UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica
Área Tecnologia de Fermentações

Produção do fragmento de anticorpo scFv por *Pichia pastoris*
geneticamente modificada

Cesar Andrés Diaz Arias

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

São Paulo
2013

Cesar Andrés Díaz Arias

Produção do fragmento de anticorpo scFv por *Pichia pastoris*
geneticamente modificada

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Diaz Arias, César Andrés
D542p Produção do fragmento de anticorpo scFv por *Pichia pastoris*
geneticamente modificada / César Andrés Diaz Arias. -- São
Paulo, 2013.
226p

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Pessoa Junior, Adalberto

1. Biotecnologia I. T. II. Pessoa Junior, Adalberto,
orientador.

620.8 CDD

A mi Madre,

María Elena Arias Pulido

AGRADECIMENTOS

Quiero agradecer al profesor Adalberto, por la oportunidad de entrar en su grupo de trabajo, por toda la paciencia y por saber entender la barrera que implica el idioma, por sus consejos, por su exigencia, por su gran dedicación a la educación, por su apoyo y confianza.

Quiero agradecer de manera muy especial a mi tío Armando Arias Pulido. Siempre serás el padre, el protector, el modelo de persona con el que siempre he soñado ser algún día. Gracias por todo el apoyo, gracias por estar siempre pendiente de mí y de mi madre. Sin tu ayuda nada de esto sería posible, gracias por creer en mí.

Quiero agradecer de manera muy especial a mi prima Barbara Ivone Arias Ruiz, por cada palabra, por cada sonrisa, por tener siempre la palabra exacta que indica siempre el camino hacia adelante. Gracias por hacer parte de mi vida, por ser la hermana y la amiga, por hacerme parte de tu vida, mil y mil gracias.

En el mundo existen muchos tipos de riquezas existen muchos tipos de alegrías, pero una de mis mas grandes alegrías es tener a Edilberto Santana haciendo parte de mi vida como mi padrino, como el padre, el amigo, en todos los momentos de mi vida.

A mi madrina Trinita, por todo el apoyo que me brinda, por las palabras sabias, y por toda la confianza que deposito en mí.

A mi tía Bety por todo el apoyo, y confianza, por estar siempre pendiente de mi madre, gracias tía por estar siempre con nosotros, apoyándonos firmemente sin ti esto no sería posible.

A mis colegas de trabajo Alex, Luiz, Leticia, Valeria, a mi alumna de iniciación científica Gabriela.

Un agradecimiento muy especial a mi colega de trabajo Marcela Frota Cavalcante por todo el apoyo, el esfuerzo, y la dedicación para con el proyecto.

A mis amigos especiales.

Agradecimiento especial a mi amigo André Moreni López y a Luciana Pellegrini por el apoyo, la fuerza, los consejos, siempre tener una mano amiga para ayudar.

A Erika Ortiz Montoya (La pulguita), voy a darle las gracias, lo más probable es que no las necesita,,, aun así se las voy a dar. Erika muchas gracias por todo. No voy a extenderme usted lo sabe.

Quiero agradecer a una amiga en especial, Daniela Viana Márquez. Oh mi princezinha, como agradecerte tantas cosas con tan pocas palabras. Gracias Dany por los concejos, por la amistad, por nunca dejarme solo, por cada risa cada palabra, por cada aliento, por el apoyo en lo laboral, emocional, y en lo que trasciende, por la amistad que me brindas muchas gracias Danielita.

Al colega que se transformo en amigo, a el amigo que se transformo en el hermano, a el hermano que me hizo parte de su vida y me nombro padrino de su matrimonio, que me acogió cuando no sabía nada de portugués, el que me brindo su casa en muchas ocasiones, el que me enseña diariamente tantas cosas, que nunca pide nada a cambio, que nunca dice no a una mano que le necesita, el que sabe hacer las cosas y no se profana de su sabiduría, el que merece ser bendecido una y mil veces, A mi hermano João gracias.

A mi amiga a mi compañera a mi confidente, a mea “namorada”, a la persona que llevo a mi vida y la lleno de alegrías, de luz, de risas, de flores, de osos de peluche. A la persona que siempre tiene un concejo, que me cuida, que siempre está preocupada con mi bienestar, que trabaja con migo y que confía en mí, Gracias amor mío, mi Graciélita, gracias por cada momento, gracias por tu vida, gracias por compartirla con migo, gracias por el amor que me das, por la vida que me entregas, por cada minuto que estas con migo, a la persona más linda del mundo, gracias mi linda, sin ti nada de esto sería posible, gracias por tu compañía por tu abrazo, por tu beso.

Por último a la persona que dedico este trabajo, y mi vida entera, a mi madre a la mujer que nunca desiste, que siempre lucha, que nunca da un paso atrás, que me dio la mejor educación. A la mujer que me educo con valores, por enseñarme a pensar, a ver las cosas de la vida, por darme libertad y en la libertad educarme. Madre yo no tengo vida para agradecer todo lo que tú haces por mí, te amo, siempre te amare, nunca Dios podría bendecirme tanto como el día en el que te escogió por madre mía. Mi pollito, mi ejemplo: Cuando llegué a Brasil, escuche de tus labios que estas orgullosa de mi. Gracias Madre mía, espero siempre por lo que me quede de vida ser digno de ti.

Dios mío, si es que existen otras vidas, si es que existen otros momentos u otras historias que contar, yo quisiera volver a encontrar a estas personas, que me diste de presente en vida, y te doy gracias por cada momento junto a ellas. Gracias por toda tu bendición.

"Haz sólo lo que amas y serás feliz, porque el que hace lo que ama, está benditamente condenado al éxito, que llegará cuando deba llegar, porque lo que debe ser, será, y llegará naturalmente, y haz las cosas por amor, porque aquel que trabaja en lo que no ama aunque lo haga todo el día es un desocupado."

Facundo Cabral

Arias CAD. Produção do fragmento de anticorpo scFv por *Pichia pastoris* geneticamente modificada. Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre.

RESUMO

O fragmento de anticorpo scFv foi expresso pela levedura *Pichia pastoris* recombinante utilizando o promotor AOX1, em presença de metanol, como fonte de carbono e como modelo de expressão. Este anticorpo é considerado uma possível alternativa para o diagnóstico e tratamento da aterosclerose. Foi realizado um estudo inicial da produção do fragmento de anticorpo e do crescimento da levedura com dois bancos de trabalho diferentes, variando a fonte de carbono (glicose e glicerol). Os resultados obtidos demonstraram que as máximas concentrações celulares e a maior produção de anticorpo foram atingidas com o estoque de trabalho mantido com glicerol como fonte de carbono e de preservação. Posteriormente, foi realizado um estudo em *shaker* e biorreator a partir de um planejamento fatorial completo 2^3 em que se estudaram as variáveis tempo de indução (24, 28 e 32 horas), temperatura de indução (10, 20 e 30°C), e concentração de indutor (metanol 0,5, 1,0 e 1,5%) sobre a variável resposta produção do fragmento de anticorpo. A única variável que apresentou efeito estatisticamente significativo, com nível de confiança de 95%, foi a concentração de indutor para os dois sistemas de produção. As melhores produções de fragmento de anticorpo foram de 27,8 mg/L em *shaker* e de 41,3 mg/L em biorreator. O terceiro estudo consistiu em avaliar a produção do fragmento de anticorpo em *shaker* pela levedura em distintas fontes de carbono (sacarose, glicerol, glicose e sacarose/glicose 50%). Neste estudo a análise de ANOVA não apresentou diferenças estatísticas significativas. Foi realizado um estudo para melhorar a quantificação do fragmento de anticorpo visando diminuir o número de etapas para evitar perdas no processo. Após obter um novo protocolo para a quantificação, realizou-se um novo estudo para avaliar a produção com as diferentes fontes de carbono. Com a análise dos resultados observou-se que todas as fontes de carbono apresentaram efeitos estatisticamente significativos, sendo que com a sacarose se obteve a maior produção com 93,7 mg/L do fragmento de anticorpo. Estes resultados foram comparados e analisados com observações realizadas ao microscópio da levedura, que demonstraram que a melhor produção de anticorpo foi obtida no momento que a levedura apresentava diâmetros menores que 0,895 μm . Seguidamente foi realizado um estudo para determinar fontes alternativas de carbono e nitrogênio (farelo de arroz e farelo de trigo) para produzir o fragmento de anticorpo, em substituição de substratos como peptona de caseína e casaminoácidos, a maior produção obtida neste caso foi de 27,9 mg/L quando foi trocado o casaminoácidos pelo farelo de trigo. Finalmente foi avaliado o efeito do $k_L a$ no crescimento da levedura e a produção do fragmento de anticorpo scFv, os resultados demonstraram que a melhor condição para o

crescimento da levedura foi com k_L 96,12 h^{-1} , por outro lado a melhor condição para a produção do fragmento de anticorpo foi de 12,24 h^{-1} com relação a produção final de 8,12 mg/L de anticorpo/ g/L de célula.

Arias CAD. Production of the antibody fragment scFv genetically modified by *Pichia pastoris*. Dissertation submitted to the Master course in Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo to obtain the title of Master.

ABSTRACT

The scFv antibody fragment was expressed in the recombinant yeast *Pichia pastoris* by using AOX1 promoter, in the presence of methanol, as carbon source and as a model for expression. This antibody is considered as a possible alternative for the diagnosis and treatment of atherosclerosis. An initial study was conducted in the production of the antibody fragment and the growth of yeast with two different work benches, varying the carbon source (glucose and glycerol). The results showed that the maximum cell concentrations, and the best production of antibody, were achieved with maintained working stock with glycerol as carbon source and preservation. Subsequently, a study was conducted in shaker and bioreactor, from a 2³ complete factorial design, in which the variables studied were time induction (24, 28 and 32 hours), temperature induction (10, 20 and 30°C), and concentration of the inducer (methanol 0.5, 1.0 and 1.5%) on the response variable production of the antibody fragment. The only variable that had a statistically significant effect, with a confidence level of 95%, was the inducer concentration for the two production systems. The best yields of the antibody fragment were of 27.8 mg/L for the shaker and 41.3 mg/L for the bioreactor. The third study was to assess the production of antibody fragment into the shaker with the yeast at different carbon sources (sucrose, glycerol, glucose and sucrose/glucose 50%). In this study, the ANOVA analysis did not show statistically significant differences. We conducted planning to improve the quantification of antibody fragment in order to decrease the number of steps to avoid losses in the process. After getting a new protocol for the quantification, we carried out a new study to evaluate the production with different carbon sources. The analysis of the results showed that all carbon sources showed statistically significant effects, among which sucrose obtained the highest yield 93.7 mg/L of antibody fragment. These results were compared and analyzed through a microscope, in which with the observations of the yeast showed that the best antibody production was obtained when the yeast had sizes smaller than 0.895 microns. Next, a study was conducted to determine alternative sources of carbon and nitrogen (rice bran and wheat bran) to produce the antibody fragment in place of casein peptone and casaminoacids as substrates. The highest yield obtained in this case was 27.9 mg/L, when casamino was replaced by the wheat bran. Finally, we evaluated the effect of kLa in yeast growth and production of the antibody fragment scFv, the results showed that the best condition for the growth of the yeast was 96.12 h⁻¹, on the other hand, the best condition for the production antibody fragment was 12.24 h⁻¹ with a final relation yield of 8.12 mg/L antibody/g/L cell.

Keywords: Antibodies. scFv. *Pichia pastoris*. kLa. Carbon source. Nitrogen source. Size yeast.

LISTA DE TABELAS

TABELA	PAGINA
1. Composição do meio de cultivo Meio de cultivo caldo BMGY.....	41
2. Níveis dos fatores utilizados no planejamento estatístico completo 2 ³ empregado para estudar a influência das variáveis temperatura, concentração do indutor e tempo de indução na expressão do fragmento scFv do anticorpo.....	46
3. Tabela comparativa das variáveis biomassa, produção de anticorpo e estoque de células criopreservadas utilizadas nas produções de anticorpo em <i>shaker</i>	73
4. Níveis das variáveis independentes estudadas no planejamento fatorial estatístico 2 ³	75
5. Tabela comparativa de todos os cultivos realizados no planejamento experimental para <i>shaker</i>	92
6. Valores de k _L a obtidos em água em função de diferentes valores de agitação (rpm) e de aeração (vvm) para o biorreator <i>Bioflo</i> 110, com dorna de 3 litros na temperatura ambiente (25°C).....	94
7. Tabela comparativa de todos os cultivos realizados no planejamento experimental fatorial completo 2 ³ para biorreator. As variáveis são: Produtividade global do fragmento de anticorpo scFv anti LDL ox; Rendimento biomassa–produto; Velocidade máxima de crescimento; Tempo de duplicação; Produção final do fragmento de anticorpo scFv ant-LDL oxidada.....	114
8. Comparação das diluições seriadas de albumina analisadas pela técnica de BCA. Antes e depois de serem concentradas com tubos de <i>vivspin</i> 10kd.....	119
9. Composição dos elementos hidrogênio, carbono e nitrogênio para os componentes a serem avaliados na produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura <i>P. pastoris</i>	141
10. Produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura <i>P.pastoris</i> cultivada com diferentes condições de k _L a.....	145

TABELAS DO APÊNDICE (A)

1.	Resultados da primeira curva padrão de biomassa (g/L).....	156
2.	Primeiro cultivo em biorreator.....	156
3.	Primeiro crescimento de <i>P. pastoris</i> conduzido em <i>shaker</i>	157
4.	Curva padrão de glicerol.....	157
5.	Segundo crescimento em <i>shaker</i>	158
6.	Primeiro cultivo em <i>shaker</i> estoque de glicerol (B1).....	158
7.	Primeiro cultivo em <i>shaker</i> estoque de glicose (B2).....	159
8.	Segunda curva padrão de biomassa (g/L) proveniente do novo estoque glicerol (B1).....	159
9.	Segunda curva padrão de biomassa (g/L) proveniente do novo estoque glicose (B2).....	160
10.	Segundo cultivo estoque de trabalho glicerol B1 em <i>shaker</i>	160
11.	Segundo cultivo estoque de trabalho glicose B2 em <i>shaker</i>	161
12.	Cultivo em <i>shaker</i> estoque de trabalho glicerol B1 com produção de anticorpo scFv.....	161
13.	Cultivo em <i>shaker</i> primeiro ensaio do planejamento estatístico da otimização na produção do fragmento de anticorpo scFv.....	162
14.	Cultivo em <i>shaker</i> segundo ensaio do planejamento estatístico da otimização na produção do fragmento de anticorpo scFv.....	162
15.	Cultivo em <i>shaker</i> terceiro ensaio do planejamento estatístico da otimização na produção do fragmento de anticorpo scFv.....	163
16.	Cultivo em <i>shaker</i> Quarto ensaio do planejamento estatístico da otimização na produção do fragmento de anticorpo scFv.....	163
17.	Cultivo em <i>shaker</i> Quinto ensaio do planejamento estatístico da otimização na produção do fragmento de anticorpo scFv.....	164
18.	Cultivo em <i>shaker</i> Sexto ensaio do planejamento estatístico da otimização na produção do fragmento de anticorpo scFv.....	164
19.	Cultivo em <i>shaker</i> Sétimo ensaio do planejamento estatístico da otimização na produção do fragmento de anticorpo scFv.....	165
20.	Cultivo em <i>shaker</i> oitavo ensaio do planejamento estatístico da otimização na produção do fragmento de anticorpo scFv.....	165
21.	Cultivo em <i>shaker</i> nono ensaio do planejamento estatístico da otimização na produção do fragmento de anticorpo scFv.....	166
22.	Cultivo em <i>shaker</i> décimo ensaio do planejamento estatístico da	

otimização na produção do fragmento de anticorpo scFv.....	166
23. Cultivo em <i>shaker</i> décimo-primeiro ensaio do planejamento estatístico da otimização na produção do fragmento de anticorpo scFv.....	167
24. Cultivo em <i>shaker</i> décimo-segundo ensaio do planejamento estatístico da otimização na produção do fragmento de anticorpo scFv.....	167
25. Cultivos em <i>shaker</i> da levedura <i>P. pastoris</i> produtora de anticorpo scFv, novos estoques de trabalho glicerol (B1) e glicose (B2).....	168
26. Cultivo em biorreator primeiro ensaio do planejamento estatístico da Otimização na Produção do fragmento de anticorpo scFv.....	168
27. Cultivo em biorreator segundo ensaio do planejamento estatístico da Otimização na Produção do fragmento de anticorpo scFv.....	169
28. Cultivo em biorreator terceiro ensaio do planejamento estatístico da Otimização na Produção do fragmento de anticorpo scFv.....	169
29. Cultivo em biorreator quarto ensaio do planejamento estatístico da Otimização na Produção do fragmento de anticorpo scFv.....	170
30. Cultivo em biorreator quinto ensaio do planejamento estatístico da Otimização na Produção do fragmento de anticorpo scFv.....	170
31. Cultivo em biorreator sexto ensaio do planejamento estatístico da Otimização na Produção do fragmento de anticorpo scFv.....	171
32. Cultivo em biorreator sétimo ensaio do planejamento estatístico da Otimização na Produção do fragmento de anticorpo scFv.....	171
33. Cultivo em biorreator oitavo ensaio do planejamento estatístico da Otimização na Produção do fragmento de anticorpo scFv.....	172
34. Cultivo em biorreator nono ensaio do planejamento estatístico da Otimização na Produção do fragmento de anticorpo scFv.....	172
35. Cultivo em biorreator décimo ensaio do planejamento estatístico da Otimização na Produção do fragmento de anticorpo scFv.....	173
36. Cultivo em biorreator décimo-primeiro ensaio do planejamento estatístico da Otimização na Produção do fragmento de anticorpo scFv.....	173
37. Cultivo em biorreator décimo-segundo ensaio do planejamento estatístico da Otimização na Produção do fragmento de anticorpo scFv.....	174
38. Segundo cultivo da levedura <i>P. pastoris</i> produtora de anticorpo scFv em biorreator.....	174
39. Curva de padrão estoque de glicose B2 por 16 horas para a levedura <i>P.</i>	

	<i>pastoris</i> produtora de anticorpo scFv.....	175
40.	Curva padrão estoque de glicerol por 36 horas da levedura <i>P. pastoris</i> produtora do fragmento de anticorpo scFv.....	175

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1. Representação da molécula de anticorpo e seus principais fragmentos.....	31
1.1 Metabolismo do metanol.....	36
1.2 Esquema de todos os experimentos realizados para a produção do fragmento de anticorpo scFv por <i>P. pastoris</i> geneticamente modificada.....	53
4.1 Primeiro cultivo da levedura <i>P. pastoris</i> em <i>shaker</i> utilizando o estoque primário.....	54
4.2 Primeiro cultivo da levedura <i>P. pastoris</i> em biorreator.....	55
4.3 Comparação entre a formação de biomassa dos primeiros cultivos em <i>shaker</i> e do cultivo realizado no biorreator.....	56
4.4 Segundo cultivo da levedura <i>P. pastoris</i> em <i>shaker</i> utilizando o estoque primário.....	57
4.5 Segundo cultivo da levedura <i>P. pastoris</i> em biorreator.....	58
4.6 Comparação entre a formação de biomassa do segundo cultivo em <i>shaker</i> e do segundo cultivo realizado no biorreator.....	60
4.7 Comparação entre a produção de etanol do segundo cultivo em <i>shaker</i> e do segundo cultivo realizado no biorreator.....	60
4.8 Comparação entre o consumo de glicerol do segundo cultivo em <i>shaker</i> e do segundo cultivo realizado no biorreator.....	61
4.9 Contaminação e variabilidade do estoque primário de trabalho.....	62
4.10 Contaminação e variabilidade do estoque primário de trabalho, microscopia da levedura <i>P. pastoris</i> geneticamente modificada.....	62
4.11 Primeiro cultivo em <i>shaker</i> do novo estoque de trabalho glicerol (B1) da levedura <i>P. pastoris</i> produtora de anticorpo scFv.....	63
4.12 Primeiro cultivo em <i>shaker</i> do novo estoque de trabalho glicose (B2) da levedura <i>P. pastoris</i> produtora de anticorpo scFv.....	64
4.13 Segundo cultivo em <i>shaker</i> do estoque (B2) da levedura <i>P. pastoris</i> produtora de anticorpo scFv.....	65
4.14 Segundo cultivo em <i>shaker</i> do estoque (B1) da levedura <i>P. pastoris</i> produtora de anticorpo scFv.....	65
4.15 Produção da biomassa dos estoques de glicerol (B1) e glicose (B2).....	67
4.16 Comparação macroscópica do crescimento dos estoques de trabalho glicose (A) e (B2).....	68
4.17 Comparação da produção da biomassa do estoque novo de glicose (B2), glicerol (B1) e o estoque anterior de glicose (A).....	69
4.18 Primeira produção de anticorpo scFv pela levedura <i>P. pastoris</i> estoque (B1) glicerol em <i>shaker</i>	70
4.19 Primeira produção de anticorpo scFv pela levedura <i>P. pastoris</i> , realizada com o estoque (B2) glicose em <i>shaker</i>	71
4.20 Comparação da biomassa e produção de anticorpo scFv pela levedura <i>P. pastoris</i> das produções feitas em <i>shaker</i> , estoque novo de glicerol (B1) e glicose (B2).....	72
4.21 Comparação das produções do fragmento do anticorpo scFv e de biomassa feitas em <i>shaker</i> em diferentes condições.....	73
4.22 Cultivo em <i>shaker</i> do primeiro ensaio do planejamento experimental	

	para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	76
4.23	Cultivo em <i>shaker</i> do segundo ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	77
4.24	Cultivo em <i>shaker</i> do terceiro ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	78
4.25	Cultivo em <i>shaker</i> do Quarto ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	79
4.26	Cultivo em <i>shaker</i> do Quinto ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	80
4.27	Cultivo em <i>shaker</i> do Sexto ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	81
4.28	Cultivo em <i>shaker</i> do Setimo ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	82
4.29	Cultivo em <i>shaker</i> do oitavo ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	83
4.30	Cultivo em <i>shaker</i> do nono ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	84
4.31	Cultivo em <i>shaker</i> do décimo ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	85
4.32	Cultivo em <i>shaker</i> do décimo-primeiro ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	86
4.33	Cultivo em <i>shaker</i> do décimo-segundo ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	87
4.34	Estudo dos efeitos mediante o gráfico de Pareto para a otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox pela levedura <i>P. pastoris</i> geneticamente modificada. Planejamento experimental fatorial completo 2 ³ em <i>shaker</i>	88
4.35	Estudo dos efeitos mediante o gráfico de Pareto para a otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox pela levedura <i>P. pastoris</i> geneticamente modificada. Planejamento experimental fatorial completo 2 ³ em <i>shaker</i>	89
4.36	Superfície de resposta indicando as interações simultâneas das variáveis independentes, a concentração de indutor (metanol 0,5%; 1% e 1,5%) e o tempo de indução (24h; 28h e 32h).....	90
4.37	Superfície de resposta indicando os efeitos simultâneos das variáveis independentes, concentração de indutor (metanol 0,5%; 1% e 1,5%); temperatura de indução (10°C; 20°C e 30°C).....	91
6.1	Cultivo do primeiro ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 2 Tabela 6) da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	96
6.2	Cultivo do segundo ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 11 C Tabela 6) da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	97
6.3	Cultivo do terceiro ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 5 Tabela 6) da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	98
6.4	Cultivo do quarto ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 5 Tabela 6) da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	99
6.5	Cultivo do quinto ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 12* Tabela 6) da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	100
6.6	Cultivo do sexto ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 6	

	Tabela 6) da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	101
6.7	Cultivo do sétimo ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 4 Tabela 6) da otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv....	102
6.8	Cultivo do oitavo ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 8 Tabela 6) da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	103
6.9	Cultivo do nono ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 3 Tabela 6) da otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv....	104
6.10	Cultivo do decimo ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 9C Tabela 6) da otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	105
6.11	Cultivo do décimo-primeiro ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 10C Tabela 6) da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	106
6.12	Cultivo do décimo segundo ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 7 Tabela 6) da produção do fragmento de anticorpo scFv.....	107
6.13	Estudo dos efeitos mediante o gráfico de Pareto para a otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox pela levedura <i>P. pastoris</i> geneticamente modificada. Planejamento experimental fatorial completo 2^3 em biorreator nesta figura estudam-se as três interações.....	108
6.14	Estudo dos efeitos mediante o gráfico de Pareto para a otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox pela levedura <i>P. pastoris</i> geneticamente modificada. Planejamento experimental fatorial completo 2^3 em bioreator Nesta figura estudam-se duas interações.....	109
6.15	Estudo dos efeitos mediante o gráfico de Pareto para a otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox pela levedura <i>P. pastoris</i> geneticamente modificada. Planejamento experimental fatorial completo 2^3 em bioreator estudam-se as três variáveis sem interações.....	109
6.16	Superfície de resposta indicando os efeitos simultâneos das variáveis independentes concentração de indutor (metanol 0,5%; 1% e 1,5%) e temperatura de indução (10°C; 20°C e 30°C).....	110
6.17	Superfície de resposta indicando os efeitos simultâneos das variáveis independentes concentração de indutor (metanol 0,5%; 1% e 1,5%) e tempo de indução (24h; 28h e 32h).....	112
6.18	Estudo dos efeitos mediante o gráfico de Pareto para a otimização da produção de biomassa pela levedura <i>P. pastoris</i> geneticamente modificada. Planejamento experimental fatorial completo 2^3 em bioreator.....	113
7.1	Análise da variância (ANOVA One way) para a produção do fragmento scFv pela levedura <i>P. pastoris</i> . As variáveis estudadas são as fontes de carbono sacarose, glicose, glicerol e sacarose/glicose (50%).....	116
7.2	Análise da variância (ANOVA One way) para a produção do fragmento scFv pela levedura <i>P. pastoris</i> . As variáveis estudadas são as fontes de carbono sacarose e glicose.....	117
7.3	Compração da quantificação de concentrações conhecidas de albumina pela tecnica de BCA antes e depois do processo de concentração.....	120

7.4	Fotografia tirada de um gel de poliacrilamida preparado ao 12%, produto de purificação por cromatografia de afinidade com a resina 6 fast flow, de um dos cultivos realizados no estudo; a coração foi realizada com azul de Comassie.....	122
7.5	Análise 3D do poço 2- produto de purificação por cromatografia de afinidade com a resina 6 fast flow, de um cultivo realizado no estudo; a coração foi realizada com azul de Comassie.....	124
7.6	Análise 3D do poço 2- produto de purificação por cromatografia de afinidade com a resina 6 fast flow, de um cultivo realizado no estudo; a coração foi realizada com azul de Comassie (2).....	124
7.7	Análise quantitativo do poço 2 - produto de purificação por cromatografia de afinidade com a resina 6 fast flow, de um dos cultivos realizados no estudo; a coração foi realizada com azul de Comassie.....	126
7.8	Análise da variância (ANOVA One way) para a produção do fragmento scFv pela levedura <i>P. pastoris</i> . As variáveis estudadas são as fontes de carbono sacarose, glicose, glicerol e sacarose/glicose (50%). As análises foram feitas com o protocolo de purificação descrito no item 7.1.....	129
8.1	Microscopia da levedura <i>P. pastoris</i> cultivada em diferentes fontes de carbono.....	132
8.2	Análise da variância (ANOVA One way) para o tamanho da levedura <i>P. pastoris</i> para a produção do fragmento scFv. As variáveis estudadas são as fontes de carbono sacarose, glicose, glicerol e sacarose/glicose (50%).....	133
8.3	Análise da variância (ANOVA One way) para o tamanho da levedura <i>P. pastoris</i> para a produção do fragmento scFv. As variáveis estudadas são as fontes de carbono glicerol e mistura (sacarose/glicose 50%).....	134
8.4	Análise da variância (ANOVA One way) para o tamanho da levedura <i>P. pastoris</i> para a produção do fragmento scFv. As variáveis estudadas são as fontes de carbono sacarose e glicose/sacarose (50%).....	135
8.5	Análise da variância (ANOVA One way) para o tamanho da levedura <i>P. pastoris</i> para a produção do fragmento scFv. As variáveis estudadas são as fontes de carbono sacarose e glicerol.....	136
8.6	Análise da variância (ANOVA One way) para o tamanho da levedura <i>P. pastoris</i> para a produção do fragmento scFv. As variáveis estudadas são as fontes de carbono sacarose, glicerol e glicose/sacarose (50%).....	137
8.7	Raio da levedura em função da fonte de carbono. Relação da área com respeito ao volume para as células cultivadas em (A) Glicose e (B) Glicerol.....	139
9.1	Diagrama de estudo do crescimento da levedura <i>P. pastoris</i> confrontando o logaritmo das unidades formadoras de colônia com o tempo.....	142
9.2	Análise de pureza e contagem das colônias da levedura <i>P. pastoris</i> , produtora do fragmento de anticorpo scFv, anti-LDL oxidada, em meio YPD, dos cultivos feitos com farelo de trigo e farelo de arroz como substratos alternativos.....	143

9.3	Análise da variância (ANOVA One way) para a produção do fragmento scFv pela levedura <i>P. pastoris</i> . As variáveis estudadas são a troca de casaminoácidos e peptona de caseína pelos farelos de arroz e de trigo.....	144
10.1	Via metabólica para o metabolismo de metanol em <i>P. pastoris</i>	146

FIGURAS DO APÊNDICE (B)

1	Coloração de Gram tomada da contaminação das induções quinta e sexta.....	177
2	Meio YPD recuperação da levedura <i>P. pastoris</i> produtora do anticorpo scFv. Isolamento das colônias para fazer o novo estoque de trabalho.....	177
3	Prova de pureza da levedura <i>P. pastoris</i> produtora do anticorpo scFv, tomada do novo estoque de glicerol (B1).....	178
4	Prova de pureza da levedura <i>P. pastoris</i> produtora do anticorpo scFv, tomada do estoque de glicose (B2).....	178
5	Curva padrão de biomassa primeiro estoque (A). Levedura <i>P. pastoris</i> produtora do anticorpo scFv.....	179
6	Curva padrão de glicerol. A curva foi feita a partir de uma solução estoque a 50mg/L de glicerol.....	180
7	Curva padrão de biomassa estoque novo da glicose (B2). Com 16 horas de cultivo. Levedura <i>P. pastoris</i> produtora do anticorpo scFv.....	181
8	Curva padrão de biomassa estoque novo da glicose (B) com 32 horas de cultivo. Levedura <i>P. pastoris</i> produtora do anticorpo scFv.....	181

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpos recombinantes
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
scFv	<i>single-chain variable fragment</i>
LDL	<i>Low Density Liprotein</i>
LDLox	<i>Low Density Liprotein oxidate</i>
MAbs	anticorpos monoclonais
AOX	Enzima álcool oxidase
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
YEPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
BMGY	<i>Buffered Glycerol-complex Medium</i>
h	horas
g	gramas
mL	mililitro
L	Litro
mg	miligrama
nm	nanômetro
O ₂	Oxigênio
T°	Temperatura graus Celsius
G3P	glicerol 3-fosfato
YPD	<i>Yeast peptone dextrose medium</i>
A	Primeiro estoque da levedura <i>P. pastoris</i>

B1	Segundo estoque da levedura <i>P. pastoris</i> cultivada em glicerol
B2	Segundo estoque da levedura <i>P. pastoris</i> cultivada em glicose
DACs	Doenças atero-coronarianas
Fab	Fragmento de anticorpo
kDa	kilo Dalton
VL	Cadeia leve
VH	Cadeia pesada
BCR	Complexo receptor de células
CDR	<i>Complementary Determining Regions</i>
DNA	Acido desoxiribonucléico
$k_L a$	Coeficiente volumétrico de transferência de massa (h^{-1})
DO	Densidade ótica

SUMÁRIO

	PAGINA
1	Introdução..... 28
1.1	Anticorpo scFv..... 29
1.1.1	Anticorpos..... 29
1.1.2	Estrutura dos anticorpos..... 31
1.2	Produção de anticorpos recombinantes para uso biotecnológico..... 32
1.3	<i>Pichia pastoris</i> 33
1.3.1	Assimilação e formação de glicerol..... 35
1.3.2	Metabolismo do metanol..... 35
1.4	Processos fermentativos..... 36
1.4.1	Biorreatores..... 36
1.4.2	Condução do processo fermentativo..... 37
1.4.2.1	Fermentação descontínua..... 37
1.4.3	Coeficiente volumétrico de transferência de massa (k_La)..... 38
2	Objetivos..... 39
2.1	Objetivo geral..... 39
2.2	Objetivos específicos apresentados neste projeto..... 39
3	Materiais e métodos..... 40
3.1	Materiais..... 40
3.2	Métodos..... 40
3.2.1	Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de

	massa (k_La).....	40
3.2.2	Armazenamento e reativação das células.....	40
3.2.2.2.1	Composição dos meios de cultivo utilizados.....	41
3.2.3	Elaboração dos estoques de <i>P. pastoris</i> utilizando duas fontes de carbono diferentes: glicerol (B1) e glicose (B2).....	43
3.2.4	Preparação do inóculo de <i>P. pastoris</i> em <i>shaker</i> e em biorreator (fase de crescimento).....	44
3.2.5	Fase de crescimento e indução em <i>shaker</i> análise estatística 2^3	44
3.2.6	Expressão do fragmento scFv do anticorpo em biorreator (fase de indução) de 3 litros.....	45
3.2.7	Estudo da influência das variáveis de temperatura, concentração de indutor e tempo de indução na expressão do fragmento scFv do anticorpo utilizando planejamento fatorial completo.....	45
3.2.8	Relação entre fragmento de anticorpo e biomassa ($Y_{P/X}$).....	46
3.2.9	Produtividade global do fragmento de anticorpo scFv (P_P).....	47
3.2.10	Produtividade global da biomassa (P_x).....	47
3.2.11	Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular.....	48
3.2.12	Determinação do tempo de geração.....	48
3.3	Determinações analíticas.....	49
3.3.1	Determinação da concentração celular.....	49
3.3.2	Determinação da concentração de etanol.....	49
3.3.3	Determinação da concentração de glicerol.....	50
3.3.4	Purificação dos fragmentos scFv.....	50
3.4	Esquema de todos os experimentos realizados no projeto.....	51
4	Resultados e discussões.....	54
4.1	Levantamento do coeficiente volumétrico de transferência de massa k_La em biorreator.....	54

4.2	Estudos iniciais de crescimento do estoque primário de <i>P. pastoris</i> geneticamente modificada realizados em agitador orbital e biorreator.....	54
4.2.1	Cultivos em <i>shaker</i> sem indução.....	54
4.2.1.1	Cultivo em <i>shaker</i> (Estoque A).....	54
4.2.1.2	Primeiro cultivo em fermentador sem indução (Estoque A).....	55
4.2.2	Comparação entre o primeiro cultivo em <i>shaker</i> e biorreator (Estoque A).....	56
4.2.3	Segundo cultivo em <i>shaker</i> (Estoque A).....	57
4.2.3.1	Segundo cultivo em biorreator sem indução (Estoque A).....	58
4.2.3.2	Comparação do segundo cultivo em <i>shaker</i> com o segundo cultivo em biorreator (estoque A).....	59
4.2.4	Contaminação e variabilidade do estoque primário (A) da levedura <i>P. pastoris</i> geneticamente modificada.....	61
4.2.5	Estudo de criopreservação.....	63
4.2.5.1	Cultivo com utilização de novos estoques de <i>P. pastoris</i> utilizando glicerol (B1) e glicose (B2) como fontes de carbono.	63
4.2.5.1.1	Segundo Cultivo com utilização dos segundos estoques (B) de <i>P. pastoris</i>	65
4.2.6	Comparação entre os segundos estoques (glicerol B1 e glicose B2), e o primeiro estoque (A) da levedura <i>P. pastoris</i> ...	67
4.2.7	Produção do fragmento de anticorpo scFv em <i>shaker</i>	69
4.2.7.1	Produção do fragmento de anticorpo recombinante scFv por <i>P. pastoris</i> geneticamente modificada em <i>shaker</i> utilizando o estoque secundário de glicerol (B1).....	69
4.2.7.1.1	Produção da proteína recombinante scFv por <i>P. pastoris</i> geneticamente modificada em <i>shaker</i> utilizando o estoque secundário de glicose (B2).....	70
4.8	Análises da influência da fonte de carbono para a preservação da levedura e a produção do fragmento de anticorpo scFv em <i>shaker</i>	71
4.8.1	Comparação da produção do anticorpo scFv pela levedura <i>P.</i>	

	<i>pastoris</i> nos cultivos em <i>shaker</i> com os dois estoques de trabalho (B1-B2) cultivados em medio BMGY.....	71
4.9	Planejamento Estatístico – Indução em <i>shaker</i> segundo estoque de glicose (B2).....	74
4.9.0	Estudo do planejamento estatístico em <i>shaker</i> segundo estoque de glicose (B2).....	75
4.9.1	Primeiro cultivo do Planejamento Estatístico em <i>shaker</i>	75
4.9.2	Segundo cultivo do Planejamento Estatístico em <i>shaker</i>	76
4.9.3	Terceiro cultivo do Planejamento Estatístico em <i>shaker</i>	77
4.9.4	Quarto cultivo do Planejamento Estatístico em <i>shaker</i>	78
4.9.5	Quinto cultivo do Planejamento Estatístico em <i>shaker</i>	79
4.9.6	Sexto cultivo do Planejamento Estatístico em <i>shaker</i>	80
4.9.7	Sétimo cultivo do Planejamento Estatístico em <i>shaker</i>	81
4.9.8	Oitavo cultivo do Planejamento Estatístico em <i>shaker</i>	82
4.9.9	Nono cultivo do Planejamento Estatístico em <i>shaker</i>	83
4.9.10	Décimo cultivo do Planejamento Estatístico em <i>shaker</i>	84
4.9.11	Décimo-primeiro cultivo do Planejamento Estatístico em <i>shaker</i>	85
4.9.12	Décimo-segundo cultivo do Planejamento Estatístico em <i>shaker</i>	86
4.10	Análise dos resultados obtidos no Planejamento Estatístico em <i>shaker</i>	87
5	Cultivo em biorreator de 3L de <i>P. pastoris</i> para produção de fragmento de anticorpo scFv.....	93
5.1	Estudo do coeficiente volumétrico de transferência de massa k_La em biorreator.....	93
5.1.1	Produção da proteína recombinante scFv por <i>P. pastoris</i> geneticamente modificada em biorreator de 3L utilizando o estoque primário.....	95
6	Resultados e discussão do planejamento fatorial estatístico 2^3 biorreator.....	95

6.1	Primeiro ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L.....	95
6.2	Segundo ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L.....	96
6.3	Terceiro ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L.....	97
6.4	Quarto ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L.....	98
6.5	Quinto ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L.....	99
6.6	Sexto ensaio do planejamento fatorial estatístico em bioreator de 3L.....	100
6.7	Sétimo ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L.....	101
6.8	Oitavo ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L.....	102
6.9	Nono ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L.....	103
6.10	Décimo ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L.....	104
6.11	Décimo-primeiro ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L.....	105
6.12	Décimo-segundo ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L.....	106
6.13	Análise dos resultados em biorreator.....	107
7	Análise do efeito entre diferentes fontes de carbono na produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura <i>P. pastoris</i> geneticamente modificada.....	115
7.1	Análise da purificação do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox por <i>P.pastoris</i>	117
7.2	Análise do efeito entre diferentes fontes de carbono na produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura <i>P. pastoris</i> geneticamente modificada. Utilizando o protocolo melhorado de purificação.....	129

8	Análise do tamanho da levedura <i>P. pastoris</i> cultivada em diferentes fontes de carbono e sua relação com a produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox.....	131
9	Produção de fragmento de anticorpo scFv a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio.....	141
10	Produção de fragmento de anticorpo scFv a partir de diferentes condições de k_{La}	145
11	Conclusões	148
12	Perspectivas e trabalhos futuros.....	150
	Referências.....	151
	Apêndice A.....	155
	Apêndice B.....	176
	Apêndice C.....	182
	Apêndice D.....	187
	ANEXOS.....	208

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os anticorpos têm se destacado no campo da biotecnologia. Alguns desses anticorpos têm sido empregados em pesquisa, para uso terapêutico, ou para diagnóstico. Além disso, os anticorpos são utilizados em diferentes tipos de doenças, tais como câncer, combate a micotoxinas, doenças virais e agentes parasitários (CHANG et al. 2008; ZIMMERMANN et al., 2009; SCHOONOOGHE et al. 2009; KOTI et al. 2010).

Diferentes tecnologias são empregadas para a produção desses anticorpos, como células animais, insetos, plantas, sendo os micro-organismos uma das formas mais utilizadas. A vantagem dos micro-organismos em comparação a eucariotas superiores é que apresentam tempo de crescimento curto, reduzindo os custos na produção. As principais células hospedeiras que apresentam grande capacidade de expressão são as leveduras *Pichia pastoris*, *Sacharomyces cerevisiae*, e a bactéria *Escherichia coli* (TAKAHASHI; SHIMADA, 2010; AEHLE et al., 2007; BON et al., 2008 CALIK et al. 2010).

Os anticorpos podem ser definidos como um grupo de glicoproteínas que funcionam como parte específica do complexo receptor de células imunológicas do tipo B. Os anticorpos tem a capacidade de reconhecer antígenos por regiões que são chamadas de epítomos (CHANG et al. 2008; ADEMOKUN et al. 2010; MINGUET; DOPFER et al. 2010). Esses anticorpos estão subdivididos, estruturalmente, e uma das menores partes das quais eles estão conformados são os fragmentos de anticorpos, o scFv, estes fragmentos de anticorpo retêm a atividade de ligação ao antígeno (PLUNCKTHUN; SKERRA, 1989).

Um estudo mundial, realizado em 2006, mostrou que a maioria das pessoas não conhece os fatores de risco para doenças do coração. No Brasil, oito em cada dez pacientes diagnosticados com colesterol alto não imaginam que esse é um fator que pode levar a um ataque cardíaco. Os anticorpos monoclonais são de alta especificidade e podem ser utilizados tanto para diagnóstico como para tratar estas doenças. A aterosclerose é uma doença imunoinflamatória da parede arterial caracterizada pelo acúmulo de colesterol em macrófagos, proliferação de células musculares lisas e fibrose. Alguns estudos mostram o envolvimento de autoantígenos na doença, sendo a LDL oxidada (*oxydated Low Density Liprotein* -

LDLox) o principal autoantígeno identificado na aterosclerose (BRAUNWALD, 1999).

A aterosclerose é considerada um processo imune-inflamatório crônico, por esta razão sua prevenção e tratamento devem ser enfocados no controle de fatores de risco tradicionais, e na imunomodulação do processo. Alguns estudos com imunização passiva tem utilizado anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpos, reportaram que o tratamento inibiu o desenvolvimento ou retardou a progressão da aterosclerose (BRAUNWALD, 1999).

O Brasil apresenta grande potencial para a busca de novos fármacos e biomarcadores enzimáticos, com o mercado externo brasileiro avaliado em 147,2 milhões de dólares, o qual representa 3,7% do mercado internacional (AEHLE et al. 2007). O mercado mundial de anticorpos teve um crescimento considerável entre os anos de 2008 e 2010, passando de 17 para 30 bilhões de dólares, aproximadamente. Alguns autores afirmam que o mercado mundial de anticorpos excedeu os 27 bilhões em 2007 (POTGIETER et al., 2009; CHAN; CARTER, 2010). Outros trabalhos oferecem outra estimativa diferente e argumentando que o mercado de anticorpos monoclonais pode estar perto dos 50 bilhões de dólares por ano (DENIZLI, 2011; AYYAR et al. 2012).

Neste contexto, o propósito deste trabalho é o estudo da produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL oxidada por *P. pastoris* geneticamente modificada, visando desenvolver a otimização do processo de produção. Esse fragmento de anticorpo é considerado como uma possível alternativa para se converter em um produto farmacêutico para a formulação de *kits* de diagnóstico para arteriosclerose.

1.1. ANTICORPO scFv

1.1.1. ANTICORPOS

O mecanismo de defesa que tem os organismos pluricelulares contra agentes patógenos é o sistema imunológico, a resposta imune pode ser dividida em dois, a resposta inata, que refere-se a barreiras físicas (pele, lágrima, saliva, muco) que dificultam a adesão e penetração dos patógenos (fungos, protozoários, bactérias ou vírus). Porém na imunidade inata interfere também o sistema de

complemento e células como neutrófilos, eosinófilos, basófilos e macrófagos, que são responsáveis por fazer o englobamento de partículas estranhas (WEISSER; HALL, 2009; VALE; SCHROEDER, 2010).

Por outro lado, a imunidade adaptativa é regida pela produção de anticorpos, que é iniciada quando ocorre o reconhecimento de partículas estranhas pelos linfócitos B. Assim, os linfócitos B diferenciam-se em plasmócitos e linfócitos B de memória, os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos (ABBAS et al., 1994). Os anticorpos são um grupo de glicoproteínas que possuem como funções cruciais nos mecanismos de resposta imune, a inativação de toxinas, a destruição celular e a ativação do sistema complemento, os anticorpos reconhecem o antígeno, em nível de membrana, e a partir deste momento é que ocorrerá a ativação, proliferação e diferenciação das células B (CHANG; CHOI et al., 2008; ADEMOKUN; WU et al., 2010; MINGUET; DOPFER et al., 2010).

Um antígeno pode apresentar vários epítomos diferentes e provocar a produção de anticorpos de diferentes clones de células B chamados anticorpos policlonais. Por outro lado, aqueles que são específicos para um único epítomo, são produzidos por um único clone celular e são chamados de monoclonais (MINGUET; DOPFER et al., 2010).

A especificidade, dos anticorpos monoclonais tem tornado eles, como excelente opção terapêutica na atualidade (SCHOONOOGHE et al 2009; KAIGORODOV; 2009); tratamentos para inativação de micotoxinas (CHANG; CHOI et al. 2008), doenças virais (KOTI; FARRUGIA et al., 2010) e em outros casos, contra agentes parasitários (ZIMMERMANN; SAALBACH et al., 2009). Tendo em vista a grande empregabilidade dessa classe de anticorpos nos mais diversos produtos de interesse farmacêutico, tais como; vacinas, kits diagnósticos, soros e outros, estudos vêm sendo conduzidos para otimizar sua obtenção em larga escala de (Ac) anticorpos recombinantes (DE GROOT; SCOTT, 2007).

1.1.2. Estrutura dos anticorpos

Os anticorpos apresentam forma semelhante a um Y, sendo utilizada esta representação, pode-se afirmar que os "braços" do Y são os Fabs, que retêm a atividade ligante ao antígeno, esses Fabs são constituídos por uma cadeia leve (V_L) que tem aproximadamente 220 aminoácidos e por parte de uma cadeia pesada (V_H) que possui aproximadamente 440 aminoácidos (MARANHÃO; BRIGIDO, 2000). A porção variável do anticorpo denomina-se Fv composta de aproximadamente 110 aminoácidos, na qual a sequência de aminoácidos varia bastante entre anticorpos específicos para diferentes antígenos e está localizada na porção amino terminal da molécula, sendo formada pelos domínios variáveis leve e pesado do Fab (Figura 1) (MARANHÃO; BRIGIDO, 2000).

Essas cadeias possuem, na sua extremidade amino-terminal, uma região variável. Cada extremidade carbóxi-terminal de cada cadeia é referida como região constante, a sequência de aminoácidos é conservada em todos os anticorpos de uma determinada classe de imunoglobulinas (ABBAS et al., 1994).

Figura 1 - Representação da molécula de anticorpo e seus principais fragmentos. (MARANHÃO; BRIGIDO, 2000).

1.2 Produção de anticorpos recombinantes para uso biotecnológico

Anticorpos são proteínas com alto potencial imunogênico produzido em laboratório a partir de células de camundongos ou ratos, e quando utilizadas em humanos são responsáveis por gerar resposta imune (resposta HAMA-*human anti-murine antibodies*) (MARANHÃO; BRIGIDO, 2000). A tecnologia do DNA recombinante favoreceu o desenvolvimento de vários tipos de anticorpos recombinantes, geralmente estes anticorpos têm sido gerados para logo ser clonados e expressados em bactérias ou também ser induzidos em eucariotos inferiores (ANDRADE, *et al.*, 2000)., assim como fragmentos como Fab, F(ab)'₂ e fragmentos de anticorpos (scFv) (KRIANGKUM *et al.*, 2001; PLUNCKTHUN; SKERRA, 1989)

A utilização de imunoglobulinas, na forma de fragmentos, é importante quando se pretende que a molécula tenha alta penetrabilidade, porém apresenta meia-vida reduzida nos indivíduos que recebem a imunização passiva (MARANHÃO; BRIGIDO, 2000). Os scFv podem se ligar e neutralizar vários agentes estranhos como toxinas ou viroses e por terem menor tamanho em relação aos anticorpos intactos, apresentam rápida difusão no tecido e melhor eliminação dos imunocomplexos produzidos. Vários pesquisadores têm direcionado seus trabalhos no desenvolvimento de vacinas contra doenças ateroscoronarianas (DACs), diabetes, entre outras, que constituem uma das principais causas de morbidade e mortalidade mundial.

Os ScFv recombinantes representam os menores domínios funcionais VH-VL de um anticorpo necessário para ligar-se com alta afinidade ao antígeno (PADLAN, 1994). A principal vantagem de usar fragmentos de anticorpos scFv em imunoensaios é que o elemento de reconhecimento (plasmídeo, fago, outros) pode ser produzido, modificado geneticamente e inserido em bactérias do tipo GRAS para expressão do fragmento com baixo custo quando comparado com eucariotes superiores. O scFv pode ser produzido sem a utilização de animais e pode ser facilmente selecionado para aquele antígeno específico por meio do uso de bibliotecas de fagos de anticorpos (GOODCHILD *et al.*, 2006).

Existe, ainda, outra aplicação de fragmentos recombinantes de imunoglobulinas (scFv) na área clínica que seria a utilização em kits diagnóstico e imunossensores. As tendências atuais no desenvolvimento de imunoensaio baseado em anticorpos incluem o uso de pequenos fragmentos de anticorpos, como o fragmento de cadeia única recombinante scFv. Ao contrário das técnicas tradicionais que usam anticorpos policlonais e monoclonais, anticorpos recombinantes selecionadas a partir de bibliotecas de fagos ou produzidos por tecnologia do DNA recombinante são mantidos em bactérias e oferecem uma fonte estável de anticorpos, além da acessibilidade ao DNA para outras manipulações genéticas (BIRD et al., 1988; HUSTON et al., 1988).

Atualmente, existem diversos sistemas de expressão para anticorpos recombinantes como, por exemplo, a bactéria *E. coli*, células de inseto, leveduras e células de mamíferos (HAYDEN et al. 1997; FROMMER; NINNEMANN, 1995). Um sistema de expressão que tem se mostrado eficiente para a produção de fragmentos de anticorpos funcionais é a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* (CREGG et al., 1985), pelo fato de apresentar maior facilidade de manipulação, alta taxa de expressão e baixo custo para seu cultivo (CREGG et al. 2000).

1.3 *Pichia pastoris*

P. pastoris é uma levedura anaeróbia facultativa pertencente à família *Saccharomycetales*, classe *Saccharomycetes*, filo *Ascomycota*, Reino *Fungi*. Sua morfologia apresenta células esféricas ou ovais, mas as células podem mudar sua forma de acordo com condições de cultivo. Em meio de cultura sólido formam colônias não filamentosas com coloração de branco a creme (KURTZMAN, 1984; POUTOU et al 2005).

Elas são chamadas de metilotróficas, pois têm a capacidade de utilizar metanol como única fonte de carbono. Essa capacidade é regulada por um gene álcool oxidase 1 (AOX1), que possui um dos promotores mais conhecidos. Além disso, elas podem crescer utilizando o glicerol como única fonte de carbono, e esse tem sido utilizado, de maneira eficiente, no crescimento de células em biorreatores. O genoma da *P. pastoris* contém duas cópias da álcool oxidase

(AOX), que regula 85% da álcool oxidase ativa na célula, na presença de metanol. Por esta razão é que este promotor é utilizado para a expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* (INAN; MEAGHER, 2001; YAMAWAKI et al., 2007; CALIK; INANKUR et al., 2010). Em geral, esta expressão pode ser feita utilizando métodos contínuos e descontínuos de produção (YAMAWAKI M. et al., 2007; ZHANG, A. et al., 2007).

As leveduras são capazes de secretar proteínas recombinantes em meio de cultura, e como organismos unicelulares, possuem a vantagem do crescimento rápido. A sua organização é de célula eucariótica, o que lhe permite realizar processos de células animais e plantas. O processo da *P. pastoris* metilotrófica, para converter metanol em água e dióxido de carbono, envolve enzimas como: álcool oxidase, catalase, formaldeído desidrogenase, formil-S-glutathiona hidrolase e formiato desidrogenase. Essas enzimas têm sido também encontradas em gêneros como, *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis*, e algumas espécies metilotróficas como *Candida boidinii* (SAKAI et al. 1996), *Pichia methanolica* (RAYMOND et al., 1998), *Hansenula polymorpha* (GELLISSEN, 2000; KANG; GELLISSEN, 2005) e *Kluyveromyces lactis* (GELLISSEN; HOLLENBERG, 1997).

A expressão do gene AOX1 é regulada pela presença de metanol como única fonte de carbono (DUAN; UMAR et al., 2009), e essa expressão é afetada quando outras fontes de carbono, como etanol, glicerol ou glicose, estão presentes no meio. Por essa razão, foi possível elaborar um procedimento para a produção de proteínas recombinantes em larga escala, baseado em um vetor que transporta o gene heterólogo, que é induzido sob o controle do promotor do gene álcool oxidase I. Esse processo biotecnológico é viabilizado quando esse gene é inserido no genoma da levedura por recombinação homóloga e, assim, a indução para expressão do gene heterólogo acontece pelo acréscimo de metanol como única fonte de carbono no meio de cultivo (SHI; KARKUT et al. 2003, GASSER; MATTANOVICH, 2007; YAMAWAKI et al., 2007; IDIRIS; TOHD et al., 2010).

As vantagens mais destacadas da produção de proteínas heterólogas por *P. pastoris*, são, as altas densidades celulares, que podem atingir concentrações superiores a 100g/L com produtividades que podem alcançar os 10 gL⁻¹ h⁻¹ (SHI, et al. 2003; CUNHA, et al. 2004; POUTOU, et al. 2005; WANG, et al 2012), a capacidade de transportar as proteínas produzidas a o meio de cultivo (LI, et al. 2007 AR; GEOFF, et al. 2013) e as modificações post-traducionais como a

glicosilação (Li, H et al. 2006; LIU, L. et al. 2013). *P. pastoris* têm a capacidade de crescer em diferentes fontes de carbono como sorbitol, glicose, glicerol, etanol, acetato, e metanol (POUTOU, et al. 2005; LI, t. et al. 2008). Esta levedura pode crescer numa faixa de pH de 3 a 7 e a temperatura ótima de crescimento encontra-se perto dos 30°C (POTVIN, et al. 2010; JIRATTIKARN, te al. 2013).

1.3.1. Assimilação e formação de glicerol

O glicerol é utilizado como fonte de carbono em condições aeróbias para muitas espécies de leveduras, incluindo *P. pastoris*. A via catabólica desse composto envolve difusão passiva através da fosforilação da membrana plasmática, da ação da enzima glicerol quinase e uma subsequente oxidação pela enzima glicerol mitocondrial ubiquinona oxidoredutase fosfato (POUTOU. et al 2005).

1.3.2. Metabolismo do metanol

Em geral, o metabolismo energético de leveduras metilotróficas, quando são cultivadas com metanol como única fonte de carbono, começa dentro dos peroxissomas, onde ocorre a oxidação de metanol à formaldeído devido à atuação da enzima álcool oxidase I, também produzindo peróxido de hidrogênio como um subproduto da reação. A oxidação ocorre em presença de oxigênio molecular que é o acceptor final de elétrons ativo (INAN; MEAGHER, 2001; XUAN; ZHOU et al., 2009; POUTOU et al 2005).

celulares da ordem de 100 g/L, o que exige condições especiais de operação. Existem alguns fatores que influenciam na produção de produtos utilizando biorreatores, como por exemplo, tipo de catalisador (células, enzimas), configuração do catalisador (livres ou imobilizadas); ou até mesmo, quanto à forma de agitar o líquido no reator. A capacidade dos biorreatores é bastante variável. Existem três grupos: os reatores de até 2m³ de capacidade, os reatores com uma escala intermediária na qual se opera até 200 m³, especialmente empregada na produção de enzimas, antibióticos e vitaminas. (SCHMIDELL et al 2001).

1.4.2. Condução do processo fermentativo

A forma geral em que um biorreator é operado é dividida em quatro processos: descontínuos, que podem ser com inóculo único ou com recirculação de células; processos semi-contínuos e descontínuos alimentados, que podem ser com ou sem recirculação de células; contínuos, executado em um reator ou em vários reatores (com ou sem recirculação de células) (SCHMIDELL et al 2001).

1.4.2.1. Fermentação descontínua

O modo de operação se inicia quando o micro-organismo é inoculado e cresce sob condições ótimas e, no decorrer do processo fermentativo, nada é adicionado, exceto oxigênio. No caso de processos aeróbios, antiespumante, ácido ou base para controle de pH também podem ser adicionados. O substrato é adicionado de uma só vez e pode causar alguns efeitos de inibição ou repressão, e reduzir o rendimento ou produtividade do processo. Por outro lado, apresenta menor risco de contaminação, além de ser muito utilizado na indústria de alimentos como iogurte, pickles, cerveja, vinho, entre outros. Em escala industrial, muitos processos são adaptados com intuito de otimizar a produção e são classificados em dois grandes grupos: aqueles em que cada dorna recebe um

inóculo; aqueles em que ocorre a recirculação do micro-organismo (SCHMIDELL et al 2001).

1.4.3. Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$)

A capacidade de medir a transferência de oxigênio em biorreator aeróbico é muito importante, visto que este valor pode determinar a produtividade do sistema. O oxigênio deve passar da fase líquida (meio de cultivo) e ultrapassar a barreira celular do micro-organismo. Esse valor é dado pelas seguintes variáveis: o transporte de oxigênio da fase líquida para a vizinhança do micro-organismo; a difusão do oxigênio na interface sólido-líquido no interior da célula; a distribuição intracelular; e as reações bioquímicas intracelulares. Todas estas etapas ocorrem simultaneamente dentro do biorreator.

O gradiente de oxigênio entre a interface e a fase líquida é a taxa de transferência de oxigênio. Em outras palavras, o produto do coeficiente de transferência de oxigênio e a relação de aeração e agitação de um fermentador indicam o potencial do fermentador de fazer chegar o oxigênio até a célula. O principal problema é que o oxigênio passa de uma fase para outra (gás - líquido - microrganismo) e neste processo podem ser observadas as diferentes etapas. A primeira etapa refere-se ao transporte da fase gasosa à interfase gás - líquido, a segunda etapa refere-se à difusão do oxigênio pela interfase gás - líquido, a terceira etapa refere-se ao transporte do oxigênio da fase líquida à vizinhança do microrganismo, a quarta etapa refere-se à difusão do oxigênio da interfase líquida para a interfase sólida (célula), e as duas últimas etapas referem-se a difusão dentro da célula e as reações bioquímicas.

Isso depende de muitas variáveis como o projeto do biorreator, o grau de agitação, o fluxo de ar, a viscosidade do meio e a presença de anti-espumante. A disponibilidade de oxigênio para os micro-organismos é de suma importância para processos em que são necessárias altas taxas de aeração, o que depende da via metabólica que se deseja atingir ou o tipo de produto que deseja obter (ERAZO, CARDENAS, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Este estudo tem como finalidade estudar algumas condições de produção do fragmento de anticorpo scFv a partir de linhagem geneticamente modificada de *P. Pastoris* por processo de cultivo descontínuo, em biorreator e em *shaker*.

2.2 Objetivos específicos apresentados neste projeto.

- Comparar o crescimento de *P. pastoris* cultivada em *shaker*, com crescimento em biorreator de três (3) litros, na condição de máximo valor de k_{La} ($\sim 100 \text{ h}^{-1}$).
- Avaliar a influência da fonte de carbono (glicose e glicerol) na conservação do inóculo.
- Analisar, com auxílio de planejamento experimental, a influência das variáveis (temperatura, concentração de indutor e tempo de indução), na expressão do fragmento de anticorpo scFv por *P. pastoris*.
- Analisar o efeito que tem diferentes fontes de carbono na produção do scFv
- Analisar o efeito que tem diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção do scFv
- Estudar a influência de diferentes condições de agitação e aeração, expressa pelo coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La} de ~ 10 a $\sim 100 \text{ h}^{-1}$), na produção do anticorpo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

O estoque primário das linhagens modificadas geneticamente de *P. pastoris* (A) SMD 1168, foi fornecido pelo grupo de pesquisa da Profa. Dulcineia Saes Parra Abdalla, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP. Os reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La)

A determinação do produto entre o coeficiente global de transporte de massa relativo à fase líquida, k_L , e a área de interface gás/líquido por unidade de volume do líquido. A determinação foi feita pelo método que consiste, primeiramente, na eliminação, com nitrogênio, do oxigênio dissolvido no meio de cultura. Após alguns minutos, liga-se a aeração (ar) no biorreator e anotam-se os valores crescentes da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo (PIRT, 1975). Considerando-se a concentração de saturação de oxigênio dissolvido, c^* , e da concentração de oxigênio dissolvido, c , o referido valor k_La é dado pela equação, de onde $\ln C_s$ é uma constante:

$$\ln(c^*-c) = -k_La \cdot t + \ln C_s \quad (\text{Equação 1})$$

3.2.2 Armazenamento e reativação das células

As linhagens modificadas geneticamente de *P. pastoris* foram cultivadas em meio sólido YPD (extrato de levedura 1,0% (m/v), peptona de caseína 2,0% (m/v), glicose 2,0% (m/v), 100 mL de água q.s.p, ágar 2,0% (m/v)) a 30 °C por 48h. Após esse período, foram realizados dois estoques de células. No

primeiro, uma colônia foi retirada da placa e inoculada em Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 200 mL de meio líquido YPD nas condições de 250 rpm a 30°C por 48h. No segundo, outra colônia foi inoculada em meio de cultura BMGY, composto de: extrato de levedura 1% (m/v), peptona de caseína 2% (m/v), tampão fosfato pH 6,0 100mM, YNB com adição de 10% (m/v) de sulfato de amônio 1,34%, biotina 4×10^{-5} % (m/v), glicerol 1%, casaminoácidos 2% e água q.s.p 100 mL nas mesmas condições. As células foram aliquotadas e armazenadas em 20% (v/v) de glicerol em ultra-freezer a -70°C. A produção final foi de 50 unidades com um volume final de 2 mL. Para etapa de reativação, Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 200 mL de meio de crescimento BMGY (*Buffered Glycerol Complex Medium*) foi inoculado com 1 mL de cada estoque congelado descrito acima em 250 rpm a 30 °C por 16h.

3.2.2.2.1. Composição dos meios de cultivo utilizados

Tabela 1: Composição do meio de cultivo Meio de cultivo caldo BMGY

Componentes	Quantidades
Extrato de levedura*	1%
Peptona de Caseína*	2%
Tampão Fosfato pH 6,0*	100mM
YNB com adição de 10% (p/v) de sulfato de amônio	1,34%
Biotina	4×10^{-5}
Glicerol*	1%
Casaminoácidos	2%
Água q.s.p	100 mL

* Todas essas soluções foram autoclavadas a 120°C por 20 minutos.

Todas essas soluções foram filtradas em filtro com diâmetro de poro igual a 0,22 µm

O meio de cultivo foi modificado para diferentes ensaios. Com o intuito de não modificar a relação carbono-nitrogênio do meio de cultivo padrão BMGY, foram realizados análises químicos para as fontes de carbono a serem estudadas. Uma vez que foram analisados os substratos e conhecia-se a

composição química, foram feitos os cálculos para manter essa relação com os diferentes substratos alternativos.

No estudo de troca de fontes alternativas de carbono e nitrogênio em *shaker* (200 mL) o casaminoácidos e a peptona de caseína foram substituídos pelos farelos de arroz e trigo, neste experimento foi calculada a concentração de carbono total no meio e a concentração de carbono nas fontes trocadas. Para manter essas condições no meio de cultivo alternativo e foi adicionada a mesma quantidade de carbono e o nitrogênio, além disso foi acrescentada a fonte de nitrogênio com sulfato de amônio, assim:

1. Quando trocaram-se o casaminoácidos pelo farelo de trigo, foram adicionados ao meio 2,99g de farelo de trigo e 3,63g de sulfato de amônio total.
2. Quando foram trocados os casaminoácidos pelo farelo de arroz, foram adicionados 3,17g de farelo de arroz e 3,58g de sulfato de amônio total.
3. Quando trocou-se a peptona de caseína pelo farelo de trigo, foram adicionados 4,25g de farelo de trigo e 4,57g de sulfato de amônio total.
4. Quando trocou-se a peptona de caseína pelo farelo de arroz, foram adicionados ao meio 4,00g de farelo de arroz e 4,53g de sulfato de amônio total.

No estudo que testou várias fontes de carbono alternativas (glicose, sacarose, glicerol e glicose/sacarose 50%), o meio de cultivo foi modificado mantendo a mesma concentração de carbono no meio quando comparado com o meio padrão contendo glicerol como fonte de carbono da seguinte forma:

1. Ao trocar o glicerol pela sacarose, foi adicionado ao meio 1,86g de sacarose.
2. Quando o glicerol foi trocado pela mistura de glicose com a sacarose, foi adicionado ao meio 0,98g de glicose e 0,93g de sacarose.
3. Quando o glicerol foi trocado pela glicose, foi adicionado 1,96g de glicose ao meio de cultivo.

3.2.3 Elaboração dos estoques de *P. pastoris* utilizando duas fontes de carbono diferentes: glicerol (B1) e glicose (B2)

Uma amostra da levedura *P.pastoris* criopreservada em glicerol 20%, (v/v) em ultra-freezer a -70°C do estoque primário (A), descrito no item 3.2.2, foi selecionada aleatoriamente. Após a seleção, foi feita uma reativação da levedura em meio líquido BMGY, por 60 horas a 250 rpm e 30°C em Erlenmeyers de 500 mL com 200 mL de volume final. Diluições seriadas de ordem 10, desse cultivo, foram feitas utilizando água peptonada a 0,1% (m/v) e distribuídas em 20 placas de Petri contendo o meio YPD. Foram colocados 15 mL de meio em cada placa. As placas foram incubadas por 48 h a 30°C. Após esse período, as colônias foram analisadas quanto às características macroscópicas e microscópicas, inclusive através da coloração de Gram. (Apêndice C: diagrama de fluxo para reativar a levedura *P. pastoris*).

Após as etapas de isolamento e purificação, uma colônia sem contaminação foi misturada em 200 mL de meio BMGY, em um Erlenmeyer de capacidade 500 mL, e cultivada por 48h a 30°C. Uma segunda colônia foi misturada em meio BMGY nas mesmas condições de tempo e agitação, porém, neste caso, a fonte de carbono glicerol foi substituída por glicose. Após esse tempo, amostras de ambos os cultivos foram retiradas e centrifugadas a 1253 xg por 20 minutos. Os *pellets* foram separados da fase líquida, resuspendidos em água para que fosse realizada a medida de absorbância em espectrofotômetro a 600 nm.

Esses novos estoques foram nomeados de estoques secundários (B2) glicose e (B1) glicerol, respectivamente. Para cada um dos cultivos foram preparados 50 tubos de 2 mL e estocados a -70°C em glicerol 20% (v/v). Além disso, outra amostra de cada cultivo retirada na última hora do cultivo e imediatamente antes da estocagem foi utilizada para fazer cultivos em placa para conhecer a concentração celular em UFC. Essa etapa foi feita da seguinte forma: diluições seriadas de ordem 10 em água peptonada 0,1% (m/v) das colônias, de ambos os estoques, foram realizadas e inoculadas em placas. Estas placas foram cultivadas por 2 dias a 30°C e, após esse tempo, realizou-se a contagem das colônias para os dois estoques.

3.2.4. Preparação do inóculo de *P. pastoris* em *shaker* e em biorreator (fase de crescimento)

Para a etapa de preparo de inóculo em *shaker*, 10% do volume de reativação (20 mL) foram transferidos para 200 mL de meio de cultivo BMGY, em frascos *Erlenmeyers* de 500 mL e incubados por 16h, 250 rpm a 30 °C. Para o crescimento em biorreator, verteu-se o inóculo (200 mL), assepticamente, em uma dorna de 3L de um fermentador de bancada (*Bioflo 110, New Brunswick Scientific Co.*) contendo 1,8L de meio de cultura BMGY. Durante essa fase de crescimento, amostras foram retiradas e centrifugadas (1253 xg por 20 min) a cada 6h para quantificação da biomassa, do substrato (glicerol) e da produção de etanol.

3.2.5. Fase de crescimento e indução em *shaker* análise estatística 2³

Após a etapa de preparo do inóculo (item 2.2.4) se iniciou a fase de crescimento celular (24h, 28h, 32h). A temperatura nesta etapa foi ajustada para 30 °C a agitação foi de 250 rpm. A fase de produção do fragmento de anticorpo foi feita após as fases de crescimento e a concentração de indutor adicionado ao meio de cultivo foi estudada em diferentes níveis. Para isto, adicionaram-se 0,5% (v/v), 1% (v/v) e 1,5% (v/v) de metanol ao meio de cultivo para induzir a produção do fragmento de anticorpo. A temperatura na fase de indução para a produção do fragmento de anticorpo foi estudada em 10 °C, 20 °C, 30 °C. Essa fase de indução foi realizada em três etapas, sendo elas após 24, 28h e 32h e a cada 24 horas após esses tempos até finalizar o tempo total de cultivo de 96h. A cada 12h foram retiradas e centrifugadas (1957 xg por 30 min) amostras para quantificar o substrato (glicerol), da biomassa e da produção da proteína scFv. Para inibir a ação de proteases adicionou-se também 1mM de PMSF (*phenylmethanesulfonylfluoride*).

3.2.6 Expressão do fragmento scFv do anticorpo em biorreator (fase de indução) de 3 litros

A agitação e a vazão específica de ar foram de 600 rpm e 1,8 vvm, respectivamente, o que correspondeu ao valor do k_La de $96,12 \text{ h}^{-1}$. O pH do meio, durante o cultivo aeróbio, e o oxigênio dissolvido foram medidos por eletrodos (*Ingold, Woburn, MA, EUA*). Antes da adição do inóculo ao fermentador, a agitação, vazão de ar e temperatura foram ajustadas a 30°C . As demais variáveis foram feitas de maneira similar ao item anterior (2.2.5).

3.2.7 Estudo da influência das variáveis de temperatura, concentração de indutor e tempo de indução na expressão do fragmento scFv do anticorpo utilizando planejamento fatorial completo

Na etapa de expressão do fragmento scFv do anticorpo, foi realizado um planejamento estatístico completo 2^3 com o objetivo de investigar a influência de três variáveis independentes: temperatura; concentração do indutor (metanol); e tempo de indução (Tabela 2 e 4). Um modelo de regressão linear foi proposto para prever a resposta:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i < j}^n b_{ij} x_i x_j \quad (\text{Equação 2})$$

Em que b_0 é o coeficiente de interceptação, b_i são os coeficientes lineares, b_{ij} são os coeficientes de interação e x_i e x_j são os valores codificados das variáveis independentes.

A validação do modelo foi obtida através do coeficiente de determinação (R^2), da análise de variância (ANOVA) e do teste de Fischer. Esses planejamentos foram acrescidos de 4 repetições, no ponto central, para possibilitar o cálculo do erro experimental. Após a realização dos experimentos

foi realizada a análise estatística dos resultados, com o auxílio do software *Statistica* 6.0 (STATSOFT, 2004).

Tabela 2- Níveis dos fatores utilizados no planejamento estatístico completo 2^3 empregado para estudar a influência das variáveis temperatura, concentração do indutor e tempo de indução na expressão do fragmento scFv do anticorpo.

Níveis	Inferior	Central	Superior
	(-1)	(0)	(+1)
Valores codificados			
Temperatura (C°)	10	20	30
Concentração do indutor (%) v/v	0,5	1,0	3,0
Tempo de indução (h)	24	28	32

3.2.8 Relação entre fragmento de anticorpo e biomassa ($Y_{P/X}$)

A relação entre a concentração do fragmento de anticorpo excretado a o meio de cultivo e a concentração da biomassa final foi definida da seguinte forma:

$$Y_{P/X} = (P_f - P_i) / (X_f - X_i) \quad (\text{mgL}^{-1} \text{gL}^{-1}) \quad (\text{Equação 3})$$

Onde P_f representa a concentração de fragmento de anticorpo no tempo final de cultivo, X_f representa a concentração de biomassa no tempo final final de cultivo. P_i representa a concentração do fragmento de anticorpo no tempo inicial do cultivo, X_i representa a concentração de biomassa no tempo inicial do cultivo (MIRANDA, 2005).

3.2.9 Produtividade global do fragmento de anticorpo scFv (P_P)

A produtividade global do fragmento de anticorpo foi definida assim:

$$P_P = (P_f - P_i)/(t_f) \quad (\text{mgL}^{-1}\text{h}^{-1}) \quad (\text{Equação 4})$$

Onde P_f representa a concentração de fragmento de anticorpo no tempo final de cultivo, P_i representa a concentração do fragmento de anticorpo no tempo inicial do cultivo, e t_f representa o tempo final de cultivo, quando o processo foi interrompido (MIRANDA, 2005).

3.2.10 Produtividade global da biomassa (P_x)

A produtividade global da biomassa foi definida assim:

$$P_x = (X_f - X_i)/(t_f) \quad (\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}) \quad (\text{Equação 5})$$

Onde X_f representa a concentração de biomassa no tempo final de cultivo, X_i representa a concentração de biomassa no tempo inicial do cultivo, e t_f representa o tempo final de cultivo, quando o processo foi interrompido (MIRANDA, 2005).

3.2.11 Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular.

A determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular foi determinada assim:

$$\ln\left(\frac{Cx}{Cx0}\right) = \mu_{\max} * t \quad (\text{Equação 6})$$

A velocidade específica de crescimento celular obtida considerando a fase exponencial de crescimento, quando $\mu = \mu_{\max}$. Determina-se o valor da velocidade específica máxima de crescimento pelo rearranjo da equação do balanço de massa em reator batelada, conforme Baile e Olis (1986).

Na fase exponencial, a equação 6 torna a curva de crescimento linear, e o valor de $\mu_{\max}$ pode ser obtido pelo método dos mínimos quadrados linear.

3.2.12 Determinação do tempo de geração

O tempo de geração foi definido da seguinte forma:

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad (\text{Equação 7})$$

Onde t_d é o tempo de duplicação, e μ é a velocidade máxima de crescimento (POSTEN; COONEY, 1993).

3.3 Determinações analíticas

3.3.1 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi obtida mediante uma curva de calibração que correlaciona densidade ótica (DO) com massa seca de células. Para a elaboração desta curva, células provenientes do cultivo do inóculo (item 3.2.4) foram centrifugadas a 1253 xg por 20 min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas pelo menos 2 vezes com água destilada (homogeneizou-se e centrifugou-se a 1957 xg por 30 min / T_{ambiente}). Em seguida, as células foram misturadas para 100 mL em água destilada, de forma a se obter uma suspensão homogênea densa (suspensão original), que foi utilizada para preparar suspensões com diversas diluições. As suspensões diluídas foram submetidas à leitura de absorbância em espectrofotômetro (Beckman DU 640 e Hitachi U1800) a 600nm, utilizando-se água destilada como branco. A massa seca foi determinada a partir da suspensão original (volume restante) após secagem de alíquotas de 5,0 mL (em estufa a 105°C por 24h), em cadinhos previamente tarados (deixou-se por 1h em estufa a 100°C, mais 1h em dessecador, pesou-se e então, anotaram-se as massas). Após as 24h em estufa, levaram-se os cadinhos contendo a massa-seca de células ao dessecador por um período de 1h. Realizou-se, em seguida, a pesagem dos mesmos e anotaram-se as massas obtidas (CORTEZ; CONCEIÇÃO, 2009).

3.3.2 Determinação da concentração de etanol

A concentração de etanol foi determinada por uma adaptação do método do dicromato através da titulação com solução de sulfato ferroso amoniacal, utilizando ortofenantrolina como indicador. Fez-se uma prova do branco utilizando água destilada ao invés do destilado, para determinar o poder redutor do sulfato ferroso amoniacal. A concentração de etanol na amostra foi obtida pela expressão (JOSLYN, 1970):

$$E(g/L) = 11,5. V_d. N_d. \left(1 - \frac{V_a}{V_b}\right) \quad (\text{Equação 8})$$

Em que: V_b = volume da solução de sulfato ferroso amoniacal (mL) utilizado para titular o volume V_d de normalidade N_d .

11,5= equivalente grama de etanol na reação com $K_2Cr_2O_7$.

V_d = volume de dicromato (mL) utilizado para recebimento do etanol destilado.

N_d = normalidade do dicromato.

V_a = volume da solução de sulfato ferroso amoniacal utilizado para titular o dicromato não reagido com a amostra (mL).

3.3.3 Determinação da concentração de glicerol

A concentração de glicerol, ao longo do processo fermentativo, foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Bok e Demain (1977). Esse método é baseado na oxidação do glicerol pelos íons periodato, produzindo formaldeído que ao reagir com reagente de Nash (acetil acetona, acetato de amônio e ácido acético glacial) forma como produto a 3,5 diacetil 1,4 dihidrolutidina de coloração amarelada com leitura de absorbância a 412nm. A curva de calibração foi determinada com glicerol de grau analítico de concentração 10-100 mg/L (BOK; DEMAINE, 1997).

3.3.4 Purificação dos fragmentos scFv

O meio de cultivo foi centrifugado 1957 xg por 30 min, à temperatura de 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado por membranas de 0,8 µm, 0,45 µm e 0,22 µm (etapa de clarificação). Após o processo de clarificação, iniciou-se o processo de concentração que foi realizado com filtros de 10 kD até obter um produto concentrado com volume final de 10% do volume inicial. Após o processo de concentração, foi feita a purificação por cromatografia de afinidade em coluna *Sepharose 6 Fast Flow* (Amersham). A coluna foi previamente ativada com lavagens alternadas de PBS, etanol 20%, água destilada e solução

de PBST (PBS e Tween 20, 0,1% (v/v)). Após essa etapa, 20 mL do meio concentrado foram postos em contato com a resina durante 1h 4°C. Assim que os fragmentos scFv que foram adsorvidos na coluna foram eluídos com 500mM de imidazol e a coluna foi equilibrada com PBS. As proteínas purificadas foram dialisadas contra imidazol e concentradas com filtros de 10kd e quantificadas pelos métodos de BCA e/ou *Lowry*. (1951). (Ver diagrama de fluxo apêndice C purificação do fragmento de anticorpo scfv anti LDL-ox).

3.4 Esquema de todos os experimentos realizados no projeto

O projeto iniciou com a produção do fragmento de anticorpo scFv com um meio de cultivo padrão e um protocolo de purificação inicial que foram descritos anteriormente nos materiais e métodos, e são representados com os números 1 e 2 quadros azuis da figura 1.2.

O primeiro ensaio a ser realizado foi o estudo de criopreservação (item 4.2.5), sendo que no primeiro estoque de trabalho denominado de estoque A, foram apresentados cultivos com variabilidade no crescimento e contaminações recorrentes. Para dar solução, foram preparados dos estoques novos de trabalho em glicose e glicerol que foram descritos neste trabalho como estoques de trabalho glicerol B1 e Glicose B2. Este estudo é representado com o número três (3) da figura 1.2. Neste estudo foi avaliada a melhor fonte de carbono para o crescimento e a estocagem da levedura *P. pastoris* (4.2.5).

Seguido a o estudo de criopreservação, foi realizado um estudo de produção do fragmento de anticorpo scFv, com auxílio de planejamento experimental estatístico 2^3 para *shaker* (item 4.9) e biorreator (item 6.1) que é representado com o número 4 na figura 1.2. Neste estudo foram avaliadas as variáveis de temperatura, concentração de indutor e tempo de indução. Estes estudos foram realizados após serem verificadas algumas variáveis, como que o estoque de trabalho não apresentara contaminação ou variabilidade no crescimento, ou no caso do biorreator era necessário manter fixa a temperatura de produção.

O terceiro estudo foi o efeito que tem diferentes fontes de carbono na produção do fragmento de anticorpo scFv, este estudo é representado com o número 5 na figura 1.2. As fontes de carbono estudadas foram a glicose, o glicerol, a sacarose, e a mistura 50% de glicose e sacarose. Deste estudo se derivaram dois estudos a mais, o primeiro estudo foi o tamanho que apresentava a levedura assim que era cultivada em diferentes fontes de carbono, este estudo é representado pelo número 6 na figura 1.2, e o segundo estudo foi respeito ao protocolo inicial de purificação representado com o número 7 na figura 1.2.

O quarto estudo foi o efeito que tem fontes alternativas de nitrogênio e carbono como farelo de trigo e farelo de arroz em troca da peptona de caseína e o casaminoácidos, este estudo é representado com o número 8 na figura 1.2.

Para finalizar, foi realizado um estudo para avaliar o efeito que tem diferentes condições de k_La na produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox, as condições avaliadas foram: $96,12 \text{ h}^{-1}$, $53,28 \text{ h}^{-1}$ e $12,24 \text{ h}^{-1}$. Este estudo é representado com o número 9 na figura 1.2,

Figura 1.2 – Esquema de todos os experimentos realizados para a produção do fragmento de anticorpo scFv por *P. pastoris* geneticamente modificada

4 Resultados e discussões dos estudos de crescimento, criopreservação e planejamento estatístico em *shaker*.

4.1 Estudo de crescimento

4.2 Estudos iniciais de crescimento do estoque primário de *P. pastoris* geneticamente modificada realizados em agitador orbital e biorreator

4.2.1 Cultivos em *shaker* sem indução

4.2.1.1 Cultivo em *shaker* (Estoque A)

Foram estudados dois cultivos da levedura *P. pastoris* em *shaker*, a partir do primeiro estoque de células crio-preservadas sem a indução por metanol, pois o objetivo neste momento foi avaliar apenas o crescimento celular. Os ensaios foram realizados com 200 mL de meio BMGY, nas condições de 30°C, 250 rpm e 168 h. A partir dos resultados dos dois cultivos foram calculadas as médias dos valores da biomassa em diferentes tempos de cultivo (Apêndice A: Tabela 3).

Figura 4.1 - Primeiro cultivo da levedura *P. pastoris* em *shaker* utilizando o estoque primário. O ensaio foi realizado em duplicata e cada amostra foi analisada em triplicata para a determinação da biomassa total. O cultivo cresceu durante 168 horas a 30 °C sob 250 rpm.

Observa-se, na Figura 4.1, que com 168 horas de cultivo atingiu-se valor de biomassa de aproximadamente 9 g/L. A fase de adaptação ocorreu nas primeiras 12 horas de cultivo.

4.2.1.2 Primeiro cultivo em fermentador sem indução (Estoque A)

O primeiro cultivo da levedura *P. Pastoris*, geneticamente modificada, foi realizado em biorreator de 3L com volume final de 2L (Figura 4.2). A amostragem foi feita durante toda a fermentação com intervalos de 6 horas e o cultivo foi feito a 30°C, k_La de 96,12 h⁻¹. Os resultados do primeiro ensaio de crescimento em biorreator estão expostos na Tabela 2, do apêndice A.

Figura 4.2 - Primeiro cultivo da levedura *P. pastoris* em biorreator. As variáveis analisadas foram: ◆ Biomassa, ■ Glicerol, ● Oxigênio, ▲ Etanol. * pH. O cultivo se realizou por 98 horas a 30°C, k_La de 96,12 h⁻¹, 0,5 mL de antiespumante e sem indução por metanol.

As análises foram feitas em triplicata. O cultivo da levedura *P. pastoris* foi realizado durante 98h. O inóculo foi preparado em 200 mL de meio BMGY, e este foi adicionado no fermentador após às 16 horas de cultivo do preinóculo. A relação de agitação e aeração segundo o ensaio do k_La é 96,12 h⁻¹. O pH foi acompanhado durante todo o cultivo, registrando-se variações de 5,59 a 6,59. A concentração mais alta de biomassa (29,7 g/L) foi obtida com 42 horas de

cultivo. A fase de adaptação aconteceu durante as primeiras 6 horas de cultivo (apêndice A - Tabela 2).

4.2.2 Comparação entre o primeiro cultivo em *shaker* e biorreator (Estoque A)

Após os dois ensaios, descritos anteriormente conseguiu-se obter, simultaneamente, o crescimento em biorreator e em *shaker* da levedura *P. pastoris*, observando-se maior biomassa do cultivo em biorreator. Nos ensaios feitos em *shaker*, encontrou-se uma concentração final da biomassa de 9 g/L. No caso do biorreator, o valor foi quase três vezes superior ao *shaker*, com valor de 26 g/L. (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Comparação entre a formação de biomassa dos primeiros cultivos em *shaker* e do cultivo realizado no biorreator, ■ Biomassa do primeiro crescimento a 30°C da levedura *P. pastoris* em biorreator com 1800 mL de meio BMGY. ♦ Curva de crescimento da levedura *Pichia pastoris* em *shaker*. O ensaio foi realizado em duplicata e cada amostra foi analisada em triplicata para biomassa total.

A Figura 4.3 retrata a diferença do crescimento no biorreator comparado ao *shaker*. Quanto ao crescimento em *shaker* pode-se observar uma fase de adaptação de 12 horas, diferente do cultivo em biorreator que mostra perfil de crescimento exponencial a partir da hora 6. O cultivo cresceu durante 100 horas a 30°C sob 250 rpm para *shaker* e 600 rpm para biorreator. O glicerol foi a fonte de carbono e os inóculos para ambos ensaios foram cultivados em glicose e estocados em 20% (v/v) de glicerol.

4.2.3 Segundo cultivo em *shaker* (Estoque A)

Fez-se um novo crescimento de *P. pastoris* em *shaker* (Figura 4.4). O cultivo foi conduzido por 98 horas. A quantidade de inóculo foi de 1 mL de cultivo crio preservado, para cada 1000 mL de meio de cultivo final. Este ensaio foi feito com o primeiro estoque de trabalho (A) da levedura *P. pastoris*. Preparou-se um inóculo de 20 mL, que cresceu por 16 horas. Neste ensaio, se mediu a concentração de etanol produzido pela levedura, sendo a concentração máxima de etanol encontrada 1,2 g/L.

Figura 4.4 - Segundo cultivo da levedura *P. pastoris* em *shaker* utilizando o estoque primário variáveis: ◆ Biomassa, ■ Glicerol, ▲ Etanol. Todas as análises foram realizadas em triplicata e o cultivo cresceu durante 78 horas a 30°C sob 250 rpm. (ver dados na Tabela 5 do apêndice A).

Como se pode observar na Figura 4.4, o segundo crescimento da levedura *P.pastoris* mostrou máximo de biomassa após 78 horas de cultivo com 6,7 g/L. O glicerol foi totalmente consumido após 48 horas de cultivo, ou seja, no começo da fase estacionária. A concentração mais alta de etanol foi encontrada no período de 36 a 48 horas, com 1,2 g/L, estando próximo aos últimos pontos da fase exponencial. O primeiro cultivo mostrou um máximo de biomassa igual a 9,0 g/L, assim, a concentração celular neste segundo cultivo foi menor que o primeiro crescimento em *shaker* com 6,7 g/L (Figura 4.1). No

entanto, estes dois primeiros ensaios não apresentaram alta produção de biomassa. (apêndice A - Tabela 3).

4.2.3.1. Segundo cultivo em biorreator sem indução (Estoque A)

De acordo com os dados dos dois primeiros ensaios, a produção da biomassa foi maior em biorreator. No primeiro ensaio a biomassa foi quase três vezes maior, contudo, no segundo ensaio em *shaker* (Figura 4.4) pode-se verificar que o crescimento da *P. pastoris* alcançou o valor de 6,7 g/L, enquanto que no segundo cultivo em biorreator (figura 4.5) verificou-se uma concentração de 22,9 g/L. (Apêndice A - Tabela 38).

Figura 4.5. Segundo cultivo da levedura *P. pastoris* em biorreator. As variáveis do ensaio foram: ◆ Biomassa, ■ Glicerol, ● Oxigênio, ▲ Etanol. * pH; O cultivo se realizou durante 98 horas, com 30°C, $k_L a$ de 96,12 h^{-1} , 0,5 mL de antiespumante e sem indução por metanol.

O segundo cultivo da levedura *P.pastoris* em biorreator mostrou um máximo de biomassa após 98 horas de cultivo com 22,9 g/L. O glicerol foi totalmente consumido após 24 horas de cultivo, a concentração mais alta de etanol foi registrada após 36 horas de cultivo com 1,8 g/L, um dos últimos pontos da fase exponencial (Figura 4.5). A biomassa apresentada foi um pouco menor que a biomassa apresentada no primeiro crescimento em biorreator, em que a concentração mais alta de biomassa foi de 29,7 g/L (Figura 4.2). Ainda

assim, a produção de biomassa para os dois primeiros ensaios (29,7 g/L para o primeiro e 22,9 g/L para o segundo) foi considerada baixa, já que tem-se visto que a levedura *P. pastoris* consegue atingir concentrações celulares de até 150 g/L em cultivos descontínuos com o glicerol como fonte de carbono, e de até 400 g/L em sistemas contínuos de produção (HELLWING, et. al, 2000; GELLINSEN, et. al, 2005). (Ver apêndice A - Tabela 38).

4.2.3.2. Comparação do segundo cultivo em *shaker* com o segundo cultivo em biorreator (estoque A)

Após a realização dos ensaios iniciais, comparou-se o crescimento de *P. pastoris* em *shaker* e em biorreator. Nos segundos ensaios, os cultivos cresceram por 76 horas. Em *shaker*, a concentração mais alta de crescimento de biomassa foi após 48 horas (Figura 4.6). O substrato foi consumido após 48 horas (glicerol - Figura 4.8). Também se obteve a concentração mais alta de etanol (g/L), após 48 horas de cultivo (Figura 4.7). O ensaio foi realizado em duplicata e a média dos dados foi obtida. A determinação do glicerol foi analisada em triplicata. O cultivo em biorreator, após 28 horas do crescimento, mostrou concentração mais alta de biomassa, com quase 3 vezes da concentração obtida em *Shaker* (22,4 g/L e 6,7 g/L). O glicerol foi consumido após 24 horas, sendo o cultivo mantido sob as seguintes condições 1,8 vvm, 600 rpm com temperatura constante de 30°C para os dois ensaios. Preparou-se um inóculo com 200 mL do volume final que foi cultivado por 16 horas antes de começar o crescimento em biorreator (segundo o item 2.2.6 dos materiais e métodos); a concentração mais alta de etanol foi de 1 g/L. Comparando-se os dados de etanol, a concentração mais alta obtida nos ensaios foi de, aproximadamente 1,25 g/L para o ensaio feito em *shaker* e de 1,05 g/L para o ensaio feito em biorreator. Entretanto a diferença da biomassa é maior em biorreator. Levando-se em conta esta diferença entre as biomassas de cada ensaio, a produção de etanol g/L em relação à biomassa g/L é maior em *shaker* visto que há maior produção de etanol com menos biomassa provavelmente em função da menor eficiência de oxigênio.

Figura 4.6 - Comparação entre a formação de biomassa do segundo cultivo em *shaker* e do segundo cultivo realizado no biorreator: ■ *Shaker* e ◆ Biorreator. As análises foram realizadas em triplicata a 600nm e o cultivo cresceu durante 98 horas a 30°C sob 250 rpm.

Figura 4.7 - Comparação entre a produção de etanol do segundo cultivo em *shaker* e do segundo cultivo realizado no biorreator: ■ *Shaker* e ◆ Biorreator. As análises foram feitas em triplicata e o cultivo cresceu durante 98 horas a 30°C sob 250 rpm.

Figura 4.8 - Comparação entre o consumo de glicerol do segundo cultivo em *shaker* e do segundo cultivo realizado no biorreator. O consumo de glicerol foi mais rápido em ◆ biorreator finalizado em 24 horas, diferente do crescimento em ■ *Shaker*, que mostrou um consumo total do glicerol ao final de 38 horas. Os resultados são inversamente proporcionais ao crescimento da biomassa. O cultivo cresceu durante 98 horas a 30°C sob 250 rpm.

4.2.4 Contaminação e variabilidade do estoque primário (A) da levedura *P. pastoris* geneticamente modificada

Após a conclusão destes ensaios em *shaker* e em biorreator, os cultivos apresentaram variabilidade com respeito a seu crescimento. Em função disto, foram feitos vários cultivos. Entretanto, estes apresentaram contaminação por bactérias e, em alguns casos, não apresentaram crescimento da levedura. Neste ponto, fez-se um acompanhamento para a realização do cultivo. Observou-se que, em placas semeadas com tempo entre 3 e 5 dias a 30°C em meio YPD, o crescimento do estoque primário de células (A) apresentou colônias atípicas macroscopicamente. Macroscopicamente (Figura 4.9) e microscopicamente (Figura 4.10) notou-se micro-organismo interferente

Observando as contaminações dos cultivos, foram realizados dois novos estoques de trabalho glicerol B1 e glicose B2 (item 3.2.3; Apêndice C - diagramas de fluxo “reativação da levedura *P. pastoris*” e “produção dos estoques novos de trabalho”), os quais não apresentaram contaminação na prova de pureza (Apêndice B - Figuras 3 e 4). A quinta indução feita em biorreator, no mesmo espaço de tempo, também apresentou o mesmo tipo de contaminação (item 4.2.5).

Figura 4.9 - Contaminação e variabilidade do estoque primário de trabalho, nesta figura a levedura *P. pastoris* geneticamente modificada cultivada em meio YPD. Contaminação observada nos cultivos. (A) colônias atípicas e (B) colônias típicas da levedura *P. pastoris*. Nota-se a baixa produção celular da levedura.

Figura 4.10 - Contaminação e variabilidade do estoque primário de trabalho, microscopia da levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. Contaminação observada nos cultivos. (A) micro-organismos leveduriformes e (B) micro-organismos com morfologia bacilar. A fermentação foi interrompida com 52 horas. Células coloradas pela metodologia da coloração de Gram. O estudo de microscopia foi realizado com o equipamento olympus BX60 com o aumento 100x.

4.2.5 Estudo de criopreservação

4.2.5.1 Cultivo com utilização de novos estoques de *P. pastoris* utilizando glicerol (B1) e glicose (B2) como fontes de carbono

Nesta etapa do estudo foram preparados dois estoques de levedura, aqui mencionados como estoque (B1) glicerol e (B2) glicose. Estes estoques foram feitos segundo o estabelecido na metodologia apresentada no item 3.2.2. e são explicados com gráficos no apêndice C. Para comparar o crescimento da levedura *P. pastoris* com os novos estoques de trabalho de (B1) glicerol e (B2) glicose foram planejados cultivos em *shaker*, realizados em duas novas curvas de calibração da biomassa pela metodologia de peso seco (item 3.3.1) com os novos estoques da levedura (B1) glicerol e (B2) glicose (Apêndice B - figuras 7 e 8).

Figura 4.11 - Primeiro cultivo em *shaker* do novo estoque de trabalho glicerol (B1) da levedura *P. pastoris* produtora de anticorpo scFv. As condições de crescimento foram: 30°C, 250 rpm, 72 horas, (Tabela 6 do apêndice A).

Figura 4.12 - Primeiro cultivo em *shaker* do novo estoque de trabalho glicose (B2) da levedura *P. pastoris* produtora de anticorpo scFv. As condições do cultivo foram: 30°C, 250 rpm, 72 horas, (Apêndice A - Tabela 7).

Estes resultados (Figuras 4.11 e 4.12) mostram como o estoque de trabalho glicerol (B1) e glicose (B2) proporcionaram um crescimento da biomassa maior, quando comparados com o estoque primário de células. O estoque B1 teve sua fase de adaptação menor (6 horas) que o estoque B2 (12 horas) (visualizar os diagramas de fluxo “reativação da levedura *P. pastoris*” e “produção dos novos estoques” no apêndice B).

4.2.5.1.1 Segundo Cultivo com utilização dos segundos estoques (B) de *P. pastoris*.

Figura 4.13- Segundo cultivo em *shaker* do estoque (B2) da levedura *P. pastoris* produtora de anticorpo scFv. As condições do cultivo foram: 30°C, 250 rpm, 72 horas. ▲ Etanol, ■ Glicerol, ◆ Biomassa ⬆ Fase estacionária, (Tabela 11 do apêndice A).

Figura 4.14 - Segundo cultivo em *shaker* do estoque (B1) da levedura *P. pastoris* produtora de anticorpo scFv. As condições do cultivo foram: 30°C, 250 rpm, 72 horas. ▲ Etanol, ■ Glicerol, ◆ Biomassa, ⬆ Fase estacionária, (Tabela 10 do apêndice A).

Como se observam nas Figuras 4.11 e 4.12, os novos estoques de trabalho apresentaram produção maior de biomassa que o primeiro estoque com 9 g/L. Com base nessas Figuras pode-se verificar que o estoque de glicose (4.12) tem fase de adaptação maior que o estoque de glicerol (4.11). Estes resultados são promissores para que futuramente possam ser escalonados, já que com o estoque de glicerol se obtém maior biomassa em um tempo menor.

Os dados das Figuras 4.11 e 4.12 mostram o comportamento dos primeiros ensaios de crescimento com os novos estoques (B1 e B2) de trabalho. As Figuras 4.13 e 4.14 mostraram o comportamento dos mesmos estoques de trabalho em um segundo estudo de crescimento com a finalidade de observar a variabilidade dos nossos novos estoques. Pode-se observar que o estoque de glicerol (B1), em um primeiro ensaio com 19,3 g/L, mostrou crescimento maior que o estoque de glicose (B2) com 9,2 g/L. Os segundos ensaios mostraram comportamento similar aos dados dos primeiros crescimentos, nos quais o estoque B1 apresentou 25g/L e o estoque B2 19 g/L. Os primeiros crescimentos foram feitos com os dados da primeira curva padrão que foi desenvolvida com o estoque primário (A) de trabalho. Por outro lado, os resultados obtidos com os dados da segunda curva padrão que foram realizados com o estoque (B) de trabalho demonstraram um crescimento maior que o primeiro (A). O estoque B1 apresentou, nos dois ensaios, maior produção de biomassa.

Os dados da Figura 4.15 mostram o comportamento dos primeiros ensaios de crescimento da biomassa em comparação ao segundo estudo (Figuras 4.13 e 4.14). Segundo os resultados, os valores de biomassa, no segundo ensaio, foram maiores que no primeiro. Esta diferença pode ser explicada pela utilização de duas curvas padrão diferentes, ou seja, no primeiro estudo, os resultados foram calculados baseados na curva padrão realizada para os ensaios iniciais do Projeto, isto é, com o estoque primário (Apêndice B - figura 5), enquanto que para o segundo ensaio, a curva padrão usada foi desenvolvida com o estoque secundário (Apêndice B - figura 6 e 7) glicerol (B1) e glicose (B2).

Figura 4.15 - Produção da biomassa dos estoques de glicerol (B1) e glicose (B2). ▲ Primeiro crescimento glicerol; ■ Segundo crescimento glicose; × Primeiro crescimento glicose; ◆ Segundo crescimento glicerol (Tabela 25 do apêndice A).

Os resultados apresentados até aqui têm como finalidade mostrar a avaliação da fonte de carbono (glicose-glicerol) na concentração do inóculo. Os resultados apontam que o crescimento da levedura depende mais da qualidade do estoque do que da fonte de carbono utilizada para seu crescimento no momento do inóculo (Figuras 4,1; 4,12; 4,13; 4,14). Quando o estoque primário de glicose (A) foi trocado pelos novos estoques (B1- glicerol, e B2 - glicose), a concentração do inóculo não tinha grande variabilidade e, ainda assim, se obteve melhor rendimento da biomassa com os novos estoques de trabalho (Figura 4.15.). Também se pôde observar este comportamento dos estoques de preservação (A e B) em placas de *Petri* contendo meio de cultivo YPD (Figura 4.16), em que se observa claramente que o crescimento do novo estoque B tem crescimento maior que o estoque A.

4.2.6. Comparação entre os segundos estoques (glicerol B1 e glicose B2), e o primeiro estoque (A) da levedura *P. pastoris*

Diluições seriadas base 10 dos estoques primário e secundários da *P. pastoris* foram realizadas e inoculadas em placa de Petri com a finalidade de verificar o crescimento da levedura. Na Figura 4.16 é possível comparar o estoque primário de trabalho com o estoque secundário, ambos utilizando glicose como fonte de carbono. Macroscopicamente, o crescimento das

colônias de *P. pastoris* foi muito maior no segundo estoque (B) que no primeiro estoque (A) para a diluição de 1/10.

Figura 4.16 - Comparação macroscópica do crescimento dos estoques de trabalho glicose (A) e (B2). Direita (B2) diluição 1/10 e esquerda (A) sem diluição. As placas foram cultivadas por 5 dias 30°C. As condições de crescimento e armazenamento no preparo dos estoques A e B2 (crescimento em glicose – armazenamento em glicerol 20% (v/v)) foram a mesmas para os dois casos.

Na Figura 4.16, pode-se observar a diferença entre o primeiro estoque (A) e o segundo estoque (B2). A concentração celular com o mesmo tempo de cultivo na placa onde foi cultivado o estoque B2, mostra crescimento em toda a área da placa com uma amostra diluída 10 vezes. Por outro lado, a placa semeada com o estoque primário (A) mostra pouco de crescimento com uma amostra sem diluição. O estoque B2 não apresentou colônias atípicas em placas com cultivos mais diluídos, onde foi possível visualizar a morfologia das colônias, separadamente.

Em termos de concentração celular, a Figura 4.17 mostra os resultados dos cultivos realizados em *shaker*, com os estoques de trabalho A e B. A diferença da biomassa entre o segundo estoque de glicerol (B1) com 193,2 g/L é, aproximadamente, 20 vezes maior do que o primeiro estoque de glicose (A) com 9g/L. O cultivo de glicerol (B1), de 93,2 g/L, mostrou uma diferença maior ainda quando comparado ao estoque de glicose (B2), de 9,2 g/L (Figuras 4.11 e 4.12) e ao segundo cultivo de glicose (A), com 6,7 g/L. Estes dados podem ser melhor visualizados na Figura 4.17.

Figura 4.17 - Comparação da produção da biomassa do estoque novo de glicose (B2), glicerol (B1) e o estoque anterior de glicose (A). ■ Curva de biomassa estoque de trabalho glicerol (B1); ◆ Curva de biomassa estoque de trabalho glicose (B2); ▲ Curva de biomassa estoque de trabalho glicose (A).

4.2.7 Produção do fragmento de anticorpo scFv em *shaker*

4.2.7.1 Produção do fragmento de anticorpo recombinante scFv por *P. pastoris* geneticamente modificada em *shaker* utilizando o estoque secundário de glicerol (B1).

Os novos estoques de trabalho foram utilizados para observar o comportamento na indução em cultivos conduzidos em *shaker*. As condições dos cultivos foram 30°C para fase de crescimento, 20°C para fase da indução, a agitação foi de 250 rpm. Foi mantida a proporção de 1 mL de meio criopreservado para cada litro de meio de trabalho. Com base nos resultados obtidos neste primeiro ensaio com o estoque secundário de glicerol (B1), observou-se que a concentração de anticorpo scFv foi de 14,4 mg/L com induções a cada 28 horas.

Figura 4.18 - Primeira produção de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* estoque (B1) glicerol em *shaker*. A indução foi a cada 28 horas para a produção. As condições do cultivo foram: 30°C fase de crescimento, 20°C fase de produção, 1% (v/v) de indutor, 250 rpm, 96 horas de cultivo total. ▲ Etanol/Metanol, ■ Glicerol, ◆ Biomassa, (Tabela 12 do apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 54 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 21,4g/L e a fase estacionária começou após 28 horas, aproximadamente.

4.2.7.1.1. Produção da proteína recombinante scFv por *P. pastoris* geneticamente modificada em *shaker* utilizando o estoque secundário de glicose (B2).

Os novos estoques de trabalho foram utilizados para observar o comportamento na produção em cultivos conduzidos em *Shaker*. As condições dos cultivos foram 30°C para fase de crescimento celular e 20°C para fase da produção do fragmento de anticorpo, com agitação de 250 rpm e proporção de 1 mL de meio criopreservado para cada litro de meio de trabalho. Nestas condições, a concentração final de fragmento de anticorpo scFv foi de 10 mg/L para o primeiro ensaio com estoque secundário de glicose (B2). A indução foi feita cada 28 horas.

Figura 4.19- Primeira produção de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris*, realizada com o estoque (B2) glicose em *shaker*. A indução foi a cada 28 horas para a produção. As condições do cultivo foram: 30°C fase de crescimento, 20°C fase de produção, 1% (v/v) de indutor, 250 rpm, 72 horas. ▲ Etanol/Metanol, ■ Glicerol, ◆ Biomassa, (Tabela 46 do apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 60 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 32,1 g/L e a fase estacionária começou após 54 horas, aproximadamente.

4.8 Análises da influência da fonte de carbono para a preservação da levedura e a produção do fragmento de anticorpo scFv em *shaker*.

4.8.1 Comparação da produção do anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* nos cultivos em *shaker* com os dois estoques de trabalho (B1-B2) cultivados em médio BMGY.

Os dados da Figura 4.20 mostram que o segundo estoque da levedura *P. pastoris* com glicerol B1 (14,4 mg/L) produziu mais fragmento de anticorpo em comparação ao estoque com glicose B2 (10,0 mg/L), sob as mesmas condições de cultivo. Em contrapartida, os valores apresentados na Tabela 3 apontam um dado interessante, a biomassa não foi muito diferente, sendo de 21,4 g/L para o estoque B1 e de 32 g/L para o estoque B2, ou seja, verifica-se que a levedura cresce de forma similar sob as mesmas condições para ambos os estoques (glicerol B1 e glicose B2).

FIGURA 4.20- Comparação da biomassa e produção de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* das produções feitas em *shaker*, estoque novo de glicerol (B1) e glicose (B2). As duas induções foram feitas sob as mesmas condições: 250 rpm a 30°C na fase de crescimento e 20°C na fase da indução.

Com estes ensaios conseguiu-se pré-determinar o crescimento da levedura nos novos estoques de trabalho (B). Foi notório que o estoque de glicerol (B1) tem um crescimento maior que o primeiro estoque de glicose (A) e possui um crescimento mais rápido que o estoque de glicose (B2), obtendo-se 20 g/L, com 22 horas de cultivo (Figuras 4.13; 4.15; 4.19), enquanto que o novo estoque de glicose (B1) tem a mesma produção de biomassa com 42 horas de cultivo, aproximadamente (Figuras 4.14; 4.18). Por outro lado, a produção do anticorpo com os estoques de trabalho (B) mostraram diferenças (Figura 4.18; 4.19). O estoque de trabalho com o glicerol (B1), nos ensaios preliminares, proporcionou maior produção de anticorpo em comparação com o estoque de glicose (B2) em *Shaker*, e apresentou o mesmo comportamento nos cultivos em biorreator (Tabela 3).

Tabela 3- Tabela comparativa das variáveis biomassa, produção de anticorpo e estoque de células criopreservadas utilizadas nas produções de anticorpo em *shaker*. O volume final do cultivo foi de 200 mL. O inóculo foi cultivado durante 16h sob agitação de 250 rpm para todos os ensaios. A temperatura de crescimento foi de 30°C e na fase de indução foi de 20°C o tempo de indução foi após 28 horas de cultivo, 1% (v/v) da concentração de indutor para todos os ensaios.

	Estoque utilizado da levedura (B)	Concentração do anticorpo scFv (mg/L)	Biomassa média da fase estacionária (g/L)
INDUÇÃO <i>SHAKER</i>	glicerol B1	14,4	21,4
INDUÇÃO <i>SHAKER</i>	glicose B2	10,0	22,1
INDUÇÃO <i>SHAKER</i> primeiro do planejamento experimental (11C)	glicose B2	14,0	32,1

Figura 4.21 - Comparação das produções do fragmento do anticorpo scFv e de biomassa feitas em *shaker* em diferentes condições.

A Figura 4.21 mostra a comparação entre as produções do anticorpo feitas em *shaker* com as mesmas condições de temperatura, concentração de indutor e tempo de indução: duas produções com o estoque de glicose (B2) e uma produção com o estoque de glicerol (B1). Pode-se observar (Figura 4.21) que o

cultivo com o estoque B1, com concentração de biomassa similar ao cultivo com o estoque B2, produz mais anticorpo. Por outro lado, quando o cultivo feito com o estoque de B2 tem mais biomassa (primeiro do planejamento experimental) e produz a mesma quantidade que o cultivo feito com o estoque B1. Conclui-se também que a concentração de biomassa é proporcional à produção de anticorpo com o mesmo tempo de cultivo.

Com estes ensaios, concluímos que a melhor condição de estocar as células é com células cultivadas em glicerol e estocadas em glicerol (estoque B1), visto que demonstrou maior produção do fragmento de anticorpo scFv e se conseguiu atingir a fase exponencial em menor tempo.

4.9 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

Esta análise estatística foi feita igual para *shaker* e para biorreator. As variáveis independentes concentração (v/v) de indutor (0,5;1,0; 1,5), temperatura de indução (10°C; 20°C; 30°C) e tempo da indução (24h; 28h; 32h), foram estudadas para avaliação das variáveis respostas, como concentração de biomassa (g/L) e concentração de anticorpo (mg/L), utilizando um planejamento fatorial estatístico 2^3 (Tabela 6) contendo pontos centrais, os quais foram realizados em quadruplicata para estimar o erro experimental puro. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) com $p \leq 0,05$. Toda estatística e análise das tabelas e gráficos foram realizadas com o programa Statistica 9.0 (StatSoft Inc., 2010).

Tabela 4: Níveis das variáveis independentes estudadas no planejamento fatorial estatístico 2³.

Ordem experimental aleatória	% (v/v) de Indutor	Tempo de indução (h)	Temperatura da fase de indução (°C)
2	1,5	24,0	10,0
11 *	1,0	28,0	20,0
5	0,5	24,0	30,0
1	0,5	24,0	10,0
12 *	1,0	28,0	20,0
6	1,5	24,0	30,0
7	0,5	32,0	30,0
9 *	1,0	28,0	20,0
3	0,5	32,0	10,0
4	1,5	32,0	10,0
8	1,5	32,0	30,0
10 *	1,0	28,0	20,0

* Ponto central

4.9.0 Estudo do planejamento estatístico em *shaker* segundo estoque de glicose (B2)

Nesta etapa do trabalho, utilizou-se o estudo por metodologia de superfície de resposta 2³, para avaliar a produção do fragmento de anticorpo scFv a partir de *P. pastoris*. As variáveis estudadas foram: tempo de adição do indutor, temperatura de indução e concentração de indutor (ver tabela 4 e item 3.2.7).

Após comparar as duas induções com os dois estoques de trabalho B1 e B2 (Figuras 4.20; 4.21) e observar o que se consegue produzir com o fragmento de anticorpo, seguiu-se um planejamento experimental (Tabela 4).

4.9.1 Primeiro cultivo do Planejamento Estatístico em *Shaker*

Fez-se o primeiro cultivo do planejamento experimental, com o estoque de glicose (B2) nas condições descritas para o cultivo do (Tabela 4 número 11*). Neste caso, a produção do fragmento de anticorpo scFv foi de 13,2 mg/L.

A primeira indução foi feita no momento em que o cultivo atingiu 28 horas, com 1% (v/v) de indutor e temperatura de 20°C

Figura 4.22- Cultivo em *shaker* do primeiro ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv com o estoque de trabalho glicose (B2) pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. As condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 20°C na fase da indução, percentagem de indutor 1 % (v/v), tempo da primeira indução 28h. Se fazem três induções cada 24 horas. ◆ Biomassa, ■ Glicerol, ▲ Etanol/Metanol. (Tabela 13 Apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 54 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 33,2 g/L e a fase estacionária começou após 54 horas, aproximadamente.

4.9.2 Segundo cultivo do Planejamento Estatístico em *Shaker*.

Fez-se o segundo cultivo do planejamento experimental, com o estoque de glicose nas condições descritas para o cultivo do (Tabela 4 número 1). Neste caso, a produção do fragmento de anticorpo scFv foi de 25,3 mg/L. A primeira indução foi feita no momento em que o cultivo atingiu 24 horas, com 0,5% (v/v) de indutor e temperatura de 10°C.

Figura 4.23 - Cultivo em *shaker* do segundo ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv, com o estoque de trabalho glicose (B2), pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. As condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 20°C na fase da indução, percentagem de indutor 1 % (v/v), tempo da primeira indução 28h. Se fazem tres induções cada 24 horas. ◆ Biomassa, ■ Glicerol, ▲ Etanol/Metanol. (Tabela 14 Apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 32 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 30,2 g/L, e a fase estacionária começou após 32 horas, aproximadamente.

4.9.3 Terceiro cultivo do Planejamento Estatístico em *Shaker*

Fez-se o terceiro cultivo indicado no planejamento experimental com o estoque de glicose nas condições descritas para o cultivo do (Tabela 4 número 12*). Neste caso, a produção do fragmento de anticorpo scFv foi de 14 mg/L. A primeira indução foi feita no momento em que o cultivo atingiu 28 horas, com 1% (v/v) de indutor e temperatura de 20°C.

Figura 4.24 - Cultivo em *shaker* do terceiro ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv com o estoque de trabalho glicose (B2) pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. As condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 20°C na fase da indução, percentagem de indutor 1 % (v/v), tempo da primeira indução 28h. Se fazem tres induções cada 24 horas. ◆ Biomassa, ■ Glicerol, ▲ Etanol/Metanol. (Tabela 15 Apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 48 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 34 g/L e a fase estacionária começou após 38 horas, aproximadamente

4.9.4 Quarto cultivo do Planejamento Estatístico em *Shaker*

Fez-se o Quarto cultivo do planejamento experimental com o estoque de glicose nas condições descritas para o cultivo do (Tabela 4 número 4). Neste caso, a produção do fragmento de anticorpo scFv foi de 16,4 mg/L. A primeira indução foi feita no momento em que o cultivo atingiu 32 horas, com 1,5% (v/v) de indutor e temperatura de 10°C.

Figura 4.25 - Cultivo em *shaker* do Quarto ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv com o estoque de trabalho glicose (B2) pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. As condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 10°C na fase da indução, percentagem de indutor 1,5 % (v/v), tempo da primeira indução 32h. Foram feitas três induções a cada 24 horas. ◆ Biomassa, ■ Glicerol, ▲ Etanol/Metanol. (Tabela 16 Apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 48 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 28,9 g/L e a fase estacionária começou após 38 horas, aproximadamente.

4.9.5 Quinto cultivo do Planejamento Estatístico em *Shaker*

Fez-se o Quinto cultivo do planejamento experimental com o estoque de glicose nas condições descritas para o cultivo do item (Tabela 4 número 6). Neste caso, a produção do fragmento de anticorpo scFv foi de 6,4 mg/L. A primeira indução foi feita no momento em que o cultivo atingiu 24 horas, com 1,5% (v/v) de indutor e temperatura de 30°C.

Figura 4.26- Cultivo em *shaker* do Quinto ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv com o estoque de trabalho glicose (B2) pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. As condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 30°C na fase da indução, percentagem de indutor 1,5 % (v/v), tempo da primeira indução 24h. Se fazem tres induções cada 24 horas. ◆ Biomassa, ■ Glicerol, ▲ Etanol/Metanol. (Tabela 17 Apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 48 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 32,8 g/L e a fase estacionária começou após 38 horas, aproximadamente.

4.9.6 Sexto cultivo do Planejamento Estatístico em *Shaker*

Fez-se o sexto cultivo do planejamento experimental com o estoque de glicose nas condições descritas para o cultivo do (Tabela 4 número 8). Neste caso, a concentração do fragmento de anticorpo scFv ao final do cultivo foi de 17 mg/L. A primeira indução foi feita no momento em que o cultivo atingiu 32 horas, com 1,5% (v/v) de indutor e temperatura de 30°C.

Figura 4.27 - Cultivo em *shaker* do Sexto ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv com o estoque de trabalho glicose (B2) pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. As condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 30°C na fase da indução, percentagem de indutor 1,5 % (v/v), tempo da primeira indução 32h. Se fazem tres induções cada 24 horas. ◆ Biomassa, ■ Glicerol, ▲ Etanol/Metanol. (Tabela 18 Apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 48 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 33,4 g/L e a fase estacionária começou após 38 horas aproximadamente.

4.9.7 Sétimo cultivo do Planejamento Estatístico em *Shaker*

Fez-se o sétimo cultivo do planejamento experimental com o estoque de glicose nas condições descritas para o cultivo do (Tabela 4 número 9*). Neste caso, a produção do fragmento de anticorpo scFv ao final do cultivo foi de 10,8 mg/L. A primeira indução foi feita no momento em que o cultivo atingiu 28 horas, com 1% (v/v) de indutor e temperatura de 20°C.

Figura 4.28 - Cultivo em *shaker* do Setimo ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv com o estoque de trabalho glicose (B2) pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. As condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 20°C na fase da indução, percentagem de indutor 1% (v/v), tempo da primeira indução 28h. Se fazem tres induções cada 24 horas. ◆ Biomassa, ■ Glicerol, ▲ Etanol/Metanol. (Tabela 19 Apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 48 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 33,8 g/L e a fase estacionária começou após 38 horas, aproximadamente.

4.9.8 Oitavo cultivo do Planejamento Estatístico em *Shaker*

Fez-se o oitavo cultivo do planejamento experimental, com o estoque de glicose nas condições descritas para o cultivo do (Tabela 4 número 3). Neste caso, a produção do fragmento de anticorpo scFv foi de 27,8 mg/L. A primeira indução foi feita no momento em que o cultivo atingiu 32 horas, com 0,5% (v/v) de indutor e temperatura de 10°C.

Figura 4.29 - Cultivo em *shaker* do oitavo ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv com o estoque de trabalho glicose (B2) pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. As condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 10°C na fase da indução, percentagem de indutor 0,5% (v/v), tempo da primeira indução 32h. Se fazem três induções cada 24 horas. ◆ Biomassa, ■ Glicerol, ▲ Etanol/Metanol.. (Tabela 20 Apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 32 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 27 g/L, e a fase estacionária começou após 32 horas aproximadamente.

4.9.9 Nono cultivo do Planejamento Estatístico em *Shaker*.

Fez-se o nono cultivo do planejamento experimental, com o estoque de glicose nas condições descritas para o cultivo do (Tabela 4 número 10*). Neste caso, a produção do fragmento de anticorpo scFv foi de 12,3 mg/L. A primeira indução foi feita no momento em que o cultivo atingiu 28 horas, com 1% (v/v) de indutor e temperatura de 20°C.

Figura 4.30 - Cultivo em *shaker* do nono ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv com o estoque de trabalho glicose (B2) pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. As condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 20°C na fase da indução, percentagem de indutor 1% (v/v), tempo da primeira indução 28h. Se fazem tres induções cada 24 horas. ◆ Biomassa, ■ Glicerol, ▲ Etanol/Metanol. (Tabela 21 Apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 32 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 33,8 g/L e a fase estacionária começou após 32 horas, aproximadamente.

4.9.10 Décimo cultivo do Planejamento Estatístico em *Shaker*

Fez-se o décimo cultivo do planejamento experimental, com o estoque de glicose nas condições descritas para o cultivo do (Tabela 4 número 2). Neste caso, a produção do fragmento de anticorpo scFv foi de 12,7 mg/L. A primeira indução foi feita no momento em que o cultivo atingiu 24 horas, com 1,5% (v/v) de indutor e temperatura de 10°C.

Figura 4.31 - Cultivo em *shaker* do décimo ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv com o estoque de trabalho glicose (B2) pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. As condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 10°C na fase da indução, percentagem de indutor 1,5% (v/v), tempo da primeira indução 24h. Se fazem tres induções cada 24 horas. ◆ Biomassa, ■ Glicerol, ▲ Etanol/Metanol. (Tabela 22 Apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 32 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 32,3 g/L e a fase estacionária começou após 32 horas, aproximadamente.

4.9.11 Décimo-primeiro cultivo do Planejamento Estatístico em *Shaker*

Fez-se o décimo-primeiro cultivo do planejamento experimental, com o estoque de glicose nas condições descritas para o cultivo do (Tabela 4 número 5). Neste caso a produção do fragmento de anticorpo scFv foi de 18,7 mg/L. A primeira indução foi feita no momento em que o cultivo atingiu 24 horas, com 0,5% (v/v) de indutor e temperatura de 30°C.

Figura 4.32 - Cultivo em *shaker* do décimo-primeiro ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv com o estoque de trabalho glicose (B2) pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. As condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 30°C na fase da indução, percentagem de indutor 0,5% (v/v), tempo da primeira indução 24h. Se fazem tres induções cada 24 horas. ◆ Biomassa, ■ Glicerol, ▲ Etanol/Metanol. (Tabela 23 Apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 32 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 32,3 g/L e a fase estacionária começou após 32 horas, aproximadamente.

4.9.12 Décimo-segundo cultivo do Planejamento Estatístico em *Shaker*

Fez-se o décimo-segundo cultivo do planejamento experimental, com o estoque de glicose nas condições descritas para o cultivo do (Tabela 4 número 7). Neste caso, a produção do fragmento de anticorpo scFv foi de 19,3 mg/L. A primeira indução foi feita no momento em que o cultivo atingiu 32 horas, com 0,5% (v/v) de indutor e temperatura de 30°C.

Figura 4.33- Cultivo em *shaker* do décimo-segundo ensaio do planejamento experimental para otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv com o estoque de trabalho glicose (B2) pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. As condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 30°C na fase da indução, percentagem de indutor 0,5% (v/v), tempo da primeira indução 24h. Se fazem tres induções cada 24 horas. ◆ Biomassa, ■ Glicerol, ▲ Etanol/Metanol. (Tabela 24 Apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 32 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 32,3 g/L e a fase estacionária começou após 32 horas, aproximadamente.

4.10 Análise dos resultados obtidos no Planejamento Estatístico em *shaker*

Estudos têm sido encaminhados para a otimização da expressão de proteínas recombinantes utilizando o promotor AOX como modelo de expressão. Segundo Poutou (2005), o efeito da concentração de indutor nesse tipo de produção é uma variável de muita importância que tem sido estudada por diversos autores.

Assim, a enzima AOX é ativa uma vez que existem incrementos na síntese de FAD⁺ (nucleotídeos de flavina que faz ligações não covalentes nas subunidades estruturais da enzima). Por outro lado, acredita-se que um dos fatores determinantes para que a síntese metabólica do metanol seja pela via oxidativa ou assimilatória e depende da concentração de AOX ativa. Alguns

estudos afirmam que a ativação ou inativação de AOX tem associação com as concentrações de metanol no meio, assim, tem-se observado que altos incrementos nas concentrações de metanol no meio tiveram como resposta a inativação de AOX. O processo acontece assim que a oxidação do metanol excede a utilização do formaldeído, isso gera o acúmulo da enzima, e esse acúmulo de enzima junto com a dissociação do FAD^+ ocasionam a inativação de AOX e a morte celular (POUTOU et al., 2005).

Neste estudo os resultados mostraram que altas concentrações de indutor influenciaram negativamente na produção do fragmento de anticorpo por *P.pastoris*.

Figura 4.34 - Estudo dos efeitos mediante o gráfico de Pareto para a otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. Planejamento experimental fatorial completo 2^3 em *shaker* com o estoque de trabalho glicose (B2). As variáveis independentes estudadas foram: Concentração de indutor (metanol 0,5%; 1% e 1,5%); temperatura de indução (10°C; 20°C; e 30°C) e tempo de indução (24h; 28h e 32h). Nesta figura mostram-se as três interações.

A análise de Pareto (Figura 4.34) apresenta o efeito demonstrado pelas variáveis independentes quando são relacionadas com a produção do fragmento de anticorpo scFv, pela levedura *P. pastoris*. Nesta figura, pode-se observar que a concentração de indutor é a única variável que ultrapassa a faixa (vermelha), em que $p < 0,05$; significa que tem influência estatisticamente significativa, com nível de confiança de 95%. Isto indica que a concentração de indutor tem efeito sobre a produção do fragmento de anticorpo scFv. Além

disso, o valor de -3,00157 proporciona informação no sentido do efeito, neste caso negativo, correlacionado com a produção. Porém, ao serem examinadas as interações entre as variáveis, nenhuma apresenta efeito ou influência sobre a produção do fragmento de anticorpo, assim como não mostra efeito algum a temperatura e o tempo de indução, separadamente.

Figura 4.35 - Estudo dos efeitos mediante o gráfico de Pareto para a otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. Planejamento experimental fatorial completo 2^3 em *shaker* com o estoque de trabalho glicose (B2). As variáveis independentes estudadas foram: Concentração de indutor (metanol 0,5%; 1% e 1,5%); temperatura de indução (10°C; 20°C; e 30°C) e tempo de indução (24h; 28h e 32h). Nesta figura mostram-se o efeitos das variáveis sem interações.

Na figura 4.35 foi analisado o efeito apresentado por cada uma das variáveis, separadamente. As interações entre as variáveis não foram vinculadas à análise, com o propósito de observar mais detalhadamente a influência que exerce cada uma das variáveis na produção do fragmento de anticorpo scFv. Porém, a análise confirmou o efeito da concentração de indutor sobre a produção e demonstrou que a temperatura e o tempo de indução não exercem nenhum tipo de influência sobre a produção do fragmento de anticorpo.

Figura 4.36 - Superfície de resposta indicando as interações simultâneas das variáveis independentes, a concentração de indutor (metanol 0,5%; 1% e 1,5%) e o tempo de indução (24h; 28h e 32h) foram analisadas, para a otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. Estudo do planejamento experimental fatorial completo 2^3 em *shaker* com o estoque de trabalho glicose (B2).

A superfície de resposta (Figura 4.36) correlaciona a concentração de indutor e o tempo de indução. Ela indica que a melhor produção do fragmento de anticorpo é atingida quando a menor concentração de indutor e o menor tempo de indução são utilizados. Pode-se observar que no maior tempo de indução a produção do fragmento de anticorpo scFv atinge também um alto rendimento na produção, entretanto, a diferença entre os dois casos não é estatisticamente significativa. Por outro lado, menores tempos de produção, em escalas industriais, proporcionam economias de operação e de mão de obra em processos produtivos.

Figura 4.37- Superfície de resposta indicando os efeitos simultâneos das variáveis independentes, concentração de indutor (metanol 0,5%; 1% e 1,5%); temperatura de indução (10°C; 20°C e 30°C). Para a otimização da produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. Estudo do planejamento experimental fatorial completo 2^3 em *shaker* com o estoque de trabalho glicose (B2).

O estudo de superfície de resposta (Figura 4.37), para a produção do fragmento de anticorpo scFv, correlaciona as variáveis de concentração de indutor e temperatura de indução. Os dados mostram que a maior produção do fragmento de anticorpo foi obtida na menor concentração de indutor. Além disso, a influência da temperatura na produção do fragmento de anticorpo é positiva quando é trabalhada em seu nível mais baixo, neste caso de 10°C.

Os resultados obtidos em este trabalho concordam com o descrito por Cunha (2004), que descreveu, que se deve fazer o controle da concentração de metanol para não atingir níveis que possam inibir a indução do promotor.

Outros autores como Gellinssen (2005) afirmam que os níveis de transcrição realizados pelo promotor AOX podem ser de três a cinco vezes maiores, uma vez que as células foram cultivadas em condições limitantes de metanol. Isso também foi demonstrado por Hellwig (2000) que, no seu trabalho, controlou a concentração de metanol no meio de cultivo com diferentes níveis, para a produção de um fragmento de anticorpo scFv. Os resultados dos dois estudos apresentaram dados muito similares aos apresentados neste trabalho visto que, de igual modo, eles mostraram que altas

concentrações de metanol no meio de cultivo gerava baixa produtividade do fragmento de anticorpo. Porém, quando a produção foi feita com 0,55% de indutor, eles reportaram aumento significativo na produção. Este resultado corrobora com o que foi registrado neste estudo, em que a maior produção do fragmento de anticorpo ocorreu com a menor concentração de indutor (0,5%).

Resultados semelhantes foram obtidos por Khatri (2006). Ele demonstrou que ao limitar as concentrações de metanol, se induzia mais fortemente o promotor AOX quando a levedura tinha condições de metanol suficientes.

Tabela 5 - Tabela comparativa de todos os cultivos realizados no planejamento experimental para *shaker*. As variáveis são: Produtividade global do fragmento de anticorpo scFv anti LDL ox; Rendimento biomassa–produto; Velocidade máxima de crescimento; Tempo de duplicação; Produção final do fragmento de anticorpo scFv ant-LDL ox.

Planejamento Estatístico em Shaker	Produtividade global do fragmento de anticorpo (mg/L h ⁻¹)	Relação entre produto e biomassa (mg L ⁻¹ AA/ g L ⁻¹ célula)	Velocidade máxima de crescimento μ X _{máx}	Tempo de duplicação (h)	Concentração do fragmento de anticorpo (mg L ⁻¹)
Primeiro cultivo	0.183	0.423	0.133	5.21	13.2
Segundo cultivo	0.351	0.861	0.110	6.30	25.3
Terceiro cultivo	0.194	0.426	0.108	6.41	14
Quarto cultivo	0.228	0.588	0.136	5.11	16.4
Quinto cultivo	0.089	0.202	0.139	5.00	6.4
Sexto cultivo	0.236	0.528	0.144	4.83	17
Sétimo cultivo	0.150	0.326	0.111	6.23	10.8
Oitavo cultivo	0.386	1.061	0.116	5.99	27.8
Nono cultivo	0.171	0.375	0.116	5.95	12.3
Décimo cultivo	0.176	0.407	0.137	5.04	12.7
Décimo primeiro cultivo	0.260	0.570	0.137	5.06	18.7
Décimo segundo cultivo	0.268	0.563	0.149	4.66	19.3

Pode-se observar, na Tabela 5, a comparação de todos os cultivos realizados no planejamento fatorial completo 2³ conduzidos em *shaker*. A maior produção do fragmento de anticorpo foi obtida no oitavo cultivo. As condições do oitavo cultivo foram 30°C para a fase de crescimento, 10°C para a fase de

produção, 0,5% de concentração de indutor (metanol) e tempo de indução 32 horas. Neste caso, a produtividade global do fragmento de anticorpo foi de 0,386 mg/L h⁻¹. O tempo de duplicação para todos os cultivos ficou na faixa de 4,66 h e 6,41 h.

5. CULTIVO EM BIORREATOR DE 3L DE *P. pastoris* PARA PRODUÇÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO scFv.

5.1 Estudo do coeficiente volumétrico de transferência de massa k_La em biorreator

O propósito deste trabalho é entender o processo de produção do anticorpo monoclonal scFv, expresso por *Pichia pastoris*, geneticamente modificada. Inicialmente, foram levantados os valores de k_La para o biorreator Bioflo 110. Posteriormente, foi avaliada a influência que têm o k_La na produção de etanol, no rendimento de biomassa e na produção do anticorpo. O levantamento dos valores do k_La pode ser visto na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de k_La obtidos em água em função de diferentes valores de agitação (rpm) e de aeração (vvm) para o biorreator *Bioflo* 110, com dorna de 3 litros na temperatura ambiente (25°C).

Aeração (vvm) / Agitação(rpm)	k_La (h ⁻¹)	Aeração (vvm) / Agitação(rpm)	k_La (h ⁻¹)
1,5/100	3,60	0,8/400	54,36
0,2/50	5,04	2,5/200	55,80
1,2/100	6,48	1,0/400	56,88
0,8/50	9,72	1,5/400	58,68
0,5/50	1,44	1,8/400	61,56
0,8/100	11,52	0,5/500	70,20
0,5/100	12,24	2,2/400	70,56
0,5/200	13,32	0,2/600	78,84
1,0/50	13,68	0,5/600	82,08
1,0/100	13,68	2,5/400	82,08
0,2/200	16,20	0,2/800	85,68
1,5/50	16,92	1,5/500	87,48
0,8/200	17,64	1,2/600	91,80
1,0/200	20,52	1,0/600	93,60
2,2/100	20,88	0,8/600	93,96
1,2/50	25,20	2,5/600	95,04
2,5/50	25,56	0,2/400	95,40
2,2/50	26,64	1,8/600	96,12
1,8/50	28,80	0,5/800	97,56
1,5/200	31,32	2,2/600	97,92
1,8/100	32,04	1,2/800	98,28
2,5/100	33,48	1,5/600	104,04
0,2/100	35,64	2,2/800	111,24
1,8/200	36,00	1,0/800	112,68
1,2/200	37,08	1,5/800	115,20
2,2/200	39,96	2,5/800	119,88
0,5/400	52,92	1,8/800	123,12
1,2/400	53,28	0,8/800	136,80

A partir dos resultados obtidos com relação aos valores do k_La , decidiu-se trabalhar, para os experimentos de produção do anticorpo scFv, com o valor de k_La de 96,12 h⁻¹ observado nas condições de 1,8vvm/600rpm. Este valor de k_La foi escolhido porque proporciona alta aeração no meio e, portanto, minimiza a produção de etanol pela levedura segundo Hartner e Glieder (2006), que é um potencial inibidor da expressão de proteínas em leveduras metilotróficas Poutou (2005). O valor de k_La mais alto (136,80 h⁻¹) foi avaliado posteriormente, pois como é obtido nas condições extremas de operação do fermentador, decidiu-se

por conduzir todos os experimentos iniciais em valor um pouco abaixo do máximo (de 96,12 h⁻¹), mas que também minimiza a produção de etanol.

5.1.1 Produção da proteína recombinante scFv por *P. pastoris* geneticamente modificada em biorreator de 3L utilizando o estoque primário.

Inicialmente, os estudos em biorreator foram realizados utilizando o estoque primário da *P. pastoris* doado pelo grupo de pesquisa da Profa. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP. Esse estoque primário (A) foi utilizado nos primeiros ensaios, sendo que apresentaram variabilidade e contaminação. Neste ponto foram feitos os segundos estoques de trabalho, sendo avaliados, e obtendo melhores resultados, foram utilizados para prosseguir com o estudo em biorreator.

6. Resultados e discussão do planejamento fatorial estatístico 2³ biorreator

6.1 Primeiro ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L

O primeiro ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 2 Tabela 4) foi realizado a 30°C para a fase de crescimento e 10°C para a fase de indução, possuindo 1,5% (v/v) de indutor (metanol) com o tempo de indução igual a 24 horas de cultivo. A oitava indução (Tabela 26 do apêndice A) proporcionou produção de anticorpo na concentração 10,34 mg/L (Figura 6.1.).

Figura 6.1 - Cultivo do primeiro ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 2 Tabela 4) da produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada utilizando o novo estoque de trabalho de glicose (B2) em biorreator. As condições de crescimento foram: 30°C para a fase de cultivo, 10°C para a fase de indução, 1,5% (v/v) de indutor (metanol), 24 horas de tempo da indução e $k_L a$ 96,12 h⁻¹. ♦ Biomassa, *pH, ● Oxigênio, ▲ Etanol/Metanol, ■ Glicerol. ↑ Hora da indução. (Tabela 26 do apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 24 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 93,5 g/L e a fase estacionária começou após 32 horas, aproximadamente.

6.2 Segundo ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L

O segundo cultivo do planejamento fatorial estatístico (número 11* Tabela 4) produziu 32,7 mg/L de anticorpo (Figura 6.2.) e foi realizado a 30°C para a fase de crescimento e 20°C para a fase de indução, possuindo 1% (v/v) de indutor (metanol) com um tempo de indução às 28 horas e adição de 0,5 mL de antiespumante, com $k_L a$ 96,12 h⁻¹ (Tabela 27 do apêndice A).

Figura 6.2 - Cultivo do segundo ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 11 C Tabela 4) da produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada, utilizando o novo estoque de trabalho de glicose (B2) em biorreator. As condições de crescimento foram: 30°C para a fase de cultivo, 20°C para a fase de indução, 1,0% (v/v) de indutor (metanol), 28 horas de tempo da indução e $k_L a$ 96,12 h⁻¹. ◆Biomassa,*pH,●Oxigênio, ▲Etanol/metanol, ■Glicerol. ↑Hora da indução. (Tabela 27 do apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 28 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 105,3 g/L e a fase estacionária começou após 44 horas, aproximadamente.

6.3 Terceiro ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L.

O terceiro cultivo do planejamento fatorial estatístico (número 5 Tabela 4), produziu 33,6 mg/L de anticorpo (Figura 6.3) e foi realizado a 30°C para a fase de crescimento e 10°C para a fase de indução, possuindo 0,5% (v/v) de indutor (metanol) com um tempo de indução às 24 horas, 0,5 mL de antiespumante e $k_L a$ de 96,12 h⁻¹. Esta indução mostrou produção final de 63,1 g/L de biomassa na fase estacionária, o consumo total do glicerol ocorreu após 32 horas de cultivo (Tabela 28 do apêndice A).

FIGURA 6.3 Cultivo do terceiro ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 5 Tabela 4) da produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada utilizando o novo estoque de trabalho de glicose (B2) em biorreator. As condições de crescimento foram: 30°C para a fase de cultivo, 10°C para a fase de indução, 0,5% (v/v) de indutor (metanol), 24 horas de tempo da indução e k_{La} de 96,12 h^{-1} . ◆ Biomassa, * pH, ● Oxigênio, ▲ Etanol/Metanol, ■ Glicerol. ↑ Hora da indução. (Tabela 28 do apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 32 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 63,1 g/L, e a fase estacionária começou após 56 horas, aproximadamente.

6.4 Quarto ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L

O quarto cultivo do planejamento fatorial estatístico (número 5 Tabela 4), produziu 41,3 mg/L de anticorpo (Figura 6.4) e foi realizado a 30°C para a fase de crescimento e 30°C para a fase de indução, possuindo 0,5% (v/v) de indutor (metanol) com um tempo de indução às 24 horas, 0,5 mL de antiespumante e k_{La} de 96,12 h^{-1} . Esta indução mostrou produção final de 100,1 g/L de biomassa na fase estacionária, o consumo total do glicerol ocorreu após 32 horas de cultivo (Tabela 29 do apêndice A).

Figura 6.4 - Cultivo do quarto ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 5 Tabela 4) da produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada utilizando o novo estoque de trabalho de glicose (B2) em biorreator. As condições de crescimento foram: 30°C para a fase de cultivo, 10°C para a fase de indução, 0,5% (v/v) de indutor (metanol), 24 horas de tempo da indução e k_{La} de 96,12 h^{-1} . ◆ Biomassa, * pH, ● Oxigênio, ▲ Etanol/Metanol, ■ Glicerol. ⬆ Hora da indução. (Tabela 29 do apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 32 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 100,1 g/L e a fase estacionária começou após 56 horas, aproximadamente.

6.5 Quinto ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L

O quinto cultivo do planejamento fatorial estatístico (número 12* Tabela 4), produziu 30,7 mg/L de anticorpo (Figura 6.5) e foi realizado a 30°C para a fase de crescimento e 20°C para a fase de indução, possuindo 1% (v/v) de indutor (metanol) com um tempo de indução às 28 horas, 0,5 mL de antiespumante e k_{La} de 96,12 h^{-1} . Esta indução mostrou produção média de 90,2 g/L de biomassa na fase estacionária, o consumo total do glicerol ocorreu após 28 horas de cultivo (Tabela 30 do apêndice A).

Figura 6.5 - Cultivo do quinto ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 12* Tabela 4) da produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada utilizando o novo estoque de trabalho de glicose (B2) em biorreator. As condições de crescimento foram: 30°C para a fase de cultivo, 20°C para a fase de indução, 1% (v/v) de indutor (metanol), 28 horas de tempo da indução e k_La de 96,12 h^{-1} . ◆ Biomassa, *pH, ● Oxigênio, ▲ Etanol/Metanol, ■ Glicerol. ↑ Hora da indução. (Tabela 30 do apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 28 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 90,2 g/L, e a fase estacionária começou após 52 horas, aproximadamente.

6.6 Sexto ensaio do planejamento fatorial estatístico em bioreator de 3L

O sexto cultivo do planejamento fatorial estatístico (número 6 Tabela 4), produziu 23,48 mg/L de anticorpo (Figura 6.6) e foi realizado a 30°C para a fase de crescimento e 30°C para a fase de indução, possuindo 1,5% (v/v) de indutor (metanol) com um tempo de indução às 24 horas, 0,5 mL de antiespumante e k_La de 96,12 h^{-1} . Esta indução mostrou produção média de 77,9 g/L de biomassa na fase estacionária e o consumo total do glicerol ocorreu após 24 horas de cultivo (Tabela 31 do apêndice A).

Figura 6.6 - Cultivo do sexto ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 6 Tabela 4) da produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada utilizando o novo estoque de trabalho de glicose (B2) em biorreator. As condições de crescimento foram: 30°C para a fase de cultivo, 30°C para a fase de indução, 1,5% (v/v) de indutor (metanol), 24 horas de tempo da indução e k_{La} de 96,12 h⁻¹. ◆ Biomassa, * pH, ● Oxigênio, ▲ Etanol/Metanol, ■ Glicerol. ↑ Hora da indução. (Tabela 31 do apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 24 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 77,9 g/L e a fase estacionária começou após 44 horas, aproximadamente.

6.7 Sétimo ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L

O sétimo cultivo do planejamento fatorial estatístico (número 4 Tabela 4), produziu 8 mg/L de anticorpo (Figura 6.7) e foi realizado a 30°C para a fase de crescimento e 10°C para a fase de indução, possuindo 1,5 % (v/v) de indutor (metanol) com tempo de indução às 32 horas, 0,5 mL de antiespumante e k_{La} de 96,12 h⁻¹. Esta indução mostrou produção média de 70,1 g/L de biomassa na fase estacionária, o consumo total do glicerol foi após 32 horas de cultivo (Tabela 32 do apêndice A).

Figura 6.7 - Cultivo do sétimo ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 4 Tabela 4) da produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada utilizando o novo estoque de trabalho de glicose (B2) em biorreator. As condições de crescimento foram: 30°C para a fase de cultivo, 10°C para a fase de indução, 1,5% (v/v) de indutor (metanol), 32 horas de tempo da indução e k_{La} de 96,12 h^{-1} . ◆ Biomassa, * pH, ● Oxigênio, ▲ Etanol/Metanol, ■ Glicerol. ↑ Hora da indução. (Tabela 32 do apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 32 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 70,1 g/L e a fase estacionária começou após 32 horas, aproximadamente.

6.8 Oitavo ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L

O oitavo cultivo do planejamento fatorial estatístico (número 8 Tabela 4), produziu 15,22 mg/L de anticorpo (Figura 6.8) e foi realizado a 30°C para a fase de crescimento e 30°C para a fase de indução, possuindo 1,5 % (v/v) de indutor (metanol) com um tempo de indução às 32 horas, 0,5 mL de antiespumante e k_{La} 96,12 h^{-1} . Esta indução mostrou produção média de 67,3 g/L de biomassa na fase estacionária e o consumo total do glicerol foi após 68 horas de cultivo (Tabela 30 do apêndice A).

Figura 6.8 - Cultivo do oitavo ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 8 Tabela 4) da produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada utilizando o novo estoque de trabalho de glicose (B2) em biorreator. As condições de crescimento foram: 30°C para a fase de cultivo, 30°C para a fase de indução, 1,5 % (v/v) de indutor (metanol), 32 horas de tempo da indução e k_{La} de 96,12 h⁻¹. ♦ Biomassa, * pH, ● Oxigênio, ▲ Etanol/Metanol, ■ Glicerol. ↑ Hora da indução. (Tabela 30 do apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 32 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 67,3 g/L e a fase estacionária começou após 32 horas, aproximadamente.

6.9 Nono ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L

O nono cultivo do planejamento fatorial estatístico (número 3 Tabela 4), produziu 36,17 mg/L de anticorpo (Figura 6.9). e foi realizado a 30°C para a fase de crescimento e 10°C para a fase de indução, possuindo 0,5 % (v/v) de indutor (metanol) com um tempo de indução às 32 horas, 0,5 mL de antiespumante e k_{La} 96,12 h⁻¹. Esta indução mostrou produção média de 97,7 g/L de biomassa na fase estacionária e o consumo total do glicerol foi após 24 horas de cultivo (Tabela 34 do apêndice A).

Figura 6.9 - Cultivo do nono ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 3 Tabela 4) da produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada utilizando o novo estoque de trabalho de glicose (B2) em biorreator. As condições de crescimento foram: 30°C para a fase de cultivo, 10°C para a fase de indução, 0,5 % (v/v) de indutor (metanol), 32 horas de tempo da indução e $k_L a$ de 96,12 h^{-1} . ♦ Biomassa, * pH, ● Oxigênio, ▲ Etanol/Metanol, ■ Glicerol. ↑ Hora da indução. (Tabela 34 do apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 24 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 97,7 g/L e a fase estacionária começou após 32 horas, aproximadamente.

6.10 Décimo ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L

O décimo cultivo do planejamento fatorial estatístico (número 9* Tabela 4), produziu 29,7 mg/L de anticorpo (Figura 6.10). e foi realizado a 30°C para a fase de crescimento e 20°C para a fase de indução, possuindo 1% (v/v) de indutor (metanol) com um tempo de indução às 28 horas, 0,5 mL de antiespumante e $k_L a$ 96,12 h^{-1} . Esta indução mostrou produção média de 99,7 g/L de biomassa na fase estacionária e o consumo total do glicerol foi após 24 horas de cultivo (Tabela 35 do apêndice A).

Figura 6.10 - Cultivo do decimo ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 9C Tabela 4) da produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada utilizando o novo estoque de trabalho de glicose (B2) em biorreator. As condições de crescimento foram: 30°C para a fase de cultivo, 20°C para a fase de indução, 1% (v/v) de indutor (metanol), 28 horas de tempo da indução e $k_L a$ de 96,12 h^{-1} . ◆ Biomassa, * pH, ● O2, ▲ Etanol/Metanol, ■ Glicerol. ↑ Hora da indução. (Tabela 35 do apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 28 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 99,7 g/L e a fase estacionária começou após 40 horas, aproximadamente.

6.11 Décimo-primeiro ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L

O décimo-primeiro cultivo do planejamento fatorial estatístico (número 10* Tabela 4), produziu 28,73 mg/L de anticorpo (Figura 6.11). e foi realizado a 30°C para a fase de crescimento e 20°C para a fase de indução, possuindo 1 % (v/v) de indutor (metanol) com um tempo de indução às 28 horas, 0,5 mL de antiespumante e $k_L a$ 96,12 h^{-1} . Esta indução mostrou produção média de 104,3 g/L de biomassa na fase estacionária e o consumo total do glicerol foi após 24 horas de cultivo (Tabela 36 do apêndice A).

Figura 6.11 - Cultivo do décimo-primeiro ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 10C Tabela 4) da produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada utilizando o novo estoque de trabalho de glicose (B2) em biorreator. As condições de crescimento foram: 30°C para a fase de cultivo, 20°C para a fase de indução, 1% (v/v) de indutor (metanol), 28 horas de tempo da indução e $k_L a$ de 96,12 h^{-1} . ◆ Biomassa, * pH, ● Oxigênio, ▲ Etanol/Metanol, ■ Glicerol. ⬆ Hora da indução. (Tabela 36 do apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 40 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 104,3 g/L e a fase estacionária começou após 40 horas, aproximadamente.

6.12 Décimo-segundo ensaio do planejamento fatorial estatístico em biorreator de 3L

O décimo-segundo cultivo do planejamento fatorial estatístico (número 7 Tabela 4), produziu 22,47 mg/L de anticorpo (Figura 6.12). e foi realizado a 30°C para a fase de crescimento e 30°C para a fase de indução, possuindo 0,5 % (v/v) de indutor (metanol) com um tempo de indução às 32 horas, 0,5 mL de antiespumante e $k_L a$ 96,12 h^{-1} . Esta indução mostrou produção média de 72.4 g/L de biomassa na fase estacionária e o consumo total do glicerol foi após 42 horas de cultivo (Tabela 37 do apêndice A).

Figura 6.12 - Cultivo do décimo segundo ensaio do planejamento fatorial estatístico (número 7 Tabela 4) da produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada utilizando o novo estoque de trabalho de glicose (B2) em biorreator. As condições de crescimento foram: 30°C para a fase de cultivo, 30°C para a fase de indução, 0,5 % (v/v) de indutor (metanol), 32 horas de tempo da indução e $k_L a$ de 96,12 h⁻¹. ◆ Biomassa, * pH, ● Oxigênio, ▲ Etanol/Metanol, ■ Glicerol. ↑ Hora da indução. (Tabela 37 do apêndice A).

O glicerol foi totalmente consumido após 42 horas de cultivo, a máxima concentração celular foi de 72,4 g/L e a fase estacionária começou após 42 horas, aproximadamente.

6.13 ANÁLISE DOS RESULTADOS EM BIORREATOR

Segundo o descrito no item 4,9, a análise dos resultados em biorreator foi similar aos resultados obtidos em *shaker*. Neste caso a concentração de indutor também apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a produção do fragmento de anticorpo scFv. Estes resultados indicam que a concentração de indutor é uma variável importante no estudo da produção de proteínas heterólogas por *P. pastoris* utilizando o promotor AOX. Por outro lado nenhuma das variáveis apresentou interações. Isto demonstrou que ao aumentar a escala de cultivo as variáveis se comportaram de maneira similar.

Figura 6.13 - Estudo dos efeitos mediante o gráfico de Pareto para a produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. Planejamento experimental fatorial completo 2^3 em biorreator de 3L com o estoque de trabalho glicose (B2). As variáveis independentes estudadas foram: Concentração de indutor (metanol 0,5%; 1% e 1,5%); temperatura de indução (10°C; 20°C; e 30°C) e tempo de indução (24h; 28h e 32h). Nesta figura estudam-se as três interações.

É possível observar na figura 6.13 o efeito das variáveis de temperatura, concentração de indutor, e tempo de indução com todas as interações. Segundo o gráfico de Pareto, a única variável que tem efeito sobre a produção do fragmento de anticorpo scFv é a concentração de indutor, que neste caso é negativo. Isto significa que com o aumento na concentração de indutor, a produção de fragmento de anticorpo diminui. Pode-se observar que para nenhuma das outras variáveis o efeito é estatisticamente significativo, assim como também não são significativas nenhuma das interações. Na figura 6.14, nota-se que o efeito das variáveis não tem variação, mesmo quando se inclui menos interações na análise. A interação das três variáveis não foi incluída para fazer a análise estatística.

Figura 6.14 - Estudo dos efeitos mediante o gráfico de Pareto para a produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. Planejamento experimental fatorial completo 2^3 em bioreator de 3L com o estoque de trabalho glicose (B2). As variáveis independentes estudadas foram: Concentração de indutor (metanol 0,5%; 1% e 1,5%); temperatura de indução (10°C; 20°C; e 30°C) e tempo de indução (24h; 28h e 32h). Nesta figura estudam-se duas interações.

Figura 6.15 - Estudo dos efeitos mediante o gráfico de Pareto para a produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. Planejamento experimental fatorial completo 2^3 em bioreator de 3L com o estoque de trabalho glicose (B2). As variáveis independentes estudadas foram: Concentração de indutor (metanol 0,5%; 1% e 1,5%); temperatura de indução (10°C; 20°C; e 30°C) e tempo de indução (24h; 28h e 32h). Nesta figura estudam-se as três variáveis sem interações.

Para esclarecer o efeito apresentado pelas variáveis temperatura, concentração de indutor e tempo de indução, separadamente, sobre a produção do fragmento de anticorpo scFv se fez um estudo sem nenhuma das interações. Pode se observar na figura 6.15 que o efeito da concentração de indutor é estatisticamente significativa, enquanto que as variáveis de temperatura e o tempo de indução não apresentam efeito sobre a produção. Com isso, fica esclarecido que o efeito da concentração de indutor sobre a produção de anticorpo não tem relação com a interação entre as variáveis, mas representa um efeito singular.

Figura 6.16. - Superfície de resposta indicando os efeitos simultâneos das variáveis independentes concentração de indutor (metanol 0,5%; 1% e 1,5%) e temperatura de indução (10°C; 20°C e 30°C), para a produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. Estudo do planejamento experimental fatorial completo 2^3 em shaker com o estoque de trabalho glicose (B2). Com três interações.

Foi construído um gráfico de superfície de resposta (Figura 6.16) em que se pode observar o comportamento na produção do fragmento de anticorpo scFv, comparando as variáveis de temperatura de indução e concentração de indutor. Nesta figura, verifica-se o comportamento de produção com estas variáveis. Uma vez que a temperatura foi estudada com o menor nível (10°C) e foi comparada a produção com os dois níveis de concentração de indutor (1,5%; 0,5% de indutor), a menor concentração de indutor tem efeito positivo na

produção do fragmento de anticorpo. Por outro lado, fazendo uma análise do comportamento da produção quando a temperatura foi testada no seu maior nível (30°C) e o efeito da concentração de indutor em seus dois níveis sobre esta variável, foi observado que a concentração de indutor apresenta o mesmo comportamento anterior. Se comparado o menor nível de concentração de anticorpo (0,5% de indutor) com os dois níveis de temperatura, mesmo tendo um efeito positivo na produção nos dois casos, o efeito da temperatura sobre a concentração de anticorpo é menor em 30°C, quando comparada com 10°C.

Dito isso, o efeito da concentração de indutor tem um comportamento evidentemente negativo na produção do fragmento de anticorpo, o que quer dizer que quanto maior é a concentração de indutor, menor é a produção de anticorpo, dentro dos limites do planejamento, segundo os dados obtidos tanto em biorreactor como os dados obtidos em *shaker*.

Caso se observe o efeito da temperatura em *shaker* (Figura 4.8.16) e biorreator (Figura 6.16), os valores descritos para a resposta de produção do fragmento de anticorpo na variável de 30°C tem desvios maiores comparado com as outras variáveis nos dois casos. Mesmo que a temperatura não tenha tido um efeito estatisticamente significativo com os resultados expostos neste estudo, observa-se que os desvios foram diferentes nas figuras para a condição de 30°C comparado com os outros pontos de estudo. Isto pode ser explicado pelo protocolo de purificação (Diagrama de fluxo purificação do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox Apêndice C), que foi seguido durante a quantificação e armazenamento do fragmento de anticorpo. Como se apresenta no Apêndice C, dentro dos primeiros passos da purificação, encontra-se uma etapa de filtração que consta de três filtrações, em primeiro lugar é necessário que se faça uma filtração com membrana de tamanho de poro 0,8 µm; em segundo lugar uma filtração com membrana de tamanho de poro 0,5 µm; e, por último, uma filtração com membrana de tamanho de poro 0,22 µm.

No entanto, mesmo que o protocolo indique que o volume total de produção deve se filtrar por cada uma destas membranas, o modelo prático comportou-se de maneira diferente para cada um dos cultivos. Os cultivos que foram feitos com temperaturas de produção mais altas (30°C) apresentaram maior dificuldade para o processo de filtração comparado com os cultivos realizados com temperaturas mais baixas. Assim, cultivos que foram realizados

com temperatura de 30°C tiveram que ser filtrados com mais de uma membrana para cada tamanho de poro, já que apresentavam mais entupimentos por volume filtrado.

Então, a produção de anticorpo nesta temperatura pode se tornar um pouco mascarada pela manipulação da amostra, sendo que maiores passos no processo de purificação diminui a porcentagem de recuperação segundo Pessoa (2005); e a troca de membranas com maiores entupimentos causaram a variação da porcentagem. Freyre (2000) apresenta, em seu trabalho, que o processo de purificação de fragmentos de anticorpo pode apresentar perdas de até 70% na etapa de clarificação. É por esta razão que o processo de produção deve dar atenção especial aos processos de purificação, já que temperaturas altas de produção podem gerar a produção de contaminantes, isso origina a mudança do meio de cultivo e dificulta a purificação e a consequente obtenção de biomoléculas, neste caso o fragmento de anticorpo.

Figura 6.17. - Superfície de resposta indicando os efeitos simultâneos das variáveis independentes concentração de indutor (metanol 0,5%; 1% e 1,5%) e tempo de indução (24h; 28h e 32h), para a produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. Estudo do planejamento experimental fatorial completo 2^3 em shaker com o estoque de trabalho glicose (B2). Com três interações.

A superfície de resposta (Figura 6.17) apresenta o efeito das variáveis concentração de indutor e tempo de indução sobre a produção do fragmento de anticorpo scFv. Pode-se observar na figura o efeito negativo que tem altas concentrações do indutor na produção do anticorpo, sendo que o nível mais baixo (0,5% de indutor) mostrou os melhores resultados. Entretanto, mesmo que tenha apresentado uma estatística não-significativa, o tempo de indução gerou um leve incremento na produção, quando a variável foi trabalhada em seu nível mais baixo (24 horas).

Figura 6.18. - Estudo dos efeitos mediante o gráfico de Pareto para a produção de biomassa pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. Planejamento experimental fatorial completo 2^3 em bioreator de 3L com o estoque de trabalho glicose (B2). As variáveis independentes estudadas foram: Concentração de indutor (metanol 0,5%; 1% e 1,5%); temperatura de indução (10°C; 20°C; e 30°C) e tempo de indução (24h; 28h e 32h). Nesta figura estudam-se as três interações.

A análise estatística de Pareto (Figura 6.18) mostra o efeito das variáveis tempo de indução, temperatura de indução e concentração de indutor, com todas as interações. Evidencia-se que nenhuma das variáveis, bem como nenhuma de suas interações, propicia efeito sobre a produção de biomassa.

Tabela 7 - Tabela comparativa de todos os cultivos realizados no planejamento experimental fatorial completo 2^3 para biorreator. As variáveis são: Produtividade global do fragmento de anticorpo scFv anti LDL ox; Rendimento biomassa–produto; Velocidade máxima de crescimento; Tempo de duplicação; Produção final do fragmento de anticorpo scFv ant-LDL oxidada.

Planejamento Estatístico em Biorreator	Produtividade global do fragmento de anticorpo (mg/L h^{-1})	Relação entre produto e biomassa (mg L^{-1} AA/ g L^{-1} célula)	Velocidade máxima de crescimento $\mu \text{X}_{\text{máx}}$	Tempo de duplicação (h)	Concentração do fragmento de anticorpo (mg L^{-1})
Primeiro cultivo	0.144	0.112	0.133	5.18	10.3
Segundo cultivo	0.454	0.313	0.147	4.69	32.7
Terceiro cultivo	0.467	0.539	0.167	4.15	33.6
Quarto cultivo	0.574	0.416	0.154	4.49	41.3
Quinto cultivo	0.426	0.342	0.167	4.13	30.7
Sexto cultivo	0.326	0.303	0.187	3.69	23.4
Sétimo cultivo	0.111	0.115	0.153	4.51	8.0
Oitavo cultivo	0.211	0.229	0.165	4.18	15.2
Nono cultivo	0.502	0.388	0.104	6.65	36.1
Décimo cultivo	0.413	0.300	0.165	4.19	29.7
Décimo primeiro cultivo	0.399	0.278	0.144	4.80	28.7
Décimo segundo cultivo	0.312	0.315	0.159	4.36	22.4

Pode-se observar, na Tabela 7, a comparação de todos os cultivos realizados no planejamento fatorial completo 2^3 para biorreator. A maior produção do fragmento de anticorpo ocorreu no quarto cultivo, sendo que as condições do quarto cultivo foram 30°C para a fase de crescimento, 30°C para a fase de produção, 0,5% de concentração de indutor (metanol) e tempo de indução 24 horas. Neste caso, a produtividade global do fragmento de anticorpo foi de $0.574 \text{ mg/L h}^{-1}$. O tempo de duplicação para todos os cultivos ficou na faixa de 3,69 h e 6,65 h.

7. Análise do efeito entre diferentes fontes de carbono na produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada

Como mostraram os resultados anteriores, diferentes fontes de substrato podem influenciar na produção do fragmento de anticorpo (item 4.2.5), mesmo nas etapas de criopreservação.

Esta etapa do estudo buscou estudar a influência de substratos alternativos como fonte de carbono, sobre a produção do fragmento de anticorpo scFv. Os substratos utilizados para essa parte do estudo foram: glicose, sacarose, glicerol e mistura sacarose/glicose (50%). Para isso, tomou-se como referência o meio de cultivo padrão (item 2.2.2.1), no qual utiliza-se 20g/L de glicerol. Tendo em vista a quantidade de gramas de carbono contidas em 20g de glicerol, foi feito um cálculo no intuito de manter a mesma quantidade de gramas de carbono ao se utilizar essas fontes de carbono alternativas.

As condições de cultivo para todos os ensaios foram o ponto médio dos estudos feitos por análise fatorial completo 2^3 para *shaker* e para biorreator. São elas: 28 horas de indução, 1% de concentração de indutor e 20° C na fase de produção. Utilizou-se PMSF como inibidor de proteases em cada uma das induções. A purificação foi feita de acordo com o protocolo inicial (Apêndice C – Diagrama de fluxo purificação do fragmento do anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris*).

Figura 7.1 – Concentração em mg/L do fragmento scFv produzido pela levedura *P. pastoris*. As variáveis estudadas são as fontes de carbono sacarose, glicose, glicerol e sacarose/glicose (50%) por Análise da variância (ANOVA One way).

Foram avaliadas quatro condições com diferentes fontes de carbono (sacarose, glicose, glicerol e sacarose/glicose 50%) para a produção do fragmento de anticorpo pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada cultivada em *shaker*. A figura 7.1 revela que não existe diferença estatisticamente significativa, com um intervalo de confiança de 95%, na produção do fragmento de anticorpo com os diferentes substratos. Realizar a análise estatística das quatro variáveis conjuntas pode gerar um resultado não tão preciso, visto que existe a possibilidade de mascarar o efeito de cada uma das variáveis, separadamente. Portanto, foram feitas análises separadas, comparando-se todas elas com o glicerol.

Figura 7.2 - Concentração em mg/L do fragmento scFv produzido pela levedura *P. pastoris*. As variáveis estudadas são as fontes de carbono sacarose e glicose por Análise da variância (ANOVA One way).

A comparação entre sacarose e glicose foi a única associação estatisticamente significativa, com um intervalo de confiança de 95%, para a produção do fragmento de anticorpo scFv. As outras associações não foram estatisticamente significativas. Conclui-se que a melhor fonte de carbono para a produção é a sacarose, enquanto a fonte de carbono que apresentou menor produção do anticorpo foi a glicose.

7.1 Análise da purificação do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox por *P.pastoris*

Como se pode observar no item 7 (Análise do efeito entre diferentes fontes de carbono na produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada), a análise da variância (Anova one-way) demonstrou que os resultados não tinham diferenças estatisticamente significativas. Uma das causas atribuídas a esses resultados foi a utilização do protocolo de purificação que tinha sido desenvolvido até este ponto do projeto.

O protocolo de purificação apresentava várias etapas do processo (item 2.3.4. e diagrama de fluxo apêndice C purificação do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox). Segundo Pessoa (2005), a porcentagem de recuperação de uma molécula de interesse é diminuído em cada etapa nos processos de purificação. Segundo os dados oferecidos pela análise fatorial completa 2^3 para *shaker* e biorreator, o efeito da temperatura não foi esclarecido totalmente pela análise. Nesse estudo, observou-se que cultivos realizados com temperaturas de 30°C apresentavam maiores taxas de evaporação (o volume final de cultivo diminuía com uma média de 1600 mL, em biorreator de três litros, com volume efetivo de trabalho de 2L, em que 200mL são atribuídos para as amostras coletadas). Como consequência disso, os componentes se tornaram mais concentrados, modificando as condições físicas e deixando o meio de cultivo mais viscoso.

Estas condições influenciaram no momento da purificação fazendo com que os meios de cultivo realizados com temperatura de 30°C tivessem que utilizar mais de uma membrana em cada passo no momento da clarificação (item 2.3.4. e diagrama de fluxo apêndice C - purificação do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox). Assim, esses cultivos apresentavam maiores perdas da molécula-alvo.

Para visualizar melhor o efeito da temperatura na purificação do anticorpo, foram realizados dois cultivos com as mesmas condições de indutor (0,5%) e tempo de indução (24h), e foi avaliada a temperatura em 10°C e 30°C. O volume de meio de cultivo estudado foi de 250 mL. A produção foi finalizada após 96 horas de cultivo.

Os resultados obtidos foram os seguintes: para o cultivo realizado em 30°C obteve-se produção de fragmento de anticorpo igual a 85 mg/L, quando o meio de cultivo foi analisado sem passar pelas membranas na etapa da clarificação. Quando o mesmo meio de cultivo foi filtrado com todas as membranas, a quantificação final de anticorpo foi de 14,4 mg/L. Este estudo indicou que a perda total do fragmento de anticorpo, após o meio de cultivo ser filtrado com as membranas na etapa da clarificação, foi de 83%.

Com o cultivo realizado em 10°C, obteve-se produção do fragmento de anticorpo igual a 73,2 mg/L, quando o meio não foi filtrado. Quando o mesmo meio de cultivo foi filtrado com todas as membranas, a quantificação final de

anticorpo foi de 19,2 mg/L. Este estudo indicou que a perda total do fragmento de anticorpo, após o meio de cultivo ser filtrado com as membranas na etapa da clarificação, foi de 73,7%.

Conclui-se, com estes resultados, que a perda do fragmento de anticorpo médio entre os dois cultivos foi de 78,4%, quando os cultivos foram filtrados com membranas na fase de clarificação. Por outro lado, a diferença entre as duas produções foi de 13,2% ao serem comparadas as quantificações que não foram filtradas. Neste caso, a maior produção foi obtida com o cultivo realizado em 30°C. Quando foram comparadas as quantificações dos cultivos que foram filtrados, a diferença foi de 25%, sendo a maior quantificação a do cultivo realizado em 10°C.

Conclui-se, ainda, que mesmo que o cultivo realizado em 30°C tenha apresentado mais produção do fragmento de anticorpo, também apresentou maior perda do fragmento de anticorpo no processo de clarificação, tornando a produção realizada em 10°C a mais produtiva. Estes resultados confirmaram a hipótese de que o protocolo de purificação (item 2.3.4. e diagrama de fluxo apêndice C purificação do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox) tem influência na resolução dos dados. Optou-se por excluir do protocolo de purificação todas as membranas, visto que elas se mostraram desnecessárias para a quantificação do fragmento de anticorpo scFv anti-LDL-ox.

Foi decidido fazer uma análise do processo de concentração, para isso foram feitas diluições seriadas de uma solução contendo água e concentrações conhecidas de albumina. Essas diluições foram comparadas antes e depois de serem concentradas com tubos de *vivespin* 10kd, todas essas análises foram feitas por triplicata e analisadas pela técnica de BCA.

Tabela 8 Comparação das diluições seriadas de albumina analisadas pela técnica de BCA. Antes e depois de serem concentradas com tubos de *vivespin* 10kd.

µg/mL	1000	800	600	400	200
Água/Albumina Antes	981,777	796,922	602,644	388,499	160,041
Água/Albumina Depois	783,157	684,18	512,661	334,415	119,176
Porcentagem de perda (%)	20,2	14,1	14,9	13,9	25,5

Figura 7.3 – Comparação da quantificação de concentrações conhecidas de albumina pela técnica de BCA antes e depois do processo de concentração. No eixo Y concentrações teóricas, no eixo X concentrações obtidas experimentalmente. ◆ Antes da concentração (1), ■ Depois da concentração (2).

Pode-se observar, na figura 7.3, que depois da concentração com os tubos de *vivospin* 10kd a concentração de albumina quantificada pela técnica de BCA teve um decréscimo, quando comparado com os valores obtidos experimentalmente antes de ser concentrada nesses tubos. Os valores obtidos experimentalmente podem ser observados mais detalhadamente na Tabela 8. Para os cálculos obtidos experimentalmente antes do processo de concentração, obteve-se um erro estimado total de 5,32%, porém a equação linear da reta apresentou um $R^2 = 0,998$. Esses valores foram comparados com os valores obtidos experimentalmente depois do processo de concentração. Neste caso, obteve-se diminuição dos valores para cada uma das diluições feitas (Tabela 8) demonstrando a perda da proteína em todas as diluições realizadas, com valores entre 14% e 25% da proteína testada experimentalmente.

Após ter efetuado os estudos para melhorar o processo de purificação, foi estudado o processo de quantificação. Para isso, utilizaram-se duas metodologias de análise. A metodologia de *Lowry* e a quantificação pela técnica

de BCA, técnicas que identificam proteínas totais. Elas foram testadas para demonstrar se tinham diferenças entre elas.

Foram realizados dois cultivos com diferentes condições de produção, em que foram aplicadas as técnicas mencionadas acima. O primeiro deles apresentou 6,4 mg/L pelo método de *Lowry* e de 5,9 mg/L pela metodologia de BCA. O segundo cultivo apresentou 16,2 mg/L pela metodologia de *Lowry* e 16 mg/L pela metodologia de BCA. Nota-se que as quantificações por BCA se mostraram, nos dois resultados, abaixo do resultado obtido por *Lowry* apresentando uma porcentagem de erro entre os dois ensaios de 7,8%. Este resultado apresenta o erro intrínseco das técnicas somado ao erro experimental que não foi contemplado neste estudo.

Na sequência, desejava-se detalhar qual porcentagem do fragmento de anticorpo que referia à quantificação de proteínas totais. Com essa finalidade, foram desenvolvidos géis de poliacrilamida a 12% para proteínas, que foram analisados com o auxílio do programa *ImageJ*. O programa *imageJ* é uma ferramenta digital encontrada gratuitamente na rede de internet e pode ser utilizada para a análise de diversas fotografias. Sua principal vantagem é propiciar a análise específica para géis de agarose ou de poliacrilamida, aportando por meio do seu sistema a área embaixo da curva de maneira fácil e rápida. O propósito de se utilizar esta ferramenta analítica foi o de minimizar o erro na quantificação por proteínas totais com os métodos de *Lowry* e BCA, apontando um fator a mais de discussão e novos dados na pesquisa.

Figura 7.4 – Fotografia tirada de um gel de poliácridamida preparado ao 12%, poço 1- Padrão de massa molar; poço 2- produto de purificação por cromatografia de afinidade com a resina 6 *fast flow*, de um dos cultivos realizados no estudo; a coração foi realizada com azul de *Comassie*.

A figura 7.4 apresenta, no poço 2, o produto da purificação de um dos cultivos realizados no estudo. No poço 1, pode-se observar o padrão de massa molar. Como se apresenta nesta figura, o poço 2 (delimitado com a linha amarela) tem três bandas que evidenciam proteínas de distintas massas molares. Na parte de baixo, no círculo vermelho, foram visualizadas duas bandas pouco definidas que poderiam ser pequenas proteínas contaminantes ou pequenos restos do corante. No entanto, estas hipóteses não estão muito claras ainda. Mesmo assim, o problema da quantificação de proteínas totais é que não apresentam uma quantidade real da proteína de interesse. Alguns autores, como Nieba Lars et al. (1997); Verma, et al. (1998) afirmam, nos seus trabalhos, que fragmentos de anticorpos podem sofrer alterações como formação de agregados ou super glicosilação. Segundo Allende (2007), essas alterações foram descritas em *P.pastoris* e *Sacharomyces cereviseae*, sendo que a levedura *P. pastoris* apresenta menor glicosilação que *Sacharomyces cereviseae*. Também tem sido comprovado que distintos níveis de glicosilação oferecem distintas massas molares quando foram estudadas em géis de poliácridamida. A hipótese que foi proposta para este estudo foi que as três bandas que aparecem na parte de cima poderiam ser: a primeira delas o

fragmento de anticorpo scFv anti LDL oxidada que foi marcada com a caixa indicativa de 28 kd. As outras bandas poderiam ser o fragmento de anticorpo com distintos níveis de glicosilação. Para as bandas marcadas com o círculo vermelho ainda não se tem claro se são restos proteicos ou simplesmente restos do corante. Narendar e Hoffmann (2005) propõem que podem haver impurezas do produto, possivelmente geradas pela ação de proteases, e que foram retidas na coluna durante a purificação. Por esse motivo não se tem certeza se essas bandas interferem com a leitura em 280 nm.

Quando foram estudadas as bandas marcadas com o círculo vermelho e foram comparadas com as bandas do padrão de massa molar, estimou-se que tinham similaridade com as duas últimas bandas do padrão de massa molar delimitadas com o círculo azul. Como se observa na figura 8.3, as bandas delimitadas com o círculo vermelho são maiores se comparadas com as delimitadas com o círculo azul, além disso, entre o poço 1 e o poço 2 existe um poço vazio sem marcar. Estas observações indicam que estas bandas não foram produto do espalhamento ou da possível contaminação das amostras. Com o levantamento desses dados foi realizado a análise com o programa *imageJ*.

Figura 7.5 – Análise 3D do poço 2- produto de purificação por cromatografia de afinidade com a resina 6 *fast flow*, de um cultivo realizado no estudo; a coração foi realizada com azul de *Comassie*. (Nesta figura pode-se observar a análise 3D referente às bandas delimitadas com o quadrado amarelo na figura 7.3).

Figura 7.6 – Análise 3D do poço 2- produto de purificação por cromatografia de afinidade com a resina 6 *fast flow*, de um cultivo realizado no estudo; a coração foi realizada com azul de *Comassie*. (Nesta figura pode-se observar o análise 3D referente às bandas delimitadas com o quadrado amarelo na figura 8.3).

As figuras 7.5 e 7.6 apresentam a análise 3D para o poço 2 delimitado com o quadrado amarelo, na figura 7.3. A primeira parte da análise foi feita para observar, detalhadamente, as variações estimadas pelo programa com respeito à intensidade das bandas. Assim, foi confeccionado o mapa geral das variações do gel. A figura 7.5 apresentou uma análise global do gel, no momento em que ele foi trabalhado e analisado. Nota a visualização de cada um dos picos de intensidade referentes as bandas coradas com azul de *Comassie* (figura 7.6).

Pode-se observar, na figura 7.6, no eixo **Y**, os valores de: 200 marcado com o retângulo vermelho; 250 marcado com o retângulo laranja e 350 marcado com o retângulo verde, os picos referentes às três bandas obtidas no gel de poliacrilamida. Foi concluído que, segundo a massa molar das bandas, o retângulo vermelho poderia corresponder a conglomerados do fragmento de anticorpo, como descrito por Nieba Lars et al. (1997) e por Verma, et al. (1998); e o retângulo laranja corresponde ao fragmento de anticopro scFv anti LDL-oxidada com diferentes estados de glicosilação. Deve-se esclarecer que o que foi anteriormente mencionado é apenas uma hipótese baseada em resultados realizados por pesquisas anteriores ao nosso estudo. Segundo Allende (2007), para obter respostas mais profundas deve-se realizar outros estudos que não foram contemplados neste trabalho. A partir desta análise, foi feita a análise quantitativa do anticorpo utilizando as ferramentas oferecidas pelo programa *imageJ*.

Figura 7.7 – Análise quantitativo do poço 2 - produto de purificação por cromatografia de afinidade com a resina 6 *fast flow*, de um dos cultivos realizados no estudo; a coração foi realizada com azul de *Comassie*. (Nesta figura pode-se observar o análise quantitativo referente as bandas delimitadas com o cuadrado amarelo na figura 8.3).

O passo seguinte, realizado para fazer a análise quantitativa pode ser observado na figura 7.7. Nessa figura, foi calculada a área de cada um dos picos anteriormente estudados com a ferramenta 3D (figuras 7.5 e 7.6). A quantificação da área é subjetiva para cada pessoa. No processo do fechamento de cada um dos picos, o pesquisador faz manualmente e de maneira visual e intuitiva esse procedimento. Esse erro é próprio desta técnica de quantificação e o estudo estatístico de reprodutibilidade não foi contemplado neste estudo. Porém, mesmo apresentando o erro descrito anteriormente, o programa apresenta-se como uma ótima ferramenta para conseguir resultados mais reais, quando comparado com a quantificação de proteínas totais.

Como pode-se observar na figura 7.7, o cálculo das áreas foi: o primeiro pico (1) correspondente ao retângulo vermelho na figura 7.6 e ao número 1 da figura 7.7, correspondente a fragmentos de anticorpo que formaram agregados segundo Nieba Lars et al. (1997) e Verma, et al. (1998). Este resultado fornece uma análise da área com valor de 658,385, correspondente ao 3,2% da área total quando são somadas às áreas dos três picos.

Posteriormente foi feita a análise para o segundo pico que se refere ao retângulo laranja da figura 7,6. Neste caso, segundo Allende (2007), a sobre-manosilação é menos frequente em leveduras metilotróficas como *P.pastoris*. A

presença de duas bandas pode indicar, neste caso, os fragmentos de anticorpo que foram sobre-manosados e os que não foram. Para esta análise, foram quantificadas as duas bandas. Este resultado fornece uma análise da área com valor de 7244,811 correspondente aos 35,2% da área total quando são somadas as áreas dos três picos.

Finalmente, foi feita a análise para o terceiro pico que se refere ao retângulo verde da figura 7,6. A presença de duas bandas indica que existe algum interferente e, neste caso, não se sabe com certeza sua identidade exata mas, possivelmente se trata de pequenas proteínas que ficaram ligadas na resina. Para esta análise foram quantificadas juntas bandas assumindo que as duas são o fragmento de anticorpo. Este resultado fornece uma análise da área com valor de 12631,853 correspondente aos 61,5%, da área total quando são somadas as áreas dos três picos.

Como considerações finais deste estudo coloca-se que a utilização de diferentes membranas na etapa de clarificação incrementam a perda do fragmento de anticorpo scFv resultando em baixas produções. Concluiu-se que a utilização destas membranas não era necessária para a quantificação. O estudo de concentração no *vivespin* também ofereceu resultados de perda do anticorpo. Decidiu-se, neste caso, também que a concentração com *vivespin* não era necessária para a quantificação. Por outro lado, a metodologia de quantificação realizada durante todo o estudo, ocorreu por meio de proteínas totais e Dot-blot, que consiste em uma técnica que não é quantitativa, mas que proporciona dados sobre a atividade específica do fragmento de anticorpo. Porém, estas metodologias mostram alguns erros que podem ser visualizados com a utilização de ferramentas como o SDS-PAGE e o programa *imageJ*.

Outras técnicas poderiam ser utilizadas em estudos posteriores como a quantificação por densitometria descrita por Solís (2005), ou a transferencia de proteínas por membrana de nitrocelulose descrita por Meza-Herrera et al. (2004). Estas técnicas poderiam descobrir novos resultados aportando novas informações e com maior grau de detalhes. O desenvolvimento de uma técnica que seja quantitativa e que demonstre atividade do fragmento de anticorpo como o ELISA deve ser incluída em próximos estudos. O desenvolvimento de processos de purificação integrativos é necessário para a obtenção de produtos

biotecnológicos, e para diminuir perdas destes produtos em cada uma das etapas do processo.

O ideal seria trocar o protocolo inicial de purificação só na etapa de quantificação e centrifugar 1957 xg por 30 min /T_{4°C}) 5 mL de cultivo. Não se deve concentrar a amostra em filtro 10kd (vivespin). Deve-se adicionar diretamente na coluna esses 5mL de meio de cultivo de produção do fragmento de anticorpo scFv e seguir o protocolo sugerido no item 3.3.4.1. Deve-se realizar um gel de poliacrilamida 12% para a análise das amostras.

7.2 Análise do efeito entre diferentes fontes de carbono na produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada. Utilizando o protocolo melhorado de purificação.

Segundo o estudo apresentado no item 7, os resultados não apresentaban diferenças estatisticamente significativas, e esses resultados foram atribuídos ao protocolo de purificação. Então, foi realizado um estudo igual ao descrito no item 7. Neste estudo, particularmente, foi trocado o protocolo de purificação inicial pelo protocolo de purificação descrito no item 7.1.

Figura 7.8- Concentração mg/L do fragmento scFv produzido pela levedura *P. pastoris*. As variáveis estudadas são as fontes de carbono sacarose, glicose, glicerol e sacarose/glicose (50%) por Análise da variância (ANOVA One way). As análises foram feitas com o protocolo de purificação descrito no item 7.1.

Como se observa na figura 7.8 a análise da variância demonstrou que todas as variáveis tinham diferenças estatisticamente significativas diferente ao estudo realizado no item 7, figura 7,1. Este resultado demonstra que os protocolos de purificação para a quantificação do fragmento de anticorpo scFv são diferentes e apresentaram diferentes conclusões em suas respectivas análises. Assim, o protocolo que tem menos etapas diminui o erro dos ensaios

e os efeitos gerados pelas variáveis sobre a produção podem ser visualizados mais claramente.

Neste estudo, pode-se observar como a maior produção do fragmento de anticorpo foi atingida quando foi utilizada a sacarose como única fonte de carbono, com concentração média de 93,7 mg/L de scFv. A menor produção de anticorpo foi atingida quando a glicose foi utilizada como única fonte de carbono, com concentração média de 63,3 mg/L de scFv, que diminuiu a produção em 31%, aproximadamente. Por outro lado, quando foi utilizada a mistura 50/50 dessas duas fontes de carbono, a produção de anticorpo diminuiu em 12%, aproximadamente, obtendo uma produção do fragmento de anticorpo com concentração média de 82,3 mg/L. Quando foi utilizado o glicerol que é a fonte de carbono utilizada no meio de cultivo padrão, foi obtida uma concentração de 72,7 mg/L de scFv, com isso, foi obtida a diminuição na produção do fragmento de anticorpo em 22,6%, aproximadamente, quando foi comparada com a máxima produção conseguida com a sacarose.

Segundo o proposto por Allende (2007), existem diferentes estudos mostrando como a indução pelo promotor AOX é influenciada pelo substrato de crescimento e cultivo das leveduras. Substratos como xilose, ribose ou sorbitol apresentaram atividade específica de AOX1, com valores próximos a 60%, quando comparada com metanol. Também foi mostrado por este estudo que quando os cultivos foram realizados com glicerol como fonte de carbono, a atividade de AOX não foi detectada, porém outros estudos indicam que o glicerol não reprime o sistema, ao passo que a glicose e o etanol mostraram a repressão do promotor (POUTOU, et al., 2005).

Conclui-se que as melhores fontes de carbono a serem utilizadas para a produção do fragmento de anticorpo scFv são a sacarose, em primeiro lugar, a mistura sacarose glicose, em segundo lugar, e o glicerol em terceiro lugar.

Não se deve utilizar glicose como fonte de carbono para a produção do fragmento de anticorpo scFv, esta fonte de carbono demonstrou ter as produções mais baixas em todos os testes realizados no estudo.

8. Análise do tamanho da levedura *P. pastoris* cultivada em diferentes fontes de carbono e sua relação com a produção do fragmento de anticorpo scFv anti LDL-ox

Um dos propósitos da indústria é baixar custos na produção de produtos biotecnológicos. A utilização de distintos substratos como fonte de carbono para a obtenção de biomassa e de subprodutos é um dos estudos que são realizados geralmente para otimizar os rendimentos de produção. O propósito deste estudo foi correlacionar o tamanho da levedura *P.pastoris*, cultivada em diferentes fontes de carbono, e a produção do fragmento de anticorpo, visando à produção com meios alternativos.

Em geral, as células eucarióticas experimentam diferentes mudanças, quando são expostas a diversas condições ambientais. Essas condições podem promover a síntese e/ou a degradação de proteínas e de organelas. A levedura *P. pastoris* é considerada metilotrófica, condição que significa que essa levedura pode crescer utilizando o metanol como única fonte de carbono. Para poder utilizar o metanol, a levedura tem que produzir enzimas no citosol e nos peroxissomas (YUAN, et al., 1997).

Quando as leveduras estão se adaptando à diferentes fontes de carbono, elas apresentam diferentes mecanismos para desenvolver ou degradar algumas organelas. Autores tem postulado que quando estas leveduras experimentam uma troca de substrato como, por exemplo, de metanol para glicose ou para etanol, os peroxissomas são rápida e seletivamente degradados. Tem-se reportado que em *Hansenula polymorfa* os peroxissomas são degradados por um processo análogo à macroautofagia. Alguns estudos demonstraram morfológica, bioquímica e geneticamente a degradação de peroxissomas em *P. pastoris* quando a levedura experimentou mudanças de substrato (YUAN, et al., 1997).

Os peroxissomas são organelas próprias de células eucarióticas, que possuem uma membrana simples e podem variar em quantidade, o conteúdo enzimático, ou variar consideravelmente de tamanho. Essas variações se

relacionam com o tipo de organismo, o tipo de célula e as condições ambientais (POUTOU, et al., 2005).

Figura 8.1 - Microscopia da levedura *P. pastoris* cultivada em diferentes fontes de carbono.

Ao realizar os estudos de produção do fragmento do anticorpo em diferentes fontes de carbono, tornou-se necessário realizar a análise de pureza para cada uma delas, o que evidenciou que, durante o processo, as leveduras apresentavam diferentes tamanhos entre uma fonte e outra. Essa divergência de tamanhos poderia ser atribuída às mudanças estruturais da levedura *P. pastoris*, quando ela é cultivada em diferentes fontes de carbono como subtrato, conforme o que foi proposto, inicialmente, neste item.

Para constatar essas diferenças foi feita uma análise de variância (ANOVA one way) com um *n* de 30 observações, com auxílio da coloração de Gram. As observações foram feitas no microscópio do laboratório de ecologia de micro-organismos do instituto oceanográfico-USP (Olympus BX60), mantendo sempre o mesmo aumento e com a mesma intensidade luminosa.

Figura 8.2 – Tamanho (diâmetro μm) da levedura *P. pastoris* em função da fonte de carbono para a produção do fragmento scFv. As variáveis estudadas são as fontes de carbono sacarose, glicose, glicerol e sacarose/glicose (50%). Por Análise da variância (ANOVA One way).

A figura 8.2 expõe o efeito gerado no tamanho das células a partir das quatro fontes de carbono (sacarose, glicose, glicerol e sacarose/glicose-50%). Evidencia-se que pelo menos uma das quatro apresenta diferença estatisticamente significativa, com um intervalo de confiança de 95%. Na figura observa-se também que os valores de produção apresentados pela glicose são diferentes quando comparados com as demais fontes de carbono. Isso quer dizer que a glicose apresenta diferença estatisticamente significativa quando comparada a todas as outras fontes de carbono.

Figura 8.3 - Tamanho (diâmetro μm) da levedura *P. pastoris* em função da fonte de carbono para a produção do fragmento scFv. As variáveis estudadas são as fontes de carbono glicerol e sacarose/glicose (50%). Por Análise da variância (ANOVA One way).

Para que não houvesse interferências na análise em decorrência do resultado apresentado pela glicose, foi feita a análise de maneira individual. A figura 8.3 mostra que quando se compara o glicerol com a mistura, o resultado apresenta diferença estatisticamente significativa, com um intervalo de confiança de 95%, para o efeito gerado no tamanho das células a partir das fontes de carbono glicerol e mistura. Neste caso o glicerol apresenta menor tamanho de célula quando comparado com a mistura, sendo que a mistura apresentou maior produção do fragmento de anticorpo (figura 7,8).

Figura 8.4 - Tamanho (diâmetro μm) da levedura *P. pastoris* em função da fonte de carbono para a produção do fragmento scFv. As variáveis estudadas são as fontes de carbono sacarose e mistura sacarose/glicose (50%). Por Análise da variância (ANOVA One way).

A análise do efeito gerado no tamanho da levedura pelos substratos sacarose e mistura não apresentou diferença estatisticamente significativa, com um intervalo de confiança de 95%. Esse efeito pode ser observado na figura 8.4. Neste caso a sacarose não apresentou diferença na produção de anticorpo quando foi comparada com a mistura.

Figura 8.5 - Tamanho (diâmetro μm) da levedura *P. pastoris* em função da fonte de carbono para a produção do fragmento scFv. As variáveis estudadas são as fontes de carbono sacarose e glicerol. Por Análise da variância (ANOVA One way).

A análise do efeito gerado no tamanho da levedura pelos substratos sacarose e glicerol não apresentou diferença estatisticamente significativa, com um intervalo de confiança de 95%. Esse efeito pode ser observado na figura 8.5.

Figura 8.6 - Tamanho (diâmetro µm) da levedura *P. pastoris* em função da fonte de carbono para a produção do fragmento scFv. As variáveis estudadas são as fontes de carbono sacarose, glicerol e sacarose/glicose (50%). Por Análise da variância (ANOVA One way).

Quando foram analisadas as três variáveis (sacarose, glicerol e glicose/sacarose-50%), constatou-se que ao menos uma das variáveis apresentava diferença estatisticamente significativa, com um intervalo de confiança de 95% (Figura 8.8). Neste caso, pode-se observar que a mistura é diferente quando comparada com o glicerol. Por outro lado, glicerol e sacarose não apresentam diferenças segundo a figura 8,6.

Quando se comparou os efeitos do estudo com os efeitos obtidos na análise 7.2, verificou-se que a levedura apresenta diferentes tamanhos quando é cultivada em distintos substratos. Esses tamanhos podem ser relacionados com a produção do fragmento de anticorpo. A análise mostrou que tamanhos de levedura que estão na faixa entre 0,502 µm e 0,895 µm obtiveram a mais alta produção do fragmento de anticorpo. Estas leveduras foram cultivadas com glicerol, sacarose e mistura sacarose e glicose 50/50.

A mistura de glicose com sacarose mostrou efeito sobre as leveduras, ocasionando o aumento de tamanho, quando comparadas com o cultivo feito em sacarose, e diminuindo a produção do fragmento de anticorpo. Por outro lado, a glicose foi o substrato que proporcionou a menor produção de anticorpo,

mas, quando foi misturada com a sacarose 50/50 apresentou produção do fragmento de anticorpo ainda maior que a obtida com glicerol, além a levedura apresentar menor tamanho quando comparada com o cultivo realizado com glicose como fonte de carbono. Estes resultados indicam que a mistura de um substrato com a sacarose pode ser uma boa ferramenta para aumentar a produção e pode-se observar ainda que a levedura também diminuiu o tamanho quando a produção foi aumentava.

Por outro lado, as leveduras cultivadas com glicose apresentaram maior tamanho e menor produção. A análise demonstra que estas leveduras se encontravam com diâmetro entre 0,972 μm e 1,329 μm . Estes resultados mostraram que o tamanho da célula tinha relação com a produção do fragmento de anticorpo.

A primeira hipótese é sobre o tamanho apresentado pela levedura cultivada em diferentes fontes de carbono. Esta hipótese pode ser direcionada com a relação área-volume existente entre os diferentes tamanhos da levedura. Assim, uma levedura que é cultivada com uma fonte de carbono energeticamente mais eficiente como a glicose, não precisa ter uma relação área volume pequena, devido ao fato de que os nutrientes que entram são facilmente assimilados e aportam valores energéticos altos, a levedura consegue manter bioquímica e fisiologicamente um volume maior. Este fenômeno é diferente em leveduras cultivadas com uma fonte de carbono mais complexa como, por exemplo, o glicerol cujo valor energético a ser assimilado é menor (2ATP para a glicose; 1ATP para o Glicerol), essa diferença energética conferiria à levedura cultivada em glicose a capacidade de manter estruturas morfológicamente maiores (tamanhos).

Figura 8.7 – Raio da levedura em função da fonte de carbono. Relação da área com respeito ao volume para as células cultivadas em (A) Glicose e (B) Glicerol.

Como se pode observar no exemplo anterior (Figura 8.7), a relação entre área e volume para a levedura cultivada em glicose é de $5,33 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$, por outro lado, a relação entre área e volume para a levedura cultivada em glicerol foi de $8,50 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$. Nota-se que a relação área/volume para a célula cultivada em glicerol é maior. Isso poderia indicar que ao se cultivar a levedura em uma fonte de carbono mais difícil de degradar e que aporta baixos valores

energéticos, como o glicerol, ela tem que aumentar a área de contato com o meio.

A segunda hipótese diz respeito à produção do fragmento de anticorpo. Neste caso, os resultados indicam que a produção do scFv pode ser pré-visualizada microscopicamente conseguindo ficar em um tamanho de célula que não supere os 0,895 μm . Esses tamanhos podem ser atingidos utilizando misturas de substratos como por exemplo a sacarose. As adaptações feitas pela levedura quando as condições ambientais mudam (fonte de carbono) tem sido descritas em alguns trabalhos, porém, as os resultados são direcionados aos processos de autofagia que, geralmente, envolve organelas como peroxissomas. Nestes trabalhos, o tamanho da levedura não é colocado como um objetivo.

Segundo Guan (2001), quando a levedura é cultivada em metanol, e após um tempo a fonte de carbono é trocada pela glicose ou pelo etanol, os peroxissomas são rapidamente degradados. Segundo Poutou (2005), estudos tem provado que algumas fontes de carbono tem prioridade para serem utilizadas pela levedura *P. pastoris* na seguinte ordem: glicerol > etanol > acetato > metanol.

Esses resultados podem indicar que as mudanças fisiológicas apresentadas pela levedura, quando a fonte de carbono é trocada, poderiam resultar em diferenças morfológicas, e essas modificações poderiam ter influência no tamanho da célula. Por outro lado, essas transformações fisiológicas poderiam estar estreitamente vinculadas com a prioridade dos micro-organismos em utilizar ou não, mais eficientemente diferentes fontes de carbono. Assim, a interface de adaptação de uma fonte de carbono para outra pode resultar mais difícil em alguns casos (glicose-metanol) como foi observado por meio dos resultados que foram obtidos.

Finalmente, esses resultados apresentam duas hipóteses sobre a razão da diferença de tamanho da célula. Além disso, os resultados obtidos por respostas até agora na literatura são escassos. No entanto, os resultados obtidos experimentalmente indicam que as fontes de carbono que apresentaram a maior produção, apresentaram também os menores tamanhos de célula, antes da indução com metanol e isso se pode afirmar estatisticamente com intervalo de confiança de 95%.

9. Produção do fragmento de anticorpo scFv a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio

Durante toda a fase produção, descrita anteriormente, utilizou-se o meio de cultivo BMGY. Este meio tem sido empregado para o cultivo de *P. pastoris*, visando à produção de proteínas heterólogas. O meio de cultivo possui componentes como o extrato de levedura, peptona de caseína, ou casaminoácidos, os quais oferecem nitrogênio e parte do carbono, para o crescimento e a produção de biocompostos pelos micro-organismos.

A peptona de caseína e os casaminoácidos são fornecidos por empresas reconhecidas que produzem estes insumos, no entanto, o alto custo destes produtos tem impulsionado nosso grupo de pesquisa para encontrar fontes alternativas que possam substituir as demandas de carbono e nitrogênio para a produção de produtos biotecnológicos. Nesse contexto, o objetivo dessa etapa do estudo foi avaliar a substituição da peptona de caseína e do casaminoácidos por farelo de arroz e farelo de trigo, na tentativa de diminuir custos gerados pelo processo produtivo.

Tabela 9. - Composição dos elementos hidrogênio, carbono e nitrogênio para os componentes a serem avaliados na produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris*.

Componente analisado	% de hidrogênio	% de carbono	% de nitrogênio
Farelo de trigo	6,14	41,68	2,23
Farelo de arroz	6,96	44,29	2,08
Peptona de Caseína	6,51	44,34	16,01
Casaminoácidos	5,76	33,10	10,15

Para este estudo se realizou a análise de hidrogênio, carbono e nitrogênio para cada um dos componentes a serem avaliados, conforme a Tabela 9, com o intuito de manter a relação carbono/nitrogênio dos cultivos feitos com o meio BMGY. Realizaram-se os cálculos para cada um dos

experimentos tomando como referência a porcentagem de carbono de cada composto, e o restante de nitrogênio foi suplementado com sulfato de amônio para manter sempre constante a relação carbono/nitrogênio em todos os experimentos.

Figura 9.1 - Diagrama de estudo do crescimento da levedura *P. pastoris* confrontando o logaritmo das unidades formadoras de colônia com o tempo. Apresenta-se, na Tabela, a hora 0 ■; hora 28 ■; hora 100 ■; da fonte de carbono e nitrogênio alternativa sobre fonte de carbono e nitrogênio com as substituições.

Observa-se, na figura 9.1, que a levedura atingiu, após 28 horas de cultivo, um crescimento celular acima de 10 unidades logarítmicas. Isso indica que, quando se realiza a comparação com o meio de cultivo base BMGY (Apêndice C – Diagrama de fluxo: produção dos estoques novos da levedura *P. pastoris*/B1-glicerol e B2-glicose), existe uma diminuição de 2 unidades logarítmicas. Porém, após 100 horas de cultivo, a levedura mostra um crescimento na faixa das 12 unidades logarítmicas, se aproximando dos cultivos feitos no meio BMGY que apresentaram crescimentos similares. Pode-se concluir que o farelo de arroz e o farelo de trigo são substratos viáveis para a obtenção de biomassa pela levedura, em substituição à peptona de caseína e ao casaminoácidos.

Segundo os resultados obtidos, a troca da peptona de caseína e do casaminoácidos pelo farelo de trigo proporciona um leve incremento na produção da biomassa, quando comparado com o farelo de arroz. Entretanto, o incremento não superou uma (1) unidade logarítmica.

Figura 9.2 - Análise de pureza e contagem das colônias da levedura *P. pastoris*, produtora do fragmento de anticorpo scFv, anti-LDL oxidada, em meio YPD, dos cultivos feitos com farelo de trigo e farelo de arroz como substratos alternativos.

A prova de pureza para todos os cultivos deste estudo (figura 9.2) e a contagem das colônias foram feitas na hora 0, na hora 28 e na hora 100 de cultivo, conforme ilustrado na figura 9.1. A pureza do cultivo foi uma variável difícil de controlar durante o processo de produção, visto que os cultivos eram facilmente contaminados com micro-organismos diferentes à levedura. Para evitar as possíveis contaminações, o modo de esterilização dos farelos foi rigorosamente acompanhado. O procedimento de esterilização em autoclave (121°C) foi feito três vezes consecutivas, com espaço de 24 horas, para cada tipo de farelo, antes de iniciar o processo de produção.

As condições de cultivo para todos os ensaios foram o ponto médio dos estudos feitos por análise fatorial completo 2^3 para *shaker* e para biorreator. São elas: 28 horas de indução, 1% de concentração de indutor e 20° C na fase de produção. Utilizou-se PMSF como inibidor de proteases em cada uma das induções. A purificação foi feita de acordo com o protocolo inicial (Apêndice C – Diagrama de fluxo purificação do fragmento do anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris*) (sem as modificações do item 7).

Figura 9.3 - Análise da variância (ANOVA One way) para a produção do fragmento scFv pela levedura *P. pastoris*. As variáveis estudadas são a troca de casaminoácidos e peptona de caseína pelos farelos de arroz e de trigo.

A figura 9.3 apresenta a variação dos resultados da produção do fragmento de anticorpo para cada um dos substratos utilizados no estudo. Nota-se que todas as variáveis apresentam diferenças estatisticamente significativas com um intervalo de confiança de 95%. Isto evidencia, que a inclusão de substratos alternativos é uma opção de substituição viável para a produção do anticorpo.

A figura 9.3 revela que o melhor substrato alternativo para a produção do fragmento de anticorpo scFv é o farelo de trigo, visto que ele apresentou o menor custo e a maior produção (o dobro) do fragmento de anticorpo, a concentração produzida foi de 27,9 mg/L de scFv quando foi trocado pelo casaminoácidos. Quando o farelo de trigo foi trocado pela peptona de caseína, proporcionou concentração de scFv de 10,34 mg/L. Por outro lado, quando o farelo de arroz foi trocado pelo casaminoácidos apresentou concentração de scFv de 24,31 mg/L, assim, quando o farelo de arroz foi trocado pela peptona de caseína, apresentou concentração de 13,35 mg/L. Conclui se que nos dois casos a substituição do casaminoácidos incrementou a produção do scFv, e que a menor produção atingida foi na presença de farelo de trigo em substituição da peptona de caseína.

10. Produção de fragmento de anticorpo scFv a partir de diferentes condições de k_{La}

O estudo da produção do fragmento de anticorpo por *P. pastoris* com distintos valores de k_{La} foi conduzido com condições de 0,5% concentração de indutor, temperatura de 10 °C e 24 horas de indução finalizando as 96 horas de cultivo, que apresentou bons resultados no começo deste estudo.

Foram estudados três valores diferentes de k_{La} . As condições estudadas foram 1,8 vvm / 600 rpm que correspondem ao valor de 96,12 h⁻¹, 1,2 vvm / 400 rpm que correspondem ao valor de 53,28 h⁻¹ e 0,5 vvm / 100 rpm que correspondem ao valor de 12,24 h⁻¹, segundo o descrito na Tabela 10.

A biomassa produzida no cultivo realizado com valor correspondente a 96,12 h⁻¹ foi de 65,34g/L de biomassa que proporciona uma produtividade de 0,667 g/Lh⁻¹ quando o inoculo para todos os ensaios foi de 1,2g/L. A biomassa produzida no cultivo realizado com valor correspondente a 53,28 h⁻¹ foi de 43,23g de biomassa que proporciona uma produtividade de 0,437 g/L h⁻¹. A biomassa produzida no cultivo realizado com valor correspondente a 12,24 h⁻¹ foi de 2,7g de biomassa que proporciona uma produtividade de 0,015 g/L h⁻¹.

Por outro lado, a relação de anticorpo foi de 1,02 mgL⁻¹ Anticorpo/gL⁻¹ Celula para o cultivo realizado com valor de k_{La} 96,12 h⁻¹, a relação de anticorpo foi de 0,90 mgL⁻¹ Anticorpo/gL⁻¹ Celula para o cultivo realizado com valor de k_{La} 53,28 h⁻¹, e por ultimo, a relação de anticorpo foi de 8,12 mgL⁻¹ Anticorpo/gL⁻¹ Celula para o cultivo realizado com valor de k_{La} 12,24 h⁻¹ (Tabela11).

Tabela 10 – Produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P.pastoris* cultivada com diferentes condições de k_{La} .

k_{La} (h ⁻¹)	Produtividade de Biomassa (g/Lh ⁻¹)	Produtividade de Anticorpo (mg/Lh ⁻¹)	Relação (mg L ⁻¹ _{AA} /g L ⁻¹ _{CÉLULA})	Concentração de anticorpo mg/L
96,12	0,667	0,925	1,02	66,64
53,28	0,437	0,540	0,90	38,9
12,24	0,015	0,304	8,12	21,9

Segundo os dados apresentados na Tabela 10, pode-se afirmar que os valores de k_{LA} mostraram diferenças nas produções de biomassa, isso demonstra que para otimizar o crescimento da levedura é necessário trabalhar com valores altos de k_{LA} , o que corrobora com o trabalho realizado por Hartner e Glieder (2006). Por outro lado, quando foram comparados os valores de k_{LA} de $96,12 \text{ h}^{-1}$ e $53,28 \text{ h}^{-1}$ não se obteve diferença significativa na produção do fragmento de anticorpo com relação a biomassa produzida $1,02 \text{ mgL}^{-1} \text{ AA/gL}^{-1} \text{ CÉLULA}$ e $0,9 \text{ mgL}^{-1} \text{ AA/gL}^{-1} \text{ CÉLULA}$, respectivamente. Entretanto, o cultivo realizado com k_{LA} de $12,24 \text{ h}^{-1}$ apresentou relação do fragmento de anticorpo de $8,12 \text{ mgL}^{-1} \text{ AA/gL}^{-1} \text{ CÉLULA}$.

Alguns autores afirmam que o consumo de metanol em *P. pastoris* é realizada dentro dos peroxisomas. Em primeiro lugar, o metanol é oxidado pela ação da álcool oxidase (AOX), em presença de oxigênio, formando formaldeído, que pode ser assimilado como biomassa ou oxidado até ácido fórmico e, por último, transforma-se em dióxido de carbono (CUNHA, et al. 2004; GELLINSEN, et al., 2005; KHANTRI; HOFFMAN, 2005; POUTOU, et al., 2005; HARTNER; GLIEDER, 2006).

Figura 10.1 Via metabólica para o metabolismo de metanol em *P. pastoris*. (Quadro azul peroxisoma).

Pode-se observar, na figura 10.1, a via metabólica que indica o metabolismo do metanol por *P.pastoris*. No círculo vermelho se descreve graficamente como a enzima álcool oxidase interage com o metanol em presença de oxigênio para a produção de peróxido de hidrogênio e formaldeído. Segundo Poutou (2005), a enzima codificada por AOX1 (álcool oxidase) apresenta baixa afinidade pelo oxigênio e esse é um problema que a levedura compensa com a produção de grandes quantidades dessa enzima. Nossos resultados indicam que baixas concentrações de oxigênio no meio de cultivo no processo de produção ativam a expressão do promotor AOX, gerando um aumento na produção do fragmento de anticorpo, isso pode ser explicado assim:

A hipótese é que quando a levedura não consegue quebrar a molécula de metanol na falta de oxigênio, o micro-organismo não pode incluí-la dentro do seu metabolismo, por conseguinte, necessita gerar mais álcool oxidase induzindo paralelamente a produção do fragmento de anticorpo scFv.

11. CONCLUSÕES

Foi possível produzir o fragmento de anticorpo scFv em todas as induções com metanol. Em todos os cultivos, o biorreator proporcionou maior produção de biomassa quando comparada com o crescimento em *shaker*, alcançando o nosso primeiro objetivo específico.

A fonte de carbono utilizada nos estoques de trabalho B1 glicerol e B2 glicose geraram distintos rendimentos enquanto a produção do anticorpo. O estoque B1 proporcionou maior produção de anticorpo e de biomassa em tempos mais curtos. Observou-se aumento celular e as máximas concentrações obtidas foram de 127g/L para biorreator e 32 g/L para *shaker*, respectivamente. Dos cultivos desenvolvidos em biorreator, os novos estoques de trabalho (B1 e B2) proporcionaram maior produção de biomassa que o primeiro estoque de trabalho (A). Conclui-se, com estes resultados, que a melhor forma de estocar a levedura é através do crescimento em glicerol e estocagem em glicerol 20%.

A única variável que apresentou efeito estatisticamente significativo, com nível de confiança de 95%, para o planejamento fatorial completo 2^3 foi a concentração de indutor. Nesse estudo, se obteve a mais alta produção do fragmento de anticorpo nas condições de 10°C para fase de produção, 0,5% de indutor e indução após 32 horas de cultivo, com 27,8 mg/L para o estudo realizado em *shaker*. As melhores condições para a produção do fragmento de anticorpo para biorreator foram 30°C para a fase de produção, 0,5% de indutor e indução após 24 horas de cultivo, com produção de fragmento de anticorpo de 41,3 mg/L. Conclui-se, com este estudo, que a única variável que demonstrou efeito estatisticamente significativo foi a concentração de indutor (metanol 0,5%), dentro dos limites do planejamento, além disso, nenhuma das interações teve efeito na produção do fragmento de anticorpo.

Conseguiu-se diminuir o número de etapas para evitar perdas no processo de purificação e diminuir o erro nas análises. Foram realizados dois cultivos, em 10°C e 30°C em biorreator, e os resultados demonstraram que o processo apresentava perda média entre os dois cultivos de 78,4%, na etapa de clarificação. A maior produção de anticorpo e a maior perda no processo de purificação ocorreram no cultivo realizado em 30°C, sendo que o processo de

concentração em tubos de *vivespin* apresentou perdas entre 14% e 25%. Conclui-se que o primeiro protocolo apresentava perda da molécula alvo nas etapas de clarificação, e concentração.

Avaliou-se o efeito de diferentes fontes de carbono (sacarose , glicerol, glicose sacarose/glicose 50%) na produção do fragmento de anticorpo scFv. Os resultados obtidos demonstraram que a melhor fonte de carbono para a produção do scFv é a sacarose visto que ela gerou a maior produção do fragmento de anticorpo com 93,7 mg/L. Por outro lado, a produção obtida com glicose foi a menor, com 63,3 mg/L. Neste estudo, a levedura apresentava diferentes tamanhos, esses dados foram analisados com ANOVA para determinar as diferenças estatísticas e proporcionar a comparação da produção do scFv. Os dados obtidos deixaram em evidencia que a melhor produção do fragmento de anticorpo scFv foi obtida no momento em que a levedura apresentava tamanhos menores que 0,895 μm , por outro lado, quando a levedura apresentava tamanho superior a 1,329 μm , a produção do scFv era menor

Determinou-se o efeito das fontes alternativas de carbono e nitrogênio, em *shaker*, no crescimento e na produção do fragmento de anticorpo scFv. Os resultados indicaram que a maior produção do scFv ocorreu com farelo de trigo, em substituição ao casaminoácidos, obtendo produção de anticorpo de 27,9 mg/L. A produção mais baixa se deu com farelo de arroz, em substituição à peptona de caseína, atingindo produção de scFv de 10,34 mg/L.

Avaliou-se, ainda, o efeito do k_La no crescimento da levedura e na produção do scFv. A melhor condição de k_La para o crescimento da levedura foi encontrada em 96,12 h^{-1} . Por outro lado, a melhor condição para a produção do fragmento de anticorpo scFv foi de 12,24 h^{-1} , com relação de 8,12 mg/L de anticorpo/ g/L de célula. A influência de trabalhar com valores k_La mais altos desfavorece a produção de etanol.

Finalmente, com base nos resultados obtidos, conclui-se que a melhor forma de produzir o fragmento de anticorpo scFv é utilizar o estoque de glicerol e utilizar a sacarose ao invés do glicerol. Como fonte alternativa de nitrogênio, o ideal é utilizar o farelo de trigo em substituição ao casaminoácidos. Para o crescimento da levedura, deve-se utilizar k_La de 96,12 h^{-1} , mas para a produção do scFv deve-se utilizar k_La de 12,24 h^{-1} , no biorreator, baixo as seguintes

condições: 30°C fase de produção, 0,5% de indutor e indução após 24 horas de cultivo.

12. PERSPECTIVAS E TRABALHOS FUTUROS

O projeto do estudo fatorial 2^3 deve concluir com a otimização das variáveis de temperatura, concentração de indutor, e tempo de indução, sendo este estudo muito importante para concluir com os resultados obtidos.

Como foi discutido anteriormente outras técnicas poderiam ser utilizadas em estudos posteriores como a quantificação por densitometria descrita por Solís (2005), ou a transferencia de proteínas por membrana de nitrocelulose descrita por Meza-Herrera et al. (2004). Estas técnicas poderiam descobrir novos resultados aportando novas informações e com maior grau de detalhes. O desenvolvimento de uma técnica que seja quantitativa e que demonstre atividade do fragmento de anticorpo como o ELISA deve ser incluída em próximos estudos. O desenvolvimento de processos de purificação integrativos é necessário para a obtenção de produtos biotecnológicos, e para diminuir perdas destes produtos em cada uma das etapas do processo.

A discussão sobre o tamanho da levedura pode ser melhorado com microscopia de varredura, esta análise poderia oferecer melhores resultados para as distintas observações.

Para finalizar, pode ser realizado um análise de custos para observar a diferença econômica que tem cultivar a levedura com fontes alternativas de carbono e nitrogênio.

12. REFERÊNCIAS

- ADEMOKUN, A. *et al.* The ageing B cell population: Composition and function. *Biogerontology* [S.I.], v. 11, n. 2, p. 125-137, 2010.
- AEHLE, W. *Enzymes in Industry*. 3 ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 489p., 2007.
- ALLENDE, C,C,O. Comparacion teorica de las capacidades metabolicas de *Sacharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* para la produccion de SOD. p95. 2007.
- ANDRADE, E. *et al.* Sigle-chain Fv with fragment of the human IgG1 tag: construction, *Pichia pastoris* expression and antigen binding characterization. *J. Biochem.* v. 128, p.891-895, 2000.
- AYYAR, V.B.; *et al.* Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods* 56, 116-129, 2012.
- BOK, S.H.; DEMAINE, A.L. An improved colorimetric assay for polyols. *Analytical Biochemistry*, v.81, p.753-762, 1977.
- BRAUNWALD, E. *Tratado de medicina cardiovascular*. 5. ed. São Paulo : Roca, 1999.
- BON, E.P. *et al.* Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro:Editora Interciência, p. 433-488. 2008.
- CAI, H. *et al.* High-Level expression of a functional humanized anti-CTLA4 single-chain variable fragment antibody in *Pichia pastoris*. *Biotechnological products and process engineering*, v. 82, p.41-48, 2009.
- CALIK, P. *et al.* Fermentation and oxygen transfer characteristics in recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris* in sorbitol batch and methanol fed-batch operation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* [S.I.], v. 85, n. 2, p. 226-233, 2010.
- CHANG, H. J. *et al.* Expression of functional single-chain variable domain fragment antibody (scFv) against mycotoxin zearalenone in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters* [S.I.], v. 30, n. 10, p. 1801-1806, 2008.
- COLCHER, D. *et al.* Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. *Q J Nucl Méd.* v. 42, p.225-41, 1998.
- CORTEZ.; CONCEIÇÃO. Improved xylitol production in media containing phenolic aldehydes: application of response surfacemethodology for optimization and modeling of bioprocess. Interscience; 9 September 2009
- CREGG, J. M.*et al.* *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol.* v.5 (12), p. 3376-85, 1985.

- CREGG, J. M. et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Mol Biotechnol. v.16 (1), p. 23-52, 2000.
- CUNHA, A,E. et al. Methanol induction optimization for scFv antibody fragment production in *Pichia pastoris*. Biotechnology and bioengineering. 86, 4, 2004.
- DE GROOT, A. S.; SCOTT, D. W. Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends in Immunology* [S.I.], v. 28, n. 11, p. 482-490, 2007.
- DENIZLI, A.; Purification of antibodies by affinity chromatography. J.Biol. Chem. 39(1), 1-18, 2011.
- ERAZO, R,E,; CARDENAS, J,L,R. Determinacion experimental del coeficiente de transferencia de oxigeno kLa em um biorreactor batch. Quim. Ing. Quim. 4, (2) 22-27, 2001.
- FREYRE, F,M. et al. Very high expression of an anti carcinoembryonic antigen single chain Fv antibody fragment in the yeast *Pichia pastoris*. Biotechnology. 76, 157-163, 2000.
- FROMMER, W.B., NINNEMANN, O. Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal and plant
- GELLISSEN G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. Appl Microbiol Biotechnol 54:741–750, 2000.
- GELLISSEN G.;HOLLENBERG CP. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*—a review. Gene 190:87–97, 1997.
- GELLISSEN G. et al. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica*—a comparison. FEMS Yeast Res 5:1079–1096, 2005.
- GEOFF, P. et al. The effect of alfa-mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Gene, 519 311-317, 2013.
- Guan, J. et al. Cvt18/Gsa12 is required for cytoplasm-to-vacuole transport pexophagy, and autophagy in *Sacharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. Molecular biology of the cell. 12 3821-3838, 2001.
- GUO, J., M. CAI. New type recombinant antibody fragment scFv multimer and cancer targeting. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. v. 20, p.361-5, 2003.
- HARTNER, F,S; GLIEDER, A. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeast. Microbial cell factories, 5;39, 2006.
- HAYDEN, M,S. et al. Antibody engineering. Curr Opin Immunol. V.9 (2), p. 201-12, 1997.

HELLWIG, S. *et al.* Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on line methanol control in fed batch and mixed feed fermentations. *Biotechnology and bioengineering*, 74, (4) 2001.

INAN, M.; MEAGHER, M. M. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [S.l.], v. 92, n. 6, p. 585-589, 2001.

JOSLYN, M.A. *Methods in food analysis*. 2 ed. Academic Press. p. 457.1970.

KHATRI, N. *et al.* Oxygen limited control of methanol uptake for improved production of a single chain antibody fragment with recombinant *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol, Biotechnological products and process engineering*, 72, 492-498, 2006.

KHATRI, N.K.; HOFFMANN, F. Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*. 2005.

KRIANGKUM, J. *et al.* Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies. *Biomolecular Engineering*. v. 18, p.31-40, 2001.

KOTI, M. *et al.* Construction of single-chain Fv with two possible CDR3H conformations but similar inter-molecular forces that neutralize bovine herpesvirus 1. *Molecular Immunology* [S.l.], v. 47, n. 5, p. 953-960, 2010.

LARS, N. *et al.* Biacore Analysis of Histidine-tagged protein using chelating NTA sensor chip. *Analytical biochemistry*, 252, 217-228, 1997.

LI, P. *et al.* Expression of recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol*. 142, 105-124, 2007.

LI, H. *et al.* Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 24, (2) 2006.

LIU, L. *et al.* The impact of glycosylation on the pharmacokinetics of a TNFR2:Fc fusion protein expressed in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Pharm Res*, 30, 803-812, 2013.

MARANHÃO, AQ. AND BRIGIDO, M.M. Anticorpos Humanizados. *Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento*. v.23, p. 38-43, 2000.

MINGUET, S. *et al.* Low-valency, but not monovalent, antigens trigger the B-cell antigen receptor (BCR). *International Immunology* [S.l.], v. 22, n. 3, p. 205-212, 2010.

MIRANDA, R. Estudo de meios de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos por *Pleoratus ostreatus* DMS 1833 em cultivo submerso. Universidade de Santa Catarina. 126 págs. 2005.

PESSOA, A. Jr.; VAHAN K., B. *Purificação de Produtos Biotecnológicos* (2005).

PLUCKTHUN, A. SKERRA, A., Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* V.178, p.497-515, 1989.

POTVIN, G. *et al.* Bioprocessengineeringin aspects of heterologus protein production in *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering journal*, p15, 2010.

POUTOU, R. *et al.* Influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. ISSN:1794-2470 VOL.3 No. 3:1-120, enero - junio, 2005.

POSTEM, C; COONEY,C. *Biotechnology. Growth of Microorganisms.* cap 3, p 118, pgs 64, 1993,

PIRT. S.J. The teory of feed-bach with reference to the penicillin fermentation. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* , London. v.24. n.7. p. 415-24.1974.

SCHOONOOGHE, S. *et al.* Efficient production of human bivalent and trivalent anti-MUC1 Fab-scFv antibodies in *Pichia pastoris*. *Bmc Biotechnology* [S.I.], v. 9, p. 14, Aug 2009.

SHI, X. Z. *et al.* Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* [S.I.], v. 28, n. 2, p. 321-330, 2003.

TAKAHASHI, H.; SHIMADA, I. Production of isotopically labeled heterologous proteins in non-E. coli prokaryotic and eukaryotic cells. *Journal of Biomolecular Nmr* [S.I.], v. 46, n. 1, p. 3-10, 2010.

VERMA, R. *et al.* Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. 216, 165-181, 1998.

WANG, J,Q. *et al.* Expression of a family 10 xylanase gene from *Aspergillus usarii* E001 in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Biotchnology Methods*, 40, 75-83, 2013

WEIPING YUAN. *et al.* Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the a-subunit of Phosphofructokinase; *Journal of Cell Science* 110, 1935-1945 (1997).

YAMAWAKI, S. *et al.* Production of single-chain variable fragment antibody (scFv) in fed-batch and continuous culture of *Pichia pastoris* by two different methanol feeding methods. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [S.I.], v. 104, n. 5, p. 403-407, 2007.

YUAN, W. *et al.* Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the alpha subunit of phosphofructokinase. *journal of cell*, 110, 1935-1945, 1997.

ZHANG, A. L. *et al.* Constitutive expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* by high-density cell culture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [S.I.], v. 34, n. 2, p. 117-122, 2007.

ZIMMERMANN, J. *et al.* Antibody expressing pea seeds as fodder for prevention of gastrointestinal parasitic infections in chickens. *Bmc Biotechnology* [S.I.], v. 9, 2009.

APÊNDICE A

Tabela 1 - Resultados da primeira curva padrão de biomassa (g/L) da *P. pastoris* cultivada em *shaker* (250 rpm) por 16 h a 30°C, proveniente do estoque criopreservado em Glicerol 20% (v/v) doado pelo grupo de pesquisa da prof. Dlucineia Abdala.

Diluição	Média Abs	Biomassa g/L
0	2,27	3,3
5	1,22	0,6
10	0,81	0,3
25	0,38	0,1
50	0,21	0,0
100	0,13	0,0
200	0,09	0,0
500	0,05	0,0
1000	0,04	0,0
2000	0,02	0,0

Tabela 2 - Primeiro cultivo em biorreator. Os dados são de oxigênio dissolvido; pH; Biomassa g/L; Glicerol g/L, k_La de 96,12 h⁻¹.

Tempo (horas)	[O₂]	pH	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)
0	122,4	5,59	0,0	11,8
6	109,7	5,58	0,5	11,8
12	14,0	5,49	2,7	8,0
18	26,7	5,19	9,3	3,5
24	4,0	6,30	15,5	0,5
30	103,4	6,74	19,6	0,3
36	133,0	6,78	20,7	0,4
42	138,9	6,76	27,6	0,4
48	142,5	6,74	22,7	0,4
54	144,9	6,72	24,4	0,4

Tabela 3 - Primeiro crescimento de *P. pastoris* conduzido em *shaker*. O ensaio foi realizado por duplicado e cada mostra foi tomada por triplicado, para biomassa total o ensaio cresceu por 168 horas as mostras foram obtidas por triplicata a maior biomassa obtida foi de 9 g/L o ensaio foi feito por duplicata.. As mostras foram tomadas cada 6 horas.

Tempo (horas)	Média	Biomassa media (g/L)
0	0,31	0,1
6	0,20	0,0
12	0,26	0,0
24	6,61	2,8
30	9,21	3,9
36	10,36	4,4
48	16,31	7,0
54	15,03	6,4
60	14,4	6,1
72	15,81	6,7
78	14,72	6,3
84	17,82	7,6
96	17,13	7,3
168	20,98	9,0

Tabela 4 - Curva padrão de glicerol. A curva foi feita com um stock de 50mg/L de glicerol com diluições seriadas 5,10,15,20,25,30,35,40,45,50 mg/L, A absorbância foi feita a 412 nm.

Concentração (mg/L)	Média
0	0
5	0,29
10	0,36
15	0,45
20	0,53
25	0,63
30	0,66
35	0,79
40	0,91
45	0,94
50	1,04

Tabela 5 - Segundo crescimento em *shaker* da levedura *P. pastoris* as variáveis Biomassa, Glicerol, Etanol. Todas as mostras foram feitas por triplicata, a fermentação foi por 168 horas, 250 rpm, 30°C.

Tempo	(h)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)
0		0,08	11,3	0,43
6		0,06	9,7	0,64
12		0,09	7,6	0,43
24		3,22	2,6	0,43
30		4,32	2,6	0,64
36		5,33	1,3	1,28
48		6,34	0,0	1,28
54		6,08	0	0,43
60		5,84	0	0,53
72		6,30	0	0,64
78		6,39	0	0,64

Tabela 6 - Primeiro cultivo em *shaker* estoque de glicerol (B1) da levedura *P. pastoris* modificada geneticamente para a produção do anticorpo scFv em *shaker* do novo estoque de trabalho, as condições 30°C, 250 rpm, 72 horas.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)
0	0,1
6	3,2
11	4,7
24	11,0
28	12,3
36	13,8
48	17,4
54	15,8
59	17,0
72	19,3

Tabela 7 - Primeiro cultivo em *shaker* estoque de glicose (B2) da levedura *P. pastoris* produtora de anticorpo scFv, do novo estoque de trabalho as condições do cultivo foram 30°C, 250 rpm, 72 horas

Tempo (h)	Biomassa (g/L)
0	0
6	0
11	1,0
24	1,9
28	3,2
36	4,4
48	7,0
54	6,7
59	7,2
72	9,2

Tabela 8 - Segunda curva padrão de biomassa (g/L) proveniente do novo estoque glicerol B1 da levedura *P. pastoris* cultivada em *shaker* por 16 h (250 rpm) a 30°C.

Diluição	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média
0	2,214	2,301	2,312	2,276
5	1,546	1,581	1,569	1,565
10	1,099	1,222	1,165	1,162
25	0,548	0,542	0,545	0,545
50	0,292	0,281	0,17	0,248
100	0,159	0,156	0,106	0,140
200	0,067	0,072	0,074	0,071
500	0,049	0,035	0,047	0,044
1000	0,031	0,032	0,036	0,033
2000	0,028	0,025	0,024	0,026

Tabela 9 - Segunda curva padrão de biomassa (g/L) proveniente do novo estoque glicose B2 da levedura *P. pastoris* cultivada em *shaker* por 32 h (250 rpm) a 30 °C.

Diluição	Média Abs.
0	2,276
5	2,136
10	1,597
25	1,017
50	0,633
100	0,338
200	0,185
500	0,075
1000	0,040
2000	0,026

Tabela 10 - Segundo cultivo estoque de trabalho glicerol B1 em *shaker* da levedura *P. pastoris* produtora de anticorpo scFv, as condições de crescimento foram: 30°C, 250 rpm, 72 horas.

Tempo (h)	BIOMASSA (g/L)	GLICEROL (g/L)	ETANOL (g/L)
0	0	17	0,0
6	0,50	16,7	0,0
11	1,00	8,1	0,8
24	20,0	7,1	0,8
28	21,2	4,1	0,8
36	21,1	2,1	0,8
48	24,0	1,0	0,8
54	24,9	0,0	0,7
59	24,9	0,1	0,8
72	26,5	0,0	0,8

Tabela 11 - Segundo cultivo estoque de trabalho glicose B2 em *shaker* da levedura *P. pastoris* produtora de anticorpo scFv, novo, as condições de crescimento foram: 30°C, 250 rpm, 72 horas.

Tempo (h)	BIOMASSA (g/L)	GLICEROL (g/L)	ETANOL (g/L)
0	0,0	17,0	0,0
6	2,5	16,7	0,0
11	17,0	8,1	0,8
24	20,0	7,1	0,8
28	21,2	4,1	0,8
36	21,1	2,1	0,8
48	24,0	1,0	0,8
54	24,9	0,0	0,8
59	24,9	0,1	0,8
72	26,5	0,0	1,0

Tabela 12 - Cultivo em *shaker* estoque de trabalho glicerol B1 com produção de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris*.

Tempo (h)	BIOMASSA (g/L)	GLICEROL (g/L)	ETANOL (g/L)
0	2,0	17,0	0,0
6	6,5	16,7	0,2
11	15,1	8,1	0,0
24	21,1	7,1	0,0
28	23,2	4,1	0,0
28	23,2	4,1	10,4
36	23,0	2,1	8,7
48	23,2	1,0	8,7
52	20,9	0,0	11,0
52	20,9	0,0	19,7
74	21,9	0,1	19,7
74	21,9	0,1	31,3
96	21,4	0,0	29,0

Tabela 13 - Cultivo em *shaker* primeiro ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada item 6 (11*), novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 20°C na fase da indução, porcentagem de indutor 1 % (v/v), tempo da indução 28h.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)	Temperatura (°C)
0	0,9	18	0	30
6	3,4	16,7	0,4	30
20	14,6	8,1	0,2	30
24	15,2	7,1	0,8	30
28	24	4,1	0,8	20
28	24	2,1	10,8	20
40	28,4	1	8,2	20
52	32,5	0	7,3	20
52	32,5	0,1	20,4	20
64	32,1	0	17,9	20
76	31,1	0	14,2	20
76	31,1	0,1	23,4	20
88	31,1	0,1	18,6	20
100	32,1	0,2	10,3	20

Tabela 14 - Cultivo em *shaker* segundo ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada item 6 (1), novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 10°C na fase da indução, porcentagem de indutor 0,5 % (v/v), tempo da indução 24h.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)	Temperatura (°C)
0	0,8	20	0	30
6	3,6	18,3	0,4	30
20	16,6	10,9	0,2	30
24	26,3	1,8	0,8	10
24	26,3	1,8	4,8	10
32	28,4	0,2	1,2	10
48	32,2	0,1	0,8	10
48	32,2	0,1	6,3	10
56	29,8	0,1	4,3	10
72	31,6	0,1	2,2	10
72	31,6	0,1	6,2	10
80	31,3	0,1	3,4	10
96	30,2	0,1	1,8	10

Tabela 15 - Cultivo em *shaker* terceiro ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada item 6 (12*), novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 20°C na fase da indução, porcentagem de indutor 1 % (v/v), tempo da indução 28h.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)	Temperatura (°C)
0	1,1	18,6	0	30
6	5,4	17,2	0,2	30
20	19,6	9,2	0,2	30
24	23,8	3,1	0,8	30
28	26,3	2,1	0,8	20
28	26,3	1,1	11,2	20
40	30,4	1	8,7	20
52	33,2	0	5,03	20
52	33,2	0,1	20,2	20
64	32,3	0	16,5	20
76	33,2	0	11,3	20
76	33,2	0,1	23,8	20
88	33,4	0,1	17,8	20
100	34	0,2	7,2	20

Tabela 16 - Cultivo em *shaker* Quarto ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada item 6 (4), novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 10°C na fase da indução, porcentagem de indutor 1,5 % (v/v), tempo da indução 32h.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)	Temperatura (°C)
0	1	17,3	0	30
6	2,6	17,3	0,4	30
20	15,6	7,9	0,2	30
32	25,3	4,8	0,8	10
32	25,3	4,8	17,8	10
42	22,4	0,2	12,2	10
56	23,2	0,1	7,8	10
56	23,2	0,1	7,8	10
68	27,8	0,1	22,3	10
80	26,2	0,1	8,2	10
80	26,2	0,1	16,2	10
88	27,3	0,1	9,4	10
104	28,9	0,1	5,8	10

Tabela 17 - Cultivo em *shaker* Quinto ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada item 6 (6), novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 30°C na fase da indução, porcentagem de indutor 1,5 % (v/v), tempo da indução 24h.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)	Temperatura (°C)
0	1.1	23.3	0	30
6	2.2	17.2	0.2	30
20	18.6	9.9	0.2	30
24	27.3	4.8	1.1	30
24	27.3	4.8	14.8	30
32	25.4	1.2	11.8	30
48	29.2	0.1	9.2	30
48	29.2	0.1	20.2	30
56	28.8	0.1	19.3	30
72	31.2	0.1	10.2	30
72	31.2	0.1	23.8	30
80	32.3	0.1	19.4	30
96	32.8	0.1	13.6	30

Tabela 18 - Cultivo em *shaker* Sexto ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada item 6 (8), novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 30°C na fase da indução, porcentagem de indutor 1,5 % (v/v), tempo da indução 32h.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)	Temperatura (°C)
0	1,2	20,1	0	30
6	3,4	18,3	0,5	30
20	22,1	8,4	0,2	30
32	28,4	4,8	0,5	30
32	28,4	4,8	15,3	30
42	30,2	0,1	7,2	30
56	32,6	0,1	5,3	30
56	32,6	0,1	21,4	30
68	29,5	0,1	14,3	30
80	33,5	0,1	7,6	30
80	33,5	0,1	20,7	30
88	32,3	0,1	9,4	30
104	33,4	0,1	4,9	30

Tabela 19 - Cultivo em *shaker* Sétimo ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada item 6 (9*), novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 20°C na fase da indução, porcentagem de indutor 1 % (v/v), tempo da indução 28h.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)	Temperatura (°C)
0	0,8	20,2	0	30
6	5,4	19,2	0,2	30
20	20,6	11,2	0,2	30
24	23,8	9,8	0,8	30
28	31,9	2,2	0,8	20
28	31,9	2,2	9,9	20
40	33,3	0,8	7,3	20
52	32,7	0	4,9	20
52	32,7	0	15,2	20
64	31,1	0	11,3	20
76	33,7	0	7,4	20
76	33,7	0	17,7	20
88	34,5	0	13,7	20
100	33,9	0	8,3	20

Tabela 20 - Cultivo em *shaker* oitavo ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada item 6 (3), novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 10°C na fase da indução, porcentagem de indutor 0,5 % (v/v), tempo da indução 32h.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)	Temperatura (°C)
0	0,8	20,4	0	30
6	1,6	19,1	0,2	30
20	18,4	9,3	0,2	30
32	25	0,2	0,2	30
32	25	0,2	16,4	10
42	26,3	0,1	7,6	10
56	24,6	0,1	5,7	10
56	24,6	0,1	21,3	10
68	25,9	0,1	17,3	10
80	26,7	0,1	9,8	10
80	26,7	0,1	19,7	10
88	26,7	0,1	11,4	10
104	27	0,1	8,9	10

Tabela 21 - Cultivo em *shaker* nono ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada item 6 (10*), novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 20°C na fase da indução, porcentagem de indutor 1 % (v/v), tempo da indução 28h.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)	Temperatura (°C)
0	1	19,9	0	30
6	3,6	17,6	0,2	30
20	17,2	11,2	0,2	30
24	23,4	2,7	0,5	30
28	26,7	0,1	0,5	20
28	26,7	0,2	1,1	20
40	30,2	0,1	7,7	20
52	33,3	0,1	5,7	20
52	33,3	0,1	17,2	20
64	33,9	0	14,3	20
76	33,2	0	11,7	20
76	33,2	0,1	20,7	20
88	33,7	0,1	16,2	20
100	33,8	0,2	9,3	20

Tabela 22 - Cultivo em *shaker* décimo ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada item 6 (2), novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 10°C na fase da indução, porcentagem de indutor 1,5 % (v/v), tempo da indução 24h.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)	Temperatura (°C)
0	1.1	23.3	0	30
6	2.2	17.2	0.2	30
20	18.6	9.9	0.2	30
24	27.3	4.8	1.1	10
24	27.3	4.8	14.8	10
32	27.4	1.2	11.8	10
48	29.2	0.1	9.2	10
48	29.2	0.1	20.2	10
56	28.8	0.1	19.3	10
72	31.2	0.1	10.2	10
72	31.2	0.1	23.8	10
80	32.3	0.1	19.4	10
96	32.3	0.1	13.6	10

Tabela 23 - Cultivo em *shaker* décimo-primeiro ensaio do planejamento para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada item 6 (5), novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 10°C na fase da indução, porcentagem de indutor 0,5 % (v/v), tempo da indução 24h.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)	Temperatura (°C)
0	1,2	21,1	0	30
6	2,6	18,2	0,2	30
20	19,1	12,3	0,2	30
24	31,2	9,3	1,1	30
24	31,2	9,3	5,1	30
32	33,3	0,1	2,2	30
48	34,2	0,1	1,3	30
48	34,2	0,1	7,2	30
56	32,7	0,1	4,3	30
72	32,1	0,1	2,2	30
72	32,1	0,1	7,5	30
80	33,7	0,1	5,6	30
96	34	0,1	4,7	30

Tabela 24 - Cultivo em *shaker* décimo-segundo ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada item 6 (7), novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 30°C na fase da indução, porcentagem de indutor 0,5 % (v/v), tempo da indução 32h.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)	Temperatura (°C)
0	1,2	20,3	0	30
6	4,7	16,1	0,1	30
20	26,3	8,9	0,2	30
32	33,8	0,1	0,8	30
32	33,8	0,1	5,3	30
42	33,6	0,2	2,7	30
56	33,7	0,1	1,7	30
56	33,7	0,1	7,7	30
68	33,9	0,1	4,3	30
80	34,2	0,1	3,3	30
80	34,2	0,1	8,7	30
88	34,9	0,1	5,9	30
104	35,2	0,1	4,3	30

Tabela 25 - Cultivos em *shaker* da levedura *P. pastoris* produtora de anticorpo scFv, novos estoques de trabalho glicerol (B1) e glicose (B2). As condições de crescimento foram: 30°C, para todos os crescimentos, 20°C na fase da indução para as duas induções, 250 rpm. Na tabela se podem observar todos os crescimentos feitos em *shaker*, dois crescimentos para olhar o comportamento e a variabilidade, e duas induções, nesta tabela comparação da biomassa.

Tempo (h)	BIOMASSA (g/L) Estoque glicose indução	BIOMASSA (g/L) Estoque glicerol indução	BIOMASSA (g/L) Primeiro cultivo glicerol	BIOMASSA (g/L) Primeiro cultivo glicose	BIOMASSA (g/L) Segundo cultivo glicerol	BIOMASSA (g/L) Segundo cultivo glicose
0	1,9	2,0	0,1	0,0	0,0	0,0
6	3,9	6,5	3,2	0,0	2,4	0,1
11	12,0	15,1	47,1	0,1	17,0	0,5
24	15,4	23,2	110,5	1,9	20,0	5,1
28	18,6	23,0	123,7	3,28	21,2	8,6
44	22,5	23,2	138,5	4,4	21,1	11,8
52	22,5	20,9	174,5	7,06	24,0	19,3
66	23,4	20,9	158,1	6,7	24,9	18,4
74	20,6	21,9	170,3	7,2	24,9	18,8
90	22,1	21,9	193,9	9,28	26,5	19,3
98	22,8	21,4	193,9	9,28	26,5	19,3

Tabela 26 - Cultivo em biorreator primeiro ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada, novo estoque da levedura que foi cultivada em Glicose e foi estocada em glicerol 20% (v/v), as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 10°C na fase da indução, porcentagem de indutor 1,5 % (v/v), tempo da indução 24h, $k_L a$ de 96,12 h⁻¹.

Tempo (h)	Ph	O2	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/metanol (g/L)	Temperatura (°C)
0	5,54	115,6	1,1	17,0	0,5	30
6	5,52	95,1	4,5	15,7	0,5	30
20	5,50	35,1	17,2	3,1	0,0	30
24	5,66	24,9	39,9	0,1	0,5	10
24	5,69	23,8	39,9	0,1	14,2	10
32	5,81	24,8	91,6	0,1	14,2	10
48	5,86	115,5	90,5	0,0	9,8	10
48	5,89	114,5	90,5	0,0	21,9	10
56	5,72	109,5	93,4	0,1	21,0	10
72	5,79	115,5	97,7	0,0	15,0	10
72	5,82	115,5	97,7	0,0	28,4	10
80	5,79	115,5	93,5	0,0	27,4	10
96	5,81	115,5	93,5	0,0	23,4	10

Tabela 27 - Cultivo em biorreator segundo ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada, novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 20°C na fase da indução, porcentagem de indutor 1 % (v/v), tempo da indução 28h, $k_L a$ de 96,12 h⁻¹.

Tempo (h)	Ph	O2	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/metanol (g/L)	Temperatura °C
0	5,48	96,4	0,8	18,4	0,0	30
6	5,44	78,1	4,7	17,0	0,0	30
24	5,50	72,2	37,6	7,9	0,0	30
28	5,80	60,9	70,6	0,1	0,0	20
28	6,06	38,1	70,6	0,1	12,2	20
44	6,05	19,2	105,8	0,1	0,0	20
52	6,24	87,2	104,1	0,0	0,0	20
52	6,26	87,2	104,1	0,0	10,5	20
66	6,28	84,0	99,1	0,0	11,1	20
74	6,18	92,8	105,3	0,0	9,6	20
74	6,19	93,6	105,3	0,0	5,1	20
88	6,21	100,1	105,3	0,0	4,5	20
100	6,21	102,3	105,3	0,0	4,5	20

Tabela 28 - Cultivo em biorreator terceiro ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada, novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 30°C na fase da indução, porcentagem de indutor 0,5 % (v/v), tempo da indução 24h, $k_L a$ de 96,12 h⁻¹.

Tempo (h)	pH	O2	Biomassa (g/L)	glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)
0	5,47	89,2	0,8	15,8	0,5
6	5,47	52,2	5,2	12,1	0,3
20	5,34	47,6	51,5	1,7	0,8
24	5,57	58,6	52,8	1,5	0,8
24	5,61	58,6	52,8	1,5	4,6
32	5,8	53,5	51,0	0,4	4,0
48	5,75	42,1	51,0	0,1	2,7
48	5,75	42,1	51,0	0,1	6,0
56	5,76	34,7	60,7	0,1	5,7
72	5,85	65,7	60,7	0,1	5,0
72	5,85	65,7	60,7	0,1	11,2
80	5,91	27,1	63,1	0,1	10,9
96	5,91	27,1	63,1	0,1	9,8

Tabela 29 - Cultivo em biorreator quarto ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada, novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 30°C na fase da indução, porcentagem de indutor 0,5 % (v/v), tempo da indução 24h, k_{La} de 96,12 h⁻¹.

Tempo (h)	pH	O ₂	Biomassa (g/L)	glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)
0	5,46	97,4	0,8	16	0,5
6	5,42	21,2	5,3	12,2	0,3
20	5,14	1,2	31	1,7	0,1
24	5,27	12,2	38,8	0,7	0
24	5,32	12,1	38,8	0,7	4,5
32	5,84	1,2	75,9	0,1	4,6
48	6,1	1,6	97,3	0,1	0,8
48	6,1	1,6	98,3	0,1	6,2
56	6,22	1,6	100,7	0,1	2,2
72	6,32	1,4	100,1	0,1	0,5
72	6,32	2,7	100,1	0,1	3,2
96	6,35	2,7	100,1	0,1	3,2

Tabela 30 - Cultivo em biorreator quinto ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada, novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 20°C na fase da indução, porcentagem de indutor 1 % (v/v), tempo da indução 28h, k_{La} de 96,12 h⁻¹.

Tempo (h)	pH	O ₂	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)
0	5,68	105,1	0,5	12,6	0,7
6	5,65	105,4	2	9,4	1,5
20	5,3	4,2	34,1	3,9	1,5
28	5,97	23	45,4	0,1	1,5
28	6,05	21	45,4	0,1	12,5
40	6,73	100	58,2	0,1	11,8
52	6,8	100	82,8	0,2	11,5
52	6,8	100	82,8	0,2	19,5
64	6,82	100	79,4	0,1	14,5
76	6,82	100	89,6	0,1	17,5
76	6,83	100,1	89,7	0,2	17,6
88	6,82	100	87,6	0,1	14,2
100	6,82	100	90,2	0,1	10,3

Tabela 31 - Cultivo em biorreator sexto ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada, novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 30°C na fase da indução, porcentaje de indutor 1.5 % (v/v), tempo da indução 24h, k_{La} de 96,12 h⁻¹.

Tempo (h)	pH	O ₂	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)
0	5,88	100	0,5	11,1	2,1
6	5,85	77,9	1,8	10,9	1,6
20	5,31	4	33,3	1,8	1,2
24	5,68	4,5	42,9	0,7	0,5
24	6,06	4,2	42,9	0,1	15,7
32	6,06	3,7	44,8	0,1	7,6
48	6,93	73,5	57,9	0,1	5,3
48	6,99	73,5	57,9	0,1	21,2
56	6,99	91	80,9	0,1	11
72	6,93	97	77,9	0,1	8,3
72	6,93	97	77,9	0,1	20
80	6,93	97	77,9	0,1	10
96	6,93	97	77,9	0,1	5

Tabela 32 - Cultivo em biorreator setimo ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada, novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 10°C na fase da indução, porcentagem de indutor 1,5 % (v/v), tempo da indução 32h, k_{La} de 96,12 h⁻¹.

Tempo (h)	pH	O ₂	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)
0	7,16	100	0,6	22,8	1,1
6	7,16	98	1,6	19,2	0,5
20	7,16	50	31,9	4,6	0,4
32	7,16	16	63,9	0,1	0,3
32	7,19	92,7	63,9	0,1	15
42	7,08	98,2	63	0	9,9
56	7	100	60,3	0	9
56	7	100	60,3	0	21,1
68	6,95	100	70,1	0	14
80	6,95	100	70,1	0	13,5
80	6,95	100	70,1	0	26
88	6,95	100	70,1	0,1	25,3
104	6,95	100	70,1	0,1	23,4

Tabela 33 - Cultivo em biorreator oitavo ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada, novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 30°C na fase da indução, porcentagem de indutor 1,5 % (v/v), tempo da indução 32h, k_{La} de 96,12 h⁻¹.

Tempo (h)	pH	O2	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)
0	6,03	100	0,7	17,4	0,8
6	6,03	97	1,9	11,4	1,1
20	6,03	21	19,3	6,9	1,5
32	6,03	2,1	55,9	1,2	1,5
32	6,03	2,1	55,9	0,9	16,3
42	6,4	2	56	0,7	3,2
56	6,73	2,2	57,6	0,9	1,3
56	6,94	2,2	57,6	0,6	19,7
68	6,96	100	67,1	0,1	5,3
80	6,96	100	67,3	0,1	4,9
80	6,96	100	67,3	0,1	14,9
88	6,96	100	67,3	0,1	4,9
104	6,96	100	67,3	0,1	2,7

Tabela 34 - Cultivo em biorreator nono ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada, novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 10°C na fase da indução, porcentagem de indutor 0,5 % (v/v), tempo da indução 32h, k_{La} de 96,12 h⁻¹.

Tempo (h)	Ph	O2	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)	Temperatura (°C)
0	5,52	100	1,8	18	0,5	30
6	5,52	95,1	4,5	15,9	0,8	30
20	5,52	35,1	17,2	4,2	0,5	30
32	5,76	14,5	39,9	0,2	0,5	10
32	5,69	23,8	55,2	0,2	8,4	10
42	5,81	24,8	87,6	0,1	7,4	10
56	5,86	115,5	90	0	2,8	10
56	5,89	114,5	90,7	0	4,9	10
68	5,72	109,5	93,4	0	2,4	10
80	5,79	115,5	97,7	0	1,8	10
80	5,82	115,5	97,7	0	7,4	10
88	5,89	115,5	97,8	0	3,4	10
104	5,87	115,5	97,7	0	2,4	10

Tabela 35 - Cultivo em biorreator décimo ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada, novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 20°C na fase da indução, porcentagem de indutor 1 % (v/v), tempo da indução 28h, k_La de 96,12 h^{-1} .

Tempo (h)	Ph	O2	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)	Temperatura °C
0	5,48	100,4	0,8	21,4	0	30
6	5,39	98,1	8,7	19	0	30
20	5,55	52,2	57,6	13,9	0	30
28	5,3	20,9	70,6	1,1	0	20
28	5,3	21,1	70,6	1,1	13,4	20
40	6,05	19,2	89,9	0,1	9	20
52	6,34	87,2	90,4	0	8,4	20
52	6,26	87,2	90,2	0	18,5	20
64	6,38	84	99,1	0	11,1	20
76	6,28	92,8	102,3	0	10,6	20
76	6,29	93,6	102,3	0	19,1	20
88	6,31	100,1	100	0	14,5	20
100	6,4	102,3	99,7	0	9,5	20

Tabela 36 - Cultivo em biorreator décimo-primeiro ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada, novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 20°C na fase da indução, porcentagem de indutor 1 % (v/v), tempo da indução 28h, k_La de 96,12 h^{-1} .

Tempo (h)	Ph	O2	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)	Temperatura °C
0	5,2	100	1,1	20,6	0	30
6	5,48	98,1	10,7	19,6	0	30
20	5,48	32,2	67,8	10,3	0	30
28	6,01	18,9	74,8	5,4	0	20
28	6,06	17,1	74,8	5,4	9,4	20
40	6,05	19,4	93,9	0,1	7	20
52	6,24	27,2	90,4	0	8,4	20
52	6,26	27,4	90,3	0	18,7	20
64	6,28	100	97,1	0	11,1	20
76	6,28	92,8	102,3	0	19,2	20
76	6,39	93,6	102,3	0	18,1	20
88	6,41	100	104,3	0	11,5	20
100	6,61	100	104,3	0	10,3	20

Tabela 37 - Cultivo em biorreator décimo-segundo ensaio do planejamento estatístico para produção do fragmento de anticorpo scFv pela levedura *P. pastoris* geneticamente modificada, novo estoque de trabalho glicose, as condições de crescimento foram: 30°C na fase de cultivo, 30°C na fase da indução, porcentagem de indutor 0,5 % (v/v), tempo da indução 32h, k_La de 96,12 h⁻¹.

Tempo (h)	pH	O ₂	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol/Metanol (g/L)
0	5,6	100	1,1	23,6	0
6	5,6	98	6,6	20,2	0,5
20	5,72	20	32,3	8,3	0,5
32	6,3	13	63,9	3,1	0,8
32	6,3	67,7	63,9	1,2	17,2
42	7,2	89,3	63,8	0,1	7,3.
56	7,3	100	60,7	0,1	4,2
56	7,3	100	60,7	0	22,3
68	6,72	100	73,1	0	11,7
80	7,3	100	70,1	0	3,8
80	7,2	100	70,1	0	16,4
88	7,16	100	72,4	0,1	8,6
104	7,1	100	72,4	0,1	3,4

Tabela 38 - Segundo cultivo da levedura *P. pastoris* produtora de anticorpo scFv em biorreator. Os dados foram feitos em triplicata, a biomassa foi medida a 600 nm, e o glicerol foi medido a 412 nm, as variáveis do ensaio foram Biomassa, Glicerol, oxigênio, Etanol. a fermentação foi por 98 horas, 250 rpm, 30°C, k_La de 96,12 h⁻¹.

Tempo (h)	pH	[O ₂]	Biomassa g/L	Glicerol g/L
0	5,59	122,4	0,0	11,8
6	5,58	109,7	0,5	11,8
12	5,49	14,7	2,7	8,06
18	5,19	9,35	9,3	3,57
24	6,30	4	15,5	0,5
30	6,74	103,4	19,6	0,3
36	6,78	133	20,7	0,4
42	6,76	138,9	21,7	0,4
48	6,74	142,5	22,7	0,4
54	6,72	144,9	22,8	0,4
61	6,76	147,9	22,9	0,5

Tabela 39 - Curva de padrão estoque de glicose B2 por 16 horas para a levedura *P. pastoris*. produtora de anticorpo scFv, para o estoque de glicose por 16 horas.

Diluição	Média	Biomassa (g/L)
0	2,276	7,2
5	1,565	1,4
10	1,162	0,7
25	0,545	0,2
50	0,248	0,1
100	0,140	0,0
200	0,071	0,0
500	0,044	0,0
1000	0,033	0,0
2000	0,026	0,0

Tabela 40 - Curva padrão estoque de glicerol por 36 horas da levedura *P. pastoris* produtora de anticorpo scFv.

Diluição	Média abs.	Peso em gramas
0	3,33	101,8
5	1,60	20,3
10	0,95	10,1
25	0,39	40,7
50	0,19	20,3
100	0,10	10,1
200	0,05	0,5
500	0,03	0,2
1000	0,00	0,1

APÊNDICE B

Figura 1 - Coloração de Gram tomada da contaminação das induções quinta e sexta, que depois da hora 54 não mostraram crescimento com o primeiro estoque de trabalho. Objetiva de 100x, microscópio do laboratório de ecologia de micro-organismos do instituto oceanográfico- USP (Olympus BX60), microrganismos com morfologia bacilar Gram positivos.

Figura 2- Meio YPD recuperação da levedura *P. pastoris* produtora do anticorpo scFv. Isolamento das colônias para fazer o novo estoque de trabalho. Colônias cor branco, globulosas, crescimento 30°C, 2 dias de incubação.

Figura 3 - Prova de pureza da levedura *P. pastoris* produtora do anticorpo scFv, tomada do novo estoque de glicerol (B1). O crescimento foi por 48 horas 30°C de uma das colônias recuperadas fig. 20. Microscópio utilizado foi do laboratório de ecologia de micro-organismos do instituto oceanográfico- USP (Olympus BX60) 100x.

Figura 4 - Prova de pureza da levedura *P. pastoris* produtora do anticorpo scFv, tomada do estoque de glicose (B2). O crescimento por 48 horas 30°C. de uma das colônias recuperadas fig. 20. , microscópio utilizado foi do laboratório de ecologia de micro-organismos do instituto oceanográfico- USP (Olympus BX60) 100x.

As microscopias das Figuras 3 e 4 mostram a levedura *P. pastoris* crescendo em duas fontes diferentes de carbono (glicose e glicerol) e são registradas baixa condições nas mesmas. O microscópio utilizado foi do laboratório de ecologia de micro-organismos do instituto oceanográfico- USP (Olympus BX60) 100x. Estes resultados estão de acordo com Weiping Yuan 1997. Neste artigo os autores abordam a produção excessiva de vacúolos pela

levedura em presença de glicose; devido a isso sua aparência foi maior quando comparada com a levedura que cresceu em meio com glicerol como única fonte de carbono.

Primeira curva padrão da biomassa

Se fez segundo o ponto 2.3.1 da metodologia.

Figura 5 - Curva padrão de biomassa primeiro estoque (A). Levedura *P. pastoris* produtora do anticorpo scFv. Linearização dos dados obtidos. (tabela 1 do apêndice A).

Curva padrão de Glicerol.

Para obter informação do consumo do substrato preparou-se uma curva de calibração para glicerol que correlaciona absorbância com concentração de glicerol, como o método colorimétrico descrito por Demain (1977).

Figura 6 - Curva padrão de glicerol. A curva foi feita a partir de uma solução estoque a 50mg/L de glicerol com diluições seriadas 5,10,15,20,25,30,35,40,45,50 mg/L, A absorbância foi medida a 412 nm, (os dados som da tabela 4 do apêndice A).

Segunda curva de calibração para biomassa utilização de novos estoques de *P. pastoris*

Neste ponto se determina-se que a curva padrão feita para os primeiros crescimentos não pode ser utilizada com os novos estoque de trabalho, Então, foram feitas duas curvas padrões novas para as diferentes horas de crescimento da levedura terminando o crescimento as horas 16 e 36.

Figura 7 - Curva padrão de biomassa estoque novo da glicose (B2). Com 16 horas de cultivo. Levedura *P. pastoris* produtora do anticorpo scFv. Linearização dos dados obtidos; novo estoque de trabalho glicose (tabela 8 do apêndice A).

Figura 8 - Curva padrão de biomassa estoque novo da glicose (B) com 32 horas de cultivo. Levedura *P. pastoris* produtora do anticorpo scFv. Linearização dos dados obtidos; novo estoque de trabalho glicose. (tabela 9 do apêndice A).

APÊNDICE C

Diagrama de fluxo: Reativação da levedura *P. pastoris*.

Diagrama de fluxo: Produção dos estoques novos da levedura *P. pastoris* (B1-glicerol e B2-glicose)

DIAGRAMA DE FLUXO: PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO scFv ANTI LDL-OX.

APÊNDICE D

Abstract

Recombinant antibody fragments are becoming one of the most popular tools in human therapies. Their wide applicability is being exploited in different medical, pharmaceutical and research areas. Generally, these molecules maintain the same functionality that full length antibodies but possess several advantageous features as quickness to penetrate the tissues, easy manipulation, fast elimination of their immunocomplex and the possibility of being produced in simple expression systems like bacteria and yeast. The increasing demand in antibody based therapies is driving advances in the production and purification of genetically engineered antibodies and antibody fragments.

The main aim of this review is to highlight the principal characteristics of single-chain variable fragment of antibodies and address advances and perspectives on their purification.

Keywords

antibody

single chain variable fragment

purification

integrative technique

scale up

1. Introduction

Antibodies, also known as immunoglobulins, are one of the most important components of the animal immune system and could present different functionalities. Some of them can act as receptors of specific antigens while others act as effectors of the humoral system. All immunoglobulins, irrespective of their specificity, have a common structure with four polypeptide chains (figure 1): two identical heavy (H) chains, each carrying covalently attached oligosaccharide groups; and two identical, non-glycosylated light (L) chains [1]. A disulphide bond maintains a heavy chain and a light chain together. The heavy chains are also linked to each other by disulphide bonds. These disulphide bonds are located in a flexible region of the heavy chain known as

the hinge, a region of approximately 12 amino acids that is exposed to both enzymatic and chemical cleavage. All four polypeptide chains contain constant (C) and variable (V) regions, found at the carboxyl and amino terminal portions respectively. Light chains have single C and V regions while heavy chains possess one V region and three C ones. The V regions of both heavy and light chains combine to form two identical antigen binding sites (Fab). Effector functions of antibodies, such as placental transport or antigen-dependent cellular toxicity, are mediated by structural determinants within the crystallizable region (Fc) of the immunoglobulin [1,2].

The studies about antibodies started in 1890 when Kitasato Shibasaburo described antibody activity against diphtheria and tetanus toxins [3]. After that, numerous researches were directed to discover their structure and functionality. Certainly, one of the most important development was the hybridoma technology, developed by Köler and Milstein [4], which resulted in the ability to produce monoclonal antibodies (mAbs) and increase the specificity of antibody-based tools.

Gradually, immunoglobulins were incorporated in different areas of medicine. By 2005, 18 monoclonal antibody products were on the market and more than 100 in clinical trials. In fact, by 2008, engineering antibodies accounted for more than 30% of all revenues in the biotechnology market approved by the Food and Drug Administration (FDA) [5].

Due to the increasingly antibody application, the development of new purification methods is needed to cover the present demands. Currently, there are production limits imposed by the technology, equipment and/or facilities that are available. As a consequence, numerous research projects are exploring multiple ways of recovery and purification processes. The addressed strategies include reducing raw materials costs and decreasing the number of purification steps, for example, by applying integrative unitary operations [6]. These are advantageous methodologies as they are less expensive and may offer scale facilities, which make them worth of consideration for large-scale applications [7].

2. Structure and applications of scFv fragments

Several scientific advances as recombinant DNA technology and phage-display techniques allowed the construction of engineered antibodies fragments [8], which could be classified into two main groups [9]. The first group comprises whole immunoglobulin molecules that are designed to reduce the immunogenicity. Structurally, these are chimeric molecules which consist of human and murine regions [10,11,12]. The second class consists of fragments of antibodies molecules, such as antibody binding region (Fab), single chain variable fragment (scFv) and scFv based conjugates, which could be produced by enzymatic proteolysis or genetic engineering [13,14,15].

Single chain variable fragment (scFv) is the smallest immunoglobulin with antigen-binding activity. As it can be seen in figure 2, this molecule consists of the variable regions of heavy (VH) and light (VL) chains, which are joined together by a flexible peptide linker [16]. ScFv offers several advantages as immunotherapy tool since it penetrates more rapidly and evenly to tumors and other tissues than the whole antibodies do [17,18]. They can be fused with other molecules like drugs [19,20] or radionuclides [21] in order to deliver these agents specifically towards target cells. Other therapeutic applications are the treatments of inflammatory and tumor diseases [22,23,24] as well drug addiction [25,26]. They are also used in research, for example, in standard assays like immunoblot analysis, flow cytometry or immunohistochemistry [27].

3. Production of scFv antibodies

Both antibodies and antibody fragments are expressed in native and recombinant sources [28,9]. At present, most of antibodies used in therapy are being expressed in mammalian cell lines in order to reduce the risk of immunogenicity. Transgenic mammalian cells (for example, chinese hamster ovary cells [CHO]) grown in culture are the industry standard for producing full-length monoclonal antibodies [29]. However, work to date indicates that mammalian cells are less suitable for high-level production of scFv, despite the less complex structure of these engineered fragments. Typical expression levels for a scFv in mammalian cells are on the order of 1 to 4 mg/L, which is tens to hundreds of times lower than the level achieved for mAb [30,31]. Other

disadvantages of these production systems are their complexity and high growing costs, which difficult posterior scaling up. In this context, scFv production is explored in both prokaryotic and simple eukaryotic expression systems.

Escherichia coli is one of the most used prokaryotic microorganisms [32,33,34]. As expression system, it exhibits the advantage to produce heterologous protein in large quantities [35], reaching massive yields of more than 3 g/L [36]. Generally, the production of antibody fragments is directed toward the periplasm by using specific amine terminal sequences. The periplasmic oxidizing environment contributes to the correct formation of disulfide bonds and therefore, to the folding to a functional fragment [37,38]. In contrast, the expression of recombinant antibodies in the reducing cytoplasmic compartment results in the formation of inclusion bodies which require multi step protocols of denaturation and refolding to obtain a full functional scFv immunoglobulin [39]. Some Gram-positive bacteria have been also successfully tested for the production of recombinant antibodies. For example, *Bacillus brevis* [40,41] has shown an efficient production of mouse/human chimeric immunoglobulin fragments in the culture medium, *Bacillus subtilis* [42] and *Bacillus megaterium* [43] were also used to express single chain antibody fragments satisfactorily. Other examples are the scFv production in *Lactobacillus* to study HIV transmission [44] and for the expression of anti-Streptococcus mutants to prevent tooth decay [45].

Most of the bacterial expression systems tested until now has demonstrated to be satisfactory alternative sources to produce antibody fragments. However, the main disadvantage of these microorganisms is their incapability of generating post-translational glycosylation, which ensures a correct fragment antibody's functionality.

Eukaryotic cells possess a more complex protein folding and secretion apparatus than prokaryotic cells. Plants [46], insects [47] and yeast cells have been tested as alternative expression systems. At present, yeast cells are one of the most explored systems of scFv production since it conjugates the simple medium requirements, characteristic of bacteria, with the enhanced post-translational folding and secretion capability of superior eukaryotes. *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* are the yeast systems most

used for antibody production [48,49]. Although *S. cerevisiae* has historically been more studied, *P. pastoris* is currently more used because it presents a better capability of producing and secreting heterologous proteins and of releasing a few endogenous polypeptides into the culture medium which facilitates the subsequent downstream process [27,50].

4. Downstream processing of scFv

Downstream processing is the key point for the commercial development of recombinant antibodies since it accounts for more than 70% of the total manufacturing cost [51]. Purification protocols should be designed to target the best performance as possible combined with the minimum cost. Selection of an extraction technique depends on the equipment available, the scale of operation and on the type of sample. As is shown in figure 3, a traditional complete purification process involves an initial stage of primary recovery (clarification and treatment of samples to downstream purification), an intermediary purification (where purity of 40- 80 % is reached) and the polishing (achievement of the final high purity and the optimum conditions to the scFv stability) [52]. The next sections will address the unit operations currently used in each stage of scFv antibodies purification.

4.1 Primary recovery

Given the high cell densities achievable in microbial cell culture processes, the clarification stage may be a significant bottleneck in both clinical and commercial manufacturing. Many of the process impurities are negatively charged at extraction pH and can form colloids during the cell culture and harvest processes. Residual impurities may also precipitate and increase turbidity during processing and even interfere with the performance of the capturing chromatographic step [53,54].

One of the first methodologies applied to clarify cell cultures was microfiltration [55]. This technology allows separation of biomass from the product of interest and can also be used to achieve significant purification via selective sieving of product or impurities. At present, increasing cell densities in broth bioreactor and the advent of low shear centrifuges made hybrid centrifugation-depth filtration system become the industrial standard method for primary recovery

[56,54]. According to depth filtration methodology, one or more depth filters can be used sequentially to optimize the filtration. In each successive filtration step, smaller particles are progressively removed by means of mechanical sieving and adsorption. This technology offers many advantages such as no contact of process fluids by operators, decreased risk of media damage, and reduced liquid hold-up, which facilitates the high throughput processing requirement for antibodies. The employment of several steps during the primary recovery, however, could lead to subsequent lost of material of interest. In this context, alternative strategies to reduce or eliminate depth filtration are being considered, for example, the inclusion of flocculating agents in the cell culture fluid. These enhance the amount of cellular debris being removed by the centrifuge and improve the clarity of the harvested cell culture fluid, requiring little or no depth filtration prior to the capture step [7]. Another alternative to avoid depth filtration is the use of disk-stack centrifuge, which has emerged as the most widely used form of centrifugation. This methodology utilizes a special type of preparative centrifuge which is compact in design and gives better solid-liquid separation than the standard tubular bowl centrifuge [57].

4.2 Purification

4.2.1 Affinity-based chromatography

Affinity purification relies on the specific interaction between the antibody molecule and a complementary ligand. To perform chromatographic purification, the ligand is immobilized onto a carrier which is generally a polymer based material. The antibody of interest selectively binds to the carrier after passing a solution containing it through the chromatographic column under favorable conditions [58]. This methodology reduces non-specific interaction, increases operational yields and facilitates the elimination of undesirable contaminants, even from diluted extracts. Commonly, affinity-based chromatography is used in the intermediary purification as a first capture of the targeted antibody. Several molecules, with different structure and function, are commercially available as potential ligands in affinity chromatography.

4.2.1.1 Biospecific ligands

Protein A is one of the first molecules used as a biospecific ligand to capture native or engineered antibodies. Protein A is a 40-60 kDa surface protein placed in the cell wall of the bacteria *Staphylococcus aureus*. It binds with high affinity to Fc region of IgGs from a variety of species such as human, rabbit and pig. Even though, there exists a wide range of protein A based resins [59], which make it one of the most widely used technique for antibody purification [60,61], several novel molecules are being probed as alternative ligands. One of the reasons to replace protein A is based on process economics. Titrers have increased steadily over the last decade, from a few milligrams to multi-grams per liter [62], thus shifting the main costs from cell culture to downstream operations. Within the downstream operations, the Protein A represents a major cost. Although the Protein A-resin lifetimes have been extended to more than 300 cycles [63] with well-defined cleaning cycles, the expense and disposal of these agents make desirable the development of further alternatives. On the other hand, concerns over the safety of Protein A have been based on leakage of Protein A itself [64] which could contaminate the purified sample.

Table 1 shows others naturally IgG-binding proteins [65] that have been described in the literature. They have been less explored than protein A [66] due to their low specificity and poor binding capacity. Exceptionally, protein L has significance [67] because of its high affinity for the Fab portion of antibodies, especially light chains and scFv molecules [68,69].

4.2.1.2 Pseudobiospecific ligands

Pseudobiospecific ligands can be biological or non-biological molecules that present the capability to interact with antibody fragments but do not occur naturally in the biological systems. Pseudobiospecific ligands can surmount some of the drawbacks of natural antibody-binding ligands and are low-cost alternatives to conventional protein A/L adsorbents [70]. Compared to biospecific ligands, pseudobiospecific ligands display not only reduced costs of

production and easy sterilization at large-scale production but also increase resistance to chemical and biochemical degradation with little toxicity and immunogenicity. The affinity of such ligands is generally lower than natural ligands but sufficiently high to ensure, under optimized operational conditions, a good selectivity towards immunoglobulin molecules. Commonly used pseudobiospecific ligands include hydrophobic [71], thiophilic [72] and mixed mode affinity ligands [34] as well chelating metal ions.

At present, immobilized metal affinity chromatography (IMAC), which employs chelating metal ions as ligand, is a popular methodology used to purify recombinant proteins [73,68]. Several vector systems, which express proteins containing a stretch of 5-6 histidines in the final product, are commercially available [52]. Based on the millimolar affinity constant values from metal ions to the His-tagged proteins, the later can be separated from host proteins. Binding takes place around neutral pH and elution can be carried out by either reducing pH or using competitors (e.g. imidazole). A distinctive advantage of IMAC over other affinity techniques is its applicability under denaturing conditions. This is often necessary when recombinant proteins are over-expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies [69]. Additionally, IMAC offers a series of important features for large-scale purification such as ligand stability, low cost, high protein loading, mild elution conditions and ease in regeneration [74]. Disadvantages and problems associated with the use of IMAC include: need of extensive work to process optimization generally required to reach the desirable selectivity towards target protein; controlled oxidative reduction conditions inside the column; metal-induced cleavage that may damage the protein backbone; toxicity of metal ions leaching from the solid support and the inclusion of an additional purification step for removing histidine-tags after the IMAC in recombinant systems which may introduce contaminants into the final product [75].

4.2.1.3 Synthetic ligands

Synthetic ligands are specific antibody-binding molecules designed to improve the binding properties of natural ligands [67,76]. Synthetic ligands have emerged from novel technologies as combinatorial techniques, sophisticated

molecular modeling approaches, designing and screening programs and high resolution of molecular structure methods (X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance) [52]. For example, ligand 22/8 (artificial protein A) binds both Fab and Fc fragments and proved to be the most efficient ligand for binding high chain of IgG ($K_a=1.4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) and for the separation of IgG from human [77]. This adsorbent also proved to be effective in the purification of antibodies from different species (chicken, cow, rabbit, pig, horse, rat, goat, sheep and mouse), from different human classes (IgA and IgM) and IgG subclasses. With the advent of recombinant antibody fragments, the identification of new ligands with the ability to recognize the antigen-binding domains of these fragments was required. A more recent antibody-binding molecule, ligand 8/7 (artificial protein L), presents the capability of binding full sized and fragments of immunoglobulins from different classes and sources [67]. That property resulted in the isolation of immunoglobulins from crude samples, under non-optimized conditions, by achieving a high degree of purity (up to 95%) [69].

Other examples of commercial antibody-binding ligands evaluated more recently are the protein A based ligands (MabSelect®, GE Healthcare), synthetic ligands based on mimetic dyes (Mabsorbent® A1P and A2P, Prometic Biosciences), multimodal ligands (MEP Hypercel®, Pall), prototype ligands (Millipore), single domain camelid antibody (CaptureSelect®, BAC) and Fabsorbent™ F1P HF (ProMetic BioSciences). Fabsorbent™ F1P HF is a robust small molecule that captures and purifies antibody fragments directly from biological feedstocks as an alternative to Protein L [78]. This adsorbent is a non-peptidyl triazine ligand bound to an agarose matrix that is hydroxide stable and therefore, can be sanitised using up to 1 M sodium hydroxide. The adsorbent can purify scFv and Fab fragments from a range of mammalian sources including human, bovine, ovine and murine [79].

4.2.2 Non-affinity chromatography

Although affinity-based chromatography is the most applied technique, it is also possible to purify antibodies with other chromatographic methodologies such as

ion exchange [80,81], size exclusion, hydroxyapatite [82] and hydrophobic interaction [83].

4.2.2.1 Ion exchange chromatography

Ion exchange chromatography was one of the first chromatographic techniques explored, and it is still in improvement. Recent developments allowed the production of well-characterized exchange matrix with determined porosities and charge densities. Up to date, most of stationary phases used for separation of ionic compounds are based on organic polymers and silica gel. In contrast to stationary phases prepared on silica gel, organic polymers show higher stability towards extreme pH conditions [84]. Mixed mode ion exchangers are also being promoted since they offer additional selectivity compared to standards mode [85].

Several reports present the application of ion exchange chromatography as the main separative methodology to obtain novel antibodies fragments that will be used in further researches [86,87].

4.2.2.2 Size exclusion chromatography

Size exclusion chromatography is not directly used for capturing recombinant antibodies because of its low productivity [88], but it remains as a complementary methodology to remove impurities with a molecular weight different to scFv fragments [89].

4.2.2.3 Hydroxyapatite chromatography

Hydroxyapatite crystals, with a structured arrangement of interaction points, can be considered an alternative for the purification of antibodies fragments [82]. However, due to the complexity of the mechanisms involved, antibody separations through this methodology remain difficult to predict and are not very widespread. This type of chromatography is applied just in combination with other purification methodologies.

4.2.2.4 Hydrophobic interaction chromatography

This technique is based on different superficial hydrophobicity properties present in molecules. To the purification of antibody fragments, it is used mainly as an initial capture or intermediary purification step [71]. Advantages of this chromatography are their effectiveness for removal of DNA and host protein contaminants [34]. However, the high salt concentrations required to elute antibodies make their use restricted [83].

4.3 Polishing

The main aim of the polishing step is to remove minor contaminants and aggregates present in the sample after an intermediary purification (generally accomplished by affinity based chromatography). These impurities could be salts, organic components, DNA and molecules with similar chemical superficial properties that the molecule target [90]. This step is also used to transfer the purified molecule into a suitable buffer and if necessary, to concentrate.

Dialysis and filtration were the first unit operations used to polishing. Several advances in filtration media maintain it as a methodology frequently employed. Dialysis, however, is a slow technique that requires large volumes of buffer and presents the risk that scFv could lose their binding capability during handling [91,92]. In this context, other alternatives have been assessed. At present, the most used methodologies are non-affinity chromatographies [52,7]. Anion exchange is employed frequently as the last chromatography step because of its ability to scavenge endotoxins that may have entered the process via contaminated manufacturing materials or inappropriate sample handling [33]. Its proven ability to reduce other key contaminants such as nucleotide, virus, and leached protein A, make it an even stronger candidate [90]. Cation exchange chromatography (CEC) is also used for polishing, mainly when the removal of leached protein A is required [76]. Although CEC is also expected to remove DNA from the sample, usually its performance is poorer than the anion exchange because of pH work conditions [90]. Gel-filtration based chromatography is also widely applied as a final purification methodology.

Several works reported the successful polishing ability of gel-filtration chromatography that allowed final purities up to 95% [93,69].

4.4 Integrative techniques

Currently, the production of single chain antibodies is limited by the lack of a method which provides sufficient amounts of pure antibodies. Treatments *in vivo* with scFv often utilize from hundreds of milligrams to a few grams of proteins, thus requiring facilities for very large scale production and manufacturing costs [88,36]. Conventional multi-step downstream processing can account for up to 70 % of the total process costs [94]. Each step, i.e. primary recovery, purification and polishing, contribute to the loss of product (Table 2) affecting the cost/benefit relationship. One of the most promising strategies for achieving a better operational economy is the reduction of the number of steps by integrating the primary capture of the product, from the cell suspension, with an initial purification operation [98,99]. Such integrated downstream processing implies the application of separation technologies capable of processing particle-containing solutions. These include expanded bed adsorption (EBA), precipitation and aqueous two-phase systems [98].

4.4.1 Expanded bed adsorption

The initial purification of the target molecule has traditionally been accomplished by adsorption chromatography using a conventional packed bed of adsorbent. This necessitates a clarification of the crude feed before its application to the chromatographic column. In contrast, adsorption in expanded beds (EBA) enables proteins to be recovered directly from particulate-containing feedstocks, such as fermentation broths and preparations of disrupted cells [100]. The adoption of this technique greatly reduces the complexity of downstream processing by eliminating certain filtration, centrifugation and concentration steps [101,102]. Successful antibody and antibody fragments purification by EBA have been reported in several microorganisms such as *E. coli* [103,104] and *P. pastoris* [105,106].

4.4.2 Precipitation

Precipitation remains as a methodology of interest because concentrating the sample to a solid offers the maximum degree of volume reduction, benefiting subsequent downstream purification [83]. Protein precipitation achieves separation by the conversion of soluble proteins to an insoluble state, which subsequently can be removed by various means. There are several methods to reduce the solubility of proteins which comprise the manipulation of medium conditions such as pH, metal ions, nonionic polymers, organic solvents, ligand-antibody interaction, specific ligands and polyelectrolytes [107]. Up to date, some applications to purify scFv antibodies included metal chelate affinity precipitation [108] and purification with smart polymers [109]. However, this technique has not been widely implemented to separate antibodies because of the high possibility of co-precipitation of homogenate impurities and complexity to scale up the separation of solid from supernatant.

4.4.3 Liquid-liquid extraction

Aqueous two-phase extraction has proved to be a powerful unit operation for the downstream processing of biomolecules, allowing the clarification, concentration and partial purification simultaneously of the target protein [110,111]. Aqueous two phase systems provide a suitable environment to maintain biological activity and protein solubility due to its high biocompatibility, high water content and low interfacial tension, minimizing product degradation. However, there exist some limitations related to complex interactions of the multiple components involved as well as scale up.

Several systems have been explored to purify immunoglobulins from plant [112] and mammal cells with purity of 70-95 % and recoveries greater than 90 % [113,114]. Nevertheless, purification of scFv by partitioning in aqueous two phase systems has not been widely studied. At present, just exist few reports about the application of reversed micellar aqueous two phase systems to fractionate antibody fragments from human IgG lysates [115].

5. Conclusion

Research in antibodies manufacture, aiming industrialization, is a constantly changing world. Advancing technologies were moving the focus on different areas, such as expression, production, clarification and purification. With the growing competition in the development of antibody based products, there is extensive pressure on the industry to develop strategies to obtain high-quality products in a short period of time; shifting the investigation focus mainly to downstream processes for large-scale production. Traditional methodologies, as protein A/L based chromatography, do not provide a complete solution to the cost and stability issues associated with purification procedures. This problem is aggravated due to unsatisfactory clarification techniques in which certain disadvantages such as a long time consumption, plugging of filters and material loss make the scaling up become a difficult task. In this context, it can be seen that, although there is extensive progress in recombinant antibodies purification, rigorous research into alternative cost-effective purification methods and/or improvements in traditional techniques is still required to ensure present and future scFv demands.

Acknowledgements

Luciana P. Malpiedi is grateful for the financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), which is also supporting the project together with CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, Brasília, Brazil) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- [1] Amersham Biosciences, Antibody Purification Handbook, Edition AC, 2002.
- [2] L.J. Holt, C. Herring, L.S. Jespers, B.P. Woolven, I.M. Tomlinson, Trends Biotechnol. 21 (2003) 484.
- [3] E.S. Golub, The Limits of Medicine: How Science Shapes Our Hope for the Cure, The University of Chicago Press, Ltd, London, 1997.
- [4] G. Köhler, C. Milstein, Nature 256 (1975) 495.

- [5] K. Deffar, H. Shi, L. Li, X. Wang, X. Zhu, *Afr. J. Biotechnol.* 8 (2009) 2645.
- [6] J. Thömmes, M. Weiher, A. Karau, M. Kula, *Biotechnol. Bioeng.* 4 (2005) 367.
- [7] D. Low, R. O'Leary, N. Pujar, *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 48.
- [8] N.E. Weisser, J.C. Hall, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 502.
- [9] R. Verma, E. Boleti, A.J.T. George, *J. Immunol. Methods* 216 (1998) 165.
- [10] A.H. Horwitz, C.P. Chang, M. Better, K.E. Hellstrom, R.R. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 (1998) 8678.
- [11] S.L. Morrison, M.J. Johnson, L.A. Herzenberg, V.T. Oi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 (1984) 6851.
- [12] L.K. Sun, P. Curtis, E. Rakowicz-Szulczynska, J. Ghayeb, N. Chang, S.L. Morrison, H. Koprowski, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 (1987) 214.
- [13] D.C. Andersen, D.E. Reilly, *Curr. Opin. Biotechnol.* 15 (2004) 456.
- [14] K. Ray, M.K. Embleton, B.L. Jaiikhani, M.K. Bhan, R. Kumar, *Clin. Exp. Immunol.* 125 (2001) 94.
- [15] R. Ros, F. Schwesinger, D. Anselmetti, M. Kubon, R. Schäfer, A. Plunckthun, L. Tiefenauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 7402.
- [16] Z.A. Ahmad, S.K. Yeap, A.M. Ali, W.I. Ho, N.B.M. Alitheen, M. Hamid, *Clin. Dev. Immunol.* 2012 (2012) 1.
- [17] S.K. Batra, M. Jain, U.A. Wittel, S.C. Chauhan, D. Colcher, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 603.
- [18] N. Oriuchi, T. Higuchi, H. Hanaoka, Y. Iida, K. Endo, *Ann. Nucl. Med.* 19 (2005) 355.
- [19] P.S. Chowdhury, J.L. Viner, R. Beers, I. Pastan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 669.
- [20] R. Singh, U. Samant, S. Hyland, et al., *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 562.
- [21] S.V. Kashmiri, *J. Nucl. Med.* 42 (2001) 1528.
- [22] A.C. Chan, P.J. Carter, *Nat. rev. immunol.* 10 (2010) 301.
- [23] J. Gao, S.S. Feng, Y. Guo, *Nanomedicine* 5 (2010) 1141.
- [24] D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, O. Langer, *Nat. nanotechnol.* 2 (2010) 751.
- [25] W.B. Gentry, D. Rüedi-Bettschen, S.M. Owens, *Hum. Vaccines* 5 (2009) 206.

- [26] E.C. Peterson, E.M. Laurenzana, W.T. Atchley, H. Hendrickson, S.M. Owens, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325 (2008) 24.
- [27] T. Schirrmann, T. Meyer, M. Schütte, A. Frenzel, M. Hust, *Molecules* 16 (2011) 412.
- [28] T. Schirrmann, L. Al-Halabi, S. Dübel, M. Hust, *Front. Biosci.* 1 (2008) 4576.
- [29] P.A.J. Rosa, A.M. Azevedo, S. Sommerfeld, M. Mutter, M.R. Aires-Barros, W. Bäcker, *J. Biotechnol.* 139 (2009) 306.
- [30] E.C. Peterson, M.S. Owens, R.L. Henry, *AAPS J.* 8 (2006) E383.
- [31] J.D. King, O.D. Byron, A. Mountain, N. Weir, A. Harvey, A.D.G. Lawson, K.A. Proudfoot, D. Baldock, S. Harding, G.T. Yarranton, R.J. Owens, *Biochem. J.* 290 (1993) 723.
- [32] L. Guglielmi, P. Martineau, *Methods Mol. Biol.* 562 (2009) 215.
- [33] K. Sushma, M.A. Vijayalakshmi, V. Krishnan, P.K. Satheeshkumar, *J. Biotechnol.* 156 (2011) 238.
- [34] A. Willems, J. Leoen, S. Schoonooghe, J. Grooten, N. Mertens, *J. Chromatogr. B* 786 (2003) 161.
- [35] B.V. Kilikian, I.D. Suárez, C.W. Liria, A.K. Gombert, *Process Biochem.* 35 (2000) 1019.
- [36] S.S.J. Leong, W.N. Chen, *Chem. Eng. Sci.* 63 (2008) 1401.
- [37] A. Skerra, A. Plucktum, *Protein Eng.* 4 (1991) 971.
- [38] A. Skerra, A. Plucktum, *Science* 240 (1998) 1038.
- [39] P. Martineau, P. Jones, G. Winter, *J. Mol. Biol.* 280 (1998) 117.
- [40] Y. Inoue, T. Ohta, H. Tada, S. Iwasa, S. Udaka, H. Yamagata, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48 (1997) 487.
- [41] T. Shiroza, N. Shinozaki-Kuwahara, M. Hayakawa, Y. Shibata, T. Hashizume, K. Fukushima, S. Udaka, Y. Abiko, *Biochim. Biophys. Acta.* 1626 (2003) 57.
- [42] S. Wu, R. Ye, X. Wu, S. Ng, S. Wong, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 2830.
- [43] E. Jordan, M. Hust, A. Roth, R. Biedendieck, T. Schirrmann, D. Jahn, S. Dübel, *Microb. Cell Fact.* 6 (2007) 1.
- [44] C.J. Chancey, K.V. Khanna, J.F. Seegers, G.W. Zhang, J. Hildreth, A. Langan, R.B. Markham, *J. Immunol.* 176 (2012) 5627.

- [45] C. Krüger, A. Hultberg, C. van Dollenweerd, H. Marcotte, L. Hammarström, *Molec. Biotechnol.* 31 (2005) 221.
- [46] R. Valdés, L. Gomez, S. Padilla, J. Brito, B. Reyes, T. Alvarez, O. Mendoza, O. Herrera, W. Ferro, M. Pujol, V. Leal, M. Linares, Y. Hevia, C. Garcia, I. Mila, O. Garcia, R. Sanchez, A. Acosta, D. Geada, R. Paez, J.L. Vega, C. Borroto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308 (2003) 94.
- [47] M. Liang, S. Dübel, D. Lia, I. Queitsch, W. Li, E.K.F. Bautz, *J. Immunol. Methods* 247 (2001) 119.
- [48] R.T. Burtet, M.A. Santos-Silva, G.A. Buss, L.M. Morales, A.Q. Maranhao, M.M. Brigido, *J. Biochem.* 142 (2007) 665.
- [49] K.D. Miller, J. Weaver-Feldhaus, S.A. Gray, R.W. Siegel, M.J. Feldhaus, *Protein Expr. Purif.* 42 (2005) 255.
- [50] X. Shi, T. Karkut, M. Chamankhah, M. Alting-Mees, S.M. Hemmingsen, D. Hegedus, *Protein Expr. Purif.* 28 (2003) 321.
- [51] A.C.A. Roque, M.A. Taipa, C.R. Lowe, *J. Mol. Recognit.* 17 (2004) 262.
- [52] B.V. Ayyar, S. Arora, C. Murphy, R. O'Kennedy, *Methods* 56 (2012) 116.
- [53] D.J. Roush, Y. Lu, *Biotechnol. Prog.* 24 (2008) 488.
- [54] D. Yavorsky, R. Blanck, C. Lambalot, R. Brunkow, *Technolo. March* (2003) 62.
- [55] R. van Reis, A. Zydney, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2001) 208.
- [56] J. Schroeder, A. Krul, F. Riske, Comparison of tangential flow filtration and centrifugation/depth filtration for the initial clarification of a monoclonal antibody. Poster presented at ACS National Conference, Anaheim Ca., March 2 to April 1, 2004.
- [57] J.P. Maybury, K. Mannweiler, N.J. Titchener-Hooker, M. Hoare, P. Dunnill, *Eng.* 18 (1998) 191.
- [58] A. Denizli, *J. Biol. and Chem.* 39 (2011) 1.
- [59] M. Linhult, S. Gülich, T. Gräslund, A. Simon, M. Karlsson, A. Sjöberg, K. Nord, S. Hober, *Proteins* 55 (2004) 407.
- [60] T.I. Potgieter, M. Cukan, J.E. Drummond, N.R. Houston-Cummings, Y. Jiang, F. Li, H. Lynaugh, M. Mallem, T.W. McKelvey, T. Mitchell, A. Nylen, A. Rittenhour, T.A. Stadheim, D. Zha, M. d'Anjou, *J. Biotechnol.* 139 (2009) 318.
- [61] F. Ren, B. Li, N. Zhang, M. Cao, W. Dan, S. Zhang, *Biotechnol. Lett.* 30 (2008) 1075.

- [62] M. Matasci, D.L. Hacker, L. Baldi, F.M. Wurm, *Drug Discov. Today: Technol.* 5 (2008) e37.
- [63] G. Hale, A. Drumm, P. Harrison, J. Phillips, *J. Immunol. Methods* 171 (1994) 15.
- [64] J.W. Bloom, M.F. Wong, G. Mitra, *J. Immunol. Methods* 117 (1989) 83.
- [65] L. Cope, T. McNeely, *Bacteria Immunoglobulin-Binding Proteins: Biology and Practical Applications*, in: Zhiqiang, A. (Ed.), *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2009, p 385.
- [66] B. Akerström, B.H.K. Nilson, H.R. Hoogenboom, L. Björck, *J. Immunol. Methods* 177 (1994) 151.
- [67] A.C.A. Roque, M.A. Taipa, C.R. Lowe, *J. Chromatogr. A* 1064 (2005) 157.
- [68] D. Das, T.M. Allena, M.R. Suresh, *Protein Expr. Purif.* 39 (2005) 199.
- [69] A.C.A. Roque, C.S.O. Silva, M.A. Taipa, *J. Chromatogr. A* 1160 (2007) 44.
- [70] S. Hober, K. Nord, M. Linhult, *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 40.
- [71] A. Moosmann, E. Gerlach, R. Lindner, H. Böttinger, *J. Chromatogr. A*, 1236 (2012) 90.
- [72] K. Trisler, L.L. Looger, V. Sharma, M. Baker, D.E. Benson, S. Trauger, P.G. Schultz, V.V. Smider, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 26344.
- [73] J.L. Casey, P.A. Keep, K.A. Chester, L. Robson, R.E. Hawkins, R.H.J. Begent, *J. Immunol. Methods* 179 (1995) 105.
- [74] G. Palombo, S.D. Falco, M. Tortora, G. Cassani, G. Fassina, *J. Mol. Recognit.* 11 (1998) 243.
- [75] V. Gaberc-Porekar, V. Menart, *J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (2001) 335.
- [76] A.A. Shukla, B. Hubbard, T. Tressel, S. Guhan, S. Low, *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 28.
- [77] S.F. Teng, K. Sproule, A. Husain, C.R. Lowe, *J. Chromatogr. B* 740 (2000) 1.
- [78] S. Williams, A. Lobbezoo, M. Stobbart, H. Kirkman, S. Burton, *A Synthetic Ligand Affinity Adsorbent for Capture and Purification of Genetically Engineered Antibody Fragment Therapeutics*, ProMetic BioSciences Ltd., Cambridge Science Park, Cambridge, 2009.

- [79] ProMetic BioSciences Ltd., Capture and Purification of Fab fragments from human polyclonal IgG papain digest using Fabsorbent F1P HF, Application Note, Cambridge, 2009.
- [80] C. Marty, P. Scheidegger, K. Ballmer-Hofer, R. Klemenz, R.A. Schwendener, *Protein Expr. Purif.* 21 (2001) 156.
- [81] J.V. Schaefer, A. Plückthun, Improving Expression of scFv Fragments by Co-expression of Periplasmic Chaperones, in: Kontermann, R., Dübel, S. (Eds.), *Antibody Engineering Vol. II*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, p. 345.
- [82] J.R. Sinacola, A.S. Robinson, *Protein Expr. Purif.* 26 (2002) 301.
- [83] P. Gagnon, *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 57.
- [84] M. Jackowska, S. Bocian, P. Kosobucki, B. Buszewski, *Chromatographia* 72 (2010) 611.
- [85] A. Nordborg, E.F. Hilder, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 71.
- [86] L. Evans, M. Hughes, J. Waters, J. Cameron, N. Dodsworth, D. Tooth, A. Greenfield, D. Sleep, *Protein Expr. Purif.* 73 (2010) 113.
- [87] X. Zhang, T. Zhang, B. Wang, T. Tang, L. Sun, Q. Luo, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 5 (2011) 2689.
- [88] S. Aldington, J. Bonnerjea, *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 64.
- [89] J. Laroche-Traineau, A. Clofent-Sanchez, X. Santarelli, *J. Chromatogr. B* 737 (2000) 107.
- [90] A.A. Shukla, M.R. Etzel, S. Gadam, *Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry*. Taylor and Francis Group, LLC, 2007.
- [91] Amersham Biosciences, *Protein Purification Handbook*, Edition AB, 1999.
- [92] J.A. Moss, A.R. Coyle, J. Ahn, M.M. Meijler, K. Offer, K.D. Janda, *J. Immunol. Methods* 281 (2003) 143.
- [93] I. Laroche, M. Demaeyer, J. Stassen, Y. Gansemans, E. Demarsing, G. Matthyssens, D. Collen, P. Holvoet, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 16343.
- [94] A. Ramakrishnan, A. Sadana, *Economics of Bioseparation Processes*, in: Ahuja, S. (Ed.), *Separation Science and Technology ,Handbook of Bioseparations*, Vol. II. Copyright © 2000 by Academic Press.
- [95] L.M. Damasceno, I. Pla, H. Chang, L. Cohen, G. Ritter, L.J. Old, C.A. Batt, *Protein Expr. Purif.* 37 (2004) 18.

- [96] F.M. Freyre, J.E. Vazquez, M. Ayala, L. Canaán-Haden, H. Bell, I. Rodríguez, A. González, A. Cintado, J.V. Gavilondo, J. Biotechnol. 76 (2000) 157.
- [97] L. Sanchez, M. Ayala, F. Freyre, I. Pedroso, H. Bell, V. Falcon, J.V. Gavilondo, J. Biotechnol. 72 (1999) 13.
- [98] M.B. Dainiak, A. Kumara, F.M. Plieva, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, J. Chromatogr. A 1045 (2004) 93.
- [99] L.P. Fonseca, J.M.S. Cabral, J. Chem. Technol. Biotechnol. 77 (2002) 1176.
- [100] R. Robert, G. Clofent-Sanchez, A. Hocquellet, M.J. Jacobin-Valat, D. Daret, A.M. Noubhani, X. Santarelli, Int. J. Biol. Macromol. 39 (2006) 51.
- [101] H.A. Chase, TIBTECH. 12 (1994) 296.
- [102] S. Ghose, H. Chase, Bioseparation 9 (2000) 29.
- [103] M.B. Hansen, A. Lihme, M. Spital, D. King, Bioseparation 8 (1999) 189.
- [104] T. May, K. Pohlmeyer, BioProcess Int. 9 (2011) 32.
- [105] H.A. Chase, N.M. Draeger, J. Chromatogr. 597 (1992) 129.
- [106] K.L. Vigor, P.G. Kyrtatos, S. Minogue, K.T. Al-Jamal, H. Kogelberg, B. Tolner, K. Kostarelos, R.H. Begent, Q.A. Pankhurst, M.G. Lythgoe, Q.A. Chester, Biomaterials 31 (2010) 1307.
- [107] V.A. Izumrudov, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, Bioseparation 7 (1999) 207.
- [108] A. Kumar, P. Wahlund, C. Kepka, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, Biotechnol. Bioeng. 84 (2003) 494.
- [109] A. Kumar, A. Srivastava, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, Prog. Polym. Sci. 32 (2007) 1205.
- [110] M. Rito-Palomares, J. Chromatogr. B 807 (2004) 3.
- [111] P. Selvakumar, T.C. Ling, S. Walker, A. Lyddiatt, J. Chromatogr. B 878 (2010) 1784.
- [112] J.W. Lee, D. Forciniti, Biotechnol. Prog. 26 (2009) 159.
- [113] P.A.J. Rosa, A.M. Azevedo, I.F. Ferreira, J. de Vries, R. Korpelaar, H.J. Verhoef, T.J. Visser, M.R. Aires-Barros, J. Chromatogr. A 1162 (2007) 103.
- [114] A.M. Azevedo, P.A.J. Rosa, I.F. Ferreira, A.M.M.O. Piscoa, J. de Vries, R. Korpelaar, T.J. Visser, M.R. Aires-Barros, Sep. Pur. Technol. 65 (2009) 31.
- [115] M. Kamihira, H. Yanagisawa, K. Takahashi, H. Takeuchi, J. Ferment. Bioeng. 77 (1993) 80.

ANEXOS

Resumo do pôster apresentado no XX Congresso Latino-americano de Microbiologia.

Montevideo del 27 al 30 de Septiembre de 2010.

Comparison of antibody fragment scFv production by *Pichia pastoris* in Bioreactor and *shaker*

Cesar Andres Diaz Arias¹; Daniela de Araujo Viana Marques², Soraya Kazuma M²; Marcela Cavalcante²; Bruno Rosso¹; Valeria de carvalho Santos-Ebinuma¹; João Vitor¹; Dulcineia Abdalla Saes Parra²; Adalberto Pessoa Junior¹

¹ University of São Paulo-Faculty of Pharmaceutical Sciences-Dept. Sci. Biochemical-Pharmaceutical-Av. Lineu Prestes, no. 580, Block 16, University City, São Paulo 05508-000, E-mail: cae-sare@hotmail.com, ² University of São Paulo-Faculty of Pharmaceutical Sciences - Dept. Analisis clinical Toxicology - Av Lineu Prestes, Block 17

The monoclonal antibody fragment scFv was expressed by the yeast *Pichia pastoris* using the AOX1 promoter in the presence of methanol as sole carbon source and as a model of expression; this antibody is considered a possible alternative for the diagnostic and treatment of arterioscleroses. We compared two models of production, the first in bioreactor with final volume of 2L, the growth temperature was 30°C, and induction growth was 20°C and agitation maintained at 600 rpm with a constant flow of oxygen of 1.2 vvm which corresponds to a K_La 91.8 h⁻¹. The second growth with final volume of 200 ml in *shaker* grew conditions of the same temperature under; agitation was performed at 250 rpm. The initial inoculum grew in glycerol medium for 16 hours and absorbance which of 0.286 measured in 50-fold dilution in spectrophotometer at 600 nm; Petri dishes were inoculated with dilutions 1 / 100 throwing a result 53×10^{16} CFU of viable cell. The culture medium used was BMGY (Buffered Glycerol Complex Medium); the antibody production was occurred during 98 h and the first Induction at 28 h (the end of growth phase) where it was found the highest cell density. The samples were taken every 6 h in the production phase and every 12 h after the Induction phase and observed an increase in cell growth with a maximum of 22.92 g/L in bioreactor and 6.77 g/L in *shaker*. The consumption overall of glycerol was observed in 24h and 42h, respectively, and ethanol production a maximum concentration of 1,028 and 1,286 g/L respectively, significant values taking into account the cell density of the two studies. The best result of antibody production was in bioreactor with

an overall quantification of 2.0 g/L. The highest production methods of the antibody against when the temperature at 20°C and remained at the cell density high absorbance reaches, the production of ethanol decreased by high concentrations of dissolved oxygen as a function of K_La .

Organizing Committee

Vilma Regina Martins
Estela Bevilacqua
Luiz Fernando Lima Reis
Patrícia Gama
Marinilce F Santos
Chao Yun Irene Yan
Marimélia Porcionatto
Flávia A Gomes
Silvana Allodi

We certify that

KAZUMA, S.M., CAVALCANTE, M.F., DIAZ, C.A., MARQUES, D.V.,
CASTRO, F.G.S., RUDNICK, M., FAULIN, T.E.S., CÉSAR, F.A.,
PESSOA JUNIOR, A., ADBALLA, D.S.P

presented the Poster entitled

Inhibitory activity of single chain variable fragment anti-LDL (-) on the
formation of foam cells

at the XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology held in São
Paulo, Brazil on July 24-27th, 2010.

President
Organizing Committee
SBBC 2010

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

XV SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA XLV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho "INHIBITORY ACTIVITY OF ANTI-LDL(-) SINGLE-CHAIN VARIABLE FRAGMENT ON THE FORMATION OF FOAM CELLS" (FCF009), de autoria de SORAYA MEGUMI KAZUMA, MARCELA FROTA CAVALCANTE, CESAR ANDRES DIAZ, DANIELA VIANA MARQUES, FERNANDA GOMES SIERRA CASTRO, MARTINA RUDNICKI, TANIZE DO ESPIRITO SANTO FAULIN, FERNANDA ANDRADE DE CÉSAR, ADALBERTO PESSOA JUNIOR e DULCINEIA SAES PARRA ABDALLA, foi exposto no Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas, realizado no período de 18 a 22 de outubro de 2010, durante a XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia.

São Paulo, 22 outubro de 2010.

Prof.^a Dr.^a *Sandra Helena Polisselli Farsky*
Presidente da Comissão Organizadora

Prof. Dr. *Jorge Mancini Filho*
Diretor da FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

XVII SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
XLVII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica
4º Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas

Certificado

Certificamos que o trabalho **"PHASE SEPARATION OF MICELLAR SOLUTIONS CONTAINING TRITON X-114 AND PICHIA PASTORIS FERMENTATION SUPERNATANT"** (FCF067), de autoria de LUCIANA PELLEGRINI MALPIEDI, CÉSAR DÍAZ, ADALBERTO PESSOA JR, foi exposto no Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas, realizado no período de 1º a 5 de outubro de 2012, durante a XVII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia.

São Paulo, 05 de outubro de 2012.

Prof. Maria Inês R. M. Santoro
Presidente da Comissão de Pesquisa

Profa. Bernadette D.G. M. Franco
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Prof. Sandra Helena Polisselli Farsky
Presidente da Comissão Organizadora

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

XVII SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
XLVII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica
4º Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas

Certificado

Certificamos que o trabalho **"VIABILITY ANALYSIS BY FLOW CYTOMETRY OF PICHIA PASTORIS STRAINS AFTER FREEZING AND FREEZE-DRYING"** (FCF003), de autoria de VALKER ARAUJO FEITOSA, CESAR ANDRES DIAZ ARIAS, RENATA CHAVES ALBUQUERQUE, ADALBERTO PESSOA JÚNIOR, foi exposto no Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas, realizado no período de 1º a 5 de outubro de 2012, durante a XVII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia.

São Paulo, 05 de outubro de 2012.

Prof. Maria Inês R. M. Santoro
Presidente da Comissão de Pesquisa

Profa. Bernadette D.G. M. Franco
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Prof. Sandra Helena Polisselli Farsky
Presidente da Comissão Organizadora