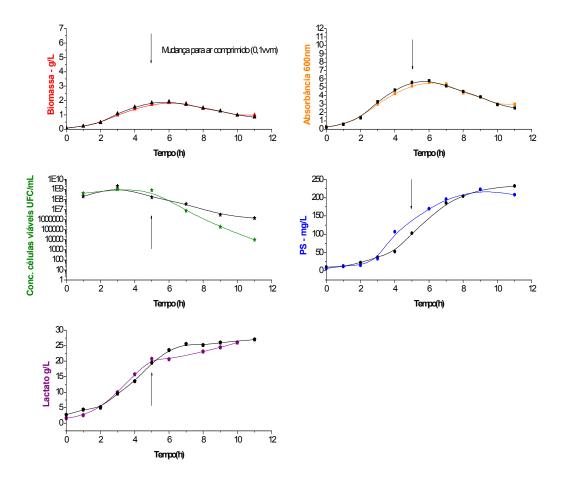


Figura 31: Comparação entre o ensaio 8 e o ensaio 10 (anaerobiose seguida de aerobiose 0,1 vvm). Em preto são apresentadas as curvas do ensaio 8. Em cores estão representados os dados do ensaio 11.

—▲— biomassa (g massa seca/L); —●— PS no sobrenadante (mg/L); -*— concentração de células viáveis (UFC/mL); -■— Absorbância 600 nm; -◆— produção de lactato (g/L). As setas indicam o momento da mudança na atmosfera do cultivo (após 5ª hora).

Contrariamente ao verificado para o sorotipo 23F, os resultados obtidos foram semelhantes aos do ensaio 8 com exceção da concentração de células viáveis, que foi menor na presença de ar, como mostra a (Figura 31). A mudança na aeração (anaerobiose seguida de aerobiose - 0,1 vvm de ar comprimido), representada na figura pelas setas, não produziu grande mudança nas varáveis analisadas. Foi observada, entretanto, uma diminuição da ordem de 100 vezes na concentração de células viáveis do microrganismo (UFC/mL) que não se refletiu na determinação da massa seca e na leitura da absorbância a 600 nm.

O ensaio 11 (Figura 32) foi realizado para verificar se a condição de aeração durante a

fase estacionária provocaria um aumento do PS no sobrenadante da cultura, porém empregando uma vazão maior de ar. Os mesmos passos do ensaio 10 foram seguidos, exceto que, quando da adição de ar comprimido, a vazão de ar foi aumentada para 0,5 vvm.

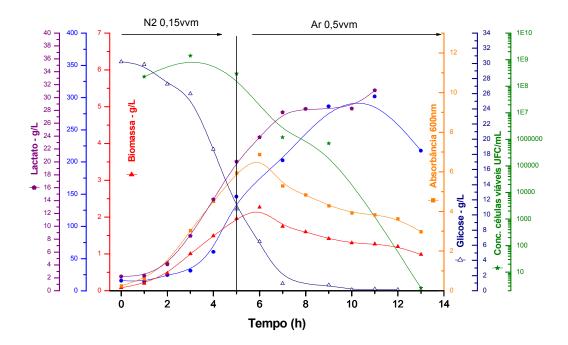


Figura 32: Ensaio 11. Cultivo descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio. Anaerobiose mantida por N₂ 0,15 vvm até o fim da fase exponencial (5ª hora). Após, adição de ar comprimido 0,5 vvm.
 — Loiomassa (g massa seca/L); — PS no sobrenadante (mg/L); —* concentração de células viáveis (UFC/mL); — Absorbância 600 nm; — produção de ácido lático (g/L); — Δ — consumo de glicose (g/L).

Ao final do cultivo, restou uma quantidade mínima de células viáveis. Houve uma liberação maior de polissacarídeo capsular, quando comparado aos ensaios descontínuos alimentados com pulso. Entretanto, esta maior liberação de polissacarídeo capsular parece ser devida ao estresse oxidativo, pois a concentração de células viáveis deste ensaio até a 11ª hora de cultivo não foi diferente da dos ensaios descontínuos com pulso.

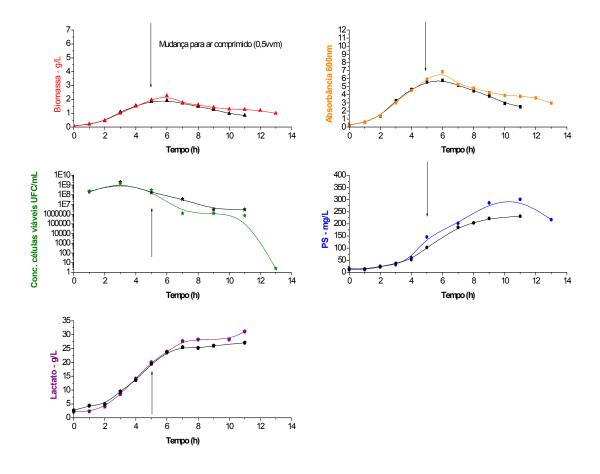


Figura 33: Comparação entre o ensaio 8 e o ensaio 11 (anaerobiose seguida de aerobiose 0,5 vvm). Em preto são apresentadas as curvas do cultivo descontínuo. Em cores estão representados os dados do ensaio 12.

—▲— biomassa (g massa seca/L); —●— PS no sobreadante (mg/L); -*— concentração de células viáveis (UFC/mL); -■— Absorbância 600 nm; -◆— produção de ácido lático (g/L). As setas indicam o momento da mudança na atmosfera do cultivo (após 5ª hora).

Diante destes dois ensaios de aeração, foi possível delimitar o efeito da presença do oxigênio em duas vazões diferentes de ar comprimido, após a fase de crescimento em anaerobiose. Houve maior liberação do polissacarídeo capsular e a concentração de células viáveis entrou em declínio completo na 11ª hora (ensaio 11 - adição de ar comprimido, 0,5 vvm). Este comportamento sinaliza que o microrganismo sofre estresse oxidativo, o que estimula a atividade de autolisinas, responsáveis pela degradação da parede celular. A liberação de polissacarídeo capsular para o meio sofreu acréscimo de 30%, em relação ao ensaio descontínuo com pulso (ensaio 8), e em contrapartida, ocorreu morte da cultura celular.

Houve maior crescimento celular, refletido pelo aumento de biomassa e densidade óptica em 19%. Comparando-se ao ensaio 8 (ensaio descontínuo alimentado com pulso), na décima primeira hora de cultivo, houve uma pequena queda na concentração de células viáveis (de 3.0×10^6 UFC/mL para 7.0×10^5 UFC/mL) e a concentração de PS se mostrou maior (aproximadamente 300 mg/L). Quando submetido à aerobiose (1,19 L/min de N_2 e 0,13 L/min ar comprimido) desde o início do cultivo, não houve crescimento significativo (DO_{max} \sim 1,1, na 7^a hora de cultivo).

4.3.5.4 CULTIVO DESCONTÍNUO COM ALIMENTAÇÃO CONSTANTE

Uma estratégia de cultivo foi montada: cultivo descontínuo alimentado com alimentação constante (F= 0,14 L/h). O meio de alimentação seria mais concentrado em hidrolisado ácido de caseína, extrato de levedura e glicose, no intuito de aumentar o tempo de alimentação, promover maior crescimento celular e conseqüentemente obter maior quantidade de polissacarídeo. Foi utilizada uma simulação como referência (simulação no programa Anabio - ver Anexo II). Houve aumento da concentração da fonte de carbono (glicose), acompanhado pelo aumento proporcional das concentrações de Hidrolisado Ácido de Caseína e Extrato de Levedura no meio de alimentação.

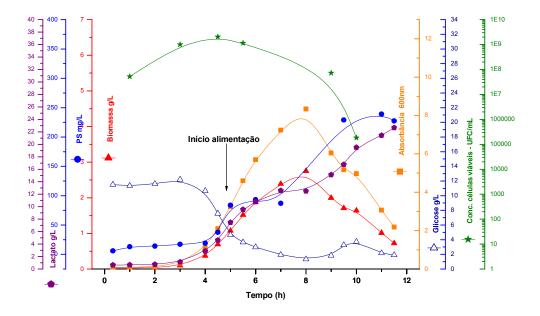


Figura 34: Ensaio 12. Cultivo descontínuo alimentado (alimentação constante- vazão: 0,14 L/h).

—▲— biomassa (g massa seca/L); —●— PS no sobrenadante (mg/L); -*- concentração de células viáveis (UFC/mL); -■— Absorbância 600 nm; —♦— produção de ácido lático (g/L); — Δ — consumo de glicose (g/L). A seta indica início de alimentação constante.

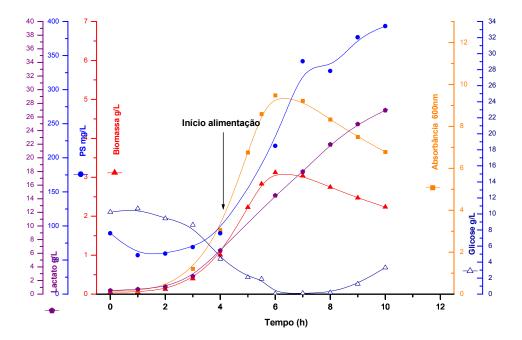


Figura 35: Ensaio 13. Cultivo descontínuo alimentado (alimentação constante- vazão: 0,14 L/h).

—▲— biomassa (g massa seca/L); —●— PS no sobrenadante (mg/L); -*— concentração de células viáveis (UFC/mL); —■— Absorbância 600 nm; —◆— produção de ácido lático (g/L); — Δ — consumo de glicose (g/L). A seta indica início de alimentação constante.

É interessante notar que nos dois cultivos descontínuos com alimentação constante houve fase lag (1-2 h), ainda não observada nos demais ensaios. Os meios do inóculo e da fase batelada foram modificados (15 g/L Hidrolisado Ácido de Caseína, 10 g/L Extrato de Levedura e 10 g/L Glicose) e pode ser que a restrição de fonte de carbono e nitrogênio tenha provocado um comportamento diferente do microrganismo. As possíveis causas do fato de os resultados da duplicata não terem se reproduzido serão investigados adiante.

4.3.5.5 ENSAIOS DESCONTÍNUOS COM ALIMENTAÇÃO EXPONENCIAL

Os ensaios a seguir foram baseados em modelos cinéticos gerados no Departamento de Engenharia Química da UFSCar pelo doutorando Antônio Carlos Horta, sob supervisão do Dr. Roberto Giordano e Dra. Teresa Zangirolami. O início e a vazão de alimentação (0,48e^{0,08t} L/h) foram pré-determinadas também pelo modelo e pelos perfis de cultivo descontínuo alimentado com pulso obtidos anteriormente (dados dos ensaios 4 e 5). Os detalhes do modelo estão no Anexo 1. Foram empregadas as concentrações de 25 e 100 g/L de Extrato de Levedura, 30 e 150 g/L de Hidrolisado Ácido de Caseína e 15 e 100 g/L de Glicose nos meios inicial e de alimentação, respectivamente, como descrito na Tabela 7 (em Materiais e Métodos).

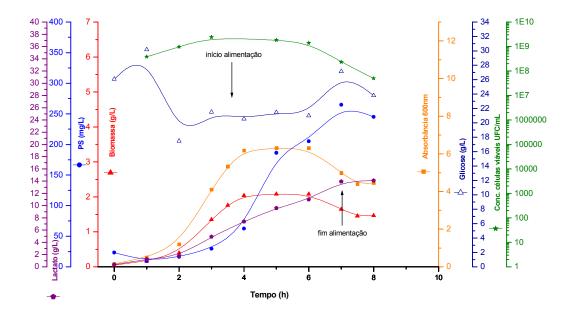


Figura 36: Ensaio 14. Cultivo descontínuo alimentado (alimentação exponencial - vazão: 0,48e^{0,08t} L/h).

—▲— biomassa (g massa seca/L); —•— PS no sobrenadante (mg/L); -*— concentração de células viáveis (UFC/mL); —■— Absorbância 600nm; —•— produção de ácido lático (g/L); — Δ — consumo de glicose (g/L). As setas indicam início e fim de alimentação exponencial.

O cultivo foi iniciado com volume inicial de 2,25 L A cada hora foram retiradas alíquotas do cultivo, das quais seriam obtidas as medidas off-line, e observaram-se as medidas on-line fornecidas pelo Bioflo/Labview. O início da alimentação foi antecipado para a hora 3,5, devido ao grande aumento da DO 600nm, da qual se inferiu um provável consumo de glicose, que levaria o microrganismo à fase estacionária, produzindo assim pouco polissacarídeo. Na sétima hora de cultivo houve decréscimo celular. A alimentação foi interrompida e este decréscimo foi confirmado 30 minutos depois, indicando que o crescimento era superado pela diluição que a cultura sofria pela adição de meio. O final do cultivo se deu na oitava hora com uma DO total (DO 600 nm * volume) = 18,64.

Os dados do ensaio 14 (Figura 36) foram usados para reajustar o modelo cinético, pois o acúmulo de glicose no reator não tinha sido previsto pelo modelo gerado com os dados dos ensaios 4 e 5 nas condições empregadas. Este modelo reajustado com os dados experimentais obtidos no ensaio 14 foi então empregado para simular novas condições de alimentação, a fim de diminuir a concentração de glicose no meio de alimentação (35 g/L) e manter sua concentração final em 10 g/L no reator. A simulação foi nomeada como "Ferm18". Abaixo, têm-se as variáveis da simulação e seu gráfico correspondente.

Tabela 9: Variáveis da simulação. O Termo 1.3859 é para calibrar a equação da vazão, devido ao fato da bomba não ter sido calibrada com meio de cultivo (mas sim com água).

Simulação dos dados obtidos no ensaio 14
Tempo final da Batelada e início da alimentação=3.0 h
Tempo de parada da Alimentação = 8.0 h
Cs na Alimentação = 35 g/L de glicose
Tempo final total=10 h
Volume inicial=2.3 L
Cx0=0.135 g/L
Cs0= 20 g/L
C10= 0.358 g/L
Cps0=23.275 mg/L
Volume de meio de alimentação = 2.7 Litros
Se tempo menor que 3 h:
Fa=0;
V=V0
Se tempo entre 3 h e 8 horas:
Fa=(0.48/1.3859)*exp(0.08*(t-t_Batelada));
V=V0+((0.48/1.3859)/0.08)*(exp(0.08*t)-exp(0.08*t_Batelada));

Cs: concentração de substrato; Cx: concentração celular; Cl: concentração de lactato; Cps: concentração de PS; F: vazão de meio de alimentação.

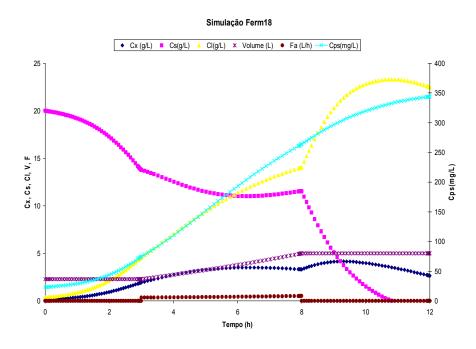


Figura 37: Simulação. Modelo matemático ajustado com os dados do ensaio 14.

Foram então realizados dois ensaios (15 e 16) com base na simulação "Ferm 18". Abaixo, têm-se os gráficos destes ensaios; não foi possível manter a concentração residual de

glicose no reator em 10 g/L, como previsto pela simulação. Nem tampouco conseguimos atingir o patamar de produção de polissacarídeo estimado (aproximadamente 350 mg/L). Esta produção foi somente de 200 mg/L em ambos ensaios.

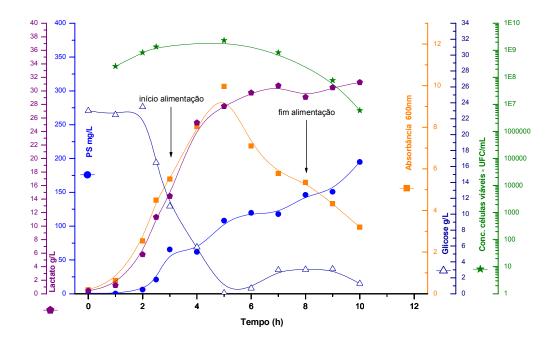


Figura 38: Ensaio 15. Cultivo descontínuo alimentado (alimentação exponencial - vazão: 0,48e^{0,08t} L/h).

—▲— biomassa (g massa seca/L); —•— PS no sobrenadante (mg/L); -*— concentração de células viáveis (UFC/mL); —■— Absorbância 600 nm; —•— produção de ácido lático (g/L); — Δ — consumo de glicose (g/L). As setas indicam início e fim de alimentação exponencial.

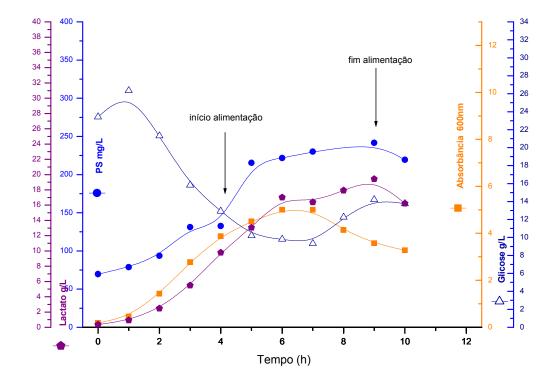


Figura 39: Ensaio 16. Cultivo descontínuo alimentado (alimentação exponencial - vazão: 0,48e^{0,08t} L/h).

—▲— biomassa (g massa seca/L); —●— PS no sobrenadante (mg/L); -*— concentração de células viáveis (UFC/mL); —■— Absorbância 600 nm; —◆— produção de ácido lático (g/L); — Δ — consumo de glicose (g/L). As setas indicam início e fim de alimentação exponencial.

Os ensaios 15 e 16, mesmo que em condições semelhantes, apresentaram perfis bastante diferentes, sem razoável causa aparente.

4.3.6 ENSAIOS CONTÍNUOS COM RECICLO CELULAR

Visando manter a concentração de células viáveis e aumentar a concentração celular e produção de PS sem acumular ácido lático, a técnica de microfiltração/ perfusão surgiu como alternativa aos processos fermentativos. Esta técnica é largamente utilizada para remoção eficaz e constante de metabólitos (normalmente, componentes de baixo peso molecular) de *E.* coli (DORAN, 1995; PÖRTNER; MÄRKL, 1998) e *Lactobacillus rhamnosus* (KWON et al. 2001). A densidade celular e, conseqüentemente a produtividade volumétrica da cultura

podem ser aumentadas pela retenção da biomassa, enquanto meio fresco é continuamente adicionado e o meio saturado é removido. A retenção da biomassa ou o seu retorno ao fermentador promove o aumento da concentração celular e o adiamento da fase estacionária.

Utilizou-se fermentador BioFlo 3000, com capacidade para 2 L de cultura bacteriana. A ele, foi acoplado um sistema de 3 membranas Durapore de poro 0,22 μm, 50 cm² (Millipore ® / PelliconXL, lote nº P2JN6608-27, cat. nº PXGVPPC50). O permeado foi coletado em recipiente de 4 L, previamente tarado por balança. Após quatro horas de cultivo, o sistema foi acionado e, simultaneamente e sob mesmo fluxo (ml/min), foi adicionado meio de cultura fresco, de modo a manter o volume do reator aproximadamente constante. O fluxo do permeado foi variável ao longo do cultivo, devido ao aumento da densidade celular. Esta variação foi devida à obstrução dos poros da membrana pelas células.

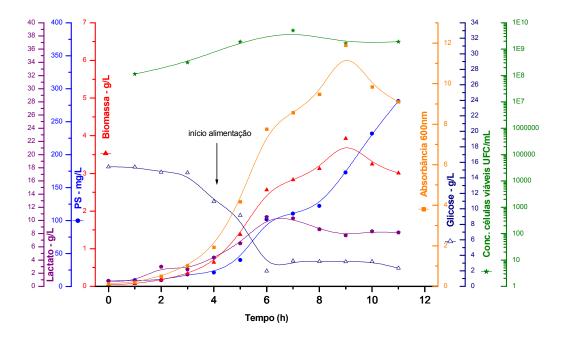


Figura 40: Ensaio 17. Cultivo contínuo com reciclo de células. Membrana de perfusão acoplada ao fermentador. Anaerobiose mantida por N₂ 0,25 vvm até o fim do cultivo.

—▲— biomassa (g massa seca/L); —●— PS no sobrenadante (mg/L); –*— concentração de células viáveis (UFC/mL); –■— Absorbância 600 nm; —◆— produção de ácido lático (g/L); — Δ — consumo de glicose (g/L). A seta indica o início do reciclo celular e da alimentação.

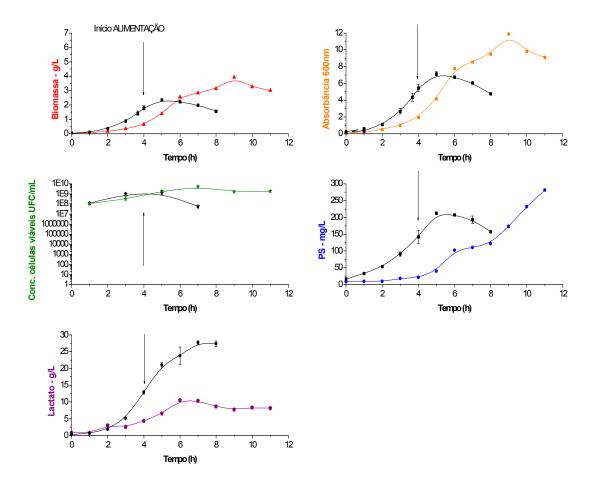


Figura 41: Comparação entre os ensaios 1 e 2 e o ensaio 17 (membrana de perfusão acoplada ao fermentador). Em preto são apresentadas as curvas médias obtidas e seus respectivos desvios padrão. Em cores estão representados os dados do ensaio teste.

—▲— biomassa (g massa seca/L); —●— PS no sobrenadante (mg/L); -*— concentração de células viáveis (UFC/mL); —■— Absorbância 600 nm; —◆— produção de ácido lático (g/L). As setas indicam o momento do início da alimentação com meio fresco.

Uma série de fatores contribuiu para obtenção dos resultados mostrados nas Figuras 40 e 41, entre eles:

- A fonte de carbono estava em menor concentração no meio inicial (15,0 g/L, ao invés de 25,0 g/L de glicose anidra). Por precaução, reduziu-se a concentração de glicose no meio para que não houvesse inibição do crescimento pelo excesso de substrato;
- Por se tratar de uma dorna de capacidade para 3 L, a agitação das pás foi diminuída

- para 100 rpm, para evitar o atrito e o "stress" celular.
- A alimentação, a partir da quarta hora de cultivo mudou o perfil de crescimento celular (biomassa e turbidez/absorbância), prolongando a fase exponencial e aumentando a densidade celular.
- O fato de recolher o meio saturado em metabólitos e a reposição de meio fresco proporcionou maior crescimento celular, obtida a partir da sexta hora de cultivo (dada pelo aumento de biomassa e densidade óptica 600 nm).
- O aumento da concentração de polissacarídeo se deu gradualmente, assim como ocorreu nos ensaios controle; sendo que ao final do cultivo, houve uma tendência ascendente para uma maior liberação de polissacarídeo capsular.
- Houve diluição do lactato (metabólito da glicose) pela alimentação de meio de cultura fresco e retirada de meio rico em metabólitos (cultivo em perfusão).
- Pela renovação de meio de cultivo, houve manutenção da concentração de células viáveis da ordem de 10⁹ UFC/ mL. Nos ensaios controle, a curva de concentração de células viáveis se apresentou em declínio a partir da quinta hora de cultivo.

Diante dos resultados obtidos no ensaio 17 (Figura 40), partimos para reatores automatizados de 5 L - controlados e monitorados por LabVIEW, com aquisição de dados em tempo real – acoplados a cassete de membrana Durapore (poro 0,22 μm, 0,5 m² - Millipore ® / Pellicon 2 – TFF Cassetes, no. cat. P2GVPPC05, lote P1KN0854) no intuito de diminuir a obstrução dos poros da membrana pelo aumento da densidade celular ao longo do cultivo.

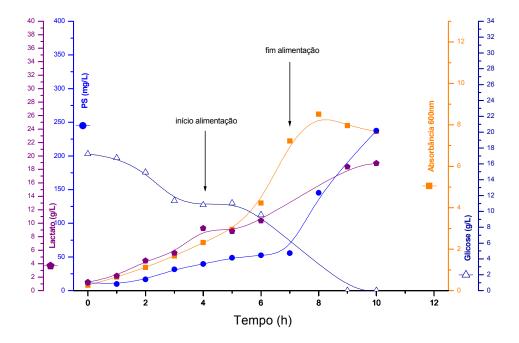


Figura 42: Ensaio 18. Cultivo contínuo com reciclo de células. Membrana de perfusão acoplada ao fermentador. Anaerobiose mantida por N₂ 0,25 vvm até o fim do cultivo
 -•- PS no sobrenadante (mg/L); -•- Absorbância 600 nm; -•- produção de ácido lático (g/L);
 - Δ - consumo de glicose (g/L). As setas indicam o início e o fim do reciclo celular e da alimentação.

Houve maior dificuldade de manter o sistema (entrada de meio fresco no fermentador e saída de meio saturado em metabólitos) em funcionamento. Logo após o término da alimentação e do reciclo celular toda a glicose foi consumida e a partir da nona hora de cultivo não havia mais glicose disponível e a concentração de lactato voltou a aumentar. A produção do polissacarídeo (240,0 mg/L) foi 15% menor (quando comparada ao ensaio 17 (282,0 mg/L). É importante notar que as duas curvas apresentaram tendência ascendente de produção de PS. Comparado aos ensaios descontínuos sem pulso, o cultivo em perfusão não apresentou vantagens quanto à produção de PS (aumento de 32% e 12% nos ensaios 17 e 18, respectivamente), além da dificuldade de operação do sistema, mesmo em reatores de 2 e 5 L. Possivelmente esta dificuldade seria ampliada quando de um aumento de escala.

4.3.7 CÁLCULO DOS PARÂMETROS DOS CULTIVOS EM BIORREATOR.

Os parâmetros importantes para a análise dos ensaios realizados estão apresentados, a seguir, na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros do cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 6B calculados a partir dos dados experimentais dos ensaios realizados em diferentes condições.

ensaios realizados em diferentes condições.									
Ensaio	Descrição	μmáx* (h ⁻¹)	Duração* µmáx (h)	μs (pulso ou alimentação) -1 (g glicose · g	Y X/S* (g massaseca . -1 g glicose)	Y PS/S* (mg PS. g 1 glicose)	Y L/S* (g lactato1 g glicose)	PS máximo (mg/L)	Lactato máximo (g/L)
1	Cultivo Descontínuo.	0,99	3,5	n/a	0,11	6,08	0,88	213,0	27,4
2	Cultivo Descontínuo.	1,01	3,5	n/a	0,11	5,79	0,96	212,0	28,0
3	Cultivo Descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio	0,81	4,0	3,94	0,1	5,43	n/a	236,2	n/a
4	Cultivo Descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio.	0,79	4,0	2,73	0,07	4,23	0,85	245,8	29,5
5	Cultivo Descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio.	0,80	4,0	2,73	0,06	6,92	0,75	250,8	34,5
6	Cultivo Descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio.	1,03	4,0	2,88	0,1	4,85	0,83	385,2	31,8
7	Cultivo Descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio	1,02	4,0	2,58	0,13	6,40	0,99	389,3	32,8
8	Cultivo Descontínuo com pulso de glicose e acetato de amônio	0,76	4,0	2,46	0,18	4,43	0,80	232,0	27,1
9	Cultivo descontínuo com pulso - Meio com 2X extrato de levedura (50,0g/L).	0,90	4,0	1,72	0,17	3,76	0,69	216,1	26,0
10	Cultivo descontínuo com pulso - Anaerobiose seguida de aerobiose.	0,72	4,0	2,1	0,22	5,05	0,69	222,1	25,0
11	Cultivo descontínuo com pulso - Anaerobiose seguida de aerobiose.	0,74	4,0	n/a	0,20	4,13	0,93	301,6	31,1
12	Cultivo Descontínuo Alimentado (alim. constante).	1,12	4,0	3,57	0,13	9,19	0,89	239,0	22,4
13	Cultivo Descontínuo Alimentado (alim. constante).	0,94	4,0	3,24	0,16	5,32	0,97	393,2	27,0

Continuação.

14	Cultivo Descontínuo Alimentado (alim. exponencial).	1,05	3,5	0,55	0,13	2,27	0,42	264,7	14,1
15	Cultivo Descontínuo Alimentado (alim. exponencial).	1,28	2,5	4,85	0,15	4,83	1,22	195,0	31,3
16	Cultivo Descontínuo Alimentado (alim. exponencial).	0,93	3,0	2,20	0,11	6,11	0,83	198,4	19,4
17	Cultivo contínuo com recirculação de células.	0,72	5,0	4,31	0,22	7,05	0,69	281,1	10,5
18	Cultivo contínuo com recirculação de células.	0,47	3,0	0,20	0,09	4,67	1,22	237,4	18,9

^{*} Calculados apenas dos dados da fase batelada; n/a – não se aplica.

A modificação do meio de cultura no ensaio 9 (cultivo descontínuo alimentado com pulso – extrato de levedura 50 g/L –Figura 29) não foi favorável à produção de PS quando comparado aos ensaios descontínuos alimentados com pulso. Isto pode ser demonstrado pelo coeficiente Y_{PS/S} menor (3,76), mesmo com μmáx 15% maior.

Os cultivos descontínuos alimentados - alimentação exponencial — tiveram comportamento diferenciado. Apesar de os valores de $Y_{X/S}$ terem sido semelhantes (0,11 a 0,15), os outros coeficientes de rendimento ($Y_{PS/S}$ e $Y_{L/S}$) calculados foram bastante discrepantes. O ensaio 15 (Figura 38) teve μ máx maior (1,28) comparado com todos os outros ensaios, porém isto não se refletiu em aumento de produção de PS.

Comparando-se os ensaios 12 (alimentação constante), e 14 (alimentação exponencial) têm-se: a concentração de glicose no reator no ensaio 12 foi mantida ~ 2,0 g/L e no ensaio 14 ~20,0 g/L; os resultados em termos de células foram semelhantes, porém o perfil da produção de PS, lactato, acetato e formato diferiram significativamente, conforme mostra a Tabela 11. Além disso, a qualidade do PS produzido foi melhor com a alimentação exponencial, a qual favoreceu a produção de PS com elevada relação PS/proteína e PS/ácidos nucléicos.

annentação constante e ensaio 14. annientação exponencial.								
Meio alimentação	Vazão alimentação (L/h)	Glicose residual (g/L)	Lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Formato (g/L)	PS Total (mg)	PS/proteína (mg/mg)	PS/ácidos nucléicos (mg/mg)
Ensaio 12 Caseína 150 g/L Ext. Levedura 100 g/L Glicose 100 g/L	0,14	~ 2	23	2,5	6	960	1,0	2,6
Ensaio 14 Caseína 82 g/L Ext. Levedura 25g/L	$0,48.e^{0,08.t}$	~ 20	14	1,5	3	1300	3,4	3,2

Tabela 11: Análise das variáveis em dois cultivos descontínuos com alimentação diferenciada. Ensaio 12: alimentação constante e ensaio 14: alimentação exponencial

Porém, para o ensaio 13 (cultivo descontínuo alimentado com alimentação constante) esta relação é invertida, já que houve maior produção de PS (1950 mg totais), mesmo que a relação PS/proteína e PS/ácidos nucléicos seja semelhante ao ensaio 12 (1,2 e 2,7 respectivamente).

Altos valores de $Y_{PS/S}$ não necessariamente geraram alta produção de PS capsular. Como exemplo tem-se o ensaio 5, com $Y_{PS/S} \sim 6,92$ e produção de PS $\sim 250,0$ mg/L. Já o ensaio 7, teve $Y_{PS/S} \sim 6,40$ e produção de PS $\sim 390,0$ mg/L.

Ensaios que tiveram $Y_{L/S}$ maior que 0,90 produziram maiores níveis de lactato (variando de 28,0 a 33,0 g/L, com exceção do ensaio 5 ($Y_{L/S} \sim 0,75$ e lactato máximo $\sim 34,5$).

4.4 ANÁLISE DO CONJUNTO DE RESULTADOS OBTIDOS

Glicose 60 g/L

Diante de todos os resultados obtidos, verificou-se que ensaios realizados nas mesmas condições (descontínuos com pulso - ensaios 3, 4, 5, 6 e 7) não foram reprodutíveis (na densidade óptica: DO 600 nm ~7,0 nos ensaios 6 e 7 e DO 600 nm ~5,5 nos ensaios 3, 4 e 5; na concentração de glicose no meio de cultura no momento do pulso: ~4,0 g/L nos ensaios 3, 4, e 5 e ~15,0 g/L nos ensaios 6 e 7; liberação de PS para o sobrenadante: ~250,0 mg/L nos ensaios 3, 4, e 5 e ~390,0 mg/L nos ensaios 6 e 7). Duas hipóteses foram levantadas para explicar o fenômeno: 1) qualidade do estoque congelado, hipótese descartada após testes nos estoques antigos, que desempenharam melhor papel na produção de PS quando comparados ao novo lote; 2) estado fisiológico da cultura do inóculo: o tempo de incubação e a fase de crescimento ideal da cultura determinariam uma melhor qualidade na produção do PS.

Foi possível estabelecer uma relação bem clara entre DO 600 nm inóculo, produção PS e biomassa no reator. Esta relação também foi observada nos ensaios descontínuos alimentados.

Abaixo se têm as curvas médias dos ensaios descontínuos alimentados com pulso (Figura 43). As curvas do gráfico 1 (ensaios 3, 4 e 5) são resultantes de um inóculo com DO 600 nm ~ 1,94 e concentração de glicose no momento do pulso de aproximadamente 5 g/L. Já as curvas do gráfico 2 (ensaios 6 e 7) são resultantes de um inóculo com DO 600nm ~1,6 e concentração de glicose no momento do pulso de aproximadamente 15,0 g/L. Observa-se que o momento do pulso de glicose e acetato de amônio modifica o perfil de crescimento bacteriano e aumenta em 59% a produção de polissacarídeo no gráfico 2 (Figura 43).

Comparando-se aos ensaios descontínuos sem pulso (Figuras 21 e 22) os ensaios descontínuos alimentados com pulso renderam maior produção de PS - 250,0mg/L e 390,0 mg/L para os gráficos 1 e 2 (Figura 43). Para os ensaios descontínuos sem pulso, a produção de PS é aproximadamente 213,0 mg/L. – o que representa um aumento de 17% e 83% nos ensaios descontínuos alimentados com pulso.

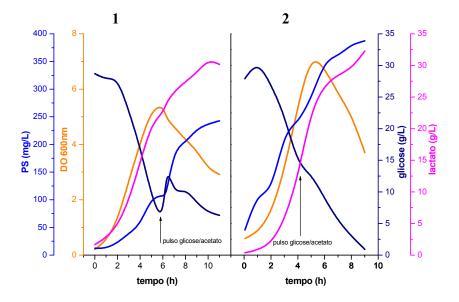


Figura 43: Curvas médias de ensaios descontínuos com pulso de glicose e acetato de amônio. Gráfico 1 – média dos ensaios 3, 4 e 5. Gráfico 2 – média dos ensaios 6 e 7. Laranja – DO 600nm; preto – glicose (g/L); azul – PS (mg/mL); rosa – lactato (g/L).

Tomando-se os dados de concentração de glicose no momento de pulso, concentração de polissacarídeo e DO 600 nm do inóculo dos cultivos descontínuos alimentados com pulso (ensaios 3, 4, 5, 6, 7 e 8) pode-se traçar um gráfico tridimensional (Figura 44). Qualitativamente, há uma relação entre estas variáveis, na qual, quanto menor DO 600 nm do inóculo e maior concentração de glicose no momento do pulso, há maior produção de polissacarídeo capsular.

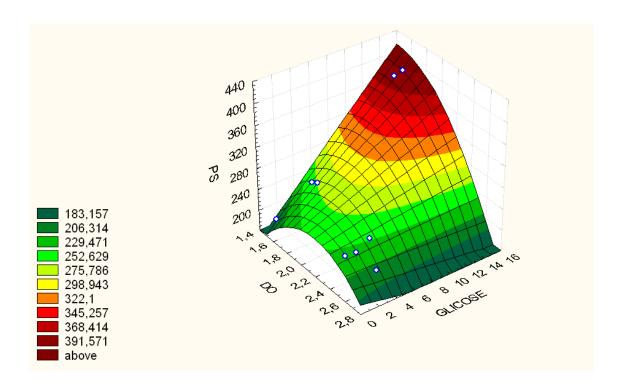


Figura 44: Produção de PS em função da glicose residual no momento do pulso e em função da DO do inóculo em cultivos de *S. pneumoniae* sorotipo 6B.

5 DISCUSSÃO

Variabilidade e adaptabilidade são características essenciais para a obtenção da habilidade de sobreviver e prosperar sob diversas condições ambientais. O pneumococo, quando submetido a diferentes condições ambientais, varia espontânea e reversivelmente. A variação de fase envolve modificações nas quantidades de fosforilcolina, polissacarídeo capsular e algumas proteínas de superfície importantes.

O comportamento do *S. pneumoniae* sorotipo 6B foi avaliado em biorreator, inicialmente num cultivo descontínuo – conhecido modo de operação para produção de polissacarídeos. A concentração de células viáveis se manteve entre 10⁸ e 10⁹ na fase exponencial de crescimento - quando houve máxima liberação de polissacarídeo capsular no sobrenadante (213,0 mg/L).

Considerando que o *S. pneumoniae* é um microorganismo aerotolerante, decidiu-se avaliar o crescimento e a produção de polissacarídeo sob efeito da presença de O₂, como estudado anteriormente para o sorotipo 23F (GONÇALVES et al. 2006). No caso do sorotipo 23F, o estresse ambiental causado pela mudança na atmosfera de nitrogênio para ar comprimido no final da fase exponencial de crescimento induziu um pequeno aumento na morte celular, porém levou a um aumento de 122% na quantidade de polissacarídeo capsular no sobrenadante. Procurou-se então avaliar o comportamento do *S. pneumoniae* sorotipo 6B nestas mesmas condições.

Entretanto, o sorotipo 6B apresentou um comportamento diferente do sorotipo 23F. A mudança na aeração dos cultivos descontínuos alimentados com pulso (ensaio 10 - anaerobiose seguida de aerobiose - 0,1 vvm de ar comprimido – Figura 30) não induziu aumento na liberação de PS, porém houve uma diminuição da ordem de 100 vezes na concentração de células viáveis do microorganismo (UFC/mL) que não se refletiu na determinação da massa seca e na leitura da absorbância a 600 nm. Somente quando adicionado 0,5vvm de ar comprimido no fim da fase exponencial (Ensaio 11, Figura 32), houve mudança significativa das variáveis de estudo: aumento de 29% de liberação de PS para o sobrenadante (de 223 mg/L para 287 mg/L) quando comparado ao ensaio 8 (cultivo descontínuo com pulso) e aumento no crescimento celular, visto pelo aumento de 19% na biomassa (g/L) e na densidade óptica, porém, ao fim do cultivo, havia número insignificante de células viáveis. Supõe-se que a espessura da cápsula do *S. pneumoniae* sorotipo 6B tenha desempenhado um papel protetor ao microorganismo quando submetido à aeração, como

mostra a microscopia eletrônica das variantes opaca e transparente (Figura 45). Uma baixa vazão de ar comprimido (0,1 vmm) não provocou mudanças no comportamento da cultura; em contrapartida, para o sorotipo 23F, nesta mesma condição, houve maior liberação de PS.

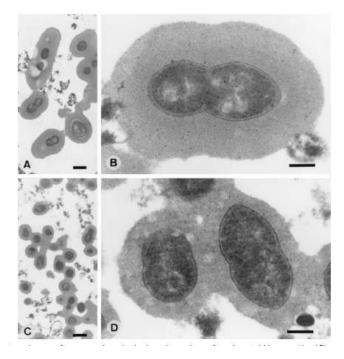


Figura 45: *S. pneumoniae* 6B. Imunoeletromicroscopia da cápsula polissacarídica do *S. pneumoniae* da cepa P324, sorotipo 6B, mais densa. Material capsular opaco (A e B) comparado à variante transparente (C e D). Barra: 1,0 μm (A e C) e 0,3 μm (B e D). (WEISER et al., 1999).

Pretendeu-se verificar a tolerância à presença de oxigênio no meio de cultura desde o início e seu efeito sobre a produção de PS. Assim, uma mistura de N₂ e ar comprimido 10% (1,19 L/min de N₂ e 0,13 L/min ar comprimido) foi testada desde o início do cultivo. Quando submetido à aerobiose, desde o início do cultivo não houve crescimento significativo.

Sabe-se que cultivos sob aerobiose de cepas de *S. pneumoniae*, que são deficientes em catalase, acumulam altas concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Segundo Taniai et al. (2008), a concentração de H₂O₂ começa a aumentar no início da fase exponencial de crescimento e atinge aproximadamente 5mM no meio desta mesma fase, simultaneamente, o crescimento celular cessa e há uma grande perda de células viáveis. Nossos resultados estão de acordo com os achados de Taniai et al.(2008). Ainda segundo estes autores, para ocorrer crescimento completo do microrganismo sob aerobiose seria necessário acrescentar catalase ao meio de cultura.

A fim de ter uma melhor visão dos processos fermentativos, optou-se por trabalhar na modelagem e simulação dos resultados dos ensaios mais significativos. Para isso, uma cooperação com o Laboratório Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (Departamento de Engenharia Química/UFSCar) foi firmada, sob coordenação da Prof. Dra. Maria do Carmo Nicoletti e Prof. Dra. Teresa Cristina Zangirolami e colaboração do doutorando Antônio Carlos Horta.

Qualquer otimização da produção de PS consequente à maximização do crescimento celular está condicionada à adoção de alguma estratégia que minimize a formação de ácido lático e/ou reduza o acúmulo de ácido lático no meio. A minimização da formação de ácido lático se torna complicada, visto que a formação do ácido a partir do piruvato é fundamental para que a bactéria reoxide o NADH formado durante a glicólise em condições anaeróbias; porém, o produto é capaz de provocar inibição da via glicolítica por retroalimentação (inibição pelo produto) (NEIJSSEL et al., 1997).

Os dados experimentais reais foram obtidos em fermentadores automatizados (controlados por LabVIEW) em escala de bancada (5 L e 10 L). Dados simulados foram gerados sobre as variáveis de estado dos processos estudados, que por sua vez, subsidiariam a otimização dos processos de produção de polissacarídeo (por exemplo, retirada de metabólitos tóxicos ao crescimento celular, mudanças nas concentrações de substrato e outros nutrientes importantes para o desenvolvimento do microorganismo). A integração numérica para determinar as variáveis foi desenhada com auxílio de um pacote de software, o MatLab 6.5 (The Mathworks, Inc., EUA), modificado para o microorganismo (Streptococcus pneumoniae). As construções foram utilizadas para prever a densidade celular máxima (Xm - g/L), o consumo de substrato (S, no caso, glicose - g/L) e geração de produto (P: lactato - g/L).

Assim, com o objetivo de otimizar um processo de obtenção de PS 6B cultivos descontínuos alimentados com duas condições de alimentação foram testados: exponencial e constante, baseados em modelos cinéticos pré-determinados.

Para o cultivo descontínuo alimentado com alimentação constante - ensaio 12 - não foi possível superar o patamar de produção de polissacarídeo (~250,0 mg/L) obtido emcultivos descontínuo alimentados com pulso de glicose e acetato de amônio. Somente no ensaio 13 se obteve uma produção de PS significativamente maior (54%) quando comparado aos ensaios descontínuos alimentados com pulso (à exceção dos ensaios 6 e 7). É possível que a DO 600 nm da cultura do inóculo tenha influenciado a produção de PS no ensaio 13.

Para os cultivos descontínuos alimentados com alimentação exponencial (vazão: 0,48e^{0,08t}L/h) foram estudadas duas condições de alimentação, sendo que o meio foi modificado nas concentrações de Glicose, Hidrolisado Ácido de Caseína e Extrato de Levedura. A condição Caseína – 82 g/L, YE-25 g/L e Glicose – 60 g/L (ensaio 14) teve produção semelhante aos ensaios descontínuos com pulso (à exceção dos ensaios 6 e 7). Já para os ensaios 15 e 16 (Meio alimentação: Caseína –52,5 g/L, YE-25 g/L, Glicose – 35 g/L), a alimentação não trouxe vantagens para a produção de PS (195,0 mg/L e 198,0 mg/L respectivamente).

Visando manter a concentração de células viáveis e aumentar a concentração celular e produção de PS, a técnica de microfiltração/ perfusão surgiu como alternativa aos processos fermentativos, já que há remoção eficaz e constante de metabólitos. A densidade celular e a produtividade volumétrica da cultura seriam aumentadas pela retenção de biomassa e o adiamento da fase estacionária.

Para o sorotipo 6B de *S. pneumoniae*, foi montado um sistema de membranas acopladas ao fermentador de 5L acoplado a cassete de membrana, controlados e monitorados por LabVIEW, com aquisição de dados em tempo real. Simultaneamente à remoção do permeado (saturado em ácido lático, cuja presença inibe o crescimento celular), o meio fresco foi adicionado. Isto provocou um prolongamento da fase exponencial e aumento da densidade celular. Com a renovação de meio, a concentração de células viáveis da cultura foi mantida, enquanto a quantidade de polissacarídeo capsular livre teve na sua curva uma tendência ascendente. O cultivo contínuo com reciclo de células se mostrou promissor, porém de difícil operação (entupimento das membranas de reciclo, controle do fluxo entrada de meio fresco no fermentador e saída de meio saturado em metabólitos, possibilidade de contaminação).

Devido à baixa reprodutibilidade dos ensaios (descontínuos, descontínuos alimentados e contínuos), decidiu-se investigar a qualidade do estoque congelado.

O acompanhamento do perfil de crescimento do inóculo se mostrou de vital importância e foi possível verificar, assim, o momento ideal para o repasse para o reator (meio da fase exponencial de crescimento). Consequentemente, obtivemos maior produção de PS ao final do cultivo.

Segundo Leal-Sánches et al.(2002), a preparação do inóculo é a parte do desenvolvimento do processo fermentativo que garante o fenótipo microbiano para propósitos experimentais e produtivos, fornecendo biomassa celular e gerando alta produtividade. Certamente o estágio de preparação do inóculo afetará a expressão do fenótipo desejado,

quantitativamente e qualitativamente, num período especificado. Por isto, o desenvolvimento do inóculo é confrontado como um problema fundamental.

Aliado ao fato exposto acima, também está associada uma possível ação de enzimas líticas ao longo do crescimento do microrganismo, tanto no inóculo quanto no fermentador.

6 CONCLUSÃO

- 1. A utilização de meio com maior concentração de extrato de levedura foi benéfica apenas quando do cultivo em frascos (aumento de 26,7% de densidade celular DO 600nm em relação ao meio de Hoeprich), provavelmente por um maior poder tamponante do meio, que foi anulado em reatores devido ao controle de pH por adição de base.
- 2. Os cultivos descontínuos com pulso, com introdução de ar na fase estacionária demonstraram que há diferenças fisiológicas e comportamentais entre sorotipos de *S. pneumoniae*. Estudos anteriores realizados no laboratório, envolvendo o sorotipo 23F (GONÇALVES et al., 2006), mostraram que sob mesmas condições de cultivo, houve maior liberação de polissacarídeo capsular para o sobrenadante, aumento de biomassa e manutenção de concentração de células viáveis no cultivo quando comparado aos cultivos com o sorotipo 6B.
- 3. Quando se aumentou a vazão de ar na fase estacionária para 0,5vvm (cultivo descontínuo com pulso) obteve-se a liberação do PS 6B para o meio, com uma concentração 29% maior que sob anaerobiose. No entanto, a introdução desta vazão de ar provoca perda acentuada de células viáveis.
- 4. Como estratégia alternativa para a otimização da produção de polissacarídeo capsular foi realizado um cultivo contínuo com reciclo celular, que levou a um aumento de biomassa celular máxima (de 2,35 g/L para 3,92 g/L) e de PS (de 250,0 mg/L para 281,0 mg/L) e a curva se mostrou ainda ascendente. Porém esta condição de cultivo se mostrou de difícil operação devido ao controle das vazões de entrada de meio fresco e saída de meio saturado em metabólitos e entupimento da membrana de reciclo.
- 5. Para os cultivos descontínuos alimentados, a alimentação constante teve melhores resultados, quando comparados aos ensaios com alimentação exponencial. Houve maior produção de PS e a condição de cultivo é de fácil operação.
- 6. Os cultivos descontínuos com pulso também são promissores, mas é imprescindível que a cultura do inóculo esteja ideal para repasse para o reator, hipótese confirmada nos

ensaios 6 e 7, quando a produção de PS ~ 390 mg/L.

6. O estado fisiológico do inóculo é o fator mais importante para a produção de PS nos cultivos de *S. pneumoniae* sorotipo 6B. Esta relação é consequência do perfil de crescimento bacteriano e de uma provável ação de enzimas líticas no final da fase exponencial de crescimento.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, H.; CHAPNICK, E. K. Conjugated polysaccharide vaccines. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v.13, p.113-133, 1999.

AMORY-RIVIER, C.; RIEUX, V.; AZOULAY-DUPUIS, C.; TROMBE, M. C. Sélection de mutants virulents de *S. pneumoniae* – Utilisation d'un modèle murin de septicémie. **Path. Biol.**, v. 47, n5, p. 519-525, 1999.

ARICHA, B.; FISHOV, I.; COHEN, Z.; SIKRON, N.; PESAKHOV, S.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; DAGAN, R.; PORAT, N. Differences in membrane fluidity and fatty acid composition between phenotypic variants of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v.186, n.14, p. 4638-4644, 2004.

AUZAT, I.; CHAPUY-REGAUD, S.; LE BRAS, G.; DOS SANTOS, D.; OGUNNIYI, A. D.; LE THOMAS, I.; GAREL, J. R.; PATON, J. C.; TROMBE, M. C. The NADH oxidase of *Streptococcus pneumoniae*: its involvement in competence and virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 34, n.5, p.1018-1028, 1999.

BERGMANN, S.; HAMMERSCHMIDT, S. Versatility of pneumococcal surface proteins (Mini-Review). **Microbiology**, n.152, p.295-303, 2006.

BRANDILEONE, M. C. C. Distribuição de sorotipos, resistência antimicrobiana e perfil molecular da *Streptococcus pneumoniae* isolado de doença invasiva no Brasil: 1993-1998. 200f. Tese de Doutorado.— Escola Paulista de Medicina — Universidade Federal de São Paulo, São Paulo 1999.

BRANDILEONE, M. C. C.; CASAGRANDE, S. T.; GUERRA, M. L. L. S.; ZANELLA, R. C.; ANDRADE, A. L. S. S.; DI FABIO, J. L. Increase in numbers of b-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugated vaccine coverage. **J. Med. Microbiol.**, v.55, p.567-74, 2006.

BRICKS, L. F.; BEREZIN, E. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on the prevention of invasive pneumococcal diseases. **J. Pediatr.**, v.82, n.3, 2006.

BRILES, D.E.; CRAIN, M. J.; GRAY, B. M.; FORMAN, C.; YOTHER, J. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v.60, p.111-116, 1992.

_

DAGAN, R.; GRADSTEIN, S.; BELMAKER, I.; PORAT, N.; SITON, Y.; WEBER, G. An outbreak of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 in a closed community in southern Israel. **Clin. Infect. Dis.**, v.30, p.319-321, 2000.

DI FABIO, J. L.; CASTAÑEDA, E.; AGUDELO, C.; DE LA HOZ, F.; HORTAL, M.; CAMOU, T. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, SIREVA-Vigia Group, 1993-1999. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.20, n.10, p.959-967, 2001.

DISCHE, Z.; SHETTLES, L. B. A specific color reation methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. **J. Biol. Chem.**, v.175, p.595-603, 1948.

DORAN, P. M. Bioprocess engineering principles. London: Academic Press, 120p., 1995.

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

GARCIA, S.; LEVINE, O. S.; CHERIAN, T.; GABASTOU, J. M.; ANDRUS, J. Pneumococcal disease and vaccination in the Americas: an agenda for accelerated vaccine introduction. **Rev. Panam. Salud Publica**, v.19, n.5, p.340-48, 2006.

GONÇALVES, V. M.; TAKAGI, M.; CARNEIRO, S. M.; GIORDANO, R. C.; TANIZAKI, M. M. *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F cultivation under aerobic and anaerobic atmospheres: differences in cell associated capsular polysaccharide. **FEMS Microbiology**, v.26, p.224-235, 2004.

GONÇALVES, V. M.; TAKAGI, M.; CARNEIRO, S. M.; GIORDANO, R. C.; TANIZAKI, M. M. Introduction of air in the anaerobic culture of *Streptococcus pneumoniae serotype* 23F induces the release of capsular polysaccharide form bacterial surface into the cultivation medium. **J Appl Microbiol**, v.101, p.1009-1014, 2006.

GONÇALVES, V. M.; ZANGIROLAMI, T. C.; GIORDANO, R. L. C.; RAW, I.; TANIZAKI, M.M.; GIORDANO, R. C. Optimization of medium and cultivation conditions

_

for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.59, p.713-717, 2002.

GONÇALVES, V. M. Cultivo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 23F: produção e purificação do seu polissacarídeo capsular para formulação de vacinas. 118f. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

GONZALEZ, B. E.; HULTEN, K. G.; KAPLAN, S. L.; MASON, E. O. Clonality of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates from pediatric patients in the United States. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, n.6, p.2810-2812, 2004.

GRUBER, I. M.; ZHDANOVA, L. G.; MOKHOV, I. V.; GORBACHEV, I. D.; VARGINA, A. K. Physiological characteristics of pneumococci. **Zh. Mickrobiol. Epidemiol. Immun.**, v.12, p.24-29, 1981 [resumo em inglês].

HAKENBECK, R. Transformation in *Streptococcus pneumoniae*: mosaic genes and the regulation of competence. **Res. Microbiol.**, v.151, p.453-456, 2000.

HAMMERSCHMIDT, S.; WOLFF, S.; HOCKE, A.; ROSSEAU, S.; MULLER, E.; ROHDE, M. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. **Infect. Immun.**, v.73, p.4653-4667, 2005.

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

HENRICHSEN, J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.2759-2762, 1995.

HOSKINS, J.; ALBORN JR, W. E.; ARNOLD J. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. **J. Bacteriol.**, v.183, n.19, p.5709-5717, 2001.

INSTITUT MERIÉX. Procédé de purification de polyosides de *Streptococcus pneumoniae* et vaccin à base de polyosides ainsi purifiés. BE 80 26320, 1980. [pat]

JEDRZEJAS, M. J. Pneumococcal virulence factors: structure and function. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, n.2, p.187-207, 2001.

- KADIOGLU, A.; WEISER, J. N.; PATON, J. C.; ANDREW, P. W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat. Pub. Group Microbiol.**, v.6, p.288-301, 2008.
- KIM, J.O.; ROMERO-STEINER, S.; SORENSEN, U. B. S.; BLOM, J.; CARVALHO, M.; BARNARD, S.; CARLONE, G.; WEISER, J. N. Relationship between cell surface carbohydrates and intrastrain variation on opsono phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v.67, n.5, p. 2327-2333, 1999.
- KIM, J. O.; WEISER, J. N. Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and technic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, v.177, p.368-377, 1998.
- KWON, S.; YOO, I. K.; LEE, W. G.; CHANG, H. N. High rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two stage membrane cell-recycle bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.**, v.73, n.1, p.25-34, 2001.
- LEAL-SÁNCHES, M. V.; JIMÉNES-DÍAZ, R.; MALDONADO-BARRAGÁN, A.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A.; RUIZ-BARBA, J. L. Optimization of Bacteriocin Production by Batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, n.09, p.245-260, 2002.
- LÓPEZ, R.; GONZÁLES, M. P.; GARCÍA, E.; GARCÍA, J. L.; GARCÍA, P. Biological roles of two new murein hidrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling. **Res. Microbiol.**, v.151, p.437-442, 2000.
- LUCAREVSCHI, B. R.; BALDACCI, E. R.; BRICKS, L. F.; BERTOL, C. J.; TEIXEIRA, L. M.; MENDES, C. M. F.; OPLUSTIL, C. Colonização de orofaringe por *Streptococcus pneumoniae* em crianças de creches municipais de Taubaté-SP: correlação entre os principais sorotipos e a vacina pneumocócica conjugada heptavalente. **J. Pediatr.**, v. 80, p. 215-220, 2003.
- LUND, E.; HENRICHSEN, J. Methods in Microbiology. v.12, p.241-262, 1978.
- MCGEE, A. D.; YOTHER, J. Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v.69, n.6, p.3755-3761, 2001.

MALLEY R, MORSE SC, LEITE LCC, AREAS APM, HO PL, KUBRUSLY FS, ALMEIDA IC, ANDERSON P. Multiserotype protection of mice against pneumococcal colonization of the nasopharynx and middle ear by killed nonencapsulated cells given intranasally with nontoxic adjuvant. **Infect. Immun.**, v.72, n.7, p.4290-4292, 2004.

MANTESE, O. C.; PAULA, A.; MORAES, A. B.; MOREIRA, T. A.; GUERRA, M. L. L. S.; BRANDILEONE, M. C. C. Prevalência de sorotipos e resistência antimicrobiana de cepas invasivas do *Streptococcus pneumoniae*. **J. Pediatr.**, v.79, n.6, 2003.

MORRISON, D. A. Streptococcal Competence for Genetic Transformation: Regulation by Peptide Pherormones. **Microb. Drug. Resist.**, v.3, n.1, p. 11-30, 1997.

MORONA, J. K.; MILLER, D. C.; COFFEY, T.J.; VINDURAMPULLE, C.J.; SPRATT, B. G.; MORONA, R.; PATON, J. C. Molecular and genetic characterization of the capsule biosyntesis locus of *Streptococcus pneumoniae* type 23F. **Microbiology**, v.145, p.781-789, 1999.

NEBENZAHL, Y. M.; PORAT, N.; LIFSHITZ, S.; NOVICK, S.; LEVI, A.; LING, E.; LIRON, O.; MORDECHAI, S.; SAHU, R. K.; DAGAN, R. Virulence of *Streptococcus pneumoniae* may be determined independently of capsular polysaccharide. **FEMS Microbiology**, v.233, p.147-152, 2004.

NEIJSSEL, O. M.; SNOEP, J. L.; TEIXEIRA DE MATOS, M. J. Regulation of energy source metabolism in streptococci. **Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.**, v.26, p.12S-19S, 1997.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. **Bioreaction engineering principles.** New York: Plenum Press, 150p., 1994.

OSELKA, G. Prevenção da doença pneumocócica no Brasil. J. Pediatr., v.79, n.3, p. 45-54, 2003.

OVERWEG, K.; PERICONE, C. D.; VERHOFF, G. G. C.; WEISER, J. N.; MEIRING, H. D.; DE JONG, A. P. J. M.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. M. Differential protein expression in phenotipic variants of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v.68, n.8, p.4604-4610, 2000.

PARK, H.; MOORE, M. R.; TREANOR, J. J.; PELTON, S. I.; PILISHVILI, T.; BEALL, B.; SHELLY, M. A.; MAHON, B. E.; NAHM, M. H. Differential effects of pneumococcal vaccines against serotypes 6A and 6C. JID, v.198, p.134-46, 2008.

PORAT, N.; TREFLER, R.; DAGAN, R. Persistence of two invasive *Stretococcus pneumoniae* clones of serotypes 1 and 5 in comparison to that of multiple clones of serotypes 6B and 23F among children in southern Israel. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.5, p.1827-1832, 2001.

PÖRTNER, R.; MÄRKL, H. Mini Review: Dialysis Cultures. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.50, p.403-414, 1998.

RESTREPO, A. V.; SALAZAR, B. E.; AGUDELO, M.; RODRIGUEZ, C. A.; ZULUAGA, A. F.; VESGA, O. Optimization of culture conditions to obtain maximal growth of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **BMC Microbiology**, v.5, p. 34-45, 2005.

ROBINSON, D. A.; BRILES, D. E.; CRAIN, M. J.; HOLLINGSHED, S. K. Evolution and virulence of serogroup 6 pneumococci on a global scale. **J. Bacteriol.**, v.184, n.22, p.6367-6375, 2002.

SHAPIRO, E. D.; BERG, A. T.; AUSTRIAN, R.; SCHROEDR, D.; PARCELLS, V.; MARGOLIS, A. Protective efficacy of polyvalent pneumococcal polyssaccharide vaccine. **N Engl. J. Med.**, v.325, p.1453-60, 1991.

SIMS, R. V.; STEINMANN, W. C.; MCCONVILLE, J. H.; KING, L. R.; ZWICK, W. C.; SCHWARTZ, J. S. The clinical effectiveness of pneumococcal vaccine in the elderly. **Annais Intern. Med.**, v.108, p.653-57, 1988

SCHÜNGERL K. **Bioreaction engineering: characteristics features of bioreactors.** New York: Wiley, v.2, 1991.

SENTHURAN, A.; SENTHURAN, V.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization. **J. Biotechnol.**, v.73, p.61-70, 1999.

SERRANO, I.; MELO-CRISTINO, J.; RAMIREZ, M. Heterogeneity of pneumococcal phase variants in invasive human infections. **BMC Microbiology**, v.6, p. 67-76, 2006.

SLEEMAN, K. L.; GRIFFITHS, D.; SHACKLEY, F.; DIGGLE, L.; GUPTA, S.; MAIDEN, M. C.; MOXON, E. R.; CROOK, D. W.; PETO, T. E. A. Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a population of children. **J. Infect. Dis.**, v.194, p.682-688, 2006.

- TANIAI, H.; IIDA, K.; SEKI, M.; SAITO, M.; SHIOTA, S.; MAKAYAMA, H.; YOSHIDAI, S. Concerted Action of Lactate Oxidase and Pyruvate Oxidase in Aerobic Growth of *Streptococcus pneumoniae*: Role of Lactate as an Energy Source. **J. Bacteriol.**, v.190, n.10, p.3572-3579, 2008.
- VENTURA, C. L.; CARTEE, R. T.; FORSEE, W. T.; YOTHER, J. Control of capsular polysaccharide chain length by UDP-sugar substrate concentrations in *Streptococcus pneumoniae*. **Mol. Microbiol.**, v.63, p.723-733, 2006.
- WEISER, J. N.; AUSTRIAN, R.; SREENIVASAN, P. K.; MASURE, H. R. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. **Infect. Immun.**, v.62, n.6, p.2582-2589, 1994.
- WEISER, J. N.; BAE, D.; EPINO, H.; GORDON, S. B.; KAPOOR, M.; ZENEWICZ, L. A.; SHCHEPETOV, M. Changes in availability of oxigen accentuate differences in capsular polysaccharide expression by phenotipic variants and clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v.69, n.9, p.5430-5439, 2001.
- YAVORDIOS, F.; COUSIN, M. Procédé d'obtention de polyosides capsulaires, polyosides capsulaires ainsi obtenus et leur application à la préparation de vaccins. EP 0 071515 A1, 1983 [pat].
- YOTHER, J.; WHITE, J. M. Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. **J. Bacteriol.**, v.174, p.601-609, 1992.
- XU, G.; CHU, J.; WANG, Y.; ZHUANG, Y.; ZHANG, S.; PENG, H. Development of a continuous cell-recycle fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus paracasei*. **Process. Biochem.**, v.41, p.2458-2463, 2006.

Anexo I

Trabalho nº XXX, Anais do XXX Simpósio Nacional de Bioprocessos – Sinaferm 2007, x a x de agosto de 2007, Curitiba, PR

Modelagem e Simulação do Cultivo de *S. pneumoniae* em Biorreator Acoplado a Sistema de Perfusão: Identificação das Condições Ótimas de Operação

Antonio Carlos L. Horta¹, Talita S. Carmo², Teresa C. Zangirolami^{1,*}, Viviane M. Gonçalves², Roberto C. Giordano¹, Martha M. Tanizaki², Maria do Carmo Nicoletti¹

Av. Vital Brasil, 1500 CEP 05503-900 Butantã - São Paulo

RESUMO

Streptococcus pneumoniae causa graves infecções, incluindo pneumonia, septicemia e meningite. O pneumococo é envolto por uma cápsula polissacarídica, reconhecidamente o fator de virulência mais expressivo, sendo assim utilizada na elaboração de vacinas conjugadas. Lactato é o principal metabólito formado durante os cultivos, tornando-se um inibidor do crescimento ao se acumular no meio. Para minimizar os efeitos inibitórios, acoplou-se membrana de microfiltração a biorreator tipo tanque agitado, permitindo a retirada do meio saturado em metabólitos e retenção das células. A otimização do sistema foi realizada utilizando modelagem e algoritmos genéticos para estimativa de parâmetros e simulação do modelo para diferentes valores dos fatores-chave de operação, os quais foram escolhidos empregando planejamento composto central rotacional. Os resultados simulados revelaram ser possível obter produtividade de 2 a 3 vezes superior à obtida experimentalmente, utilizando alimentação exponencial de meio suplementar contendo alta concentração de glicose.

INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae, ou pneumococo, é um agente etiológico comum das infecções do trato respiratório e apresenta morbidade e mortalidade elevadas em indivíduos de todas as idades (Kim & Weiser, 1998; Weiser et al., 1994; Kim et al. 1999). É um comensal da cavidade da nasofaringe, porém, sob condições apropriadas, causa graves infecções, incluindo pneumonia, septicemia e meningite. A alta incidência da doença pneumocócica aliada ao aparecimento de cepas resistentes a antibióticos gera um grave problema de saúde pública. Por isso, se faz necessária a prevenção por meio de vacinação. Dois tipos de vacinas estão atualmente no mercado: a vacina constituída de 23 diferentes polissacarídeos capsulares e vacinas constituídas de polissacarídeos capsulares conjugados a proteína.

Para a produção em larga escala de vacinas antipneumocócicas conjugadas com custo viável, a serem utilizadas em campanhas de vacinação, é essencial maximizar a formação do polissacarídeo capsular, o principal antígeno vacinal, em cultivos de cepas prevalentes de *S. pneumoniae*. Esta bactéria é caracterizada como um microrganismo Gram-positivo, apresentando morfologia de cocos, diplococos lanceolados ou cadeias (Klein & Ellis, 1997). Ela cresce tipicamente de modo difuso em

¹ Universidade Federal de São Carlos – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia; Caixa Postal 676 – 13565-905 São Carlos – SP – e-mail: <u>*teresacz@power.ufscar.br</u>

² Centro de Biotecnologia - Instituto Butantan

caldo e requer meios complexos para seu pleno desenvolvimento. Quanto aos requerimentos de oxigênio, são microrganismos anaeróbios facultativos (Kim & Weiser, 1998) ou aerotolerantes (Chapuy-Regaud et al., 2001). Caracterizam-se ainda por serem catalase e citocromo-oxidase negativos, de forma que, com o envelhecimento da cultura, ocorre rápida perda da concentração de células viáveis devido ao acúmulo de peróxido de hidrogênio (Brandileone et al. 1994). As cepas de relevância clínica são homofermentativas, sendo o L-lactato o produto final da fermentação da glicose. Considerando-se que o crescimento de S. pneumoniae ocorre em condições anaeróbicas, o acúmulo de lactato no meio de cultivo, que causa inibição do crescimento, torna-se o principal obstáculo para a obtenção de altas densidades celulares e, consequentemente, elevadas concentrações de polissacarídeo. Uma das alternativas para reduzir a concentração de metabólitos inibitórios no meio de cultivo consiste em acoplar um sistema de microfiltração a biorreator operado em batelada alimentada, permitindo a retirada do meio saturado em metabólitos e retenção das células, que são mantidas em crescimento gracas à suplementação de nutrientes presentes no meio fresco alimentado ao biorreator. Com o mesmo objetivo, ou seja, reduzir a inibição pelo lactato, biorreatores com reciclagem de células e perfusão de meio de cultivo vêm sendo empregados para atingir alta produção de ácido láctico em cultivos de Lactobacillus (Senthuran et al., 1999; Kwon et al., 2001 e Xu et al., 2006).

No entanto, para alcançar os resultados desejados utilizando o sistema "biorreator + membrana de microfiltração", faz-se necessária uma escolha criteriosa das condições de operação do mesmo, ou mais especificamente, da vazão de alimentação de meio fresco, da concentração da fonte de carbono no mesmo e da vazão de retirada de meio de cultivo. Porém, a complexidade do processo e das reações bioquímicas nele envolvidas torna inviável a adoção de uma abordagem exclusivamente experimental para definir as condições de operação, tanto pelo número de experimentos que seriam necessários, quanto pelo tempo e os recursos que seriam consumidos. Neste contexto, o desenvolvimento de um modelo matemático, capaz de descrever as principais variáveis de estado do bioprocesso, juntamente com a aplicação de uma estratégia de otimização aos resultados simulados, apresentam-se como ferramenta valiosa para rastrear condições de operação promissoras a serem avaliadas experimentalmente. Rodrigues & Iemma (2005) descreve a associação entre modelagem, simulação e planejamento experimental no estudo de um processo contínuo para purificação de enzimas, envolvendo 7 fatores, com o objetivo de identificar os principais efeitos que determinam a resposta "rendimento global". Outra possibilidade de aplicação desta associação consiste em realizar simulações de um processo com valores dos fatores previamente definidos por um delineamento composto central rotacional (DCCR) e empregar análise por superfície para otimização. Esta metodologia é rápida, exige pouco esforço computacional, além de contribuir para melhorar o entendimento sobre o processo em estudo ao identificar as variáveis mais significativas e indicar novas condições experimentais a serem investigadas.

Desta forma, os objetivos do presente trabalho consistiram em: i) estabelecimento de um modelo não estruturado para descrever o crescimento celular, a formação de polissacarídeo capsular, o consumo de glicose e o acúmulo de lactato em cultivos de *S. pneumoniae*; ii) simulação do modelo utilizando combinações de valores da vazão de alimentação e da concentração de glicose no meio de alimentação, as quais foram previamente definidas empregando a metodologia de delineamento experimental composto central rotacional; iii) identificação das condições de operação mais promissoras para obtenção de alta produção de polissacarídeo capsular aplicando análise por superfície de resposta aos resultados simulados.

Palavras-chave: Simulação, Modelagem, Perfusão, Vacina, *S. pneumoniae*, Delineamento Composto Central Rotacional, Produção de Polissacarídeo Capsular.

MATERIAIS E MÉTODOS

a) Experimento em biorreator acoplado a sistema de retenção de células

Microrganismo: A cepa liofilizada ST 433/03 do sorotipo 6B foi fornecida pelo Serviço de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

Meio de Cultura: Foi utilizado para cultivo o Meio de Hoeprich modificado (Hoeprich, 1955; Gonçalves et al, 2002), contendo hidrolisado ácido de caseína (37,5 g.L⁻¹), glicose monohidratada (15 g.L⁻¹), dialisado de extrato de levedura (25,00 g.L⁻¹), fosfato bipotássico (6,25 g.L⁻¹), bicarbonato de sódio (1,00 g.L⁻¹), L- Glutamina (0,78 g.L⁻¹), asparagina (0,125 g.L⁻¹), colina (0,012 g.L⁻¹), solução de sais (2,00 mL.L⁻¹), solução de ácido tioglicólico 10% (1,00 mL.L⁻¹). A solução de sais é constituída por sulfato de magnésio (250 g.L⁻¹), sulfato ferroso (2,50 g.L⁻¹), Sulfato de zinco (0,40 g.L⁻¹), sulfato de magnâs (0,18 g.L⁻¹), ácido clorídrico (10,00 mL.L⁻¹).

Procedimento experimental: O protocolo de cultivo descrito em Gonçalves et al. (2002) para S. pneumoniae sorotipo 23F foi utilizado para o cultivo do sorotipo 6B, sendo modificado quando necessário. Os ensaios foram feitos em reatores BioFlo 2000 (New Brunswick Scientific Inc.) com capacidade para 5L de cultivo, controlados e monitorados por programa LabView 7.1 (National Instruments). O meio de cultivo foi esterilizado por filtração em 0.22 um. O inóculo foi cultivado em 500mL do mesmo meio, a partir do estoque celular congelado (a -70° C) em meio Greaves com glicerol 30% (Greaves, 1960) e incubado por ~13h em atmosfera de 5-10% de CO₂ a 37°C. Foi usado um volume de inóculo suficiente para obter uma densidade óptica inicial ~0,2. Polipropilenoglicol foi utilizado como antiespumante, injetado com seringa quando necessário. Para o cultivo com reciclo de células, o reator foi acoplado através de uma bomba peristáltica ao cassete Pellicon (membrana Durapore 0,22μm, área 0,5m²/ Pellicon 2 – TFF Cassetes Millipore). O cultivo foi conduzido em batelada até a quase exaustão de glicose. Neste momento a alimentação de meio fresco e a retirada do meio de cultivo foram iniciadas simultaneamente e mantidas na mesma vazão, a qual variou entre 0.6 e 1,0 L/h ao longo do cultivo. A composição do meio de alimentação foi a mesma do meio de cultivo. As demais condições de operação do biorreator foram: pH mantido entre 7.4 e 7.6, vazão de N₂ em 0,25 VVM, velocidade de agitação de 100 rpm e temperatura de 37 °C. O volume do biorreator foi mantido em aproximadamente 2,0 L durante a operação em perfusão.

Métodos Analíticos: A densidade óptica da cultura celular foi medida por espectrofotômetro (Hitachi U-1800 Spectrophotometer) no comprimento de onda de 600nm. Amostras de cultura celular retiradas a cada hora foram centrifugadas a 4000 rpm, 4°C por 30 min. O sobrenadante foi utilizado para medidas de glicose, lactato e concentração de polissacarídeo capsular livre no sobrenadante. O sedimento celular foi ressuspendido em solução salina 0,9%, as células recentrifugadas e usadas para medidas de biomassa. A glicose residual foi medida diretamente por método colorimétrico de glicose oxidase (Enz-Color Biodiagnostica, Brazil) e por HPLC (Shimadzu, cat. No. 228-34350-92, com detector de índice de refração); a produção de lactato foi quantificada por HPLC. A concentração de ácidos e açúcares foi determinada com coluna de HPLC Aminex HPX87H (Biorad), 0,005M ácido sulfúrico como fase móvel, fluxo de 0,6mL/min, temperatura 60° C. O volume de injeção na coluna foi de 20μL. A concentração de PS livre no sobrenadante foi medida pelo conteúdo de ramnose (Dische & Shettles, 1948) após diálise contra água destilada.

b) Modelagem, estimativa de parâmetros e simulação do cultivo em biorreator acoplado a sistema de retenção de células

Tratamento dos dados experimentais disponíveis: O trabalho de modelagem e estimativa de parâmetros teve inicio com o tratamento dos dados experimentais. O conjunto de dados obtidos em cultivo realizado em perfusão foi dividido em três partes: fase lag (0-2 h) (Shuler & Kargi, 1992), período de batelada (2-6 h) e período de perfusão (6-11 h). Os dados do período de batelada e de perfusão foram tratados pela metodologia de alisamento e a interpolação de dados, com a finalidade principal de aumentar o número de dados e assim aumentar os graus de liberdade na estimativa dos parâmetros ajustáveis do modelo. Para tanto foi empregado o algoritmo proposto por Eilers (2003), conhecido como O Suavizador Perfeito (A Perfect Smoother).

Modelagem e estimativa de parâmetros: Na construção do modelo não estruturado para a descrição do processo foram testados diferentes modelos para representar a cinética do crescimento celular, tais como o modelo de Hoppe e Hansford, com inibição não competitiva pelo produto; o modelo de Levenspiel, com inibição por produto; e ainda com o modelo híbrido de Andrews e Levenspiel, com

inibição por substrato e por produto (Shuler & Kargi, 1992). O modelo utilizado na simulação foi o de Hoppe e Hansford, o qual apresentou melhor ajuste aos dados experimentais. Como os dados disponíveis foram obtidos em cultivo conduzido em baixa concentração de glicose, a inibição do crescimento pelo substrato não foi incluída no modelo proposto. A expressão cinética escolhida para representar o crescimento celular e as equações diferenciais presentes no modelo estão descritas nas equações (1) a (5).

$$\mu = \frac{\mu_{MAX}}{\left(1 + \frac{K_S}{C_S}\right) \left(1 + \frac{C_L}{Clacter}\right)} \tag{1}$$

$$\frac{dCx}{dt} = (\mu - kd).Cx \tag{2}$$

$$\frac{dC_S}{dt} = \left(S_F - C_S\right) \cdot \frac{F}{V} - \left(\frac{\mu}{Yxs} + m\right) Cx \tag{3}$$

$$\frac{dC_L}{dt} = \left(C_X \cdot \frac{\mu}{Y_{XL}} - C_L \cdot \frac{F}{V}\right) \tag{4}$$

$$\frac{dC_{PS}}{dt} = \left(\frac{\mu}{Y_{XP}} + \beta\right) Cx - C_{PS} \cdot \frac{F}{V}$$
 (5)

As descrições das variáveis, constantes e parâmetros do modelo apresentado se encontram no Quadro 1.

Variáveis e constantes $C_{\rm S}(g/L)$ $C_X(g/L)$ $C_L(g/L)$ C_{PS} (mg/L) F(L/h) $S_F(g/L)$ V(L)Concentração Concentração Concentração Concentração Concentração Vazão de Volume do de de glicose na de glicose celular de lactato alimentação biorreator polissacarídeo alimentação Parâmetros $Y_{ij} (g_i/g_j)$ m (h⁻¹) $k_d (h^{-1})$ $\mu_{\text{MAX}} (h^{-1})$ $K_S(g/L)$ C_{lacter} (g/L) Velocidade Coeficiente Constante de Coeficientes de rendimento Constante de específica Constante de inibição pelo de de j a i $(Y_{XS}, Y_{XP} e Y_{XL})$ morte máxima de saturação manutenção lactato crescimento

Quadro 1: Variáveis, constantes e parâmetros do modelo.

A estimativa de todos os parâmetros foi realizada simultaneamente à etapa de escolha de modelo, também em duas fases, na batelada e perfusão, após exclusão dos dados pertencentes à fase de adaptação (fase lag). Foram estimados os 8 parâmetros presentes no modelo, de acordo com a estratégia descrita abaixo.

A estimativa de parâmetros constitui uma otimização, cujo objetivo é encontrar a melhor aproximação de \hat{y} (saída do modelo) à y (dados experimentais), por adaptação do vetor de parâmetros (θ). A função f mapeia as entradas escolhidas do vetor de entradas u na saída escalar y, e é parametrizado por um conjunto de n parâmetros extraídos do vetor θ tal que $\hat{y} = f(u, \theta)$ (Nelles, 2001).

Neste trabalho, o modelo teve seus parâmetros ajustados adotando-se as técnicas de otimização supervisionada não linear pelos algoritmos de busca global, Simulated annealing (SA), refinados pelo algoritmo de busca local, Levenberg-Marquardt (LM) e o método de Newton. Estas técnicas estão relatadas em detalhes nos estudos de Changfeng Ma e Lihua Jiang (2007), Chao (2007), Nelles (2001) e Coleman e Li (1996) e (1994). Todos os algoritmos foram implementados em Matlab.

O problema é iniciado com a escolha dos parâmetros do modelo a serem estimados e da função objetivo. A partir disso, o sistema é sujeito a uma busca aleatória sobre o espaço do modelo a ser ajustado no intuito de encontrar o conjunto de parâmetros ótimos, de forma heurística. A cada

passo, o modelo é integrado e a função objetivo recalculada. Assim os passos são aceitos ou não, de acordo com o critério Metropolis (Chao, 2007):

$$P_{AB} = \min \left\{ 1, e^{\left[\frac{-(S_A - S_B)}{T}\right]} \right\} \tag{6}$$

onde P_{AB} é a probabilidade de aceitação da transição do espaço A ao espaço B do modelo, e T é a temperatura. A analogia feita com a temperatura se justifica pois mede o grau de agitação das partículas; altas temperaturas significam estados instáveis, nos quais as partículas saltam entre estados diferentes de energia. Assim pode-se considerar que em temperaturas elevadas a probabilidade do modelo se prender em um estado de mínimo local diminui, e a chance de encontrar o mínimo global aumenta.

A função objetivo mede a diferença entre os dados experimentais e os correspondentes resultados simulados. A solução ótima do modelo, ou seja, os valores para os parâmetros que levam ao melhor ajuste, pode ser alcançada encontrando-se o mínimo da função objetivo. Neste caso, a função objetivo foi:

$$Fobj = \sum \left(\frac{C_X - Ccelular}{dC1}\right)^2 + \left(\frac{C_S - Csubstrato}{dC2}\right)^2 + \left(\frac{C_L - Clactato}{dC3}\right)^2 + \left(\frac{C_{PS} - CPS}{dC4}\right)^2$$

Na qual Cx, Cs, C_L e C_{PS} são respectivamente as concentrações celular, de substrato, de lactato e de polissacarídeo calculadas pelo modelo, enquanto Ccelular, Csubstrato, Clactato e CPS são respectivamente os valores experimentais das concentrações celular, de substrato, de lactato e de polissacarídeo. Já dC1, dC2, dC3 e dC4 são os respectivos desvios padrões, que têm a finalidade de normalizar os erros entre as diferentes grandezas.

Simulação do modelo sob diferentes perfis de alimentação: Com os valores dos parâmetros estimados conforme descrito anteriormente, o modelo proposto foi simulado primeiro para o período de batelada, adotando-se uma concentração inicial de glicose de 10 g/L. O critério escolhido para término da batelada e início da operação contínua, com adição de meio fresco, retirada de meio de cultivo e retenção celular, foi o momento no qual a concentração residual de glicose no meio atingiu 2 g/L. Os valores finais da batelada para as variáveis concentração de glicose, de biomassa, de polissacarídeo e de lactato foram fornecidos como condições iniciais à simulação do modelo aplicada à fase de perfusão. Todas as simulações foram realizadas em MatLab 6.5 (Mathworks).

Para o estudo da influência da vazão de alimentação sobre a produção de polissacarídeo em condições de crescimento não limitado, escolheu-se o perfil exponencial de alimentação representado pela eq. (8), em função dos parâmetros C_1 e C_2 , o qual foi implementado no algoritmo de simulação juntamente com o modelo descrito anteriormente.

$$F = C_2 \cdot e^{C_1 \cdot t} \tag{8}$$

A complexidade do modelo proposto inviabiliza a obtenção de uma solução analítica para a vazão de alimentação. Por isso, adotou-se a metodologia de delineamento composto central rotacional (Rodrigues & Iemma, 2005) com a finalidade de simular várias possíveis combinações de perfis de alimentação exponenciais e diferentes concentrações de substrato no meio de alimentação, consistindo em um planejamento fatorial completo em 2 níveis (simulações 1 a 8 na Tabela 5); uma simulação no ponto central (simulação 9 na Tabela 5), além de 6 simulações realizadas nas condições rotacionais (simulações 10 a 15 na Tabela 5). Os valores reais das variáveis e dos níveis codificados correspondentes estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores reais e codificados para as variáveis C₁, C₂ e S_F utilizados no delineamento experimental composto central rotacional.

C1 (h ⁻¹)	X_1	C2 (l/h)	X_2	$S_F(g/l)$	X_3
0,00	- 1,68	0,01	- 1,68	30	- 1,68
0,02	- 1	0,13	- 1	44	- 1
0,05	0	0,31	0	65	0
0,08	+ 1	0,48	+ 1	86	+ 1

Ī	0,10	+ 1,68	0,60	+ 1,68	100	+ 1,68
	0,10	1,00	0,00	1,00	100	1,00

A transformação dos valores reais em valores codificados foi feito por meio das equações 9 (a), (b) e (c) (Rodrigues & Iemma, 2005):

$$X_1 = \frac{C_1 - 0.05}{0.03}$$
 (a); $X_2 = \frac{C_2 - 0.31}{0.18}$ (b); $X_3 = \frac{S_F - 65}{20.8}$ (c)

Na simulação do cultivo em biorreator acoplado ao sistema de microfiltração, foram consideradas as seguintes restrições operacionais:

- i) Se a vazão de alimentação for muito elevada, o tempo de vida da membrana de microfiltração seria muito curto devido ao entupimento e ao desgaste. Desta forma, valor máximo para F foi estabelecido em 0,8 L/h. Já o mínimo para F, o qual é definido pela velocidade de rotação mínima da bomba peristáltica, foi estabelecido em 0,01 L/h.
- ii) Pelo conhecimento do tempo de vida útil da membrana, o tempo de simulação (correspondente ao tempo de operação em perfusão) foi limitado a 12 horas.
- iii) Por razões relacionadas à esterilização do meio por microfiltração, a concentração máxima de glicose no meio de alimentação foi limitada a 100 g/l. Já a concentração mínima foi definida em 20 g/l.
- iv) Como, durante o experimento de perfusão, a vazão de meio de alimentação foi manipulada de forma que fosse igual à de retirada do meio de cultivo, a condição de operação a volume constante foi adotada tanto na modelagem quanto na simulação do processo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

a) Suavização e interpolação dos dados experimentais

Devido ao pequeno número de dados experimentais (doze medidas de cada variável feitas de hora em hora durante o cultivo de onze horas) em relação ao número de parâmetros (8) a serem estimados, optou-se por aplicar as técnicas de alisamento e interpolação descritas em Materiais e Métodos para gerar mais dados.

Os dados experimentais correspondentes às fases selecionadas foram suavizados e, em seguida interpolados, conforme descrito na Tabela 2. A escolha do parâmetro de suavização λ foi feita de acordo com as características dos respectivos dados (mais ou menos rugosidade).

Tabela 2. Parâmetros utilizados na interpolação e suavização dos dados experimentais.

Variável	λ	Nº de dados interpolados por	Número de dados	Número de dados com
		hora	originais	interpolação
Cx	20000	120	10	1081
Cs	30000	120	10	1081
$C_{\rm L}$	15000	120	10	1081
C_{PS}	20000	120	10	1081

A Figura 1 ilustra graficamente os resultados do alisamento e interpolação dos dados experimentais. A fase lag não foi tratada, pois não é explicada pelo modelo.

Observa-se ainda que o recurso de alisamento praticamente não foi utilizado, já que as curvas representando os dados gerados passam pela maioria dos pontos experimentais.

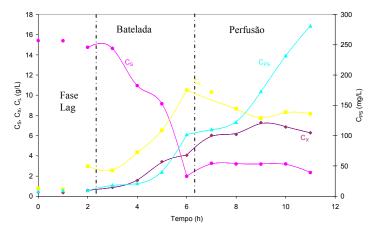


Figura 1: Evolução das concentrações de Cx (♦), Cs (•), C_L (•) e C_{PS} (△) no tempo. Pontos: dados experimentais; Linhas Contínuas: dados gerados por alisamento e interpolação.

b) Estimativa de parâmetros e ajuste do modelo aos dados experimentais

As condições iniciais para a simulação da fase batelada e da fase perfusão (valores alisados e interpolados ao final da batelada) estão relacionadas na Tabela 3. Já os valores estimados para os parâmetros nas diferentes fases, utilizando a metodologia Levenberg-Marquardt refinando a saída do "Simulated annealing" em conjunto com o método Newton reflexivo, estão representados na Tabela 4.

Os resultados dos ajustes podem ser visualizados na Figura 2. Em geral o modelo descreve bem as 4 variáveis de estado, porém existem diferenças entre os valores simulados e os dados gerados por alisamento e interpolação. Esta falta de ajuste do modelo aos dados gerados, principalmente aos da glicose na fase de perfusão, está relacionada à dificuldade de manter a vazão de retirada do meio de cultivo dentro da faixa de operação desejada, acarretando problemas no controle da vazão de alimentação do meio fresco e do volume do reator. Além disso, por uma falha no sistema de aquisição *on-line*, apenas um valor médio da vazão de retirada do meio pôde ser estipulado para a operação em perfusão, o qual foi empregado para simular o experimento. Como a dificuldade de manter o fluxo de permeado através da membrana foi se acentuando com o tempo de cultivo, não foi possível simular o experimento após nove horas. Apesar das dificuldades experimentais e da falta de informações mais precisas sobre fatores importantes, como a vazão de alimentação exata a cada instante, a capacidade descritiva do modelo para a produção de polissacarídeo, de lactato e de crescimento celular foi preservada.

Tabela 3: Condições de simulação e resultado do período de batelada.

	Tempo	Cx (g/L)	Cs (g/L)	$C_L(g/L)$	C_{PS}
	(h)				(mg/L)
Inicio	0	0,5	10	2,5	9
Fim	3,72	2,8	1,98	8,3	60

Tabela 4: Parâmetros ajustados via SA-LM na fase de batelada e perfusão respectivamente.

Fase	K_{S}	m	k_d	Y_{XS}	Y_{XP}	μ_{max}	Y_{XL}	C_{lacter}	β
Batelada	0,41	0,5	0	0,42	0,5	0,55	0,4	44,4	9,1
Perfusão	4.52	0.43	0.01	0,36	0,5	0,85	0,4	47,6	11,47

É interessante ainda comentar que o perfil simulado para a concentração de na fase de perfusão com menor acúmulo desta no meio, está relacionado à presença de vários nutrientes no meio de cultivo que podem ter sido utilizados pela bactéria durante o crescimento. Como o modelo considera a glicose como a única fonte de carbono, é natural que a concentração desta seja menor nos dados simulados em comparação com os experimentais.

Ainda analisando a Figura 2, as descontinuidades observadas nas transições entre a batelada e a perfusão estão relacionadas às condições iniciais adotadas para iniciar a simulação da fase de perfusão, as quais correspondem aos valores dos dados gerados por interpolação e alisamento ao final da batelada.

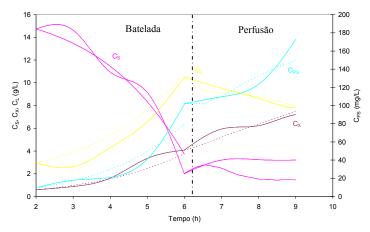


Figura 2. Comparação entre os resultados simulados e os experimentais obtidos no cultivo empregando membrana de perfusão acoplada ao biorreator para retenção de células e drenagem de meio. Linhas tracejadas: dados simulados; Linhas contínuas: dados interpolados e alisados.

c) Definição das condições mais promissoras para operação do sistema biorreator acoplado à membrana de microfiltração.

Conforme descrito anteriormente, a busca pelas melhores condições para operação do processo utilizando o sistema de microfiltração para retirada de meio de cultivo foi realizada por meio de um delineamento experimental composto central rotacional. Desta forma, as simulações relacionadas na Tabela 5 foram realizadas utilizando os valores reais de C_1 , C_2 e S_F correspondentes aos níveis de X_1 , X_2 e X_3 . Como variáveis respostas foram determinadas a concentração máxima de polissacarídeo no meio, a produtividade máxima em polissacarídeo capsular (Pr_{MAX}) e a concentração residual de glicose no meio (Gli_{RES}) no momento em que a concentração de PS atingiu o valor máximo. A produtividade foi obtida dividindo-se a concentração máxima de polissacarídeo capsular (PS_{MAX}) pelo tempo de cultivo total ($t_{TOTAL\ PS_{max}}$) correspondente para atingi-la.

Sem dúvida, os valores de maior destaque apresentados na Tabela 5 são as concentrações máximas de polissacarídeo estimadas pela simulação, que atingem mais de 1000 mg/L, quando concentrações mais altas de glicose na alimentação, em vazões altas de meio de alimentação foram empregadas. Estes resultados confirmam o potencial da estratégia adotada neste trabalho para otimizar a operação do biorreator acoplado à membrana de microfiltração.

Ao contrário do esperado, a concentração de glicose residual não atingiu valores mais elevados devido ao aumento da concentração de glicose no meio de alimentação. Além disso, como o valor estimado para o parâmetro concentração crítica de lactato foi relativamente alto (~ 47 g/L), a modulação do crescimento celular pelo acúmulo de lactato, mesmo nas simulações conduzidas em altas concentrações de glicose na alimentação e baixas vazões volumétricas de suplementação de meio, só ocorre quando a concentração do metabólito se aproxima de 30 g/L. Para melhorar o modelo, é necessário realização de cultivo em condições de fornecimento de glicose correspondentes às empregadas nas simulações 7, 8 ou 15, de forma que valores reais para a concentração crítica de lactato e de glicose possam ser determinados.

Tabela 5. Valores codificados das variáveis C₁, C₂ e S_F e valores simulados correspondentes a concentração de PS máximo, tempo de cultivo, concentração residual de glicose e produtividade máxima em PS.

Simulação X_1 X_2 X_3	PS_{MAX}	t _{TOTAL PSmax}	Pr _{MAX} (mg de	Gli_{RES}
-----------------------------	------------	--------------------------	--------------------------	-------------

				(mg/L)	(h)	PS/L.h)	(g/L)
1	-1	-1	-1	153,64	2,2	61,65	0
2	+1	-1	-1	411,56	12,1	34,01	0,57
3	-1	+1	-1	605,36	12,1	50,03	0,32
4	+1	+1	-1	643,94	12,1	53,22	0,31
5	-1	-1	+1	575,05	12,1	47,52	0,25
6	+1	-1	+1	636,73	12,1	52,62	0,78
7	-1	+1	+1	1082,2	12,1	89,44	0,43
8	+1	+1	+1	1184,1	12,1	97,86	0,41
9	0	0	0	722,67	12,1	59,72	0,58
10	-1,68	0	0	685,90	12,1	56,69	0,19
11	1,68	0	0	769,89	12,1	63,63	0,63
12	0	-1,68	0	95,03	1	95,03	0
13	0	1.68	0	960,96	12,1	79,42	0,31
14	0	0	-1,68	399,92	12,1	33,05	0,41
15	0	0	1,68	1046,3	12,1	86,47	0,71

Continuando a análise da Tabela 5, observa-se que, com exceção das simulações 1 e 12, nas quais o fornecimento de glicose foi insuficiente para sustentar o crescimento, nas demais, a concentração máxima de polissacarídeo foi atingida ao final do tempo pré-estabelecido para a operação em perfusão. Portanto, os valores calculados para a produtividade não agregam informação útil para a otimização dos valores de C1, C2 e S_F. Novamente, o alto valor para a concentração de lactato crítico explica a manutenção de um perfil de crescimento ilimitado até o final do cultivo. Desta forma, para análise por superfície de resposta dos resultados apresentados na Tabela 5, escolheu-se como variável resposta a concentração de máxima simulada de polissacarídeo capsular.

Os dados foram processados utilizando o programa Statistica, obtendo-se os coeficientes de correlação para um modelo empírico quadrático com efeitos de interação apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Coeficientes de regressão para a resposta concentração máxima de polissacarídeo (R²=0,98723)

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t(5)	p-valor
Mean/Interc.	721,5711	59,96579	12,03305	0,000070
(1)X1 (L)	44,0316	16,32188	2,69771	0,042901
X1 (Q)	3,3680	24,51694	0,13738	0,896095
(2)X2 (L)	233,9437	16,32188	14,33313	0,000030
X2 (Q)	-67,3073	24,51694	-2,74534	0,040534
(3)X3 (L)	201,4122	16,32188	12,34001	0,000062
X3 (Q)	1,6763	24,51694	0,06837	0,948140
1L by 2L	-22,3900	21,32556	-1,04991	0,341832
1L by 3L	-16,6150	21,32556	-0,77911	0,471161
2L by 3L	46,3025	21,32556	2,17122	0,082017

A Tabela 6 mostra (em negrito) que todos os termos lineares em X_1 , X_2 e X_3 são significativos, enquanto apenas o termo quadrático em X_2 é significativo (p-valor<0,05). Porém, observa-se que os termos X_2 e X_3 , que correspondem, respectivamente, à constante C_2 no perfil de alimentação exponencial e à concentração de glicose na alimentação, têm influência maior na resposta produção máxima de polissacarídeo do que a constante C_1 (variável codificada X_1). Assim, foi possível refinar o modelo por exclusão dos termos não significativos. Os novos coeficientes estimados para o modelo refinado são descritos na eq. 10, juntamente com os respectivos desvios padrão.

$$Y = 728 + 44*X_1 + 233*X_2 + 201*X_3 - 69*X_2^2 (R^2=0,971)$$
 (10)
 (\(\pm\)24) (\(\pm\)17) (\(\pm\)17) (\(\pm\)17) (\(\pm\)19)

A Tabela 7 mostra a análise de variância para o modelo refinado. A comparação entre os valores de F_{calc} e $F_{tab}(1\%,4,10)$ permite afirmar com segurança que os dados simulados são bem representados pela correlação quadrática descrita na eq. (10) e que, portanto, esta pode ser empregada para identificação da região ótima de operação do biorreator acoplado ao sistema de microfiltração por meio da análise das superfícies de resposta, como a representada na Figura 3, para as variáveis mais relevantes, S_F e C_2 .

Tabela 7. Análise de variância para a resposta concentração máxima de polissacarídeo simulada
(modelo refinado – Eq. 10).

	(-1).		
Fator	SQ	GL	QM	F	p
(1)X1(L)	26478	1	26477,7	6,3600	0,030289
(2)X2 (L)	747435	1	747434,8	179,5342	0,000000
X2 (Q)	55451	1	55451,3	13,3194	0,004465
(3)X3 (L)	554016	1	554016,0	133,0749	0,000000
Erro	41632	10	4163,2		
Total SQ	1425012	14			

SQ= soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; QM= quadrados médios. F_{calc} = 332 $F_{tab}(1\%,4,10)$ =5,99

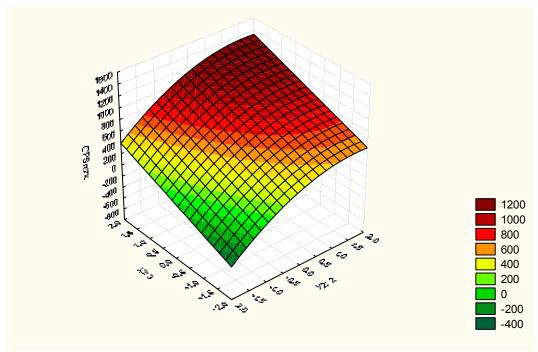


Figura 3. Superfície de resposta gerada a partir da eq. (10), representando a resposta concentração máxima de polissacarídeo simulada pelo modelo (C_{PSmax}) em função das variáveis codificadas X_2 (variável real C_2) e X_3 (variável real S_F).

A Figura 3 mostra que, enquanto para C_2 a região de máximo já foi atingida, para a variável S_F a superfície apresenta um perfíl ascendente, o que sugere que novas concentrações de glicose na alimentação com valores mais altos poderiam ser utilizadas na simulação para atingir a região de curvatura. Embora matematicamente possível, novas simulações só serão úteis para melhorar o entendimento do processo quando cultivos em condições mais semelhantes às simuladas na Tabela 5 forem realizados.

Para efeito de comparação, os resultados da simulação 8 são representados na Figura 4, juntamente com os valores alisados e interpolados aos dados experimentais obtidos no cultivo em biorreator acoplado à membrana de microfiltração. Nota-se que, mesmo que não seja possível manter a

operação de perfusão por 12 h, a concentração de polissacarídeo simulada após 5 h de perfusão, nas condições de operação definidas para a simulação 8, ultrapassa 400 mg/L, ou seja, 60% superior à obtida experimentalmente (~ 250 mg/L).

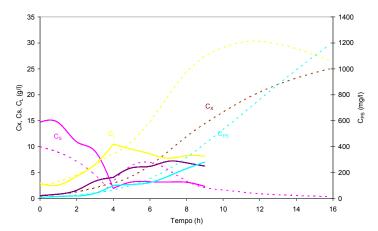


Figura 4. Comparação dos perfis de crescimento, consumo de glicose, produção de lactato e de polissacarídeo capsular. Linhas contínuas: dados experimentais alisados e interpolados do cultivo realizado ($s_F = 15 \text{ g/L}$, $F_{médio} = 0.8 \text{ L/h}$); Linhas pontilhadas: resultados simulados correspondentes à Simulação 8 ($s_F = 86 \text{ g/L}$ e $F = 0.48.e^{(0.08.t)}$). Fase lag não incluída.

CONCLUSÕES

A associação entre reator em batelada alimentada e membrana de microfiltração é uma alternativa promissora para contornar os efeitos inibitórios de metabólitos acumulados no meio de cultivo. No entanto, devido à complexidade e custo de operação deste sistema, os valores da vazão de alimentação, de retirada de meio e da concentração de substrato no meio suplementar devem ser cuidadosamente escolhidos. Neste trabalho foi implementada uma estratégia de otimização baseada em modelagem e simulação, levando a valores simulados de produtividade de 2 a 3 vezes superiores aos observados experimentalmente. O modelo desenvolvido pode ser ainda utilizado para simular outras formas de operação do sistema que prolonguem o tempo de vida útil da membrana, como operação em batelada alimentada e acionamento intermitente da bomba de retirada de permeado, apenas para manter o acúmulo de lactato abaixo da concentração crítica. Tais simulações de novas formas de operação dependem da reprodução pelo modelo do crescimento em altas concentrações de glicose no meio de alimentação. Para isso, novos experimentos estão em andamento utilizando as condições empregadas na simulação 8, ie,

$$F = 0.48 \cdot e^{(0.08.t)}$$
 (l/h) e S_F=86 (g/L).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brandileone, M.C.C., Vieira, V.S.D., Almeida, R.G., Landgraf, I., Buschinelli, S., Casagrande, S.T., Zanella, R.C. (1994) *Bacteriologia de <u>Streptococcus pneumoniae</u>*: manual técnico. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, pp. 62.

Chao, B.; Chae, S.H.; Zhang, X.; Lu, K.H., Im, J.; Ho, P.S.(2007), Investigation of diffusion and electromigration parameters for Cu–Sn intermetallic compounds in Pb-free solders using simulated annealing. Acta Materialia. Disponível em: <www.sciencedirect.com>, Acesso em: 15 Mar. 2007.

Chapuy-Regaud, S., Duthoit, F., Malfroy-Mastrorillo, L., Gourdon, P., Lindley, N.D., Trombe, M.-C. (2001) Competence regulation by oxygen availability and Nox is not related to specific adjustment of central metabolism in Streptococcus pneumoniae. *J. Bacteriol.*, 138, 2957-2962.

Coleman, T.F., Li, Y. (1996) An Interior, Trust Region Approach for Nonlinear Minimization Subject to Bounds. SIAM Journal on Optimization, Vol. 6, pp. 418-445.

- Coleman, T.F., Li, Y. (1994) On the Convergence of Reflective Newton Methods for Large-Scale Nonlinear Minimization Subject to Bounds. Mathematical Programming, Vol. 67, N° 2, pp. 189-224.
- Dische, Z., Shettles, L. B. (1948) A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *J. Biol. Chem.*, 175, 595-603.
- Eilers, P.H.C. (2003), A Perfect Smoother, Analytical Chemistry, Vol. 75, No. 14, July 15, pg. 3631-3636.
- Gonçalves, V.M., Zangirolami, T.C., Giordano, R.L.C., Raw, I., Tanizaki, M.M., Giordano, R.C. (2002) Optimization of medium and cultivation conditions for capsular polysaccharide production by <u>Streptococcus pneumoniae</u> serotype 23F. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 713-717.
- Greaves, R.I.N. (1960) Preservation of living cells by freeze-drying. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 85, 723-728.
- Hoeprich, P.D. (1955) Carbon-14 labeling of <u>Diplococcus pneumoniae</u>. *J. Bacteriol.*, 69, 682-688. Kelton, W.D.(2000), Simulation Modeling and Analises. Averill M. Law, 3ª ed.
- Kim, J.O. Romero-Steiner, S., Sørensen, U.B.S, Blom, J., Carvalho, M., Barbard, S., Carlone, G., Weiser, J.N. (1999) Relationship between cell surface carbohydrates and intrastrain variation on opsonophagocytosis of <u>Streptococcus pneumoniae</u>. *Infect. Immun.*, 67, 2327-2333.
- Kim, Jo, Weiser, Jn. (1998) Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and techoic acid with the virulence of <u>Streptococcus pneumoniae</u>. *J. Infect. Dis.*, 177, 368-377.
- Klein, D.L., Ellis, R.W. (1997) Conjugate vaccines against <u>Streptococcus pneumoniae</u>. *In New generation vaccines* $2^{nd}ed$, ed Levine, M.M., Woodrow, G.C., Kaper, J.B, Cobon, G.S. Marcel Dekker, Nova Iorque, pp. 503-525.
- Kwon, S., Yoo I.K., Lee, W.G., Chang, H.N. High rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two stage membrane cell-recycle bioreactor. Biotechnol Bioeng., New York, v.73, n.1, p.25-34, 2001.
- Ma, C.; Jiang, L. (2007), Some research on Levenberg–Marquardt method for the nonlinear equations. Applied Mathematics and Computation 184 pag. 1032–1040. Disponível em: www.sciencedirect.com, Acesso em 07 Mar. 2007.
- Nelles, O. (2001) Nonlinear system identification: from classical approaches to neural networks and fuzzy models. Germany, Springer.
- Rodrigues, M. I., Iemma, A. F. (2005) Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. *Casa do Pão Editora*, 1 nd ed., Campinas, SP.
- Senthuran, A., Senthuran, V., Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B. Lactic acid production by immobilized Lactobacillus casei in recycle batch reactor: a step towards optimization. Journal of Biotechnology 73, p. 61-70, 1999.
- Shuler, M.L., Kargi, F. (1992) Bioprocess engineering: basic concepts. *Prentice Hall*.
- Xu, G., Chu, J., Wang, Y., Zhuang, Y., Zhang, S., Peng, H. Development of a continuous cell-recycle fermentation system for production of lactic acid by Lactobacillus paracasei. Process Biochemistry 41, p. 2458-2463, 2006.
- Weiser, J.N., Austrian, R., Sreenivasan, P.K., Masure, H.R. (1994) Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.*, 62, 2582-2589.

Anexo II

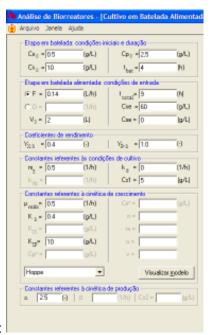
Simulação das condições de operação batelada alimentada, cultivos S. pneumoniae, (parâmetros estimados a partir dos dados da fase batelada do cultivo em perfusão). Estratégia de cultivo em batelada alimentada: batelada simples seguida por uma batelada alimentada com vazão constante F1 e por outra batelada alimentada com vazão constante F2. Dois valores de S_F foram simulados: 60 g/L (Simulação 1) e 120 g/L (Simulação 2).

Simulação 1:

Resumo: Iniciar batelada com S_0 =10 g/L (e X_0 =0,5 g/L), volume inicial 2 L. Início da alimentação (Fase 1) após \sim 4 h de cultivo (S estimado = 4 g/L, por garantia). Vazão de alimentação F_1 = 0,14 L/h e S_F = 60 g/L. Duração da fase 1: \sim 5 h. Quando completar \sim 9 h de cultivo (tempo total) ($S_{estimado} \sim$ = 2 g/L), iniciar Fase 2 da alimentação, com F_2 = 0,22 L/h e S_F = 60 g/L. Duração prevista para a fase 2: de 4 a 5 horas, (tempo total de cultivo \sim 13 a 14 horas). X_{final} = \sim 7 g/L, P_{final} (lactato) = \sim 19 g/L, V_{final} = \sim 4 L.

Super importante: qualquer aumento de concentração de glicose no meio suplementar precisa ser acompanhado pelo aumento (proporcional) na concentração dos outros nutrientes mais importantes (fontes de nitrogênio como extrato de levedura etc).

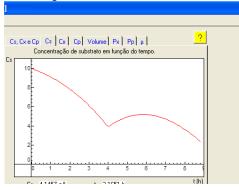
Condições (F_1 =0,14 L/h, S_f = 60 g/L)



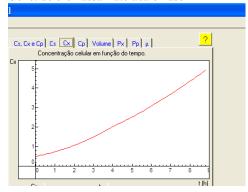
Valores dos parâmetros Batelada e Fase 1:

Resultados:

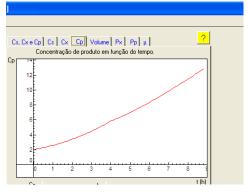
Conc. de glicose Batelada e Fase 1



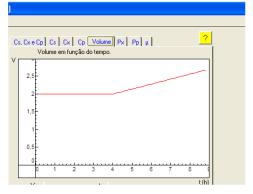
Conc. de biomassa Batelada e Fase 1



Conc. de ácido lático Batelada e Fase 1

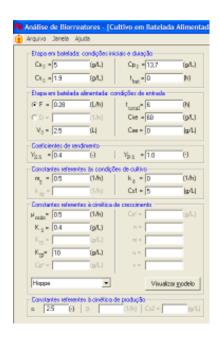


Volume Batelada e Fase 1

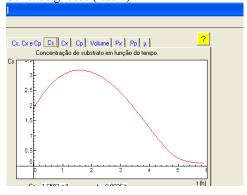


Fase 2 (F_2 =0,22 L/h, S_f = 60 g/L)

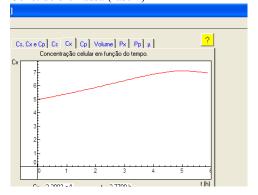
Condições iniciais Fase 2 (iguais às condições finais após 9 h de cultivo Fase 1): $X_0 = 5$; $S_0 = 1,9, P_0 = 13,7, V_0=2,5$. Valores dos parâmetros iguais aos da fase 1.



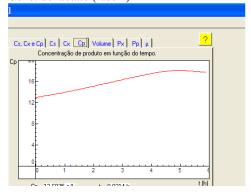
Conc. de glicose (fase 2)



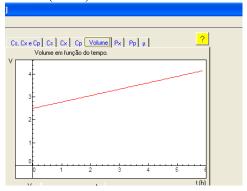
Conc. de biomassa (fase 2)



Conc. de lactato (fase 2)



Volume (Fase 2)

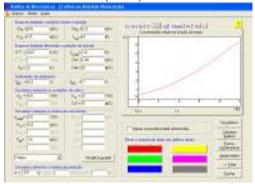


Simulação 2:

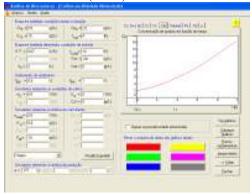
Resumo: Iniciar batelada com S_0 =10 g/L (e X_0 =0,5 g/L), volume inicial 2 L. Início da alimentação (Fase 1) após \sim 4 h de cultivo (S estimado = 4 g/L, por garantia). Vazão de alimentação F_1 = 0,07 L/h e S_F = 120 g/L. Duração da fase 1: \sim 5 h. Quando completar \sim 9 h de cultivo (tempo total) (Sestimado \sim = 3 g/L), iniciar Fase 2 da alimentação, com F_2 = 0,15 L/h e S_F = 120 g/L. Duração prevista para a fase 2: de 4 a 5 horas, (tempo total de cultivo \sim 13 a 14 horas). Valores das variáveis ao final da fase 2: X_{final} = \sim 9 g/L, P_{final} (lactato) = \sim 23 g/L, V_{final} = \sim 3,1 L. Se o experimento estiver indo bem é possível simular rapidamente uma nova vazão de alimentação (F3) para dar continuidade ao mesmo, considerando que o volume final na dorna pode alcançar \sim 5 L.

Fase 1 Condições iniciais (F_1 =0,07 L/h, S_f = 120 g/L, kD=0,0) e parâmetros e conc. de glicose (Fase1)

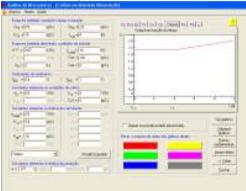
Conc. De biomassa (fase 1):



Conc. de lactato (fase 1):



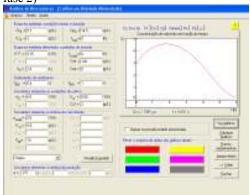
Volume (fase 1):



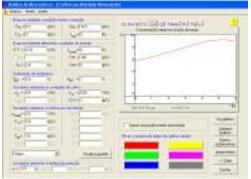
FASE 2: $(F_2=0,15 \text{ L/h}, S_f=120 \text{ g/L})$

Condições iniciais (iguais aos valores das variáveis após 9 h de cultivo fase 1): X_0 = 5,7; S_0 = 3, P_0 = 14,5, V_0 =2,4 L.

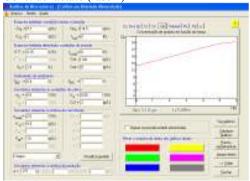
Conc de glicose e valores dos parâmetros de das condições iniciais (notar que k_D =0,05 para Scr=2 g/L, só para a fase 2)



Conc. de biomassa (fase 2)



Conc. de lactato (fase 2)



Volume (fase 2)

