

**FELIPE DE OLIVEIRA CINTRA**

**MODELAGEM MATEMÁTICA E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO  
DE EXOPOLISSACARÍDEO DE *Haemophilus influenzae* TIPO B**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Mickie Takagi

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

SÃO PAULO  
2014

## RESUMO

Cintra FO. Modelagem matemática e otimização da produção de exopolissacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo b. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

*Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) é uma bactéria patogênica ao ser humano, responsável por pneumonias, septicemias e meningites. O polissacarídeo capsular conjugado a proteína é utilizado como antígeno em vacinas polivalentes, onde representa mais que a metade do custo total da formulação. O alto custo da vacina Hib provém, entre outros, das altas perdas durante os processos de cultivo, purificação e conjugação devido à instabilidade química do polissacarídeo. Este trabalho tem por finalidade otimizar o processo de produção do polissacarídeo, levando-se em conta a interface cultivo/purificação. Primeiramente, foi feita a escolha de um modelo cinético que descreve o crescimento celular com inibição por acetato, a formação mista de acetato e a formação de polissacarídeo não-associada ao crescimento com inibição por acetato. Em seguida, foi realizado um desenho experimental para avaliar os efeitos de pH e temperatura sobre os parâmetros do modelo. Ficou demonstrado que a velocidade de crescimento é máxima em pH 6,73 ( $0,644 \text{ h}^{-1}$ ); a constante de inibição pelo acetato é maior na região alcalina ( $9,907 \text{ g}_A \cdot \text{L}^{-1}$  em pH 7,5 contra  $5,819 \text{ g}_A \cdot \text{L}^{-1}$  em pH 6,3); a formação de acetato associada ao crescimento é maior no limite superior de pH ( $0,796 \text{ g}_A \cdot \text{g}_X^{-1}$  em pH 7,5 contra  $0,477 \text{ g}_A \cdot \text{g}_X^{-1}$  em pH 6,3), enquanto que a formação não-associada tem maior influência da temperatura, com um máximo em  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 6,3 ( $0,141 \text{ g}_A \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ); a formação de polissacarídeo apresenta um máximo em condições fisiológicas ( $45,271 \text{ mg}_P \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  em pH 7,2 e  $37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ), com a inibição pelo acetato também maior em pH alcalino ( $12,083 \text{ g}_A \cdot \text{L}^{-1}$  em pH 7,5 contra  $6,541 \text{ g}_A \cdot \text{L}^{-1}$  em pH 6,3); a liberação de polissacarídeo ao sobrenadante também é maior em pH mais alto (88 % em pH 7,5 contra 55 % em pH 6,3). Tanto a produtividade de polissacarídeo quanto sua massa molecular mostraram um valor máximo em pH 7,1, porém a produtividade foi maior em temperaturas mais altas ( $117,89 \text{ mg}_P \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  em  $37^\circ\text{C}$  contra  $67,24 \text{ mg}_P \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  em  $29 \text{ }^\circ\text{C}$ ) enquanto que para a massa molecular foi observado o contrário (642 kDa em  $29 \text{ }^\circ\text{C}$  contra 472 kDa em  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A partir destes resultados, as condições otimizadas de cultivo foram definidas como pH de 7,1 e temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nestas condições, a massa molecular obtida foi cerca de 78 % maior (643 kDa) que nas condições da literatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 7,5 (361 kDa), com uma produção de polissacarídeo equivalente nos dois casos ( $1400 \text{ mg}_P \cdot \text{L}^{-1}$ ). Esse aumento resultou em maior recuperação na primeira etapa de purificação (de 44 para 75 %), comprovando assim que a nova condição otimizada de cultivo pode contribuir no aumento dos rendimentos nas etapas subsequentes de purificação e conjugação do polissacarídeo, garantir maior eficiência do processo, possibilitar a diminuição de escala e impactar na redução do custo final da vacina. Suporte financeiro de Fundação Butantan e BNDES (Nº 11.2.0322.1/2012).

**Palavras-chave:** *Haemophilus*. Polissacarídeos bacterianos. Modelos matemáticos. Planejamento de experimentos ótimos. Vacinas. Bactérias Gram-negativas.

## ABSTRACT

Cintra FO. Mathematical modelling and optimization of the production of exopolysaccharide from *Haemophilus influenzae* type b. [dissertation (Master in Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

*Haemophilus influenzae* type b (Hib) is a bacterium that is pathogenic to the human being, causing pneumonia, sepsis and meningitis. The capsular polysaccharide conjugated to a protein is used as antigen in polyvalent vaccines, where it represents more than half of the total price of the formulation. This high cost for the Hib vaccine arises among other reasons from the low recovery ratios throughout the culture, purification and conjugation processes, due to the chemical instability of the polysaccharide. This work considers the interface between culture and purification as the subject for the optimization of the polysaccharide production. First, a kinetic model was selected, that describes the cellular growth as being inhibited by acetate; acetate formation as being of the mixed type; and polysaccharide formation as being non-growth associated and also undergoing acetate inhibition. Then, a design of experiments was carried out in order to evaluate the effects of pH and temperature on the kinetic parameters. It was demonstrated that the rate of growth is maximum at pH 6.73 ( $0.644 \text{ h}^{-1}$ ); the inhibition constant is higher at alkaline pH ( $9.907 \text{ g}_A \cdot \text{L}^{-1}$  at pH 7.5 against  $5.819 \text{ g}_A \cdot \text{L}^{-1}$  at pH 6.3); the growth associated acetate formation is also higher at alkaline pH ( $0.796 \text{ g}_A \cdot \text{g}_X^{-1}$  at pH 7.5 against  $0.477 \text{ g}_A \cdot \text{g}_X^{-1}$  at pH 6.3) while the non-associated part is more influenced by temperature, achieving  $0.141 \text{ g}_A \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  at  $37^\circ \text{C}$  and pH 6.3; the polysaccharide formation presented an optimum at physiological conditions ( $45.271 \text{ mg}_P \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  at pH 7.2 and  $37.1^\circ \text{C}$ ), with the inhibition constant also higher at elevated pH ( $12.083 \text{ g}_A \cdot \text{L}^{-1}$  at pH 7.5 against  $6.541 \text{ g}_A \cdot \text{L}^{-1}$  at pH 6.3); the rate of polysaccharide release from the cells was also increased at higher pH (88 % at pH 7.5 against 55 % at pH 6.3); both polysaccharide productivity and molecular mass were optimal at pH 7.1, though productivity was increased by temperature ( $117.89 \text{ mg}_P \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  at  $37^\circ \text{C}$  against  $67,24 \text{ mg}_P \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  at  $29^\circ \text{C}$ ) while the opposite was true for the molecular mass (642 kDa at  $29^\circ \text{C}$  against 472 kDa at  $37^\circ \text{C}$ ). From these results, the optimal conditions were defined as pH 7.1 and  $30^\circ \text{C}$ . In these conditions, the molecular mass was 78 % higher (643 kDa) than the described in the literature, with pH 7.5 and  $37^\circ \text{C}$  (361 kDa), achieving the same amount of polysaccharide ( $1400 \text{ mg}_P \cdot \text{L}^{-1}$ ). This new scenery resulted in higher recovery at the first step of purification (from 44 to 75 %), thus confirming that the new conditions may also improve the yields in the following steps of purification and conjugation, ensuring better efficiency, enabling reduction of scale and minimizing the final cost of the vaccine. Supported by Fundação Butantan and BNDES (N° 11.2.0322.1/2012).

**Keywords:** *Haemophilus*. Bacterial polysaccharides. Mathematical models. Design of experiments. Vaccines. Gram-negative bacteria.

## 1 INTRODUÇÃO

*Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) é uma bactéria de grande importância médica, sendo responsável por graves infecções em indivíduos de baixa imunidade, como crianças menores de cinco anos de idade e idosos. A Hib é capaz de originar quadros clínicos severos, entre eles as pneumonias, septicemias e meningites, sendo que a última é a forma pela qual a bactéria se torna mais perigosa, levando o enfermo a óbito ou causando sequelas neurológicas graves. As infecções por Hib têm sido controladas com sucesso desde a década de 1980 nos países desenvolvidos através da vacinação com o polissacarídeo capsular conjugado a um carreador proteico. A extensão da cobertura da vacinação a países subdesenvolvidos tem sido incentivada por órgãos internacionais de saúde, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), através da inclusão do componente Hib em vacinas polivalentes, como a combinação com as vacinas tríplice de difteria, tétano e pertussis (DTP) e com a vacina de hepatite B (HepB).

A produção da vacina conjugada de Hib é realizada pelas grandes indústrias farmacêuticas, e vem sendo implementada em institutos públicos nos últimos anos. Entretanto, os processos de produção são demasiadamente caros, tornando a inserção do componente Hib como integrante das vacinas um dos principais fatores que dificultam a inclusão destas nos programas de imunização globais. O projeto institucional no qual este trabalho se insere possui três frentes:

- 1) otimização do processo de cultivo celular e produção de polissacarídeo;
- 2) otimização e simplificação dos protocolos de separação celular e purificação;
- 3) otimização da conjugação do polissacarídeo e caracterização do produto final.

Os estudos da etapa de cultivo celular e produção de polissacarídeo são centrados na caracterização dos processos bioquímicos envolvidos, com a caracterização dos principais fatores que determinam a produtividade do polissacarídeo capsular e a recuperação do mesmo nas etapas seguintes de purificação. Neste contexto, os objetivos gerais do trabalho desenvolvido nesta etapa são:

- definir os fenômenos químicos e bioquímicos envolvidos na formação e isolamento do polissacarídeo capsular;

- caracterizar a interface cultivo/purificação como um ponto de grande atenção para a otimização da produção do polissacarídeo;
- simular os processos de produção e purificação a fim de entender os mecanismos envolvidos, além de fornecer ferramentas para a predição das condições ótimas de produção.

Uma vez definida a interface cultivo/purificação como uma etapa essencial para o desenvolvimento dos bioprocessos relacionados à produção do polissacarídeo, novos critérios de otimização são encontrados. Estes critérios devem levar em consideração não apenas a produtividade mássica do polissacarídeo capsular, mas também a qualidade da molécula, o que irá influenciar na recuperação do processo de purificação. Para isso, se faz necessário encontrar modelos teóricos que permitam relacionar os fatores importantes para o crescimento celular com a purificação, e vice-versa. Assim, os objetivos específicos deste trabalho serão:

- relacionar as condições de cultivo à estabilidade química do polissacarídeo e à sua massa molecular durante o processo;
- definir as condições de cultivo que alteram as cinéticas de produção durante o crescimento através de modelos estatísticos, comparando-os aos modelos formais descritos na literatura;
- otimizar o processo de produção do polissacarídeo no sentido de maximizar sua massa molecular;
- criar bases para um modelo global que relacione a máxima produtividade de PRP com as taxas de recuperação durante a purificação.

Inicialmente será apresentada uma revisão bibliográfica, onde serão abordadas: a importância da vacinação contra Hib no cenário das políticas públicas de saúde; a produção do antígeno vacinal e os gargalos de desenvolvimento que dificultam a obtenção de um processo de baixo custo; os fatores químicos e bioquímicos que resultam nos gargalos observados; e as ferramentas da Engenharia Bioquímica que podem dar subsídio à otimização do processo, tal como a modelagem matemática. Posteriormente, serão apresentados os experimentos realizados e as metodologias utilizadas na obtenção e tratamento dos dados e os experimentos realizados; em seguida, os resultados obtidos juntamente com as discussões; e finalizando-se com as conclusões. A parte experimental do trabalho

foca na busca por alternativas para manutenção da integridade da molécula durante o processo de produção e avalia o impacto das alternativas tomadas nos demais parâmetros do processo.

## 2 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A diretriz principal deste trabalho foi a criação de modelos cinéticos e estatísticos para a otimização do processo de produção do polissacarídeo capsular de Hib, considerando-se a produtividade global obtida através da consideração da interface entre o crescimento celular e a purificação. Em trabalhos anteriores, ficou demonstrado o decréscimo dos valores de massa molecular do PRP durante o cultivo, e que estes baixos valores resultavam em altas perdas de polissacarídeo durante as etapas de UFT realizadas no processo de purificação; demonstrou-se também que o PRP é inerentemente instável, sofrendo clivagem espontânea em determinadas condições de pH, temperatura e concentração de sais. Pode-se dizer com isso que os pH's elevados usados nos cultivos descritos na literatura e o aumento da concentração de íons sódio devido ao controle de pH são alguns dos fatores responsáveis pela degradação observada, e ficou evidente que estas condições deveriam ser modificadas durante a etapa de crescimento celular para evitar as perdas observadas na purificação.

Para contornar esta problemática, foram realizados cultivos em diferentes condições de pH e temperatura, com o objetivo de avaliar como a bactéria se comportaria em relação ao seu metabolismo e à qualidade do polissacarídeo obtido ao final do processo.

Para realizar estas avaliações, fez-se necessária a escolha de um modelo cinético. Vários modelos descritos na literatura foram testados, e através do critério de informação de Akaike foi possível escolher um modelo entre o conjunto de modelos sugeridos, sendo que ficou demonstrada a robustez do modelo ao descrever eficientemente a cinética microbiana em diversas condições.

O estudo dos parâmetros cinéticos dos modelos obtidos foi feito através de ferramentas estatísticas, que possibilitaram evidenciar a importância e a forma de atuação do pH e da temperatura sobre as velocidades de crescimento celular e formação de produtos, como o acetato e o PRP, além de fornecer informações sobre os efeitos de inibição por metabólitos tóxicos. A combinação dos modelos cinéticos obtidos permitiu encontrar uma condição ótima para a produtividade de PRP durante o cultivo. Esta condição é diferente da descrita em várias fontes, fornecendo assim por si só uma informação relevante.

A medição da massa molecular durante os cultivos evidenciou que existe relação direta entre este parâmetro e as condições de pH e temperatura mantidas durante o crescimento celular. Ficou claro também que, além de influenciar nas velocidades de degradação da molécula, estes parâmetros tem influência direta sobre a massa molecular de síntese do polissacarídeo. O fato de os cultivos realizados a menores temperaturas apresentarem PRP de maiores massas moleculares indicou que a redução da taxa metabólica permite a ação mais controlada da síntese do polímero, provavelmente pela maior processividade das enzimas envolvidas.

Com a comparação entre os perfis de produtividade e de massa molecular obtidos, foi sugerida uma nova condição de cultivo que otimizasse a relação entre estes dois parâmetros. A replicação do cultivo nessas condições em regimes de alta produção observados na literatura resultou em valores muito semelhantes quanto às concentrações dos metabólitos. No entanto, o aumento da massa molecular do polissacarídeo obtido foi marcante.

Com o estudo da primeira etapa de purificação, ficou demonstrado que a simples mudança na condição de cultivo foi um fator importantíssimo para a produtividade global do processo, já que o rendimento inicial foi grandemente aumentado. A projeção dos resultados obtidos sobre todo o processo de produção, até a vacina final, demonstrou que a escala de produção pode ser reduzida consideravelmente.

O fato de a massa molecular ter influído fortemente sobre uma única etapa da purificação evidencia que este parâmetro deve ser acompanhado durante os estudos de desenvolvimento de processo para a vacina Hib e utilizado como ferramenta de otimização. Os dados obtidos aqui deixam uma série de possibilidades para continuação, tanto nas etapas de *upstream* quanto de *downstream*. Entre elas, pode-se citar:

- Acompanhar a evolução da massa molecular do PRP durante os processos de purificação e conjugação, a fim de evidenciar outras etapas de perda de estabilidade;
- Estudar como o aumento da massa molecular pode influir sobre as outras etapas de purificação e conjugação, sendo possível encontrar maiores rendimentos em cada uma delas;

- Criar modelos para correlacionar a massa molecular do polissacarídeo com a permeabilidade nas membranas de ultrafiltração, a fim de unir os modelos de produtividade das etapas de crescimento celular e de purificação, permitindo encontrar uma condição ótima global;
- Otimizar outros parâmetros do cultivo celular com base nos modelos cinéticos e nas superfícies de resposta obtidos, como os regimes de alimentação, com o objetivo de minimizar a inibição pelo acetato e maximizar a produção de PRP de alta massa molecular;
- Ainda com os modelos, aprofundar o entendimento sobre as vias metabólicas do microrganismo, elucidando os mecanismos de formação de PRP e de acetato, dos fenômenos de inibição metabólica, da eficiência energética, etc.

## REFERÊNCIAS\*

- Aiba S, Shoda M, Nagatani M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol Bioeng*. 1968;10(6):845–64.
- Albani SMF, Silva MR, Takagi M et al. Improvement in the purification process of the capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae* type b by using tangential ultrafiltration and diafiltration. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;167(7):2068–75.
- Albani SMF, Silva MR, Fratelli F et al. Polysaccharide purification from *Haemophilus influenzae* type b through tangential microfiltration. *Carbohydr Polym*. 2015;116:67–73.
- Anderson P, Smith DH. Isolation of the capsular polysaccharide from culture supernatant of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun*. 1977;15(2):472–7.
- Biberstein EL, Mini PD, Gills MG. Action of *Haemophilus* cultures on delta-aminolevulinic acid. *J Bacteriol*. 1963;86:814–9.
- Bisgard KM, Kao A, Leake J et al. *Haemophilus influenzae* invasive disease in the United States, 1994-1995: near disappearance of a vaccine-preventable childhood disease. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(2):229–37.
- Borisov VB, Gennis RB, Hemp J et al. The cytochrome bd respiratory oxygen reductases. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1807(11):1398–413.
- Brul S, Coote P. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int J Food Microbiol*. 1999;50(1-2):1–17.
- Burnham KP, Anderson DR. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. New York: Springer; 2002.
- Cecchini G, Schröder I, Gunsalus RP et al. Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1553(1-2):140–57.
- Cintra FO, Takagi M. Comparison among different sample treatment methods for analysis of molecular weight and concentration of exopolysaccharide produced by *Haemophilus influenzae* type b. In: Mendez-Vilas A, Editor. *Microbes in applied research: current advances and challenges*. Singapore: World Scientific Publishing Company; 2012. p. 513–7.
- Cintra FO, Takagi M. Study of the chemical stability of the capsular polysaccharide produced by *Haemophilus influenzae* type b. *Carbohydr Polym*. 2015;116:167–72.
- Crisel RM, Baker RS, Dorman DE. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae*, type b. I. Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. *J Biol Chem*. 1975;250(13):4926–30.
- De Haan A, Van der Put RMF, Beurret M. HPAEC-PAD method for the analysis of alkaline hydrolyzates of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. *Biomed Chromatogr*. 2013;27(9):1137–42.
- Egan W, Schneerson R, Werner KE et al. Structural studies and chemistry of bacterial capsular polysaccharides. Investigations of phosphodiester-linked capsular polysaccharides isolated from *Haemophilus influenzae* types a, b, c, and f: NMR spectroscopic identification and chemical modification. *J Am Chem Soc*. 1982;104(10):2898–910.

---

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

- Eldere J, Brophy L, Loynds B et al. Region II of the Haemophilus influenzae Type b capsulation locus as involved in serotype-specific polysaccharide synthesis. *Mol Microbiol.* 1995;15(1):107–18.
- Evans NM, Smith DD, Wicken AJ. Haemin and nicotinamide adenine dinucleotide requirements of Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae. *J Med Microbiol.* 1974;7(3):359–65.
- Fleischmann RD, Adams MD, White O et al. Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. *Science.* 1995;269(5223):496–512.
- Global Alliance for Vaccine Innovation. Hib vaccine. Disponível em: <<http://www.gavialliance.org/support/nvs/hib/>>. Acesso em: 12 nov. 2013.
- Greaves RI. Preservation of living cells by freeze-drying. *Ann N Y Acad Sci.* 1960;85(2):723–8.
- Hamidi A, Beurret MF. Process for producing a capsular polysaccharide for use in conjugate vaccines. US 7582459B2. 10 set. 2004; 01 set. 2009.
- Hinshelwood C. The chemical kinetics of the bacterial cell. Oxford: Clarendon Press; 1946.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção da População do Brasil por sexo e idade: 1980-2050 - Revisão 2008. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao\\_da\\_populacao/2008/default.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/default.shtm)>. Acesso em: 21 out. 2014.
- Kavanau JL. Enzyme kinetics and the rate of biological processes. *J Gen Physiol.* 1950;34(2):193–209.
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. KEGG PATHWAY Database. Disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>>. Acesso em: 12 nov. 2013.
- Kroll JS, Moxon ER. Capsulation and gene copy number at the cap locus of Haemophilus influenzae type b. *J Bacteriol.* 1988;170(2):859–64.
- Krulwich TA. Alkaliphiles: “basic” molecular problems of pH tolerance and bioenergetics. *Mol Microbiol.* 1995;15(3):403–10.
- Kuhnert P, Christensen H. Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects. Norfolk: Caister Academic Press; 2008.
- Kupcsulik B, Sevelle B. Optimization of specific product formation rate by statistical and formal kinetic model descriptions of an HSA producing Pichia pastoris Muts strain. *Chem Biochem Eng.* 2005;19(1):99–108.
- Li Y, Breaker RR. Kinetics of RNA Degradation by Specific Base Catalysis of Transesterification Involving the 2'-Hydroxyl Group. *J Am Chem Soc.* 1999;121(23):5364–72.
- Liu L, Du G, Chen J et al. Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of Streptococcus zooepidemicus. *Bioresour Technol.* 2008;99(17):8532–6.
- Loeb MR. Ferrochelatase activity and protoporphyrin IX utilization in Haemophilus influenzae. *J Bacteriol.* 1995;177(12):3613–5.

Luedeking R, Piret EL. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J Biochem Microbiol Technol Eng.* 1959;1(4):393–412.

Mawas F, Bolgiano B, Belgrave D et al. International collaborative study to evaluate a candidate international standard for Haemophilus Influenzae type B Capsular Polysaccharide. Geneva; 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/69141>>. Acesso em: 24 out. 2014.

Mawas F, Bolgiano B, Rigsby P et al. Evaluation of the saccharide content and stability of the first WHO International Standard for Haemophilus influenzae b capsular polysaccharide. *Biologicals.* 2007;35(4):235–45.

Merritt J, Allard G, O'Toole L et al. Development and scale-up of a fed-batch process for the production of capsular polysaccharide from Haemophilus influenzae. *J Biotechnol.* 2000;81(2-3):189–97.

Meunier DM. Molecular weight determinations. In: Settle FA, Editor. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry.* Upper Saddle River: Prentice-Hall; 1997. p. 853–866.

Ministério da Saúde. Calendário Nacional de Vacinação. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/13600-calendario-nacional-de-vacinacao>>. Acesso em: 22 nov. 2014.

Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* 1961;191(4784):144–8.

Othman DSMP, Schirra H, McEwan AG et al. Metabolic versatility in Haemophilus influenzae: a metabolomic and genomic analysis. *Front Microbiol.* 2014;5:69.

Pereira MP, Brown ED. Bifunctional catalysis by CDP-ribitol synthase: convergent recruitment of reductase and cytidyltransferase activities in Haemophilus influenzae and Staphylococcus aureus. *Biochemistry.* 2004;43(37):11802–12.

Ratkowsky DA, Olley J, McMeekin TA et al. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J Bacteriol.* 1982;149(1):1–5.

Ratkowsky DA, Lowry RK, McMeekin TA et al. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J Bacteriol.* 1983;154(3):1222–6.

Reidl J, Schlör S, Kraiss A et al. NADP and NAD utilization in Haemophilus influenzae. *Mol Microbiol.* 2000;35(6):1573–81.

Rosso L, Lobry JR, Bajard S et al. Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61(2):610–6.

Schilling CH, Palsson BO. Assessment of the metabolic capabilities of Haemophilus influenzae Rd through a genome-scale pathway analysis. *J Theor Biol.* 2000;203(3):249–83.

Silva MR. Estratégias de cultivo para a produção de polissacarídeo capsular por Haemophilus influenzae tipo b e determinação de parâmetros de qualidade para o produto. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. Universidade Federal de São Carlos, 2010.

Sociedade Brasileira de Imunizações. Alteração do Calendário de Vacinação da Criança. Disponível em: <<http://www.sbim.org.br/noticias-sbim/convocacao/>>. Acesso em: 22 nov. 2014.

Stepanova N, Romanovskii I, Ierusalimskii N. [Mathematical modelling of the growth of microorganisms in the case of continuous (uninterrupted) culture]. Dokl Akad Nauk SSSR. 1965;163(5):1266–9.

Sukupolvi-Petty S, Grass S, St Geme JW. The Haemophilus influenzae Type b hcsA and hcsB gene products facilitate transport of capsular polysaccharide across the outer membrane and are essential for virulence. J Bacteriol. 2006;188(11):3870–7.

Takagi M, Cabrera-Crespo J, Baruque-Ramos J et al. Characterization of polysaccharide production of haemophilus influenzae Type b and its relationship to bacterial cell growth. Appl Biochem Biotechnol. 2003;110(2):91–100.

Takagi M, Cabrera-Crespo J, Zangirolami TC et al. Improved cultivation conditions for polysaccharide production by H. influenzae type b. J Chem Technol Biotechnol. 2006;81(2):182–8.

Takagi M, Zangirolami TC, Tanizaki MM et al. Improvement of simple cultivation conditions for polysaccharide synthesis by Haemophilus influenzae type b. In: Méndez-Vilas A, Editor. Communication Current Research and Educational Topics in Applied Microbiology. Badajoz: Formatex; 2007. p. 602–8.

Tatusov RL, Mushegian AR, Bork P et al. Metabolism and evolution of Haemophilus influenzae deduced from a whole-genome comparison with Escherichia coli. Curr Biol. 1996;6(3):279–91.

United Nations Children's Fund. Vaccine Price Data. Disponível em: <[http://www.unicef.org/supply/index\\_57476.html](http://www.unicef.org/supply/index_57476.html)>. Acesso em: 12 nov. 2013.

United Nations Children's Fund. Historical Vaccine Procurement. Disponível em: <[http://www.unicef.org/supply/index\\_38554.html](http://www.unicef.org/supply/index_38554.html)>. Acesso em: 21 out. 2014.

Watt JP, Wolfson LJ, O'Brien KL et al. Burden of disease caused by Haemophilus influenzae type b in children younger than 5 years: global estimates. Lancet. 2009;374(9693):903–11.

World Health Organization. Recommendations for the production and control of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. Report. 2000. (WHO Technical Report Series, 897).

World Health Organization. Weekly epidemiological record, 2006. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2006/wer8147/en/index.html>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

World Health Organization. Immunization surveillance, assessment and monitoring. Disponível em: <[http://www.who.int/immunization\\_monitoring/diseases/Hib/en/index.html](http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/Hib/en/index.html)>. Acesso em: 12 nov. 2013.

Wilfert CM. Epidemiology of Haemophilus influenzae type b infections. Pediatrics. 1990;85(4):631–5.

Yano T, Koga S. Dynamic behavior of the chemostat subject to product inhibition. J Gen Appl Microbiol. 1973;19(2):97–114.

Yogev R, Arditi M, Chadwick EG et al. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine (meningococcal protein conjugate): immunogenicity and safety at various doses. *Pediatrics*. 1990;85(4):690–3.

Zolli M, Kobric DJ, Brown ED. Reduction Precedes Cytidylyl Transfer without Substrate Channeling in Distinct Active Sites of the Bifunctional CDP-Ribitol Synthase from *Haemophilus influenzae*. *Biochemistry*. 2001;40(16):5041–8.