



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
ESCOLA DE QUÍMICA



**MARIA DE LOURDES MOURA LEAL**

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE  
POLISSACARÍDEO CAPSULAR DE *Streptococcus pneumoniae*  
SOROTIPO 14**

**RIO DE JANEIRO  
2011**

**MARIA DE LOURDES MOURA LEAL**

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE  
POLISSACARÍDEO CAPSULAR DE *Streptococcus pneumoniae*  
SOROTIPO 14**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Nei Pereira Jr, *PhD*

Ellen Jessouroun, *DSc*

Maria Antonieta P. G. Couto, *DSc*

**RIO DE JANEIRO  
2011**

## FICHA CATALOGRÁFICA

L435d Leal, Maria de Lourdes Moura.

Desenvolvimento de processo para produção de polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14/ Maria de Lourdes Moura Leal. – 2011. xix, 144 f.: il.

Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2011.

Orientadores: Nei Pereira Jr., Ellen Jessouroun e Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto.

1. *Streptococcus pneumoniae*. 2. Sorotipo 14. 3. Polissacarídeo capsular. – Teses. I. Pereira Jr., Nei (Orient.). II. Jessouroun, Ellen (Orient.) III. Couto, Maria Antoneita P. Gimenes (Orient.). IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. V. Título

CDD: 579.355

MARIA DE LOURDES MOURA LEAL

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO  
CAPSULAR DE *Streptococcus pneumoniae* SOROTIPO 14

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 20 de Dezembro de 2011.

---

Nei Pereira Jr., *PhD*. Prof. EQ, UFRJ  
(Orientador)

---

Ellen Jessouroun, *DSc*. Bio-Manguinhos, FIOCRUZ  
(Orientador)

---

Maria Antonieta P. G. Couto, *DSc*. Prof<sup>a</sup>. EQ, UFRJ  
(Orientador)

---

Andrea Medeiros Salgado, *DSc*.. Prof<sup>a</sup>. EQ, UFRJ

---

Antonio de Pádua Risolia Barbosa, *DSc*. Bio-Manguinhos, FIOCRUZ

---

Eliana Flávia Camporese Servulo, *DSc*. Prof<sup>a</sup>. EQ, UFRJ

---

Lúcia Martins Teixeira, *DSc*. Prof<sup>a</sup>. IM, UFRJ

---

Raquel Moraes Soares, *DSc*. Prof<sup>a</sup>. IBCCF/UFRJ

Aos meus pais, Luiz de Moura Leal e Francisca Rego Leal pelo amor incondicional, carinho e dedicação.

A minha querida irmã, Maria dos Remédios e o meu amado sobrinho, João Pedro pela felicidade de poder compartilhar comigo esta existência.

Ao meu querido Carlos, companheiro de todas as horas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Nei, Ellen e Maria Antonieta pelos inestimáveis conselhos científicos e por acreditarem e confiarem no meu trabalho.

Ao amigo professor Nei que há alguns anos atrás... Me fez despertar/encantar para o mundo dos micro-organismos e da Engenharia Bioquímica.

Agradeço a minha querida amiga Ellen que com o convívio diário pude perceber e aprender com a sua firmeza e dedicação encarar as adversidades e que o diálogo é sempre a melhor escolha. Também agradeço a confiança da escolha para a chefia do Laboratório de Tecnologias Bacterianas e por ser esta pessoa tão importante na minha trajetória de vida.

À amiga Maria Antonieta pelo incentivo e perseverança imprescindíveis para a finalização do trabalho e pelo carinho quando me convidou para ser madrinha do Rodrigo demonstrando o desejo de um laço de amizade por toda a vida.

Um agradecimento especial a Luciana pela amizade, pelas conversas e por estar sempre pronta a ajudar no que fosse necessário.

À Ariane pela amizade e pelas discussões nas estratégias do planejamento experimental.

A todos os meus amigos do LATEB Ana Cristina, Ana Paula, Camila, Cremilda, Deborah, Eduardo, Elza, Fernanda, Jorge, Iralice, Lenilda, Milton, Sonia e Verônica. Um agradecimento especial ao William Cláudio e a Denise Pereira pela parceria e comprometimento nos experimentos. Sou grata à Ivna, Denise Aparecida, Solange e Adenilza pelas palavras de apoio e incentivo.

Ao Luiz Cláudio pela amizade e torcida em mais uma etapa da minha vida.

À minha família pai, mãe, irmã, sobrinho e ao Carlos pela paciência, por sofrerem junto comigo nos momentos difíceis, ficarem felizes com as minhas vitórias e por torcerem e acreditarem em mim e entenderem as minhas ausências.

Agradeço a todos, que de alguma forma, colaboram e apoiaram este trabalho.

## RESUMO

LEAL, Maria de Lourdes Moura. **Desenvolvimento de processo para produção de polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14.** Orientadores: Nei Pereira Jr., *PhD*, Ellen Jessouroun, *DSc* e Maria Antonieta P. G. Couto, *DSc*. Rio de Janeiro, 2011. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococos) é um patógeno humano que apresenta uma diversidade de manifestações clínicas. Apesar de os antibióticos disponíveis, a doença pneumocócica ainda é um problema de saúde pública, devido à disseminação global de cepas multiresistentes. A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência de pneumococo, sendo um polímero de grande variabilidade química e estrutural, responsável pela classificação deste microrganismo em mais de 90 sorotipos. No Brasil, o sorotipo 14 é o mais prevalente em crianças abaixo de 5 anos. Estudos relativos à cinética e modo operacional de reatores para o cultivo bacteriano para a obtenção da cápsula polissacarídica ainda são escassos. O objetivo deste trabalho foi estudar o desenvolvimento de um processo de produção de polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 14. Experimentos preliminares em frascos agitados, visando à seleção do meio e da linhagem, indicaram que o meio Catlin modificado e a linhagem 113/95 levaram aos melhores resultados. Nos cultivos em batelada conduzidos em biorreator de bancada, de 2,5 L, contendo 1,5 L de meio Catlin modificado, com concentração inicial de glicose igual a 10 g/L, agitado a 100 rpm, foi possível verificar a imprescindibilidade do controle do pH e que a condição de anaerobiose não aumentou a produção de polissacarídeo. Não houve influência significativa do binômio glicose x nitrogênio na produtividade volumétrica para o intervalo de concentrações de nitrogênio de 0,11 a 1,09 g/L e de glicose entre 6,0 e 34 g/L. Verificou-se que a inibição por lactato ocorreu principalmente pelo lactato produzido pelas células e não pelo lactato externo. A adição de colina ao meio (20 g /L) levou ao aumento do crescimento e à diminuição da lise celular, com menor liberação do polissacarídeo. No processo conduzido em batelada, a maior concentração de polissacarídeo foi 134 mg/L. Nas bateladas alimentadas, conduzidas em biorreator de bancada, com pulso de glicose e glicose-acetato foram obtidos os melhores resultados, com destaque para a alimentação de glicose-acetato, na qual a concentração de polissacarídeo atingiu 300 mg/L, com produtividade volumétrica de 18 mg/L.h. No processo com alimentação contínua com vazão constante de meio contendo colina ocorreu uma redução na concentração de polissacarídeo livre (93 mg/L). As estratégias estudadas e adotadas para o desenvolvimento deste estudo levaram a um aumento da concentração de polissacarídeo de 42 mg/L (batelada sem controle de pH) para 300 mg/L, na batelada alimentada com pulso de glicose-acetato, indicando que, este foi o melhor modo operacional do biorreator, nas condições de cultivo utilizadas para a linhagem 113/95 utilizando o meio de Catlin modificado.

**Palavras Chave:** *Streptococcus pneumoniae*, polissacarídeo capsular, sorotipo 14

## ABSTRACT

LEAL, Maria de Lourdes Moura. **Process development for the production of a capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae*, serotype 14.** Advisors: Nei Pereira Jr., *PhD*, Ellen Jessouroun, *DSc* e Maria Antonieta P. G. Couto, *DSc*. Rio de Janeiro, 2011. Thesis (Doctor's degree in Technology of Chemical and Biochemical Processes).

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is a human pathogen that causes a great variety of clinical disease manifestations. In spite of available antibiotics, pneumococcal disease remains a public health problem due to global dissemination of multiresistant strains. The polysaccharide capsule (PC) is the main virulence factor of pneumococci, which express chemical and structural differences that classify the microorganism in more than 90 serotypes. In Brazil, serotype 14 is the predominant among children below 5 years of age. Although the pneumococcal disease and new vaccines development have been extensively studied, few publications have focused on different fermentation processes, kinetic studies and bioreactor up-scale cultivation currently used for polysaccharide production. This study was designed for development of a production process of serotype 14 PC. Preliminary data from agitated flasks to choose the best medium for the selected strain (113/95), indicated the modified Catlin medium as the best option for growth. Batch cultures in a 2.5L of a lab-scale bioreactor, with 1.5L of growth medium, 10g/L of glucose and 100rpm of agitation showed that polysaccharide production was strictly dependent on pH control. It was also observed that anaerobic condition did not increase polysaccharide production. It was also shown that concentrations of glucose and nitrogen ranging from 0.11 to 1.09 g/L of glucose and from 6.0 to 34 g/L of nitrogen resulted in no difference in volumetric productivity of PC. Additionally, lactate produced by the cells during their growth and not lactate added in the culture medium, caused an inhibitory effect on PC production. The addition of choline (20g/L) caused an increase in cell growth due to a decrease in cell lysis with a lower CP liberation into the circulating medium. The highest PC production in batch cultures was 134 mg/L. Feed-batch cultures that was carried out in the same lab-scale bioreactor, either with glucose or glucose-acetate pulse, showed an increase of PC production up to 300mg/L. The volumetric productivity in that condition was 18mg/L.h. Using extended fed batch mode of operation with culture medium added of choline, showed a decrease in the amount of free polysaccharide (93mg/L). The results showed an increase of PC production from 42mg/L, in batch cultures without pH control, to 300mg/L in fed-batch processes with glucose-acetate pulse. This last approach seems to be the best choice of bioreactor operation system using *S. pneumoniae* strain 113/95 and the modified Catlin media to produce polysaccharide with good yields.

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*, Capsular polysaccharide, serotype 14

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Coeficiente de incidência de meningites bacterianas segundo o agente. Brasil 2000-2010.	9
Figura 2.2. Isolados de doença pneumocócica invasiva de diferentes sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> em crianças com menos de 59 meses de idade no Brasil.	11
Figura 2.3. Isolados de doença pneumocócica invasiva de diferentes sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> em pessoas de 5 a 60 anos de idade no Brasil.	11
Figura 2.4. Vias alternativas do metabolismo da glicose em <i>S. pneumoniae</i> .	15
Figura 2.5. Representação hipotética da superfície de pneumococos ilustrando os fatores de virulência de pneumococos.	17
Figura 2.6. Esquema da biossíntese do polissacarídeo capsular.	18
Figura 2.7. Estrutura química do polissacarídeo capsular de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14.	21
Figura 2.8. Redução das doenças pneumocócicas invasiva nos EUA a partir da introdução da vacina conjugada.	32
Figura 4.1. Diagrama de blocos para os experimentos em frascos cônicos.	61
Figura 4.2. Biorreator modelo Bioflo 110 capacidade 2,5L- New Brunswick, USA.	62
Figura 5.1. Produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) calculada em 16 horas de cultivo de <i>S. pneumoniae</i> , cepa 172/97, nos meios de Hoeprich, TSB modificado e Catlin.	72
Figura 5.2. Cinética de crescimento de <i>S. pneumoniae</i> no 1º pré-cultivo. Meio de Catlin modificado em frasco agitado (três repetições em triplicata).	73
Figura 5.3. Cinética de crescimento de <i>S. pneumoniae</i> no 2º pré-cultivo. Meio de Catlin modificado em frasco agitado (três repetições em triplicata).	74
Figura 5.4. Perfil cinético de crescimento, produção de polissacarídeo, consumo de glicose e formação de lactato em meio Catlin modificado frasco agitado cepa 113/95. Número de repetições: 02.	76
Figura 5.5. Perfil cinético de crescimento, produção de polissacarídeo, consumo de glicose e formação de lactato em meio Catlin modificado biorreator sem controle de pH. Cepa 113/95. Número de repetições: 02.	76
Figura 5.6. Perfil cinético de crescimento, produção de polissacarídeo, consumo de glicose e formação de lactato em meio Catlin modificado em biorreator com controle de pH. Cepa 113/95. Número de repetições: 02.	79
Figura 5.7. Perfil cinético de crescimento, produção de polissacarídeo, consumo de glicose e formação de lactato em meio Catlin modificado biorreator com controle de pH, mantido em atmosfera de nitrogênio. Cepa 113/95. Número de repetições: 02.	82

Figura 5.8. (A) Cinética de crescimento (B) Consumo de glicose (C) Produção de polissacarídeo (D) Formação de lactato de <i>Streptococcus pneumoniae</i> sorotipo 14 em biorreator. G: Glicose, Nt: Nitrogênio total.	85
Figura 5.9. Gráfico de Pareto obtido para produtividade volumétrica pelo planejamento experimental empregando Nitrogênio total e glicose inicial. Nesta análise, a variável 1 é o nitrogênio total e 2 é a glicose inicial; (L) é o efeito linear e (Q) o efeito quadrático; a interação (linear) é identificada como 1Lby2L no Gráfico de Pareto.	88
Figura 5.10. Perfil cinético de crescimento em meio Catlin modificado sem e com 5 g/L, 10 g/L e 20 g/L de lactato inicial em biorreator. Número de repetições: 02.	90
Figura 5.11. Perfil cinético de consumo de glicose em meio Catlin modificado sem e com 5 g/L, 10 g/L e 20 g/L de lactato inicial em biorreator. Número de repetições: 02.	90
Figura 5.12. Perfil cinético de produção de polissacarídeo em meio Catlin modificado sem e com 5 g/L, 10 g/L e 20 g/L de lactato inicial em biorreator. Número de repetições: 02.	91
Figura 5.13. Perfil cinético de formação de lactato em meio Catlin modificado sem e com 5 g/L, 10 g/L e 20 g/L de lactato inicial em biorreator. Número de repetições: 02.	91
Figura 5.14. $Q_P$ e $Y_{P/S}$ em meio Catlin modificado com 5 g/L, 10 g/L e 20 g/L de lactato inicial em biorreator. Número de repetições: 02.	93
Figura 5.15. Perfil cinético de crescimento em meio Catlin modificado sem e com 5g/L e 20g/L de colina inicial em biorreator. Número de repetições: 02.	94
Figura 5.16. Perfil cinético de consumo de glicose em meio Catlin modificado sem e com 5 g/L e 20 g/L de colina inicial em biorreator. Número de repetições: 02.	95
Figura 5.17. Perfil cinético de formação de lactato em meio Catlin modificado sem e com 5 g/L e 20 g/L de colina inicial em biorreator. Número de repetições: 02.	96
Figura 5.18. Perfil cinético de crescimento, produção de polissacarídeo, consumo de glicose e formação de lactato em meio Catlin modificado biorreator com controle de pH, com pulso de glicose em 5,5h.	97
Figura 5.19. Perfil cinético de crescimento, produção de polissacarídeo, consumo de glicose e formação de lactato em meio Catlin modificado biorreator com controle de pH, com pulso de glicose e acetato de amônio em 4h.	99
Figura 5.20. Perfil cinético de crescimento, produção de polissacarídeo, consumo de glicose e formação de lactato em meio Catlin modificado biorreator contendo 20 g/L colina, controle de pH e alimentação com vazão constante de 142,8 mL/h de meio (40 g/L glicose e 2 vezes concentrado nos demais insumos) em 5h de cultivo.	102

- Figura 5.21. Microscopia óptica (aumento de 100 x) de células em 24 horas de cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 113/95. Meio de Catlin modificado contendo 20 g/L colina, com controle de pH e alimentação com vazão constante de meio (40 g/L glicose e 2 vezes concentrado nos demais insumos). 104
- Figura 5.22. Histograma comparativo dos valores da concentração do polissacarídeo nos cultivos no final do processo. 105
- Figura 5.23. Histograma comparativo dos valores da produtividade volumétrica nos cultivos no final do processo. 106
- Figura 5.24. Amostra de polissacarídeo parcialmente purificado de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 113/95 em batelada com pulso de glicose e acetato de amônio. 106

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 4.1. Meio Hoeprich.	56
Tabela 4.2. Meio TSB ( <i>Tryptic Soy Broth</i> ) modificado.	57
Tabela 4.3. Meio Catlin modificado.	58
Tabela 4.4. Variáveis analisadas no DCCR e seus respectivos níveis codificados.	63
Tabela 5.1. Variáveis de resposta da produção de polissacarídeo de <i>S. pneumoniae</i> para diferentes linhagens.	77
Tabela 5.2 Resultado das variáveis de resposta para cultivo de <i>S. pneumoniae</i> em meio de Catlin modificado Cepa: 113/95.	77
Tabela 5.3 Resultado das variáveis de resposta para cultivo de <i>S. pneumoniae</i> empregando meio de Catlin modificado com controle de pH.	80
Tabela 5.4. Resultados de produtividade ( $Q_p$ ) para 6h e 16h de processo.	86
Tabela 5.5. Resultados da cinética para células, glicose residual, lactato, produção de polissacarídeo e produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) em 6h de crescimento de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 em meio de Catlin modificado em biorreator.	87
Tabela 5.6 Resultado das variáveis de resposta para cultivo de <i>S. pneumoniae</i> empregando meio de Catlin modificado com controle de pH e pulso de glicose.	98
Tabela 5.7 Resultado das variáveis de resposta para cultivo de <i>S. pneumoniae</i> empregando meio de Catlin modificado com controle de pH e pulso de glicose e acetato de amônio.	100
Tabela 5.8. Resultado das variáveis de resposta para cultivo de <i>S. pneumoniae</i> empregando meio de Catlin modificado contendo 20 g/L colina, com controle de pH e alimentação com vazão constante de meio (40 g/L glicose e 2 vezes concentrado nos demais insumos).	103
Tabela 5.9 Dados disponíveis na literatura para o cultivo de <i>S. pneumoniae</i> .	107

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 2.1. Marcos históricos no desenvolvimento da vacina contra pneumococos.	29
Quadro 2.2. Vacinas baseadas em antígenos proteicos em Estudos Clínicos.	36
Quadro 4.1 Sítios de isolamento e susceptibilidade à penicilina das linhagens utilizadas para produção de polissacarídeo.	53

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida  
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ATP: Adenosina tri-fosfato  
Bio-Manguinhos: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos  
BHI: Brain Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração)  
BSA: Albumina de soro bovino  
CDC: Centers for Disease Control and Prevention  
C-PS: Polissacarídeo C  
CRIEs: Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais  
CRM197: Variante não tóxica da toxina diftérica  
DALY: Disability-Adjusted Life Years  
DATASUS: Banco de dados do Sistema Único de Saúde  
EUA: Estados Unidos da América  
FDA: Food Drug Administration  
Fiocruz: Fundação Oswaldo Cruz  
GSK: Glaxo SmithKline  
HAC: Hidrolisado ácido de caseína  
Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b  
Hyl: Hialuronato liase  
IAL: Instituto Adolfo Lutz  
LATEB: Laboratório de Tecnologia Bacteriana  
LytA: Autolisina  
NADH: Nicotinamina adenina dinucleotídeo na forma reduzida  
Nan A e Nan B: Neuraminidases  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde  
PC: Fosfocolina  
PCR: Reação de cadeia polimerase  
PD: Proteína D de *Haemophilus* não tipável  
PdB: Pneumolisóide  
Ply: Pneumolisina  
PNI: Programa Nacional de Imunização  
PneumoADIP: Pneumococcal Accelerated Development and Introduction Plan  
PPV23: Pneumovax 23 (vacina pneumocócica polissacarídica)  
PsaA: Adesina A de superfície pneumocócica  
PspA: Proteína A de superfície pneumocócica  
PspC=CbpA: Proteína ligadora a colina  
*S. pneumoniae*: *Streptococcus pneumoniae*  
SIREVA: Sistema Regional de Vacinas

SUS: Sistema Único de Saúde

TCA: Ácido tricarboxílico

TD: Toxóide diftérico

THB: Tood Hewitt Broth

TSA: Tryptic Soy Agar (Agar triptona de soja)

TSB: Triptic Soy Broth (Caldo triptona de soja)

TT: Toxóide tetânico

WHO: World Health Organization

## NOMECLATURA MATEMÁTICA

$\mu_x$ : velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ )

L: concentração final de lactato (g/L)

$L_0$ : concentração inicial de lactato (g/L)

P: concentração final de polissacarídeo (g/L)

$P_0$ : concentração inicial de polissacarídeo (g/L)

$Q_P$ : Produtividade volumétrica (mg/L.h)

S: concentração final de substrato (g/L)

$S_0$ : concentração inicial de substrato (g/L)

t: instante arbitrário t (h)

$t_i$ : instante arbitrário  $t_i$  (h)

X: concentração final de biomassa (g/L)

$X_0$ : concentração inicial de biomassa (g/L)

$X_i$ : concentração de células no instante  $t_i$  (g/L)

$Y_{L/S}$ : Fator de rendimento para formação de lactato (g/g)

$Y_{P/S}$ : Fator de rendimento de produção de polissacarídeo (g/g)

$Y_{P/S}$ : Fator de rendimento para produção de polissacarídeo e crescimento celular (g/g)

$Y_{X/S}$ : Fator de rendimento para crescimento celular (g/g)

V: volume de meio no biorreator no instante t

$(P.V)_t$  = massa de polissacarídeo no instante t

$(P.V)_{t_0}$  = massa de polissacarídeo no instante inicial

$(S.V)_t$  = massa de glicose no instante t

$(S.V)_{t_0}$  = massa de glicose no instante inicial

$(X.V)_{t_M}$  = massa de células máxima

$(X.V)_{t_0}$  = massa de células no instante inicial

$(L.V)_t$  = massa de lactato no instante t

$(L.V)_{t_0}$  = massa de lactato no instante inicial

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - APRESENTAÇÃO DO TEMA DE TESE</b>	1
1.1 ESTRUTURA DO TRABALHO	6
1.2 PRODUÇÃO CIENTÍFICA	6
<b>CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	7
2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS	7
2.2 MICRO-ORGANISMO AGENTE	14
2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DE PNEUMOCOCOS	17
<b>2.3.1 Cápsula polissacarídica</b>	18
<b>2.3.2 Polissacarídeo C</b>	21
<b>2.3.3 Antígeno F (antígeno de Forssman)</b>	22
<b>2.3.4 Proteínas</b>	23
2.3.4.1 Proteína A de superfície pneumocócica (PspA)	23
2.3.4.2 Pneumolisina	24
2.3.4.3 Autolisina (enzima autolítica)	25
2.3.4.4 Adesina A de superfície pneumocócica (PsaA)	26
2.4 VACINAS PNEUMOCÓCICAS	27
<b>2.4.1 Histórico</b>	27
<b>2.4.2 Vacinas polissacarídicas</b>	30
<b>2.4.3 Vacinas conjugadas</b>	31
<b>2.4.4 Vacinas protéicas</b>	36
2.5 TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE VACINAS BACTERIANAS	40
<b>2.5.1 Modos de operação da bioconversão</b>	41
2.6 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DA CÁPSULA POLISSACARÍDICA	44
<b>2.6.1 Influência do pH</b>	44
<b>2.6.2 Influência da composição do meio de cultivo</b>	46
<b>2.6.3 Influência da tensão de oxigênio</b>	47
<b>2.6.4 Influência do modo operacional do biorreator</b>	49
<b>CAPÍTULO 3 - OBJETIVOS</b>	51
3.1 OBJETIVO GERAL	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51

<b>CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS</b>	53
4.1 MICRO-ORGANISMOS	53
4.2 PREPARO DAS CULTURAS ESTOQUE	54
<b>4.2.1 Lote semente-mãe</b>	54
<b>4.2.2 Lote de trabalho</b>	54
4.3 MEIOS DE CULTIVO	56
<b>4.3.1 Meios</b>	56
<b>4.3.2 Extrato de levedura dialisado</b>	59
<b>4.3.3 Esterilização de equipamentos, meios, soluções e controle de esterilidade</b>	59
4.3.3.1 Esterilização de vidrarias e biorreator	59
4.3.3.2 Esterilização de meios e soluções	59
4.3.3.3 Controle de esterilidade dos meios e soluções	60
4.4 AMOSTRAGEM	60
4.5 EXPERIMENTOS CONDUZIDOS EM FRASCOS CÔNICOS	61
4.6 EXPERIMENTOS EM BIORREATOR	62
<b>4.6.1 Batelada simples</b>	62
<b>4.6.2 Batelada alimentada</b>	64
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	64
<b>4.7.1 Determinação da concentração de células</b>	64
<b>4.7.2 Determinações de glicose e lactato</b>	65
<b>4.7.3 Determinação da concentração de polissacarídeo</b>	65
<b>4.7.4 Determinação da concentração do nitrogênio total</b>	66
4.8 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DO PROCESSO	66
<b>4.8.1 Processo com volume constante</b>	66
<b>4.8.2 Processos com volume variável</b>	68
<b>CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	70
5.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES	70
<b>5.1.1 Avaliação dos meios de cultivo</b>	70
<b>5.1.2 Avaliação das linhagens produtoras</b>	72
5.1.2.1 Determinação do tempo ideal de coleta das células nos 1º e 2º pré-cultivos	72
5.2 BIOPROCESSO CONDUZIDO EM BATELADA	75
<b>5.2.1 Influência do Controle do pH no Bioprocesso</b>	75

5.2.1.1 Experimentos sem controle de pH	75
5.2.1.2 Experimentos com controle de pH	78
<b>5.2.2 Efeito da atmosfera de nitrogênio no bioprocesso</b>	<b>81</b>
<b>5.2.3 Avaliação da concentração de glicose e nitrogênio total no processo de produção de cápsula polissacarídica empregando planejamento experimental</b>	<b>83</b>
<b>5.2.4 Influência do lactato no bioprocesso</b>	<b>89</b>
<b>5.2.5 Influência da adição de colina no crescimento</b>	<b>93</b>
5.3 BIOPROCESSO CONDUZIDO EM BATELADA ALIMENTADA	96
<b>5.3.1 Batelada com pulso de glicose</b>	<b>97</b>
<b>5.3.2 Batelada com pulso de glicose e acetato de amônio</b>	<b>99</b>
<b>5.3.3 Batelada com alimentação constante</b>	<b>102</b>
5.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS	105
<b>CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES</b>	<b>111</b>
6.1 CONCLUSÕES	111
6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	113
<b>CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS</b>	<b>114</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>128</b>
<b>ANEXO 1 – TRABALHO COMPLETO</b>	<b>129</b>
<b>ANEXO 2 – ARTIGO</b>	<b>137</b>

## Capítulo 1

### APRESENTAÇÃO DO TEMA DE TESE

As vacinas possuem um grande impacto na saúde pública, além da excelente relação custo-benefício. A erradicação da varíola foi um marco na saúde pública mundial que levou à reflexão sobre a possibilidade de se controlar e erradicar outras doenças imunopreveníveis. Neste contexto, foram criados programas para incentivar a aquisição de vacinas a custo menor para atender os países mais pobres. Este fato acarretou em um aumento significativo na demanda de vacinas levando os laboratórios produtores a realizarem investimentos para aumentar sua capacidade de produção. Vacinas são produtos de alto valor agregado, o que desperta o interesse de grandes multinacionais como Sanofi, Glaxo Smith & Kline (GSK), Merck Sharp & Dohme, Novartis e Wyeth (atualmente Pfizer) que dominam o mercado.

Nos últimos anos, o mercado de vacinas triplicou, mas cerca de 24 milhões de crianças, em vários países, que vivem em condições de risco, ainda não são imunizadas. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, seria necessário mais do que um bilhão de dólares por ano para que vacinas contra as principais doenças pudessem alcançar todas as crianças dos 72 países mais pobres do mundo. Paradoxalmente, hoje, os países em desenvolvimento respondem por 86% da produção mundial de vacinas (WHO, UNICEF, 2009). Doenças como cólera,

hepatites, difteria, coqueluche, meningites, entre muitas outras, ainda representam graves problemas de saúde pública em vários países, criando demanda crescente por vacinas aprimoradas e também por novos produtos, muitas vezes desenvolvidos especialmente para situações epidemiológicas específicas e particulares a algumas regiões do globo terrestre.

Neste contexto, a doença pneumocócica, que tem como agente etiológico a bactéria *Streptococcus pneumoniae*, se caracteriza como uma importante enfermidade imunoprevenível que movimenta grande parte do mercado de vacinas. A doença causada por este micro-organismo apresenta diferentes manifestações clínicas, como pneumonias adquiridas na comunidade, sendo também um dos principais causadores de meningites, bacteremias, otite média e sinusites. Tem importância acentuada no quadro de doenças infecciosas e pode ocorrer em todas as faixas etárias, entretanto as crianças menores de dois anos e pessoas com idade acima de 65 anos são as populações mais vulneráveis. As crianças por conta do seu sistema imune não estar suficientemente maduro para uma resposta imunológica contra o polissacarídeo capsular de pneumococos e as pessoas idosas por sofrerem de múltiplas doenças que comprometem a resposta imune para pneumococos. Outro grupo de pessoas que também é vulnerável é aquele que possui o sistema imune debilitado como resultado de condição de subnutrição, AIDS e anemia falciforme (PneumoADIP, 2009; WHO, 2007).

Considera-se que, no Brasil, os dados referentes às diferentes manifestações clínicas da doença pneumocócica têm sido subestimados. Algumas pneumonias ambulatoriais não são computadas, uma vez que formas não invasivas são de difícil diagnóstico e ainda existe sub-notificação de casos de meningite bacteriana causados por *S. pneumoniae*. Desta forma, estas doenças constituem um desafio para os serviços de saúde pública do país.

A carga de uma doença e a medida do seu impacto na população é quantificada pela mortalidade, morbidade ou em termos dos prejuízos econômicos causados por sua incidência na população. A taxa de mortalidade e incidência por *S. pneumoniae* em crianças menores de cinco anos, em 2000, na África foi de 396 mortes e 3627 casos por 100000, respectivamente. Nas Américas as taxas de mortalidade (nove vezes) e incidência (quatro vezes) são menores do que na África.

No Brasil estes valores são de aproximadamente 85 mortes e 1035 casos por 100.000 (PneumoADIP, 2009). A carga econômica da doença pneumocócica é muito alta, porque crianças com infecções pneumocócicas graves necessitam de assistência médica especializada. Os custos médicos diretos são compostos de variáveis que incluem visita clínica, permanência no hospital, diagnóstico laboratorial e medicações. Os custos indiretos incluem, entre outros, o transporte do paciente pela família e sua manutenção durante a hospitalização. Se o paciente é uma criança, considera-se também o custo de produtividade, uma vez que o responsável permanece no hospital com o doente sem poder trabalhar. Todos estes pontos devem ser considerados na avaliação da carga da doença o que é determinante no direcionamento dos investimentos públicos para equacionar o problema (TALBIRD *et al.*, 2010).

Atualmente, o melhor parâmetro para analisar os custos das doenças é um índice denominado DALY (*Disability-Adjusted Life Years*), que avalia o número de anos perdidos, por morte e por deficiências acarretadas pela doença. Assim considerando-se uma vida normal como 1,0, uma criança que apresentou meningite pneumocócica com seqüela neurológica apresentaria uma perda 0,76 unidades DALY. Nos EUA, na era pré-vacina conjugada, foi estimado que, para uma coorte de 3,8 milhões de crianças, a vacina conjugada 7-valente contra pneumococos poderia evitar 12.000 casos de meningite e bacteremia (78%), 53.000 casos de pneumonia (69%) e 1 milhão de casos de otite média aguda (8%). A redução nos gastos com a doença seria de 342 milhões de dólares em custos médicos, e 415 milhões de dólares em custos sociais (perda de trabalho e outros). Portanto, sob o ponto de vista social, a vacinação seria custo-efetiva. Nos estudos mais recentes são levados em conta os benefícios indiretos da vacinação (impacto em pessoas não vacinadas) e o impacto na redução das doenças causadas por cepas resistentes aos antibióticos (BRICKS *et al.*, 2006)

No Brasil, no período compreendido entre janeiro e agosto de 2009 foi registrado um total de 530.107 internações por pneumonia, sendo 221.114 internações de pacientes menores de quatro anos, com registro de 982 óbitos, e 129.434 internações de pacientes maiores de 60 anos, com 17.920 óbitos. O valor total gasto com pneumonia, neste período, foi de R\$ 409.757.631,31, sendo R\$

162.141.922,66 gastos com crianças até 4 anos e R\$ 112.952.897,51 com pacientes acima de 60 anos (DATASUS, 2009). Estimando-se que 1/3 dessas pneumonias tenham sido causadas por pneumococos, somente nos oito primeiros meses de 2009 seriam gastos em torno de 54 milhões de reais apenas no tratamento de crianças até quatro anos hospitalizadas por pneumonia pneumocócica. Comparando ao gasto público para tratar meningite pneumocócica, estimado em sete milhões de reais, para o mesmo período, o gasto com o tratamento de pneumonia é muito maior. É importante ressaltar a importância da realização de estudos de custo-efetividade para incorporação de uma vacina no calendário vacinal.

As vacinas existentes são produtos de alto preço, principalmente as conjugadas que são capazes de proteger crianças, em comparação com outras vacinas. No entanto deve-se considerar que a pneumonia mata muitas crianças e que a meningite por pneumococo e outras doenças pneumocócicas invasivas são responsáveis por um grande número de mortes e seqüelas em crianças. O controle da morbidade e mortalidade das doenças pneumocócicas baseia-se na vacinação, no diagnóstico rápido e na terapia antimicrobiana adequada. No entanto, a emergência e disseminação mundial de cepas de pneumococos resistentes aos antimicrobianos tornam a utilização de uma vacina contra *S. pneumoniae* de extrema importância econômica e social.

O Ministério da Saúde do governo brasileiro prioriza os produtos que possam atender as necessidades epidemiológicas nacionais como é o caso da vacina conjugada contra pneumococos. No intuito de acelerar a introdução da vacina contra pneumococos no calendário de vacinação da criança, o governo realizou, em agosto de 2009, um acordo de transferência de tecnologia entre Bio-Manguinhos/Fiocruz e a GSK e a partir de 2010 o Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Sistema Único de Saúde (SUS) passou a oferecer, de forma gratuita, a vacina conjugada 10-valente contra *S. pneumoniae* para todas as crianças com até um ano de idade.

O trabalho aqui apresentado teve início no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ), em 2007, e seu objetivo inicial era o desenvolvimento de uma vacina brasileira contra *S. pneumoniae*. De acordo com o novo cenário de aquisição de tecnologia de produção da vacina conjugada, o presente projeto tem como objetivo a consolidação de

competências para o desenvolvimento de um bioprocesso para a obtenção de polissacarídeo capsular de pneumococos em escala piloto com elevados rendimentos e produtividade que possam ser aplicados aos diferentes sorotipos de *S. pneumoniae* prevalentes no país. O trabalho pretende estudar diferentes formas de condução do bioprocesso empregando o sorotipo 14, com vistas à adaptação das metodologias aos sorotipos que não estão presentes na vacina 10-valente da GSK. Esta abordagem pretende contribuir no desenvolvimento conjunto de uma vacina mais adequada ao quadro epidemiológico brasileiro prevendo uma mudança de prevalência em função da utilização da vacina. O desenvolvimento conjunto ou a introdução de melhorias na vacina para a qual está sendo adquirida a tecnologia de produção inaugura uma nova abordagem nas transferências tecnológicas, buscando valorizar o desenvolvimento tecnológico no país, além da formação de massa crítica necessária para absorção e incorporação das novas tecnologias que envolvem desenvolvimento de novos produtos de uso humano.

Os polissacarídeos purificados a partir do processo a ser desenvolvido neste trabalho poderão ser empregados na formulação de uma vacina para idosos ou ligados covalentemente a uma proteína carreadora para obtenção de uma vacina conjugada destinada a crianças menores de dois anos. Esta molécula poderá também ser utilizada em uma vacina combinada, composta de polissacarídeo livre ou conjugado com proteínas homólogas. Sempre é bom se ter em mente que a imunização, utilizando vacinas seguras e eficazes, é a única abordagem racional no controle de doenças pneumocócicas.

Cabe ainda salientar que esta tese representou um grande desafio, tendo em vista que não há nenhum estudo anterior reportado com a linhagem estudada. Mesmo com o sorotipo 14, há raros registros de trabalhos, ainda assim, empregando linhagens diferentes. Por certo que uma pesquisa de caráter exploratório nem sempre gera os resultados almejados, mas do ponto de vista de entender como se dá o bioprocesso, quais são suas sutilezas e particularidades, que limitações são impostas pela natureza do agente, do produto e das condições operacionais, se constituem no melhor resultado que é a capacitação de recursos humanos no desenvolvimento tecnológico de vacinas eminentemente nacionais.

## 1.1 ESTRUTURA DO TRABALHO

O presente trabalho está estruturado em sete capítulos. Neste primeiro capítulo é feita uma breve introdução ao tema, sendo apresentada a estrutura do documento e listada a produção científica. A revisão bibliográfica, que traz o embasamento teórico do estudo, é apresentada no capítulo 2. Os principais objetivos da tese são dispostos no capítulo 3 e as metodologias utilizadas para se atingir os objetivos propostos são detalhadas no capítulo 4. O capítulo 5 apresenta os resultados e discussões, cujas principais conclusões são sinalizadas no capítulo 6, bem como as sugestões de continuidade do estudo. As referências citadas no documento são listadas no capítulo 7.

## 1.2 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

LEAL, M. L. M.; PEREIRA, D. S. G.; JESSOUROUN, E.; COUTO, M. A. P. G.; PEREIRA JR., N. Investigation of cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 5, 2011. ISSN: 0717-3458. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.info> DOI: 10.2225/vol14-issue5-fulltext-6.

LEAL, M. L. M.; PEREIRA JR. N.; PEREIRA, D. S. G.; LARENTIS, A. L.; COUTO, M. A. P. G.; JESSOUROUN, E. Desenvolvimento de um meio de cultivo para obtenção de polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, 2011.

## Capítulo 2

# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS

*Streptococcus pneumoniae* faz parte da microbiota normal da nasofaringe de crianças e adultos e trata-se do principal agente etiológico causador de pneumonia bacteriana adquirida na comunidade. Esse patógeno também é responsável por outras infecções, como sinusite, otite média, artrite, pericardite, peritonite e infecções invasivas graves como meningite e septicemia. Nos países em desenvolvimento, a prevalência de portadores assintomáticos está em torno de 95% em crianças saudáveis abaixo de 3 anos de idade e 40% em adultos. Nos países industrializados essa taxa é cerca de 2-3 vezes menor para crianças (OBARO e ADEGBOLA, 2002). A taxa de portadores assintomáticos de pneumococos varia de acordo com o grupo etário, diferentes regiões geográficas, ambiente e a presença de infecções do trato respiratório superior (BAROCCHI *et al.*, 2007). Acredita-se que a aquisição de *S. pneumoniae* ocorra pelo contato com aerossóis. Segundo a literatura, a fixação das bactérias ao epitélio se dá mediante adesão através de moléculas de proteínas presentes na sua superfície seguida de multiplicação na nasofaringe (portador).

Normalmente a colonização não é seguida pela doença, no entanto, em alguns casos, quando a bactéria escapa dos mecanismos de defesa do hospedeiro e alcança locais normalmente estéreis no ouvido médio, pulmão e corrente sanguínea tem-se caracterizada a doença pneumocócica. Este processo envolve, provavelmente, uma série de fatores e que não estão completamente elucidados (BOGAERT *et al.*, 2004; WEISER, 2010).

Apesar do uso da antibioticoterapia as taxas de incidência da doença pneumocócica são elevadas em todo o mundo, principalmente em crianças abaixo de cinco anos de idade e idosos com mais de 60 anos. Nos países onde foram introduzidas as vacinas conjugadas contra *Haemophilus influenzae* tipo b, principal causador de meningite bacteriana em crianças, e *Neisseria meningitidis* sorogrupo C ocorreu uma mudança no quadro epidemiológico, tornando os pneumococos o maior causador de meningite e septicemia em crianças. No caso do Brasil, com a introdução da vacina Hib em 1999 o pneumococo passou a ser o 2º causador de meningite bacteriana em crianças (Figura 2.1). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que mais de 1,6 milhões de pessoas morrem por ano devido à doença pneumocócica, sendo que 0,8-1 milhão são crianças menores de 5 anos de idade. Em áreas de elevada mortalidade (países pobres), pneumococo é responsável pela morte de 1% de todas as crianças que nascem e deixa 50% dos sobreviventes com seqüelas graves. Deve-se levar em consideração que fatores como desnutrição, resistência aos medicamentos e infecção por HIV contribuem para o agravamento da doença pneumocócica (pneumoADIP, 2009).

Vários trabalhos vêm sendo realizados ao longo dos anos no Brasil com o objetivo de avaliar a incidência da doença pneumocócica nas diferentes regiões do país. De Moraes e Guedes (1990) verificaram que no período de 1960 a 1977 na cidade de São Paulo foram confirmados 1965 casos de meningite causados por *S. pneumoniae* com um coeficiente médio de 1,9 por 100.000 habitantes. No trabalho de Carvalhanas e colaboradores (2005), os autores mostram que a taxa de incidência de meningite por pneumococos apresentou pouca variabilidade (1,0-1,5/100.000 habitantes) entre os anos de 1990 a 2004 no Estado de São Paulo.

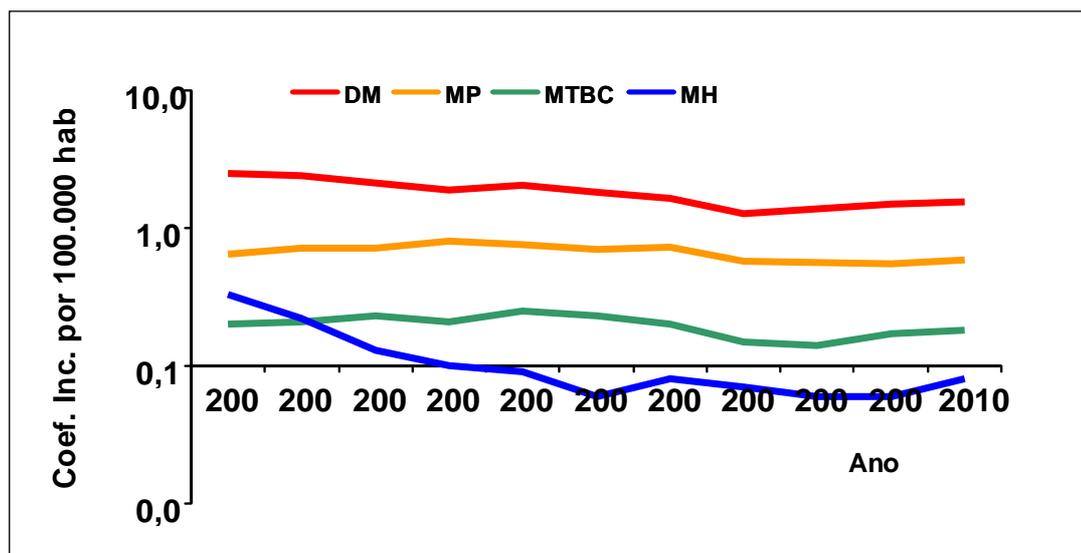


Figura 2.1. Coeficiente de incidência de meningites bacterianas segundo o agente. Brasil 2000-2010 - DM - doença meningocócica; MP- meningite pneumocócica; MTBC- meningite tuberculosa, MH meningite por *H. influenzae*. (Fonte: DE MORAES, C. (2011).

Entre janeiro de 1987 e dezembro de 1989 Sutmoller e colaboradores (1995) verificaram que *S. pneumoniae* está entre os principais patógenos bacterianos que causam infecções respiratórias agudas em crianças no Rio de Janeiro. Segundo Bryan e colaboradores (1990) em Salvador, Bahia de todos os casos de meningite no período de 1973 a 1982, *S. pneumoniae* foi responsável por 17% com uma taxa de mortalidade de 59%. Ainda na mesma cidade, entre 1995 e 1998 a incidência anual de meningite por pneumococos foi de 1,7 casos por 100.000 habitantes contemplando todas as faixas etárias e 31,7 casos por 100.000 crianças abaixo de 1 ano de idade (KO *et al.*, 2000).

Da mesma forma que a incidência da doença pneumocócica tem apresentado grandes variações nas diferentes regiões do Brasil, a prevalência do diferentes sorotipos também apresenta este mesmo padrão de distribuição. Em amostras isoladas na cidade do Rio de Janeiro, no período de 1981 a 1982, os sorotipos mais freqüentes foram, em ordem decrescente, 6B, 1, 3, 4 e 14 (TEIXEIRA *et al.*, 1988). Diferentes estudos com amostras isoladas em São Paulo indicaram os seguintes sorotipos como os mais freqüentes: 1, 6B, 18C, 14 e 5 (TAUNAY *et al.*, 1990); 14, 5, 6B, 23F e 19F (SESSEGOLO *et al.*, 1994); 14, 1, 5, 6B e 6A (BRANDILEONE *et al.*,

1997). Estudos realizados por Brandileone e colaboradores (1997) em Recife e Belo Horizonte apresentaram respectivamente a prevalência dos sorotipos 14, 6B, 9V, 1 e 18C e 24F, 1, 9V, 19F e 5 em ordem decrescente.

De acordo com Brandileone e colaboradores (2003) os 14 sorotipos prevalentes em 2.191 crianças com menos de cinco anos de idade, no período de 1977 a 2000, com doença invasiva (meningite e pneumonia), foram os seguintes (percentuais de participação entre parênteses): 14(24,8); 6B(8,9); 1(7,9); 5(7,5); 18C(6,8); 6A(5,5); 23F(4,9); 19F(4,2); 9V/19A(3,2); 3/4(1,9); 10A/7F(1,4). Outros sorotipos respondem por 23% dos casos. Yoshioka e colaboradores (2011), estudando a prevalência de diferentes sorotipos de pneumococos em crianças de 29 dias a 15 anos incompletos, verificaram tendência de prevalência um pouco diferente 14(36,5%); 1(16,7%); 5(14,6%); 6B(6,3%) e 3(4,2%) o que indica certo dinamismo na prevalência dos diferentes sorotipos no país. Os dados apresentados sugerem prevalência dos sorotipos 14, 6B, 6A e 23F em crianças abaixo de 5 anos. O perfil de prevalência em pessoas mais velhas é diferente e há grande prevalência de outros sorotipos acima de 15 anos de idade.

Nas figuras 2.2 e 2.3 está apresentada a prevalência dos diferentes sorotipos invasivos de pneumococos no Brasil, em diferentes faixas etárias definidos pelo Sistema Regional de Vacinas (SIREVA) em 2010 (Organização Pan-Americana de Saúde, 2011). Pode-se observar que existe diferença na prevalência dos sorotipos encontrados nas faixas etárias extremas. Em ordem decrescente de número de isolados para crianças menores de 5 anos: 14 (29,8%), 6B/6D (15,3%), 6A e 23F (7,9%), 19A (6,0%) e 18C (5%) para maiores de 60 anos: 23F (10,7%), 19F e 3 (8,3%), 14 e 6B/6D (7,4%), 6A (6,6%) e 4 (5%).

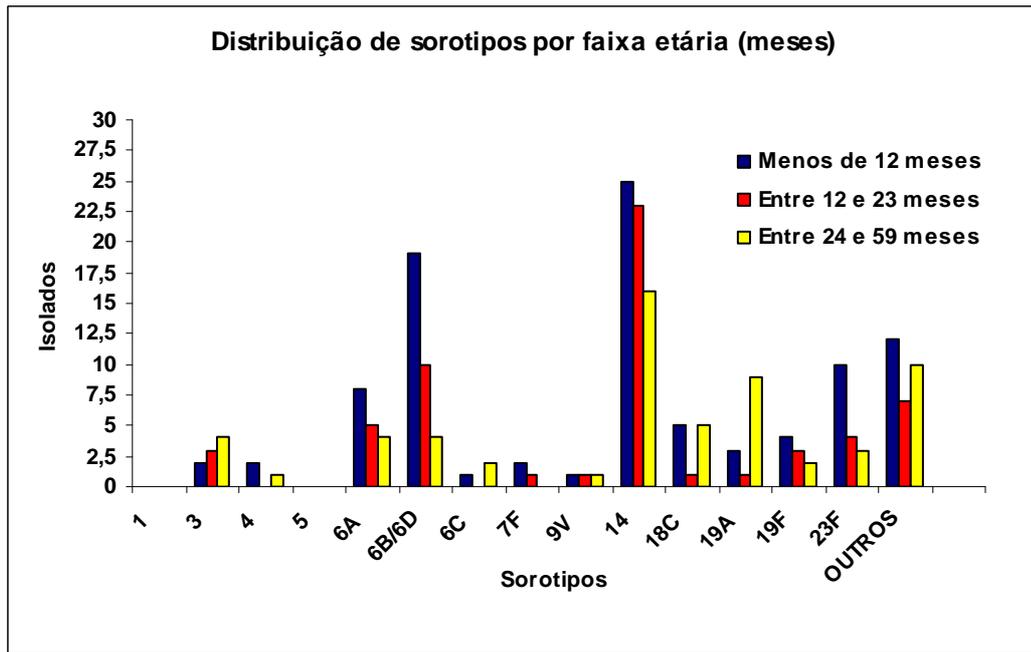


Figura 2.2. Isolados de doença pneumocócica invasiva de diferentes sorotipos de *S. pneumoniae* em crianças com menos de 59 meses de idade no Brasil. (Fonte: Organização Pan-Americana de Saúde, 2011).

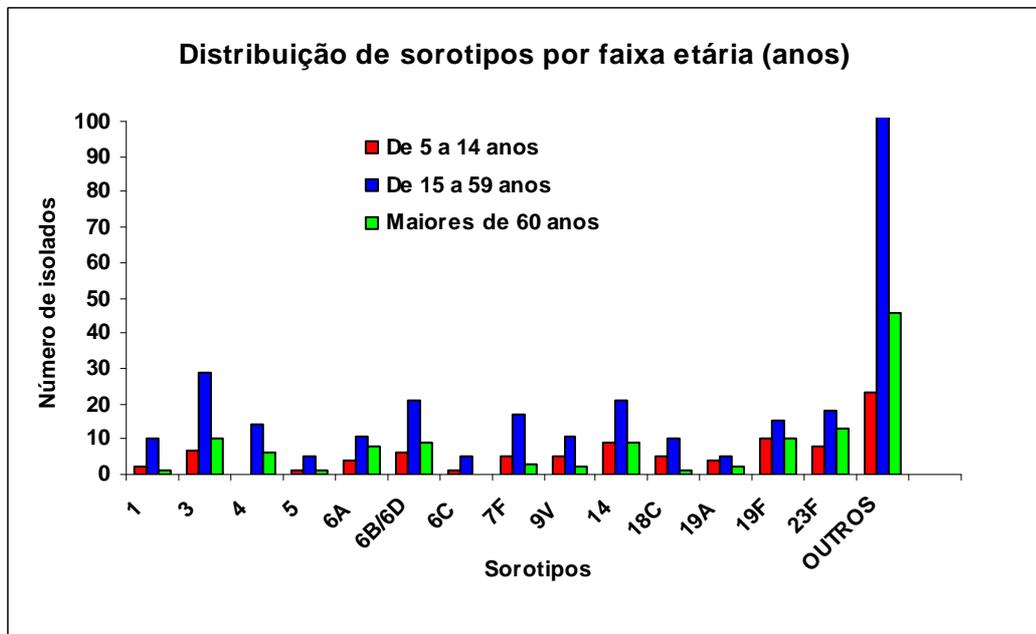


Figura 2.3. Isolados de doença pneumocócica invasiva de diferentes sorotipos de *S. pneumoniae* em pessoas de 5 a 60 anos de idade no Brasil. (Fonte: Organização Pan-Americana de Saúde, 2011).

A doença pneumocócica invasiva (DPI) tem origem na colonização da nasofaringe por sorotipos homólogos. Desta forma, a distribuição dos sorotipos isolados da colonização pode ser um indicativo para a doença invasiva, perfil de resistência antimicrobiana e de uma potencial cobertura vacinal. Entretanto, existem sorotipos que colonizam a nasofaringe e possuem uma baixa tendência em causar DPI e outros, em uma pequena proporção, que praticamente não são isolados em portadores sãos e freqüentemente causam DIP (BOGAERT *et al.*, 2004).

No Brasil, a taxa de colonização da nasofaringe de crianças varia de 30 a 50% dependendo da região do país. Nos estudos realizados por Laval e colaboradores (2006), em Goiânia, e Berezin e colaboradores (2007), em São Paulo, os sorotipos mais freqüentes na nasofaringe foram 6A, 6B, 14, 19F e 23F que também foram isolados de pessoas com doença pneumocócica invasiva, comprovando a similaridade de prevalência nas duas situações. Nos dois trabalhos citados acima os sorotipos 1 e 5 foram raros entre os isolados da nasofaringe e estão entre os sorotipos mais comuns causadores de doença pneumocócica invasiva no Brasil (CHIOU *et al.*, 2008, BRANDILEONE *et al.*, 2003). Este fenômeno também foi observado em outros países em desenvolvimento e em alguns países desenvolvidos conforme descrito por Hausdorff e colaboradores (2005) e em Israel por Porat e colaboradores (2001). Uma hipótese para tentar explicar este resultado seria de que os sorotipos 1 e 5 fazem uma passagem transitória e rápida através da nasofaringe antes de alcançar a corrente sanguínea o que acarretaria na baixa prevalência na colonização da nasofaringe (HAUSDORFF, 2007). No entanto, dados mais recentes, do ano de 2010 (OPAS, 2011), os sorotipos 1 e 5 não foram isolados de DPI em menores de 5 anos de idade no Brasil, indicando a necessidade constante de uma vigilância epidemiológica ativa com relação a dinâmica das cepas invasivas e o quadro de portadores assintomáticos.

No final da década de 60 foi isolada, na Austrália, a primeira amostra de pneumococos não suscetível a níveis mais elevados de penicilina (HANSMAN e BULLEN, 1967). Atualmente, alguns sorotipos apresentam não só resistência à penicilina como a outros antimicrobianos caracterizando o fenômeno de multiresistência (WHO, 2007). A resistência à penicilina está associada com

alterações nas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), que são enzimas que catalisam etapas importantes na síntese da peptidoglicana da parede celular do patógeno. Pneumococos não produzem beta-lactamase e provavelmente obtêm genes de resistência, aos beta-lactâmicos, de outros *Streptococcus* como o *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis*, que posteriormente se propagam de pneumococos para pneumococos. Alterações nas PBPs resultam na diminuição da afinidade entre as PBPs e os beta-lactâmicos, desta forma, sendo necessárias concentrações mais elevadas de penicilina para ligação e inibição da enzima, conseqüentemente impedindo o crescimento e a lise *in vivo* da bactéria (BERGMAN *et al.*, 2004; APPELBAUM, 2002).

Estudos têm demonstrado que alguns sorotipos, como o 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F e 23F são classicamente associados com a resistência a antibióticos. Sugerindo uma relação entre a estrutura da cápsula polissacarídica e mudanças nas PBPs, que levaria a resistência a antibióticos (DE OLIVEIRA, 2007, BRANDILEONE *et al.*, 2006, YOSHIOKA *et al.*, 2011).

Cepa destes sorotipos tem sido encontradas em várias partes do mundo, inclusive no Brasil, conforme descrito na literatura desde a década de 90 (SESSEGOLO *et al.*, 1994; MENDES *et al.*, 1998; TEIXEIRA *et al.*, 1988). Amostras isoladas nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro apresentaram diminuição da susceptibilidade à penicilina mais freqüentemente associada aos sorotipos 6B, 14, 19A e 23F (TEIXEIRA *et al.*, 1988). Dados provenientes do SIREVA 2010 (OPAS, 2011) mostram que os sorotipos isolados de meningite associados a resistência à penicilina para menores de 5 anos, são: 14 (46,7%), 6B/6D (18,7%), 23F (17,3%), 19A (6,7%), 9V (2,7%), 6A (4,0%) e 6C/19F (1,3%). Para o grupo de maiores ou igual a 5 anos de idade a ordem dos sorotipos resistentes à penicilina apresenta um perfil diferente de prevalência: 14 (24,7%), 23F (23,5%), 6B/6D (13,6%), 6A (8,6%), 9V (3,7%) e 19A (2,5%). Apesar da diferença de ocorrência entre as faixas etárias, o sorotipo 14 é o mais freqüentemente associado a resistência antimicrobiana. Vale ressaltar que, para o grupo de maiores de 5 anos, a percentagem de isolados resistentes do sorotipo 23F está próxima do sorotipo 14.

Segundo Bricks e colaboradores (2006) analisar as variações na prevalência dos diversos sorotipos de pneumococos, assim como nas taxas de resistência requer muita cautela, pois existem amplas variações na prevalência dos diversos sorotipos e na resistência bacteriana, de acordo com a região, faixa etária, época do ano e período de isolamento das cepas.

## 2.2 MICRO-ORGANISMO AGENTE

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococos) é uma bactéria Gram positiva que apresenta forma oval ou esférica, tamanho de 0,5-1,25  $\mu\text{m}$ . Ocorre geralmente aos pares em arranjo de diplococos lanceolados, podendo ocasionalmente ocorrer de forma isolada ou em pequenas cadeias. São micro-organismos encapsulados e suas colônias são esféricas, planas e com uma depressão central. Apresentam um halo esverdeado ao redor das colônias quando cultivados em ágar sangue decorrente da atividade  $\alpha$ -hemolítica.

Segundo a literatura, existem em torno de 93 sorotipos de pneumococos que são classificados de acordo com dois sistemas de nomenclatura (YOTHER, 2011). O Dinamarquês se baseia nas características estruturais e antigências da cápsula polissacarídica dividindo-os em grupos. Para distinguir os sorotipos dentro destes grupos adicionam-se letras: F (“first”) para o primeiro tipo descoberto, A para o segundo e assim sucessivamente. A nomenclatura Americana baseia-se somente nas características estruturais da cápsula, designando números de acordo com o isolamento cronológico de cada sorotipo. Embora cada sistema adote uma forma peculiar de classificação, existe uma correlação entre as duas nomeclaturas (LUND e HENRICHSEN, 1978).

*S. pneumoniae* pertence ao grupo das bactérias ácido lácticas, denominada desta maneira, porque sob condições anaeróbicas, o produto principal do seu metabolismo é o ácido láctico. É nutricionalmente exigente, requerendo um meio complexo para o seu crescimento. Esta bactéria obtém energia estritamente por via fermentativa, sendo incapaz de realizar metabolismo respiratório, tanto aeróbico quanto anaeróbico, que é uma característica para todas as espécies de

streptococos. Os únicos nutrientes dos quais os pneumococos conseguem obter energia suficiente para promover o crescimento e a divisão celular são os carboidratos. Hoskins e colaboradores (2001) identificaram um grande conjunto de genes que codificam enzimas necessárias para o transporte de pelo menos 12 carboidratos diferentes para o interior da célula e sua subsequente conversão para um intermediário da via glicolítica. Os carboidratos são oxidados a piruvato na via glicolítica com o objetivo de reoxidar a maioria, senão todo, o NADH produzido pela redução do ácido pirúvico a ácido láctico que é excretado pela célula. *S. pneumoniae* possui o equipamento enzimático que dependendo das condições de cultivo pode converter o piruvato em acetato, etanol e formiato, conforme apresentado na figura 2.4.

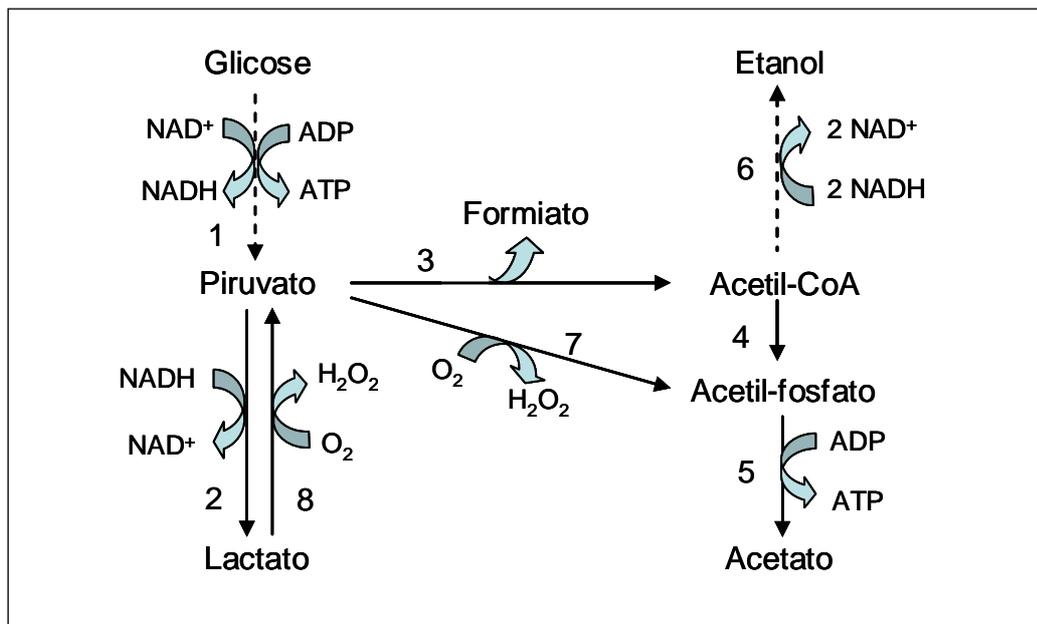


Figura 2.4. Vias alternativas do metabolismo da glicose em *S. pneumoniae*. Enzimas responsáveis pela catálise das reações metabólicas: 1. enzimas da via glicolítica; 2. lactato desidrogenase; 3. piruvato formiato liase; 4. fosfotransacetilase; 5. acetoquinase; 6. etanol-desidrogenase; 7. piruvato oxidase; 8. lactato oxidase. (Fonte: adaptado de Taniai *et al.*, 2008; Maio, 2010).

Com relação à exigência de oxigênio *S. pneumoniae* é classificado como anaeróbio facultativo (BERGEY, 1994), mas atualmente Auzat e colaboradores (1999) consideram este patógeno como anaeróbio aerotolerante por ser capaz de infectar o corpo humano em ambientes com níveis de oxigênio completamente diferentes. No trato respiratório superior *S. pneumoniae* reside como um comensal e

crece sob pressão parcial de oxigênio próxima da atmosfera. No entanto, quando pneumococos causam pneumonia, otite média e meningite, geralmente colonizam regiões que são muito pouco oxigenadas, e em muitos casos, quase livres de O<sub>2</sub>. Portanto, o oxigênio é uma variável relevante nos ambiente onde de *S. pneumoniae* cresce, uma vez que esta bactéria tem que se adaptar às diferentes pressões parciais de oxigênio. Pneumococos possuem enzimas similares àquelas encontradas em outros organismos anaeróbicos denominadas oxidases: NADH oxidase, piruvato oxidase e lactato oxidase. Estas enzimas são induzidas em ambientes com altos níveis de oxigênio como uma maneira da bactéria se defender do *stress* oxidativo e possuem efeitos distintos no metabolismo do carbono. As NADH oxidases são enzimas que se reoxidam e reduzem o oxigênio molecular em água (destoxificação do O<sub>2</sub>). A presença de NADH oxidase permite que *S. pneumoniae* reoxide uma fração do NADH da via glicolítica, utilizando O<sub>2</sub> ao invés de piruvato, portanto melhorando a eficiência do catabolismo da glicose em termos de ATP (AUZAT *et al.*, 1999).

Pneumococos não possuem o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) completo, portanto algumas enzimas presentes no TCA e que possuem um papel primordial na síntese de certos precursores de aminoácidos não estão presentes. Como resultado, o pneumococo é incapaz de sintetizar aspartato proveniente do oxaloacetato, nem pode sintetizar glutamato via alfa-cetoglutarato. Portanto há necessidade de se desenvolver um meio específico para *S. pneumoniae* que contenha, além desses aminoácidos, outros cofatores (biotina, colina, pantotenato) que também possuem o caminho biosintético incompleto (HOSKINS *et al.*, 2001).

Segundo Swiato e colaboradores (2004) a exigência nutricional de pneumococos por colina ou substâncias análogas para o seu crescimento se traduz na capacidade destes micro-organismos ligarem covalentemente a fosforilcolina aos ácidos teicóico e lipoteicóico presentes na peptidoglicana da parede celular e na membrana citoplasmática da célula bacteriana, respectivamente. Embora outros patógenos humanos também apresentem colina na sua parede celular, apenas pneumococos expressam proteínas de superfície que se ligam especificamente a colina como um mecanismo importante na patogenicidade. A autolisina é uma

destas proteínas de superfície ligadora de colina presente no ácido teicóico durante a hidrólise da peptidoglicana.

### 2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DE PNEUMOCOCOS

A patogenicidade dos pneumococos é atribuída a estruturas basicamente situadas na superfície da célula bacteriana. Estes fatores podem ser divididos em dois grupos: um grupo formado pela cápsula polissacarídica e proteínas de superfície e o outro composto por componentes da parede celular e a toxina intracelular (pneumolisina). O envoltório do micro-organismo pode ser dividido em membrana plasmática, parede celular e cápsula. A figura 2.5 mostra a representação hipotética dos fatores de virulência de pneumococos.

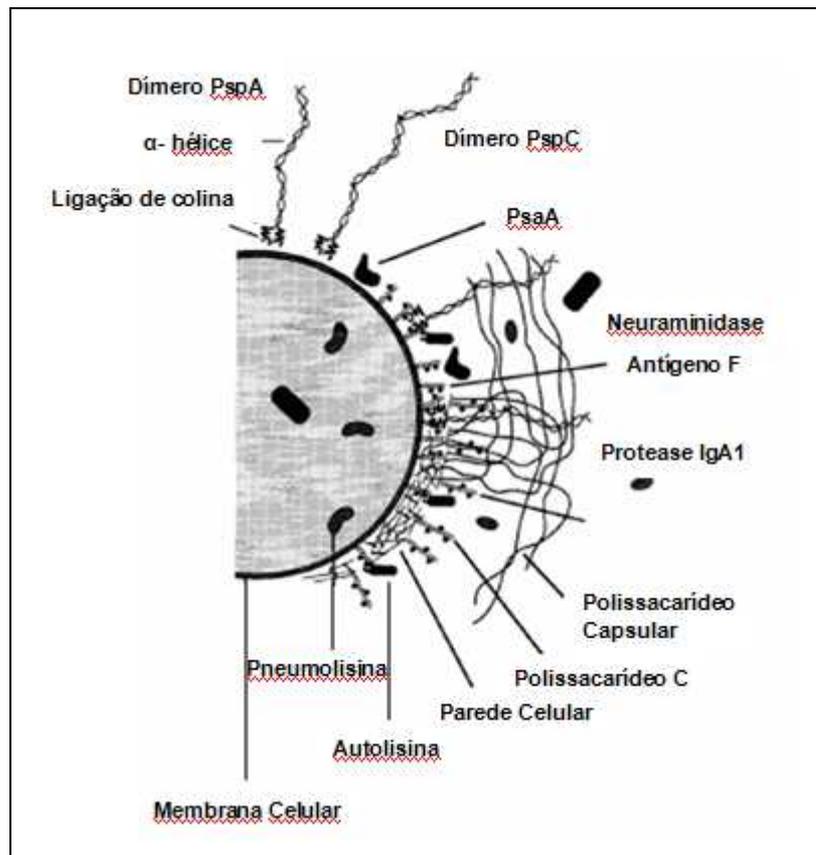


Figura 2.5. Representação hipotética da superfície de pneumococos ilustrando os fatores de virulência de pneumococos (Fonte: BRILES *et al.*, 1998).

### 2.3.1 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica é a camada mais externa da célula de *S. pneumoniae*. Trata-se de um polímero de alto peso molecular composto de unidades repetidas de oligossacarídeos, as quais possuem de dois a oito monossacarídeos que permanecem presos, possivelmente de forma covalente, na parede da bactéria. Possuem também, alguns componentes que não são sacarídeos, explicando, desta forma, a grande variabilidade antigênica destes polímeros. A síntese da maioria dos polissacarídeos capsulares de pneumococos é realizada inicialmente pela transferência de unidades monossacarídicas para um carreador lipídico associado à membrana plasmática da célula bacteriana. Após a formação da unidade repetitiva (Figura 2.6), esta é transferida para a face externa da membrana citoplasmática através da flipase (Wzx) e polimerizada (polimerase Wzy) formando o polissacarídeo maduro que é então ligada a peptidoglicana da parede celular (KADIOGLU *et al.*, 2008).

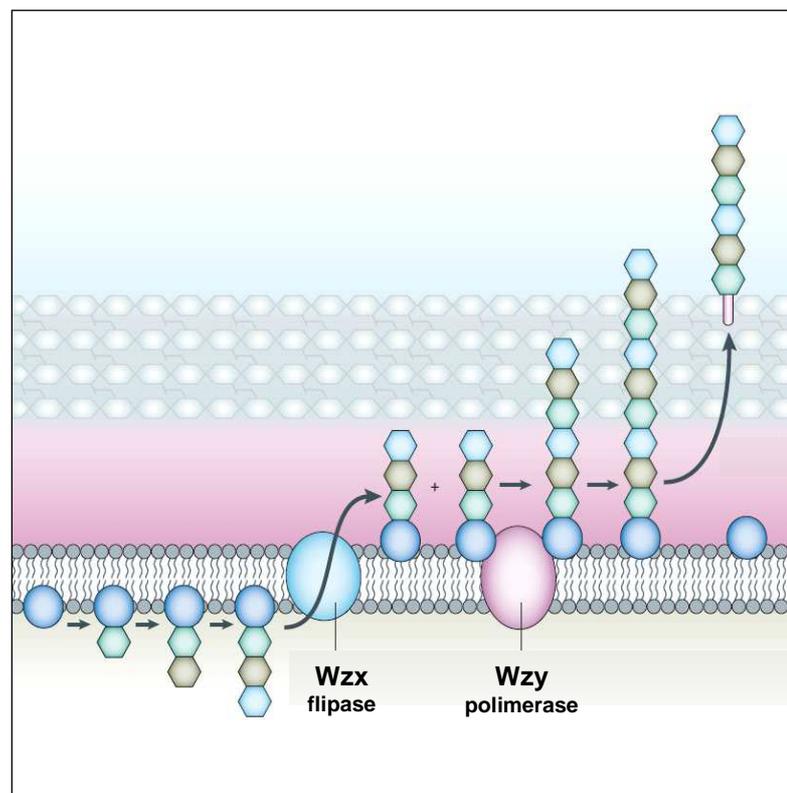


Figura 2.6. Esquema da biossíntese do polissacarídeo capsular (Fonte: KADIOGLU *et al.*, 2008)

A cápsula é sintetizada rapidamente e extensivamente durante a fase exponencial de crescimento da bactéria. A maioria dos polissacarídeos capsulares de *S. pneumoniae* possui carga negativa e uma pequena parcela é neutra (sorotipos 7F, 14 e 33).

A cápsula polissacarídica tem sido reconhecida como o principal fator de virulência dos pneumococos através do qual o micro-organismo é capaz de driblar os mecanismos não específicos de defesa do hospedeiro, como a fixação do complemento e a fagocitose. *S. pneumoniae* é completamente coberto pela cápsula polissacarídica que atua como uma camada protetora que isola a célula bacteriana do ambiente. No entanto, esta estrutura parece ser dispensável para a viabilidade da célula, levando-se em consideração que mutantes não capsulados não apresentam o seu crescimento prejudicado quando cultivados *in vitro*. Entretanto, as variantes não capsuladas são incapazes de causar doença, ou seja, demonstrando que a cápsula é imprescindível para a virulência. É importante ressaltar que os estudos iniciais sobre a cápsula polissacarídica de pneumococos permitiram a identificação de polissacarídeos como imunógenos. Portanto, a cápsula pneumocócica foi o primeiro antígeno não proteico capaz de induzir resposta de anticorpos em humanos.

A virulência de um dado sorotipo de pneumococos está relacionada principalmente com a estrutura química da cápsula (AUSTRIAN *et al.*, 1984) e com a quantidade de cápsula produzida (MAGEE e YOTHER, 2001). A sobrevivência de pneumococos nos diferentes habitats do hospedeiro está diretamente ligada à capacidade da bactéria em regular a quantidade de cápsula produzida. *S. pneumoniae* apresenta dois fenótipos (morfologia das colônias: opaco e transparente) diferentes de acordo com a quantidade de cápsula produzida e este processo de variação de fase ocorre espontaneamente, no entanto o mecanismo genético que contribui para tal processo ainda não está elucidado (GARCÍA e LÓPEZ, 2004). O fenótipo transparente que produz pequena quantidade de polissacarídeo capsular tem sido demonstrado como mais eficiente na colonização da superfície da mucosa da nasofaringe e mais hábil em residir nesta superfície, provavelmente pela exposição de estruturas presentes na superfície de

pneumococos, como adesinas, que são requeridas na fase de colonização. O fenótipo opaco é mais associado à infecções sistêmicas, onde há requerimento de expressão máxima de cápsula polissacarídica, que inibe a opsonização mediada pelo complemento (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2005). Conforme citado anteriormente, a regulação da biosíntese da cápsula polissacarídica quando pneumococos se desenvolvem em humanos é uma resposta às condições ambientais. Segundo Moscoso e García (2009), concentrações de glicose extracelular podem regular positivamente o nível de biosíntese do polissacarídeo capsular. Nas secreções nasofaringeais saudáveis, a concentração de glicose normalmente é muito baixa (< 1mM) e uma pequena quantidade de polissacarídeo capsular é necessária para uma ótima fixação de pneumococos às células epiteliais. Em contraste, na corrente sanguínea de indivíduos saudáveis a concentração de glicose é alta (5 mM) onde é necessária uma biosíntese de polissacarídeo capsular máxima.

Segundo Fernebro e colaboradores (2004) a cápsula polissacarídica está relacionada ao grau de lise espontânea ou induzida por antibióticos. Uma das alternativas para explicar este fenômeno é que dependendo da estrutura química da cápsula esta protege a membrana plasmática da ruptura, desta forma, contribuindo para tolerância aos antibióticos. Alguns sorotipos de pneumococos estão mais associados à resistência à antibióticos, no entanto pode ocorrer troca de material genético entre cepas por transformação e modificar o padrão de resistência vigente (SCHRAG, *et al.*, 2000).

Dentre os sorotipos de pneumococos mais estudados, o polissacarídeo capsular de pneumococos sorotipo 14 possui lugar de destaque por ser altamente prevalente em todo mundo, apresentar uma elevada incidência em crianças e estar associado à resistência antimicrobiana. Trata-se de um heteropolissacarídeo neutro formado por unidades repetitivas de um tetrassacarídeo cujas hexoses se encontram na seguinte razão molar: 1 unidade de D-glicose, 2 unidades de D-galactose e 1 unidade de N-acetil-D-glicosamina. O peso molecular do monômero está em torno de 650 Da e o peso molecular total da ordem de 1000 kDa (CUESTA *et al.*, 2003). A estrutura química do polissacarídeo capsular está apresenta na figura 2.7.



carreadora. No entanto, parece haver controvérsia com relação ao efeito protetor de anticorpos contra PC e contra a estrutura completa do C-PS (BRILES *et al.*, 2003).

Anticorpos contra os conjugados de C-PS com BSA (albumina bovina sérica) não foram capazes de proteger completamente camundongos quando desafiados com pneumococos dos sorotipos 3 ou 6A e nenhum anticorpo contra PC foi gerado nesse modelo animal (WHO, 1992). Conclui-se que, apesar do C-PS ser altamente imunogênico, é incapaz de produzir uma resposta protetora, e, portanto não encorajando o desenvolvimento de vacinas contra pneumococos baseadas neste componente.

### **2.3.3 Antígeno F (antígeno de Forssman)**

O ácido lipoteicóico, também conhecido como antígeno de Forssman (antígeno F) é um ácido teicóico similar ao do C-PS da parede celular. A principal diferença está na presença de um material lipídico ligado covalentemente a sua estrutura. Este antígeno está distribuído uniformemente na membrana plasmática, uma parte da molécula exposta para superfície e a outra parte (porção lipídica) ancorada na dupla camada lipídica da membrana plasmática (SORENSEN *et al.*, 1988). A porção lipídica é uma mistura de oito ácidos graxos e corresponde a 5,7% do peso molecular do antígeno (BRILES e TOMASZ, 1973).

O antígeno de Forssman é um forte inibidor da autolisina pneumocócica e um regulador da atividade da mureína hidrolase. Durante a fase estacionária de crescimento, as células de pneumococos liberam o antígeno F, e a perda desse inibidor, seguida pela atividade desenfreada da autolisina, resulta na destruição da parede celular e finalmente na lise bacteriana (HORNE e TOMASZ, 1985). A imunização de camundongos com antígeno F não protegeu contra infecção pneumocócica (AU e EISENSTEIN, 1981).

### 2.3.4 Proteínas

Segundo reportado na literatura (MOFFIT e MALLEY, 2011; KADIOGLU *et al.*, 2008; JEDRZEJAS, 2001) existe uma grande variedade de proteínas que estão envolvidas na patogenicidade e na disseminação da doença causada por *S. pneumoniae*, tais como: hialuronato liase (Hyl), pneumolisina (Ply), duas neuraminidasas (NanA e NanB), autolisina (LytA), PspC (também chamada de CbpA proteína A ligadora a colina), proteína pneumocócica A de aderência (PsaA), e proteína pneumocócica A de superfície (PspA). Dentre todas as proteínas citadas, aquelas que sejam altamente conservadas entre os sorotipos e induzam anticorpos protetores em humanos podem ser utilizadas como potenciais candidatas para compor uma vacina tanto sozinha quanto conjugada a polissacarídeos capsulares. Neste contexto as proteínas mais estudadas em modelos animais tem sido PspA e a pneumolisina e, em menor extensão PsaA.

#### 2.3.4.1 Proteína A de superfície pneumocócica (PspA)

PspA é uma proteína (peso molecular 67-99 kDa) (WALTMAN *et al.*, 1990) de superfície localizada na parede celular de *S. pneumoniae* e está presente em todas as cepas deste patógeno (CRAIN *et al.*, 1990). A PspA possui o domínio N-terminal altamente carregado e polar e que se estende da parede celular até possivelmente para fora da cápsula. A eletropositividade presente nesta parte da estrutura da proteína serve para estabilizar a cápsula que é fortemente eletronegativa. O domínio C-terminal possui resíduos hidrofóbicos que ligam a PspA aos resíduos terminais de colina do ácido teicóico e lipoteicóico na superfície pneumocócica.

A PspA é essencial na virulência de pneumococos, no entanto, os mecanismos envolvidos não estão esclarecidos. Sabe-se que o efeito mais importante envolve interferência com as propriedades antifagocíticas da bactéria e que esta proteína retarda o *clearance* de pneumococos do sangue (MCDANIEL *et al.*, 1987).

As PspAs podem ser agrupadas em três famílias (Fam 1, Fam 2 e Fam 3) baseadas na sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica, o que inclusive

sugere um possível mecanismo de virulência para estas proteínas. Estudo realizado por Brandileone e colaboradores (2004) utilizando cepas isoladas de pacientes com doença pneumocócica invasiva e de secreções da nasofaringe no Brasil, no período de 1977 a 2002, demonstraram que 94% das amostras possuíam PspA pertencentes as famílias 1 e 2. Experimentos empregando camundongos adultos saudáveis, mostraram reatividade cruzada contra proteínas PspA heterólogas. Apesar da PspA apresentar uma grande variação na sequência de aminoácidos nos seus epítomos possui uma reatividade imunológica cruzada muito elevada para mais de tipo capsular de *S. pneumoniae* (MCDANIEL *et al.*, 1991, TART *et al.*, 1996). No entanto, outros autores (HOLLINGSHEAD *et al.*, 2000 e MIYAJI *et al.*, 2002) relatam que PspAs pertencentes a diferentes famílias possuem uma reatividade cruzada limitada e que a combinação de proteínas de famílias diferentes é uma abordagem bastante interessante na formulação de uma vacina. Fragmentos de PspA livres podem ser utilizados como vacinas (possivelmente em combinação com outras proteínas de pneumococos) ou na suplementação de vacinas conjugadas o que poderia melhorar a proteção destas vacinas contra pneumonia, otite média e no estado de portador nasofaringeal com um potencial impacto para várias regiões geográficas (BRILES *et al.*, 2000).

#### 2.3.4.2 Pneumolisina

É uma proteína intracelular de peso molecular 53-kDa (ponto isoelétrico está entre 4,9 e 5,2) (LEE *et al.*, 1991) produzida por todos os sorotipos de pneumococos. O papel da pneumolisina na virulência de pneumococos está diretamente relacionada à ação de outra enzima de pneumococos, a autolisina (descrita em 2.3.4.3). A pneumolisina pertence a um grupo de citolisina colesterol-dependente (CDCs), portanto apresentando uma variedade de efeitos tóxicos para células eucarióticas e todas aquelas que possuam colesterol na membrana celular. Proteínas pertencentes a este grupo de toxinas apresentam similaridades em sua estrutura primária e seu modo de ação. As CDCs solúveis em água, quando em solução apresentam-se como monômeros e dímeros, mas podendo formar grandes

oligômeros que são inseridos na dupla camada lipídica da membrana da célula alvo. No caso da pneumolisina, quando ocorre interação entre a toxina e o receptor colesterol ocorrem alterações estruturais e conformacionais na proteína transformando os dímeros e agregados em estruturas de grandes anéis ocasionando a formação de poros dentro da membrana, que inclusive podem ser visualizados utilizando microscopia eletrônica. Estes poros destroem a integridade da membrana celular do hospedeiro, através da modificação do equilíbrio osmótico entre a célula e o seu ambiente, levando rapidamente a lise celular. Essa proteína não é secretada durante a fase de crescimento da bactéria e sua liberação do citoplasma é dependente da ação de outra enzima de *S. pneumoniae*, a autolisina (KELLY e JEDRZEJAS, 2000).

A pneumolisina possui múltiplas funções distintas, especialmente no estágio inicial da infecção, onde é crucial para colonização pneumocócica do hospedeiro. Cepas mutantes de *S. pneumoniae* pneumolisina-negativas são menos virulentas do que as cepas selvagens (RUBINS *et al.*, 1998). A imunização com pneumolisina prolonga a sobrevivência de camundongos após desafio com diferentes sorotipos de pneumococos, evidenciando a importância desta proteína como fator de virulência deste patógeno (BERRY *et al.*, 1989). No entanto, o caráter tóxico da pneumolisina impede seu uso como componente vacinal na forma nativa. Pode ser utilizada livre sob a forma de toxóide, através de destoxificação química ou genética, na suplementação das vacinas atuais ou ainda como proteína carreadora em vacinas conjugadas com polissacarídeos capsulares (COCKERMAN *et al.*, 2005).

#### 2.3.4.3 Autolisina (enzima autolítica)

As autolisinas são membros de um amplo grupo de enzimas líticas que possuem a habilidade em degradar o esqueleto de peptidoglicana de bactérias. A autolisina de *S. pneumoniae*, também conhecida como LytA amidase, possui um peso molecular em torno de 36 kDa (RONDA *et al.*, 1987, LOPEZ *et al.*, 1992). Estas enzimas estão localizadas no “envelope celular”, mais precisamente na parede celular de pneumococos. A parte C-terminal da proteína é responsável pela fixação

dos resíduos de ácido teicóico ou lipoteicóico na superfície de pneumococos e a parte N-terminal provavelmente é diretamente responsável pela atividade lítica contra estruturas de peptidoglicana pneumocócica (TOMASZ *et al.*, 1971). As enzimas autolíticas desempenham papéis importantes em várias funções biológicas básicas nas bactérias, como no crescimento da parede celular, “turnover”, separação de células-filha e na ação bacteriolítica de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (TOMASZ, 1984). A principal função destas enzimas é a degradação da parede celular que induz à lise celular e a morte da célula bacteriana (TOMASZ *et al.*, 1970, TOMASZ 1984).

A autolisina está associada direta e indiretamente à patogenicidade de pneumococos. Uma das implicações diretas é a liberação de componentes da parede celular que são altamente inflamatórios em animais. A implicação indireta envolve a liberação de proteínas bacterianas citoplasmáticas como a pneumolisina para o ambiente externo. No entanto, o papel preciso da autolisina na virulência de pneumococos ainda está sob debate (JEDRZEJAS, 2001).

Alguns estudos (CANVIN *et al.*, 1995; LOCK *et al.*, 1992; BERRY *et al.*, 1989) têm demonstrado as propriedades protetoras da autolisina, sugerindo esta proteína como componente potencial de uma nova vacina antipneumocócica.

#### 2.3.4.4 Adesina A de superfície pneumocócica (PsaA)

Adesina A de superfície pneumocócica (PsaA) é uma proteína com peso molecular 34.5 kDa (TALKINGGTON *et al.*, 1996) e 37 kDa (RUSSEL *et al.*, 1990), localizada na superfície de pneumococos. Acredita-se que esta proteína está ancorada na membrana celular de *S. pneumoniae* e ligada covalentemente a um componente lipídico da camada citoplasmática (TAM e SAIER, 1993). A patogenicidade da PsaA inicialmente foi relacionada à aderência e colonização da bactéria ao epitélio do hospedeiro (ANDERSEN *et al.*, 1993, SUTCLIFFE e RUSSEL, 1995). Entretanto, para ser considerada uma adesina é necessário que a proteína esteja na superfície da bactéria. Estudos baseados nas dimensões do lipídeo ligado

a PsaA sugerem que esta proteína não pode se estender para fora da parede celular e, portanto, não pode ser considerada uma adesina (TOMASZ, 1981). As características iniciais de adesina da PsaA foram deduzidas baseadas em experimentos empregando células de pneumococos mutantes em PsaA<sup>-</sup> que não acarretavam aderência e, por conseguinte, colonização. No entanto, o fato de não ocorrer aderência era devido a efeitos secundários causados pela ausência de outra molécula de adesina, a proteína A ligada à colina (CbpA). A CbpA é modulada pela presença ou ausência de Mn<sup>2+</sup> ou Zn<sup>2+</sup> e existe uma evidência fisiológica de que a PsaA é responsável pelo transporte destes dois íons para o interior do citoplasma da bactéria (JEDRZEJAS, 2001).

## 2.4 VACINAS PNEUMOCÓCICAS

### 2.4.1 Histórico

A palavra vacina é proveniente do latim *vacca* que em português significa vaca. Pasteur atribuiu este nome a um preparado antigênico como uma maneira de homenagear Edward Jenner pelo seu trabalho no combate à varíola. Estes estudos originaram a idéia de proteção do hospedeiro através do agente causador da doença. Vacina é definida como a preparação de micro-organismos atenuados, ou mortos, ou de seus componentes, ou de seus produtos, utilizada para induzir imunidade ativa contra uma doença.

O desenvolvimento da vacina contra pneumococos não foi diferente das demais vacinas. As primeiras preparações utilizavam a bactéria crescida em caldo e as células inteiras eram suspensas em salina e mortas por aquecimento. O esquema de aplicação era de 2 doses subcutâneas com o intervalo de uma semana. Uma série de estudos clínicos foram realizados entre 1911 e os anos 1930 empregando vacina de células inteira morta pelo calor, e apesar da dificuldade em se avaliar eficácia destas vacinas, os resultados foram considerados positivos na época em termos da redução da incidência de pneumonia. Muitas lições foram aprendidas durante o período de utilização da vacina de célula inteira tais como: métodos para

preparação de vacinas, administração, dosagem, desenvolvimento de métodos para avaliação da resposta imune e a importância de um desenho rigoroso dos estudos clínicos para evitar viés nos resultados (MÄKELÄ e BUTLER, 2008).

A busca por vacinas mais seguras e com o mínimo de reações indesejáveis estimulou a identificação de estruturas específicas, suficientemente imunogênicas capazes de substituir todo equipamento celular. Então, surgem os primeiros experimentos empregando polissacarídeos capsulares purificados de pneumococos (FELTON, 1938; FRANCIS, 1930; HEIDELBERGER e AVERY, 1923 *apud* MÄKELÄ e BUTLER, 2008). De acordo com Mäkelä e Butler (2008) o sucesso da imunização com polissacarídeos purificados abriu a possibilidade para o desenvolvimento de vacinas pneumocócicas de segunda geração.

A introdução da penicilina na década de 40 foi um grande avanço no tratamento das doenças infecciosas causadas por *Streptococcus pneumoniae*, entretanto ocasionou uma diminuição do interesse pelo desenvolvimento e utilização de uma vacina contra essa bactéria. As altas taxas de morbidade e mortalidade das doenças pneumocócicas mesmo após o uso generalizado de antimicrobianos apontavam para necessidade de retomar, de forma urgente, o desenvolvimento das vacinas polissacarídicas.

A necessidade de ampliação da população alvo (crianças menores de 2 anos) devido as características inerentes aos antígenos polissacarídicos, dá origem a um novo tipo de vacina (vacinas conjugadas) que emprega uma técnica mais elaborada, a conjugação química. A busca de formulações mais eficazes, antígenos comuns a todos os sorotipos de pneumococos, inclusive baseada na seqüência genômica (vacinologia reversa), é um desafio para o desenvolvimento de futuras vacinas contra pneumococos, tendo em vista que existe em torno de uma centena de sorotipos deste patógeno e somente uma parcela destes estão contemplados na vacina atuais. No quadro 2.1 estão apresentados os principais eventos relacionados ao desenvolvimento da vacina contra pneumococos.

Quadro 2.1. Marcos históricos no desenvolvimento da vacina contra pneumococos

Ano	Evento
1881	Pasteur e Sternberg descobriram, isolaram e identificaram <i>S. pneumoniae</i> em cultura
1911	Wright e associados conduziram estudos de imunização na África do Sul, utilizando vacina composta por células de pneumococos inteira, morta
1916	Lister demonstrou o valor protetor da vacina de célula inteira morta por aquecimento
1926	Felton e Bailey foram os primeiros a isolarem polissacarídeo capsular de pneumococos
1930	Tillett e Francis verificaram que polissacarídeo capsular purificado de pneumococos induziam anticorpos específicos em humanos
1938	Felton mostrou que a proteção da doença é tipo-específica em indivíduos vacinados com os tipos de PSs 1 e 2  Ekwurzel e associados conduziram os primeiros testes clínicos do PSs e encontraram uma significativa redução nos episódios de pneumonia e mortalidade
1945	MacLeod e Heindelberger demonstraram que a infecção pneumocócica é tipo específica no homem e poderia ser prevenida por uma vacina tetravalente, incluindo os PSs tipos 1, 2, 4, e 7
1946	Foram produzidas duas vacinas comerciais hexavalente contra pneumococos, uma para adultos e outra para crianças; entretanto, a ampla disponibilidade de antibióticos para o tratamento de infecções pneumocócicas levou a uma diminuição no interesse na vacinação; estas vacinas ficaram disponíveis somente por 3 anos
1947	Kauffman, utilizando uma vacina trivalente, mostrou proteção tipo-específica contra pneumonia e bacteremia em indivíduos idosos
1964	Austrian e Gold constataram que os índices de mortalidade por pneumonia permaneciam elevados mesmo em pacientes tratados com antibióticos
1967	Aparecimento pela primeira vez de cepas resistentes a níveis mais elevados de penicilina
1968	National Institutes of Health e Merck, Sharp & Dohme conduziram estudos de eficácia e segurança de vacinas pneumocócicas 6 e 13-valente. Estes estudos mostraram uma redução de 82,3% nas bacteremias pneumocócicas para os tipos presentes na vacina
1977	Robert Austrian e colaboradores produziram uma vacina 14-valente contra pneumococos licenciada pelo FDA
1981	Início da vacinação para idosos pelo Medicare
1983	Substituição da vacina 14-valente contra pneumococos pela 23-valente licenciada pelo FDA
2000	Vacina comercial conjugada 7-valente Prevnar (Wyeth)
2001	Vacina de célula inteira com <i>S. pneumoniae</i> não capsulado
2003	Vacina conjugada: novas formulações – Ensaio clínicos
2010	Vacina comercial conjugada 10-valente (GSK) e 13-valente (Wyeth)

Elaboração própria, adaptado de LEE *et al.* 1991.

O desenvolvimento de vacinas para uso humano passa por várias etapas até que o produto esteja disponível no mercado o que compreende a um longo período de tempo. Na primeira etapa, denominada de estudos pré-clínicos, o produto é avaliado com relação à segurança, imunogenicidade e proteção em modelos

animais. A etapa seguinte são os estudos clínicos que são divididos em três fases. A fase I tem como objetivo primário a segurança e como secundário a resposta imunológica. A fase II é destinada a busca de dados de imunogenicidade e a continuidade dos estudos de eventos adversos. A fase III visa demonstrar a eficácia da vacina candidata na prevenção da doença e confirmar os dados de segurança do produto (HOMMA, *et al.*, 2003).

#### **2.4.2 Vacinas polissacarídicas**

As vacinas polissacarídicas contra *S. pneumoniae* licenciadas pelo FDA vem sendo utilizadas desde o final da década de 70, primeiramente a 14-valente e atualmente a 23-valente, Pneumovax 23 (PPV23) fabricada pelo Merck Research Laboratories, USA. Esta vacina contém 23 polissacarídeos capsulares (sorotipos: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F) selecionados baseados em dados de vigilância soropidemiológica de isolados bacterêmicos de adultos, principalmente nos USA e Europa, e na reatividade cruzada entre os antígenos polissacarídicos pneumocócicos. Nesta vacina estão representados 85-90% dos sorotipos responsáveis por doenças invasivas nos EUA (WHO, 2008) e pouco mais de 80% no Brasil (OSELKA, 2003). Apesar desta vacina possuir um amplo espectro, apresenta baixa imunogenicidade e não é eficaz em crianças abaixo de 2 anos de idade, fato que pode ser explicado pela própria natureza dos antígenos polissacarídicos. Os antígenos polissacarídicos estimulam resposta imunológica independentes de células T, ou seja, são estimulados apenas linfócitos B, e não linfócitos T. Portanto, a resposta imunológica aos antígenos T-independentes é de curta duração, não havendo, também, indução de memória imunológica e maturação da resposta imune. Os anticorpos anti-PS possuem baixa avidéz e a mudança de um isotipo para outro não acontece mesmo após repetidas imunizações. O sistema imunológico das crianças abaixo de dois anos de idade não respondem adequadamente aos antígenos T-independentes o que significa uma resposta deficiente exatamente na faixa etária de maior risco em crianças (BIXLER e PILLAI, 1989; LEE *et al.*, 1991; OSELKA, 2003). De acordo com a WHO, 2008 a PPV23 foi desenvolvida para prevenir a doença pneumocócica em

adultos. Esta vacina está licenciada para o uso em adultos e crianças acima de dois anos que possuam um quadro de alto risco em adquirir infecções respiratórias pneumocócicas.

### 2.4.3 Vacinas conjugadas

Na tentativa de solucionar o problema da baixa imunogenicidade dos polissacarídicos capsulares têm sido propostas vacinas conjugadas obtidas através da ligação covalente destes antígenos a proteínas carreadoras. Essas proteínas podem ser provenientes do próprio micro-organismo (proteína homóloga) ou de outro agente como toxóide tetânico, toxóide diftérico, variante não tóxica da toxina diftérica (CRM197) e proteína de membrana externa de meningococo, e são responsáveis pela mudança na natureza da resposta imune. Dessa forma, o polissacarídeo conjugado é capaz de induzir uma resposta imunológica dependente de células T, com memória imunológica e maturação da afinidade dos anticorpos produzidos. O sucesso da vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), em diversos países, estimulou o desenvolvimento de vacinas conjugadas contra pneumococos e, no ano de 2000, foi licenciada a primeira vacina conjugada contra *S. pneumoniae* (BLACK *et al.*, 2000).

A vacina conjugada contra pneumococos licenciada pelo FDA e disponível no mercado é a vacina 7-valente Prevnar™ produzida pelos laboratórios Wyeth nos USA e na Europa. Esta vacina contém sete polissacarídeos (sorotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) conjugados individualmente ao CRM197. Os sorotipos incluídos nesta vacina originalmente foram os mais comuns causadores de doença invasiva em crianças nos Estados Unidos (BLACK *et al.*, 2000).

Esta vacina apresenta uma cobertura acima de 80% dos isolados pneumocócicos na América do Norte, 70% na Oceania, aproximadamente 60% na América Latina e África e 40% na Ásia (levando em consideração a reatividade cruzada dentro do sorogupo 6) (WHO, 2007). Nos Estados Unidos, após introdução da vacina conjugada, ocorreu uma redução rápida na incidência da doença

pneumocócica invasiva (DIP) na população-alvo, conforme apresentado na figura 2.8. No ano de 2004 pode-se observar uma redução de 77% em crianças menores de um ano de idade, 83% em crianças de 1 ano e 73% em crianças de 2 anos de idade (CDC, 2005).

Observou-se também um declínio, para o mesmo período, na incidência da doença pneumocócica invasiva na população que não recebeu a vacina, 41% no grupo de 20-39 anos (pais de crianças), 20% no grupo de 40-64 anos e 31% no grupo  $\geq 65$  anos (avós). Segundo o CDC (2005), 69% do impacto da vacinação foram relacionados aos efeitos indiretos da vacinação (imunidade coletiva) e redução na colonização das vias respiratórias das crianças vacinadas contra pneumococos, que resulta na diminuição da transmissão dessa bactéria para adultos.

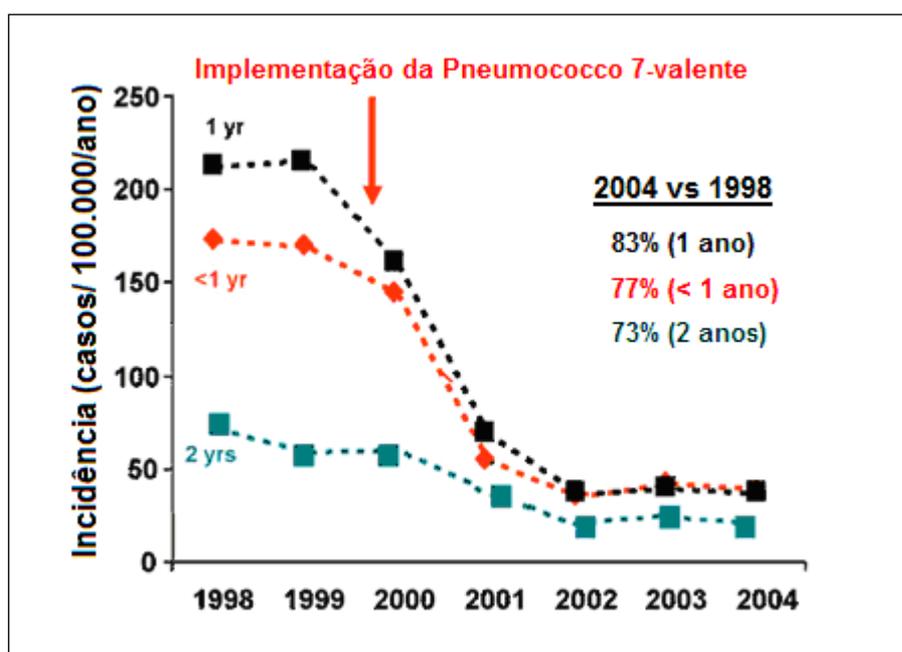


Figura 2.8. Redução das doenças pneumocócicas invasivas nos EUA a partir da introdução da vacina conjugada. (Fonte: CDC, 2005).

De acordo com os resultados promissores obtidos em estudos realizados em vários países empregando a vacina conjugada heptavalente o Comitê de Aconselhamento em Práticas de Imunização (*Advisory Committee on Immunization*

*Practices-ACIP*, 1997) recomenda a vacinação de crianças abaixo de dois anos de idade e crianças com idade entre 24 e 59 meses com risco de adquirir doença pneumocócica. O número de doses varia com a idade de início do esquema de vacinação. De acordo com a WHO (2007) em 2007 a vacina 7-valente foi registrada em mais de 70 países e introduzida em 12 Programas Nacionais de Imunizações.

No Brasil, a vacina conjugada 7-valente foi licenciada em 2001 e aprovada para uso pelo Ministério da Saúde em Outubro de 2002. Esta vacina está disponível na rede pública nos Centros de Referência em Imunobiológicos Especiais (CRIEs) somente para crianças com alto risco de desenvolver doenças invasivas. Entretanto, a maioria das mortes, hospitalizações e seqüelas por doença pneumocócica invasiva ocorrem em crianças previamente saudáveis. Dados do projeto SIREVA (Sistema Regional de Vacinas da OPAS) relatam que a cobertura oferecida pela vacina 7-valente no Brasil seria de 63,5%, devido à importante participação dos sorotipos 1 e 5, que são prevalentes no país e não fazem parte da composição da vacina.

A erradicação dos sorotipos vacinais na nasofaringe de portadores assintomáticos tem criado um nicho ecológico de instalação para os sorotipos não-vacinais (*replacement*) e que se trata de fenômeno é mundial. Em contraste com a situação de portador de nasofaringe, existem evidências que este fenômeno é mais frequente em hospedeiros imuno comprometidos ou em determinadas situações, como idosos, adultos jovens HIV-positivo e crianças com doenças crônicas. O efeito do *replacement* de um modo geral para doença pneumocócica invasiva e pneumonia têm sido pequeno até os dias atuais (DAGAN, 2009).

Nos últimos cinco anos, o sorotipo 19A assumiu uma grande importância nas doenças invasivas e não-invasivas. O aumento do sorotipo 19A é mundialmente relacionado ao uso inadequado de antibióticos para tratar infecções respiratórias agudas e ao desenvolvimento de resistência deste sorotipo, inclusive em países onde não existem programas nacionais de vacinação pediátrica.

Dentre todos os sorotipos incluídos na vacina 7-valente, o sorotipo 19F é o que induz menor resposta e, atualmente, sabe-se que esta vacina não confere proteção cruzada contra o sorotipo 19A (De ROUX *et al.*, 2008). Grandes empresas

têm trabalhado ao longo dos anos na inclusão de um maior número de sorotipos nas vacinas conjugadas para aumentar a cobertura vacinal em todas as regiões. O número ideal de sorotipos em uma vacina conjugada depende do balanço entre a formulação e o potencial de redução da doença, os custos de desenvolvimento e produção bem como o da formulação. Portanto, por estas razões não é possível expandir o número de conjugados para todos os 23 sorotipos da vacina polissacarídica. Novas vacinas conjugadas 9, 10, 11 e 13-valente foram submetidas a ensaios clínicos em várias regiões do mundo e após alguns resultados de imunogenicidade muitas vezes foi necessário mudar a formulação. Por exemplo, no estudo de segurança e imunogenicidade uma vacina pneumocócica 11-valente que continha os sorotipos 1, 3, 5 e 7F além dos sorotipos presentes na vacina 7-valente (Wyeth) conjugados a proteína D de Hib não tipável, não apresentou resposta para o sorotipo 3 em níveis comparáveis dos outros sorotipos (PRYMULA *et al.*, 2006).

Em março de 2009 a empresa GlaxoSmithKline (GSK) recebeu autorização da Comissão Europeia (EMA) para iniciar o uso da vacina 10-valente (Synflorix) na Europa. No Brasil este produto foi aprovado em junho de 2009 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Esta vacina inclui os sorotipos contidos na vacina 7-valente e mais os sorotipos 1, 5 e 7F, os quais geralmente são responsáveis por doenças em crianças nos países em desenvolvimento. Nesta vacina são utilizados três tipos de proteínas carreadoras: Toxóide tetânico (TT) conjugado ao polissacarídeo do sorotipo 18C, toxóide diftérico (TD) conjugado ao polissacarídeo 19F e a proteína D de *Haemophilus* não tipável (PD) conjugado aos demais polissacarídeos. A cobertura vacinal com a presença dos três sorotipos é cerca de 88% nos EUA e Canadá, 84% na Europa, 81% na América Latina, África e Oceania, e 66% na Ásia (HAUSDORFF *et al.*, 2000).

O Brasil foi o primeiro país a incluir a Synflorix em sua política nacional de saúde pública e a partir de 2010, o Sistema Único de Saúde (SUS) passou a oferecer esta vacina de forma gratuita para todas as crianças com até um ano de idade. Este passo foi possível devido ao acordo de transferência de tecnologia entre a GSK e o Ministério da Saúde, por meio de Bio-Manguinhos/Fiocruz, assinado em agosto de 2009. A vacina adquirida pelo Ministério da Saúde é eficaz contra dez

sorotipos, aumentando a cobertura que passará de 63,5% (7-valente) para 82,5% (10-valente). O governo brasileiro se comprometeu a adquirir cerca de 13 milhões de doses por ano da vacina da GSK até que o processo de transferência de tecnologia seja concluído, o que deve ocorrer em 2017. O custo anual da compra é de R\$ 400 milhões. Segundo o Ministério da Saúde, este quantitativo é suficiente para imunizar os 3,2 milhões de crianças nascidas por ano no país seguindo o esquema de imunização com três doses (dois, quatro e seis meses de idade) e uma quarta injeção, de reforço, deve ser aplicada até o 12º mês de vida. A introdução desta vacina no PNI (Programa Nacional de Imunizações) resultará na prevenção anual de 1.500 casos de meningite, 20 mil casos de hospitalizações por pneumonia e 3 milhões de casos de otite média aguda. Além de uma redução de 10 mil mortes por ano em todas as faixas etárias (MENCHEN, 2009).

Têm sido realizados estudos de prevalência de diferentes sorotipos de *S.pneumoniae* em diferentes regiões do Brasil, que servirão de base para avaliação do impacto da introdução da vacina conjugada 10-valente no Programa Nacional de Imunizações (MENEZES *et al.*, 2011 e YOSHIOKA *et al.*, 2011).

Também em 2010 a vacina Prevnar 13-valente produzida pela Wyeth foi licenciada no Brasil está disponível em clínicas particulares. Esta vacina contém todos os sorotipos presentes na vacina 10-valente da GSK e mais os sorotipos 3, 6A e 19A todos conjugados com o CRM197. A presença destes sorotipos permite aumentar ainda mais a cobertura vacinal conforme reportado por Hausdorff e colaboradores (2000), 92% nos EUA e Canadá, 89% na Europa, 87% na África e na América Latina, 86% na Oceania, 73% na Ásia.

As vacinas conjugadas são altamente imunogênicas em crianças abaixo de dois anos de idade, entretanto possuem algumas restrições como um custo elevado, tendo em vista o esquema recomendado de quatro doses e a sua eficácia é basicamente sorotipo específica, ou seja, está limitada ao número de sorotipos incluídos na vacina.

#### 2.4.4 Vacinas protéicas

As proteínas de pneumococos surgem como uma possibilidade de utilizar antígenos buscando maior reatividade cruzada entre os diferentes sorotipos, fenômeno que não ocorre com as vacinas conjugadas. As proteínas são antígenos T-dependentes e altamente imunogênicos e podem levar a memória imunológica, além de poderem ser engenheiradas e expressas em altos níveis o que diminuiria o custo da vacina. Deve-se ressaltar que o preço da vacina conjugada é muito alto, tornando a sua implementação, em países em desenvolvimento muito difícil (OGUNNIYI *et al.*, 2007).

Durante décadas, uma série de proteínas tem sido avaliada com relação à virulência e ao potencial vacinal. Dentre estas podemos citar: pneumolisina (Ply) e o seu toxóide (PdB), proteína de superfície A pneumocócica (PspA), adesina de superfície A pneumocócica (PsaA), proteína A fixadora de colina PspC (CbpA), neuraminidases (NanA e NanB), hialuronidase (Hyl) e autolisina (LytA) entre outras. No quadro 2.2 estão às proteínas em estágios mais avançados de desenvolvimento.

Quadro 2.2. Vacinas baseadas em antígenos protéicos em Estudos Clínicos.

Proteína	Fase
PspA	Pré-clínico
PspA + PsaA	Fase I
PspC (CbpA, SpSA, Hic)	Pré-clínico
PiuA e PiaA	Fase I
Pneumolisina	ID
BVH3/11V	Fase II
Subunidade de pili	Pré-clínico
Usp45	ID

Fonte : adaptado de Barocchi *et al.*, 2007.

ID: Informação não disponível

Uma nova abordagem para o desenvolvimento de vacinas que surgiu com era da genômica foi a vacinologia reversa. Com a disponibilidade da seqüência dos

genomas de diferentes isolados de *S. pneumoniae*, realiza-se a análise das proteínas, através da bioinformática e com base nas características de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, pode-se determinar a posição mais provável das proteínas dentro do micro-organismo. Então são selecionados os antígenos protéicos e expressos em vetores para avaliação de sua real capacidade de induzir imunidade em animais. Este modelo é valioso porque é possível fazer a varredura de inúmeros candidatos vacinais *in silico* em um intervalo de tempo mínimo (RAPPUOLI, 2000).

A vantagem em se utilizar a pneumolisina como antígeno vacinal é a sua elevada conservação entre os isolados clínicos. Entretanto, a imunização com a pneumolisina não foi capaz de proteger camundongos contra desafio letal de pneumococos. Formas, não tóxicas (toxóide) da pneumolisina, denominadas pneumolisóide (PdB) têm sido investigadas e apresentado resultados promissores (TAI, 2006). Esta destoxificação pode ser realizada química ou geneticamente. Estes toxóides possuem limitações, como no caso dos mutantes, pois existem construções que ainda retém a habilidade em formar poros nas membranas das células do hospedeiro, portanto continuam citotóxicas. Outras mutações interferem diretamente nas seqüências responsáveis pela resposta imune, o que acarreta na não proteção por parte deste antígeno (KORCHEV, *et al.*, 1998). Kirkham e colaboradores (2006) fizeram uma série de mutações em uma região da pneumolisina que possui um papel na oligomerização, e estes mutantes não apresentam atividade hemolítica. Segundo os autores, a vacinação com este mutante protege camundongos no ensaio desafio com *S. pneumoniae*, sugerindo que a sua incorporação na vacina conjugada poderia aumentar a eficácia da mesma. Também pode ser utilizada combinada com outras proteínas de pneumococos ou como proteína carreadora para conjugação com polissacarídeo capsular de pneumococos.

A PspA é considerada dentre os antígenos proteicos um dos mais protetores em modelos animais, e também é capaz de induzir anticorpos protetores em humanos.

Segundo Csordas e colaboradores (2008), existem vários trabalhos empregando a PspA como proteína carreadora para polissacarídeo de pneumococos. Entretanto estes trabalhos não avaliaram a resposta imune protetora para a proteína. Neste estudo empregando PspA recombinante conjugada ao polissacarídeo de pneumococo 23F, observou-se que a ligação covalente entre as moléculas ocasionou uma modificação na sua estrutura que transformou a proteína em um antígeno mais eficiente, quando comparado a sua forma livre.

Segundo Barocchi e colaboradores (2007), existe um grande interesse na região alfa-hélice da PspA como imunógeno para humanos. Esta região possui características semelhantes às proteínas fibrosas eucarióticas, como a miosina e a tropomiosina. Embora exista um potencial para formação de anticorpos próprios que poderiam se ligar a miosina, não há registro de que pneumococos fosse capaz de provocar qualquer tipo de doença autoimune, mesmo na maioria dos adultos, que possuem níveis elevados de anticorpos para PspA no seu soro por muita vezes. Estudos futuros serão necessários para avaliar a segurança e a possibilidade do uso da PspA como componente de uma vacina.

A imunização de camundongos com PsaA purificada mostrou ser protetora contra desafio com cepas heterólogas. Estudos realizados com os 23 sorotipos de pneumococos presentes na vacina disponível no mercado empregando-se técnicas de imunoblote com anticorpos monoclonais (RUSSEL *et al.*, 1990) e outro empregando técnica de PCR (SAMPSON *et al.*, 1997) demonstraram que a PsaA é comum a todos os 23 sorotipos e que o gene *psaA* é altamente conservado para esses mesmos sorotipos, o que faz deste antígeno um possível candidato vacinal. Seo e colaboradores (2002) mostraram que a vacinação oral com PsaA encapsulada em microesferas de microalginato acarretou em uma significativa proteção contra colonização, pneumonia e septicemia em camundongos. Esta proteína pode ser utilizada combinada com outras proteínas de pneumococos, como a PspA que atuaria na prevenção da colonização e na otite média, ou conjugada com polissacarídeo capsular desta mesma bactéria (OGUNNIYI *et al.*, 2000).

Estas proteínas têm alcançado níveis de proteção estatisticamente significantes em modelo animal contra desafio sistêmico com um ou mais sorotipos de pneumococos. Entretanto, para algumas proteínas os resultados são altamente dependentes da linhagem de camundongo e da cepa utilizada no ensaio desafio. Além disso, os dados disponíveis, para utilização de uma formulação empregando uma única proteína não são comparáveis aos dados de proteção alcançados utilizando a vacina polissacarídica conjugada. Portanto, a combinação de proteínas que participam em diferentes estágios na instauração da doença pneumocócica trata-se de uma abordagem promissora, e já existe uma série de estudos nesta direção. No entanto, deve-se restringir o número de antígenos que devam ser incluídos para não impactar no preço final da vacina (OGUNNIYI *et al.*, 2007). Outra abordagem é a utilização destes antígenos como proteínas carreadoras na conjugação com polissacarídeos capsulares de pneumococos, ou combinadas com os conjugados já existentes e que compõem a vacina comercial visando o aumento da cobertura vacinal.

Uma proposta alternativa para preparo de vacina vem sendo estudada por alguns pesquisadores e trata da utilização da célula inteira não encapsulada, obtida por modificação genética, e morta por etanol. Desta forma, a maioria dos antígenos presentes na superfície da bactéria estaria na sua configuração nativa, sem a presença da cápsula. Este tipo de vacina seria utilizado para administração intranasal juntamente com um adjuvante. Segundo Malley e colaboradores (2001) a produção desta vacina seria tecnologicamente simples e teria um baixo custo. Os resultados obtidos em ensaio desafio intranasal, empregando modelo animal, demonstraram proteção contra colonização nasofaríngea e doença invasiva, para 2 sorotipos não relacionados com o tipo capsular com o qual a vacina foi preparada. Os autores também ressaltam alguns aspectos que devem ser estudados no futuro como, por exemplo, nem todos os antígenos na célula morta podem contribuir para proteção, inclusive alguns deles podem interferir neste processo. Além disso, pode existir dificuldade em se conseguir reproduzir lote a lote os mesmos antígenos na célula morta e também encontrar um adjuvante de mucosa para uso humano ideal para ser testado com esta vacina. Recentemente, Lu e colaboradores (2010)

apresentaram novas propostas para inativação da bactéria, seleção de adjuvantes e rotas de administração da vacina de célula inteira não capsulada.

## 2.5 TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE VACINAS BACTERIANAS

A produção de vacinas bacterianas segue as mesmas etapas de um processo fermentativo comum. Iniciando-se pela seleção do micro-organismo que para as vacinas é baseado em dados epidemiológicos. A escolha do meio de cultura adequado deve levar em conta o custo dos seus constituintes considerando as necessidades nutricionais do micro-organismo a ser utilizado e de preferência não utilizar componentes de origem animal.

A forma de condução do processo fermentativo para produção industrial de vacinas bacterianas geralmente é realizada por processo em batelada, o que não descarta a possibilidade de se estudar outras formas de condução do processo que venham a aumentar a produtividade e, por conseguinte, uma redução no custo do produto. As diversas formas de condução em biorreatores estão descritas mais detalhadamente no item seguinte. A etapa de recuperação do produto (operações de “downstream”), também denominada de processos de purificação engloba as operações unitárias convencionais, centrifugação, filtração tangencial, precipitação, ultrafiltração, extração em sistema de duas fases líquidas, técnicas cromatográficas, liofilização, cristalização.

Os produtores de vacinas contra pneumococos fazem parte das grandes companhias farmacêuticas e seus produtos são resguardados sob patente. Levando-se em consideração este quadro é compreensível a grande dificuldade em se obter informações na literatura sobre o desempenho do micro-organismo, tais como parâmetros cinéticos, fatores de conversão, produtividade e formas de condução de processos em biorreatores em escala de laboratório ou industrial.

### 2.5.1 Modos de operação da bioconversão

De acordo com a literatura clássica de engenharia bioquímica (AIBA *et al.*, 1973; BAILEY e OLLIS, 1986; LIMA *et al.*, 2001) os processos fermentativos podem ser conduzidos de forma descontínua, descontínua alimentada, semicontínua e contínua. A escolha mais adequada depende de vários fatores como, das propriedades cinéticas do micro-organismo, da estabilidade operacional do biocatalisador, da forma do biocatalisador, tipo de biorreator, custos operacionais e necessidade de controle do processo. Podem também ser considerados entre outros, a compatibilidade com processamento de separação e purificação do produto, a escala de produção, tipo de instalações e tipo de produto. No entanto, geralmente, são os fatores econômicos que determinam a decisão por quais fatores a considerar na escolha da forma de condução do processo fermentativo.

A fermentação descontínua simples, ou descontínua convencional, também denominada fermentação por batelada, segue os seguintes passos: adição de meio de cultura estéril ao biorreator; adição do micro-organismo responsável pelo processo biológico (inocular); deixar transcorrer o tempo necessário para que o processo ocorra; retirada do meio fermentado do biorreator e execução das operações unitárias necessárias para recuperação do produto. No decorrer do processo fermentativo nenhum componente é adicionado, exceto oxigênio (na forma de ar) e nitrogênio no caso de processos aeróbicos e anaeróbicos respectivamente, antiespumante, ácido ou base para o controle do pH e não ocorrendo perda de líquido por evaporação o volume permanece constante durante o processo descontínuo de fermentação.

As desvantagens do processo descontínuo estão nos baixos rendimentos e/ou produtividade devido a fatores limitantes. O substrato adicionado de uma só vez pode apresentar efeitos de inibição, repressão ou desvio do metabolismo celular para produtos que não interessam. O produto de interesse ao se acumular no meio pode apresentar efeitos de inibição ou até mesmo ser deletério para as células. Com relação a operação propriamente dita esse tipo de processo apresenta “tempos mortos” (tempo para carga e descarga do biorreator, lavagem e esterilização).

Entretanto, possui menores riscos de contaminação, grande flexibilidade de operação, problemas menores relacionados à estabilidade genética do micro-organismo, possibilidade de visualizar em um mesmo recipiente diferentes condições ambientais as quais o micro-organismo está submetido.

Para contornar os problemas relacionados aos fenômenos inibitórios, que podem ocorrer em um processo por batelada convencional, desenvolveu-se o processo descontínuo alimentado, também conhecido como processo por batelada alimentada ou fermentação descontínua alimentada. A superação de problemas frequentes de estabilidade em processo contínuo, adequação do processo fermentativo a condições operacionais e estudo de cinética de processos fermentativos devem também ser consideradas para esse tipo de processo:

No processo por batelada alimentada, a adição de meio estéril (um ou mais nutrientes) ao biorreator ocorre durante o cultivo e o produto é coletado somente no final da fermentação. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e adição de mosto pode ser contínua ou intermitente, pode ocorrer ou não alteração do volume dependendo da concentração de substrato e da taxa de evaporação do sistema. Uma variação do processo por batelada alimentada é o processo descontínuo alimentado repetitivo também denominado por processo descontínuo alimentado cíclico ou ainda processo por batelada alimentada cíclica. Neste processo uma fração constante do meio fermentado é retirada do biorreator a intervalos de tempo fixos para separação do produto, adicionando-se a seguir, o volume de meio estéril até o seu valor máximo com vazão de alimentação conveniente até o final da fermentação. Quando parte do volume de meio fermentado é retirado ao término da fermentação e adiciona-se o mesmo volume de meio estéril ao biorreator denomina-se processo semicontínuo, pois os fluxos de entrada e saída são intermitentes.

A operação contínua é considerada o modo mais atrativo de operação de um biorreator. Como o próprio nome sugere tanto a alimentação de meio fresco, quanto a retirada do produto (meio fermentado) são realizadas de forma contínua e com uma vazão constante. Para que o sistema atinja a condição de estado estacionário

ou regime permanente (*steady state*) caracterizado pelas variáveis de estado (concentração de células, de substrato limitante e de produto) permaneçam constantes é necessário que o volume de líquido no biorreator também seja inalterado ao longo do tempo de operação do sistema. Um outro item importante a ser considerado para se alcançar o estado estacionário é a homogeneidade do sistema que pode ser obtida pela utilização de biorreator de mistura completa (CSTF: *Continuous Stirred Tank Fermentor*) dotado de chicanas, que, atualmente, são os mais utilizados, ou, ainda, biorreatores de escoamento pneumático ('air-lift'; colunas de bolha; leito fixo e fluidizado).

Nos processos em batelada e batelada alimentada existe uma relação dinâmica da concentração com o tempo, ou seja, as condições fisiológicas do biocatalisador não são constantes durante todo o curso da fermentação, diferentemente do que acontece no processo contínuo onde o biocatalisador se encontra em condições ótimas e constantes no decorrer do processo.

Os processos contínuos oferecem uma série de vantagens em relação aos processos em batelada, dentre os quais podemos citar:

- Inexistência de tempos improdutivos, levando o equipamento a permanecer muito mais tempo em operação;
- As operações que antecedem, como por exemplo, esterilização e preparo de meio, e sucedem o processo, como a purificação, podem ser realizadas continuamente;
- Maior uniformidade do produto, o que facilita o projeto das operações de recuperação do produto de interesse (*downstream*);
- Permite uma maior automação do processo e dos controles, o que se reflete em redução de mão-de-obra;
- O estado permanente permite que o micro-organismo trabalhe em elevadas taxas de atividade metabólica, o que possibilita o estudo dos vários parâmetros cinéticos, nutricionais e ambientais, sobre o agente de fermentação.

No entanto, também existem algumas desvantagens ao se conduzir fermentação contínua, conforme as descritas abaixo:

- Riscos de contaminação, devido à dificuldade de manutenção da esterilidade por longos períodos de tempo.
- Problemas de degenerescência do agente, ou seja, possibilidade de mutação ou variação das características fisiológicas do biocatalisador.
- Dificuldades de operação em estado estacionário em determinadas situações (formação de espuma, crescimento do micro-organismo nas paredes do biorreator, ou ainda, nos sistemas de entrada e saída de líquido).

O processo contínuo tem início com uma batelada simples e após um determinado período, geralmente na fase exponencial de crescimento (maior concentração de células viáveis), inicia-se a alimentação de meio de cultura e retirada de meio fermentado, instante em que efetivamente, começa o processo contínuo. É importante ressaltar que a rapidez com que o sistema converge para o estado estacionário depende do instante em que se inicia o processo contínuo propriamente dito e da vazão de alimentação empregada.

## 2.6 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DA CÁPSULA POLISSACARÍDICA

### 2.6.1 Influência do pH

Segundo Bergey (1994), o valor de pH para crescimento de *S. pneumoniae* situa-se na faixa de 6,5 a 8,3 e poucos trabalhos estudam o efeito desta variável na produção da cápsula. Jin e colaboradores (2009) e Macha e colaboradores (2010) trabalhando com a mesma linhagem de pneumococos sorotipo 3, porém com meios de composição diferentes, encontraram os valores de pH ótimo para produção da cápsula como sendo 8,0 e 7,0 respectivamente. Outros trabalhos como os desenvolvidos por Gogola (2011), Carmo (2010) e Gonçalves e colaboradores (2002), cultivando *S. pneumoniae* sorotipo 14, 6B e 23 F, respectivamente, realizaram o controle de pH em um valor igual a 7,0. Cruz-Leal e colaboradores (2006), trabalhando com pneumococos sorotipo 23F, mantiveram o controle de pH

em 7,6. Nos experimentos realizados por Macha e colaboradores (2010) com pneumococos sorotipo 6B o pH foi ajustado para 7,2 empregando uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . No processo industrial de produção de polissacarídeo capsular de pneumococos pela empresa Sanofi-Pasteur o pH é mantido constante em 7,2 para a maioria dos sorotipos com exceção dos sorotipos 1 e 5, para os quais o pH é controlado em 6,8 e 6,2, respectivamente (STORAÏ, 2008).

Cabe ressaltar, no entanto, que a maioria das publicações não relatam resultados de experimentos sem controle de pH para confirmar a importância desta variável. Massaldi e colaboradores (2010), com o objetivo de avaliar as características do crescimento bacteriano e a produção da cápsula polissacarídica de *S. pneumoniae* sorotipo 14, realizaram experimentos, conduzidos em frascos agitados, sem controle de pH e com pH controlado na faixa entre 6 e 6,5, a partir da segunda hora de cultivo. Estes autores verificaram um grande efeito positivo tanto no crescimento quanto na produção do polissacarídeo reforçando a relevância do controle desta variável durante o bioprocessamento.

Conforme descrito no item 2.2 o principal produto do metabolismo de *S. pneumoniae* sob condições anaeróbicas é o lactato. No entanto, este metabólito provoca inibição da via glicolítica por retro-alimentação e como consequência inibição do crescimento (GONÇALVES *et al.*, 2003). Gonçalves e colaboradores (2002), empregando meio semi-sintético para cultivar pneumococos sorotipo 23F, observaram que uma concentração de ácido láctico menor que 10 g/L foi suficiente para inibir o crescimento bacteriano. Nesse trabalho os pesquisadores utilizaram três modelos cinéticos de inibição, baseados na equação de Monod, para avaliar a inibição do lactato no cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F em anaerobiose. Os melhores resultados foram obtidos com os modelos de inibição mista e por saturação. Os autores ressaltaram ainda que o monitoramento da formação de lactato e que estimativas adequadas da concentração crítica de lactato acima da qual o crescimento não ocorre mais, são fundamentais para o controle do processo.

### 2.6.2 Influência da composição do meio de cultivo

A composição dos meios de cultivo para utilização em escala industrial sempre foi objeto de estudo, quer seja visando uma maior produtividade com menor custo, maior facilidade na etapa de purificação ou a substituição de componentes de origem animal para atender os *guidelines* das autoridades regulatórias, respeitando as exigências nutricionais do micro-organismo. Os meios clássicos para cultivo de pneumococos contêm componentes de origem animal como é o caso do BHI utilizado por Jung e colaboradores (2011) e Jin e colaboradores (2009) na produção de polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 19A e 3 respectivamente, e do THB para cultivar pneumococos sorotipo 14 (MASSALDI *et al.*, 2010).

O meio clássico de Hoeprich descrito em 1955 para cultivo de pneumococos é utilizado pelo Instituto Merieux (INSTITUT MÉRIEUX, 1980) para a produção de vacina polissacarídica. Esse meio contém, além de hidrolisado de caseína, glicose e uma gama de vitaminas, aminoácidos e fatores de crescimento. De acordo com trabalhos reportados na literatura existem trabalhos recentes que ainda utilizam o meio de Hoeprich (CRUZ-LEAL *et al.*, 2006; MASSALDI, 2010) e há outros que empregaram modificações na composição original desse meio (GONÇALVES *et al.*, 2002; STORAÏ, 2008; CARMO, 2010; GOGOLA, 2011).

Gonçalves e colaboradores (2002) substituíram a solução de vitaminas por extrato de levedura dialisado e obtiveram um aumento de duas vezes na produção de polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F em relação ao meio original de Hoeprich. Neste mesmo trabalho, com ensaios conduzidos em biorreator, os autores, empregando o meio de Hoeprich modificado, estudaram a influência da concentração inicial de glicose (25 e 30 g/L) na formação da cápsula polissacarídica. Verificaram que 30 g/L de glicose inicial levou a um consumo lento desta fonte de carbono e a uma menor formação de biomassa, que foi atribuído a um provável efeito inibitório pelo substrato.

Carmo (2010) acrescentou mais aminoácidos e vitaminas ao meio de Hoeprich modificado por Gonçalves e colaboradores (2002) e observou um aumento de 22,0% (ácido pantotênico), 18% (biotina), 9,0% (ácido nicotínico) e 9,0% (tirosina)

na concentração de polissacarídeo livre no sobrenadante do cultivo de pneumococo sorotipo 6B cultivado em frasco agitado.

Macha e colaboradores (2010) utilizaram na otimização da produção do polissacarídeo capsular sorotipo 3 o meio de Holts contendo peptona de soja (Hisoya) ao invés de Bacto peptona, empregando três diferentes concentrações iniciais de glicose (10, 20 e 30 g/L). O melhor resultado encontrado foi uma concentração de polissacarídeo de 520 mg/L para 20 g/L de glicose inicial. O meio de Holts modificado e glicose inicial de 10 g/L e 30 g/L de Hysoya foi utilizado por Macha e colaboradores (2011), sendo obtidos 550 mg/L de polissacarídeo pneumocócico 6B.

Gogola (2011) empregou o meio quimicamente definido (CDM) completo descrito por van de Rijn e Kessler (1980) suplementado com colina, um importante fator de crescimento para pneumococos, na produção de polissacarídeo de *S. pneumoniae* 14 em comparação com um meio complexo, sendo observado que o meio complexo apresentou uma maior produtividade em polissacarídeo 14. Apesar do meio complexo ser mais barato, deve-se levar em consideração a menor variabilidade entre lotes dos reagentes para preparo do CDM em relação ao meio complexo e que pode afetar a produtividade.

### **2.6.3 Influência da tensão de oxigênio**

Dentre as condições ambientais mais importantes para o cultivo de pneumococos, pode-se destacar a concentração de oxigênio. Por se tratar de uma bactéria aerotolerante, como já mencionado no item 2.2, possui a capacidade de regular a expressão de estruturas na sua superfície, inclusive a cápsula polissacarídica, de acordo com o estágio de instalação da doença pneumocócica, colonização ou infecção. Vários autores fazem referência ao uso de injeção de CO<sub>2</sub> durante o cultivo e outros recomendam o uso de pequenas tensões de oxigênio.

O Instituto Merieux, desde a década de 80, produz vacina polissacarídica pneumocócica utilizando CO<sub>2</sub> durante o processo de cultivo (INSTITUT MÉRIEUX, 1980). Austrian e Collins (1996) destacam a importância do CO<sub>2</sub> no isolamento de pneumococo. Gonçalves e colaboradores (2002) compararam a produção de polissacarídeo pneumocócico 23F, em biorreator, na presença de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>. Observaram que quando empregaram N<sub>2</sub> obtiveram uma maior concentração de polissacarídeo e que o CO<sub>2</sub> aumentou a formação de espuma durante o processo de cultivo além de aumentar também o consumo de NaOH para o controle do pH. Carmo (2006) e Gogola (2011) cultivaram *S. pneumoniae* sorotipos 6B e 14 respectivamente, em anaerobiose utilizando N<sub>2</sub>.

A empresa Sanofi-Pasteur no processo industrial realiza degaseificação do meio com CO<sub>2</sub> (STORAÏ, 2011). Jun e colaboradores (2011) não fizeram menção as condições ambientais relativas a presença ou ausência de oxigênio durante o cultivo de pneumococos sorotipo 19A. Cruz-Leal e colaboradores (2006) também não fazem referência se trabalham em anaerobiose, somente citam que utilizam uma velocidade de agitação de 100 rpm em um biorreator de 6L contendo 3,5 L de meio para cultivar *S. pneumoniae* sorotipo 23F. No trabalho de otimização da produção de polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 3 foi possível observar que no cultivo estático ocorre uma produção de polissacarídeo cerca de 2,6 vezes menor do que em cultivos agitados (180 rpm) (JIN *et al.*, 2009). Entretanto, para valores de agitação acima de 180 rpm ocorre um decréscimo na concentração de polissacarídeo, provavelmente por conta de uma maior incorporação de oxigênio no meio e a maior força de cisalhamento.

Macha e colaboradores (2010) empregando *S. pneumoniae* sorotipo 3 realizaram experimentos com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido no cultivo: 0, 5 e 20%. Verificaram que a maior concentração de polissacarídeo foi alcançada para uma concentração de oxigênio dissolvido de 7,6%. Em outro trabalho de Macha e colaboradores (2011) foi empregada vazão específica de ar entre 0,1 e 0,2 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) para a produção de *S. pneumoniae* sorotipo 6B, obtendo elevadas concentrações de polissacarídeo

De acordo com os resultados encontrados por Massaldi e colaboradores (2010), a presença de uma atmosfera de CO<sub>2</sub> no *headspace* dos frascos contendo meio de Hoeprich não induziu diferenças apreciáveis no desempenho do cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 14.

Weiser (2003) verificou que a produção de polissacarídeo capsular de pneumococos aumenta com a diminuição da concentração de oxigênio e aumento da concentração de CO<sub>2</sub> no meio. O conteúdo de oxigênio presente no gás deve ser menor que 16% (preferencialmente menor que 0,1%) e de CO<sub>2</sub> em torno de 10%. Uma maneira de reduzir a concentração de oxigênio durante o cultivo seria insuflar uma mistura de gases contendo 71% N<sub>2</sub>, 19% O<sub>2</sub> e 10% CO<sub>2</sub> ou 95% de ar e 5% CO<sub>2</sub>. Weiser (2003) sugere que o CO<sub>2</sub> pode ser fornecido também pela adição de bicarbonato ou carbonato de sódio ao meio. Na composição do meio utilizado por Bahler e colaboradores (2010) para cultivar *S. pneumoniae* sorotipos 1, 6A e 7F empregou-se L-cisteína e bicarbonato de sódio para se diminuir a tensão de oxigênio no meio.

De acordo com o exposto as condições ambientais são fatores de extrema importância no cultivo de pneumococos, mas não necessariamente é preciso se trabalhar em anaerobiose estrita para se produzir polissacarídeo capsular de pneumococos. Deve-se também levar em consideração a composição do meio contendo substâncias que diminuem a concentração de oxigênio e aumentam a de CO<sub>2</sub> no meio como a L-cisteína, ácido tioglicólico e bicarbonato de sódio.

#### **2.6.4 Influência do modo operacional do biorreator**

De um modo geral os processos fermentativos para produção de vacinas são realizados por batelada convencional. A produção de polissacarídeo capsular de pneumococos sorotipo 3 (MACHA *et al.*, 2010; JIN *et al.*, 2009), sorotipo 6B (CARMO, 2010; MACHA *et al.*, 2011), sorotipo 19A (JUNG *et al.*, 2011) e sorotipo 23F (CRUZ-LEAL *et al.*, 2006) empregando biorreatores de volumes variados foram conduzidos em batelada. Outros autores também empregaram esta mesma forma de

condução de processo para cultivarem *S. pneumoniae* sorotipos 1, 5, 6A e 7F (BAHLER, *et al.*, 2010) e os sorotipos 8 e 33F (STORAÏ, 2008) em biorreator de 2000L.

O Instituto Merieux (INSTITUT MÉRIEUX, 1980) empregou batelada com pulso de glicose e acetato de amônio para cultivar 23 diferentes sorotipos de pneumococos. Esta mesma abordagem foi utilizada por Gonçalves e colaboradores (2002) para cultivar *S. pneumoniae* sorotipo 23F e Carmo (2010) para cultivar o sorotipo 6B. O trabalho de Carmo (2010) contemplou também o cultivo em batelada alimentada com vazão de alimentação (F) constante igual a 0,14 L/h e vazão de alimentação exponencial ( $F = 0,48e^{0,08t}$  L/h) de meio concentrado, e verificou que a alimentação não trouxe ganhos para a produção do polissacarídeo. Carmo (2010), objetivando manter a concentração de células viáveis, aumentar a concentração celular e a produção de polissacarídeo 6B sem acumular metabólito tóxico (ácido láctico), empregou o cultivo contínuo com reciclo de células (microfiltração/perfusão). O autor relata que, ao comparar os resultados dos experimentos descontínuos sem pulso, o cultivo em perfusão não apresentou vantagens com relação à produção do polissacarídeo, além da dificuldade de operação do sistema.

Gogola (2011) estudou o cultivo contínuo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 em meio complexo e testou três vazões específicas (taxas de diluição) de alimentação: 0,4, 0,8 e 0,9 h<sup>-1</sup>. A maior concentração de polissacarídeo no sobrenadante de cultivo foi 105,82 mg/L. O autor também estudou o efeito da concentração de glicose, colina e glutamina em cultivo contínuo, com uma vazão específica de alimentação de 0,5 h<sup>-1</sup> empregando meio quimicamente definido. Verificou que, mesmo com as modificações no meio quimicamente definido, a concentração de polissacarídeo livre foi duas vezes menor quando comparado com o meio complexo.

Com base nesses trabalhos reportados, no presente estudo foram investigadas as principais variáveis que afetam o processo.

## Capítulo 3

# OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Objetivo deste projeto foi estudar o desenvolvimento de um processo de cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 empregando-se cepas isoladas no Brasil para obtenção de polissacarídeo capsular. A escolha do sorotipo 14 deve-se ao fato de ser um dos sorotipos mais prevalentes em todo o mundo, com incidência elevada em crianças com idade inferior a cinco anos, além de estar frequentemente associado à resistência antimicrobiana.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo geral foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Seleção do meio de cultivo de *S. pneumoniae* para uma maior produção de cápsula
- ✓ Determinar o tempo ideal de coleta das células dos pré-cultivos no meio previamente selecionado para garantir que as mesmas estejam em plena

atividade de crescimento e totalmente adaptadas, dessa forma minimizando a fase lag do cultivo final.

- ✓ Seleção da cepa melhor produtora de polissacarídeo capsular em frasco agitado utilizando o meio previamente selecionado.
- ✓ Avaliação da influência de algumas variáveis de processo para obtenção do maior rendimento em polissacarídeo.
- ✓ Avaliação da forma de condução do processo, batelada simples e batelada alimentada, visando uma maior produtividade de cápsula polissacarídica de pneumococos em biorreator de 2,5L.

## Capítulo 4

# MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MICRO-ORGANISMOS

As linhagens de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14 St 168/94, St 113/95 e St 172/97 foram isoladas de materiais clínicos e depositadas no Instituto Adolfo Lutz, Seção de Bacteriologia, SP, Brasil. No quadro 4.1 estão apresentados os materiais clínicos de isolamento das linhagens brasileiras.

Quadro 4.1 Fontes de isolamento e susceptibilidade à penicilina das linhagens de *S. pneumoniae* utilizadas para produção de polissacarídeo

<b>Linhagem</b>	<b>Material clínico</b>	<b>R ou S à penicilina</b>
St 168/94	Liquor cefaloraquidiano	R: intermediária
St 113/95	Sangue	S
St 172/97	Liquor cefaloraquidiano	R: plena

R: resistência e S: sensibilidade

## 4.2 PREPARO DAS CULTURAS ESTOQUE

### 4.2.1 Lote semente-mãe

As ampolas liofilizadas foram hidratadas com 1 mL de caldo triptona de soja e incubadas em estufa bacteriológica por 4h a 37°C. A suspensão hidratada foi semeada, com auxílio de alça de Drigalski, em meio sólido TSA (agar triptona de soja) com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas semeadas foram incubadas a  $(36 \pm 1)$  °C por 16-18 horas em atmosfera úmida e enriquecida com CO<sub>2</sub> (5%), em estufa Revco, ELLITE II (EUA).

Decorrido o tempo de cultivo, realizou-se um repique no mesmo meio e nas condições utilizadas anteriormente. Após o tempo de incubação, as células foram suspensas em caldo triptona de soja com 20% (v/v) de glicerol. A seguir, a suspensão celular foi distribuída, em alíquotas de 1mL em criotubos, congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer Revco, ULT 1386-3-D41 (EUA) a -70°C.

O lote congelado foi controlado quanto à pureza por meio de coloração de Gram e semeadura por esgotamento em meio apropriado e a sua viabilidade determinada por contagem de células viáveis.

### 4.2.2 Lote semente de trabalho

Dois criotubos (lote mãe) armazenados em freezer Revco ULT 1386-3-D41 (EUA) -70°C foram descongelados e semeados em duas garrafas de Roux contendo 200 mL de meio TSA (agar triptona de soja) com 5% de sangue desfibrinado de carneiro empregando pérolas de vidro para espalhar as células sobre a superfície do meio.

As garrafas de Roux semeadas foram incubadas a  $(36 \pm 1)$ °C durante 16-18 horas em atmosfera úmida e enriquecida com CO<sub>2</sub> (5%). Após o tempo de cultivo, as células provenientes de 02 garrafas de Roux foram ressuspensas com 20 mL de meio TSB (caldo triptona de soja) suplementado modificado. A seguir inoculou-se 6 mL de suspensão de células em cada frasco Erlenmeyer de 1000 mL contendo 500 mL do mesmo meio (total de três frascos), o que corresponde a uma concentração

inicial de 43 mg células/L. Os frascos foram incubados em agitador rotatório Inova, modelo ISF – 4V (Alemanha) a  $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$  com velocidade de agitação de 100 rpm por 5 horas.

Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se ao preparo do lote semente de trabalho. A pureza do lote foi avaliada por meio de técnica de coloração de Gram.

O cultivo obtido nos frascos de Erlenmeyer foi transferido para garrafas de centrífuga de 500 mL e procedeu-se à centrifugação em centrífuga Beckman, J2-HS (EUA) nas seguintes condições: 10 000 rpm  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o sedimentado ressuspenso com uma mistura de caldo triptona de soja com 20% (v/v) glicerol. Da mesma forma que o lote mãe, a suspensão obtida foi distribuída em alíquotas de 1 mL em criotubos e congelada com nitrogênio líquido e estocada em freezer Revco, ULT 1386-3-D41 (EUA)  $-70^{\circ}\text{C}$ . O lote obtido foi controlado quanto à pureza por meio de coloração de Gram e semeadura por esgotamento em meio apropriado. A viabilidade foi determinada empregando diluições seriadas do lote trabalho em TSB, posteriormente estas suspensões foram semeadas em TSA com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubadas a  $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$  por 16-18 horas em atmosfera úmida enriquecida com  $\text{CO}_2$  (5%), em estufa Revco, ELLITE II (EUA). Após o tempo de incubação foi realizada a contagem das células viáveis (unidades formadoras de colônias/mL) (TORTORA *et al.*, 2003).

## 4.3 MEIOS DE CULTIVO

## 4.3.1 Meios

Nas tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 estão apresentadas as composições dos meios de cultura empregados nos cultivos de *S. pneumoniae*.

Tabela 4.1 Meio Hoeprich

Componente	Concentração	Solução
Hidrolisado ácido de caseína (HAC)	20 g/L	Base
Glicose	12,5 g/L	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g/L	
L-cistina	150 mg/L	
L-triptofano	20 mg/L	
L-tirosina	200 mg/L	
L-glutamina	625 mg/L	Fatores de crescimento
Asparagina	100 mg/L	
Cloridrato de colina	10 mg/L	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	500 mg/L	Sais
FeSO <sub>4</sub>	5 mg/L	
ZnSO <sub>4</sub>	0,8 mg/L	
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,36 mg/L	
HCl	0,02 mL/L	
Biotina	0,0015 mg/L	Vitaminas
Ácido nicotínico	1 mg/L	
Piridoxal	1 mg/L	
Pantotenato de cálcio	5 mg/L	
Tiamina	1 mg/L	
Riboflavina	1 mg/L	
Adenina	10 mg/L	
Uracil	10 mg/L	
Ácido tioglicólico (10% v/v)	1 mL/L	Redução de O <sub>2</sub>
NaHCO <sub>3</sub>	1 g/L	

Tabela 4.2 Meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) modificado

Componente	Concentração	Referência
TSB	30 g/L	Paton <i>et al.</i> , 1983
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 g/L	
Hidrocloridrato de cisteína	0,15 g/L	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,013 g/L	
Cloridrato de colina	10 mg/L	} Solução especial Hoeprich, 1955
Glutamina	625 mg/L	
Asparagina	100 mg/L	
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,36 mg/L	
Bicarbonato de sódio	1,0 g/L	
Ácido tioglicólico 10% v/v	1 mL/L	
Glicose	12,5 g/L	
Extrato de levedura dialisado	90 g/L*	Adaptado Gonçalves <i>et al.</i> , 2002

Fração obtida após diálise contendo compostos de baixo peso molecular

Tabela 4.3 Meio Catlin modificado

Componente	Concentração	Referência
Glicose	10 g/L	Catlin MC6 Fu <i>et al.</i> , 1995
NaCl	5,8 g/L	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0 g/L	
Ácido glutâmico	3,9 g/L	
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g/L	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 g/L	
L-serina	0,5 g/L	
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,4 g/L	
L-glicina	0,25 g/L	
L-arginina	0,15 g/L	
L-cisteína.HCl	0,1 g/L	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,028 g/L	
Ácido cítrico	0,0312 g/L	
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2,31 mg/L	
Cloridrato de colina	10 mg/L	
Glutamina	625 mg/L	
Asparagina	100 mg/L	
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,36 mg/L	
Bicarbonato de sódio	1,0 g/L	
Ácido tioglicólico 10% v/v	1 mL/L	Adaptado Gonçalves <i>et al.</i> , 2002
Extrato de levedura dialisado	90 g/L*	

\* Fração obtida após diálise contendo compostos de baixo peso molecular

### 4.3.2 Extrato de levedura dialisado

O extrato de levedura dialisado foi preparado de acordo com o procedimento descrito na patente do Instituto Merieux (AYMÉ, *et al.*, 1973) para o cultivo de *Neisseria meningitidis* empregando o meio de Frantz (1942). Dissolveu-se 90g de extrato de levedura no volume de água destilada correspondente a 1/5 do volume final da solução. A solução de extrato de levedura então foi dialisada contra água destilada por 48h a 4°C, empregando-se uma membrana com corte molecular de 12-14kDa. A fração contendo compostos de baixa massa molecular foi utilizada no preparo dos meios TSB suplementado e Catlin modificado.

### 4.3.3 Esterilização de equipamentos, meios, soluções e controle de esterilidade

Por se tratar de produtos para uso vacinal, não só a esterilização, mas também o controle da esterilidade dos meios e soluções são procedimentos imprescindíveis. Para tal, foi estabelecido o seguinte protocolo.

#### 4.3.3.1 Esterilização de vidrarias e biorreator

Todas as vidrarias foram esterilizadas vazias por autoclavação a 121°C por 1 hora.

O vaso reacional, após a calibração dos eletrodos, era preenchido com água destilada, de acordo com a descrição do manual do fabricante. Procedia-se, então, à autoclavação a 121°C por 1 hora. Antes do uso no bioprocessamento, a água era drenada para o enchimento com o meio de cultivo em estudo.

#### 4.3.3.2 Esterilização de meios e soluções

Todos os meios e soluções foram esterilizados por filtração em membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,22 µm. Os meios eram estocados em vidraria estéril, conforme descrito no item anterior.

#### 4.3.3.3 Controle de esterilidade dos meios e soluções

Após o procedimento de enchimento do vaso reacional, conforme descrito em 4.3.3.1, o mesmo era conectado ao console, a temperatura era estabilizada em 37°C, em agitação de 100 rpm, por 24 horas. Neste intervalo era feita a inspeção visual e o pH era monitorado. Turbidez e alterações de pH eram indicativas de contaminação.

As soluções, de uma forma geral, foram semeadas em agar-sangue e incubadas em estufa bacteriológica, a 37°C, por 24 horas, para verificar se ocorria o crescimento de algum contaminante.

Conforme já descrito, empregou-se a técnica de Gram para a avaliação da pureza em todas as etapas dos bioprocessos.

#### 4.4 AMOSTRAGEM

As amostragens foram realizadas em intervalos de tempos regulares, dependendo do tempo de duração para cada experimento. O volume das alíquotas a ser retirado foi determinado em função do volume de meio empregado no cultivo, de forma a não ultrapassar 10% do volume final.

Do meio reacional eram coletadas duas amostras, a primeira após inativação com formol era destinada a quantificação celular, mediante leitura da absorvância a 550 nm em espectrofotômetro Beckman, modelo DU 730 (EUA). A segunda era coletada, após inativação empregando temperatura de 60°C por 30 minutos, seguida de centrifugação em centrífuga Beckman J2-HS (EUA), a 10 000 rpm por 30 min a 4°C, para remoção das células e filtração em membrana de acetato de celulose, com tamanho de poro de 0,22 µm.

O sobrenadante proveniente desta amostra foi dividido em duas alíquotas: uma destinada à quantificação de glicose e de lactato e a outra para a quantificação do polissacarídeo. No caso do polissacarídeo, a amostra era submetida a uma etapa de diálise (membrana com tamanho do poro de 12-14 kDa) contra 200 volumes de água à temperatura de 4°C por 48 h, com uma troca do volume de água em 24

horas. Este procedimento foi realizado para retirar a interferência relativa à glicose residual presente nas amostras de cultivo.

#### 4.5 EXPERIMENTOS CONDUZIDOS EM FRASCOS CÔNICOS

Realizou-se uma série de experimentos em frascos cônicos de 500mL contendo 250 mL de meio, submetidos a agitação em agitador rotatório Inova, modelo ISF-4V, a 100 rpm e temperatura controlada a 37°C. A seqüência de produção está apresentada na figura 4.1. Para o experimento de seleção do meio mais adequado para produção de polissacarídeo utilizou-se a linhagem 172/97. Nos experimentos para determinar o tempo ideal de coleta dos pré-cultivos e a avaliação da melhor cepa produtora de polissacarídeo empregou-se o meio previamente selecionado e as linhagens 172/97, 168/94 e 113/95. O tempo de transferência do inóculo (1º e 2º pré-cultivos) variou de acordo com a cepa. O volume de inóculo utilizado foi de 10%v/v.

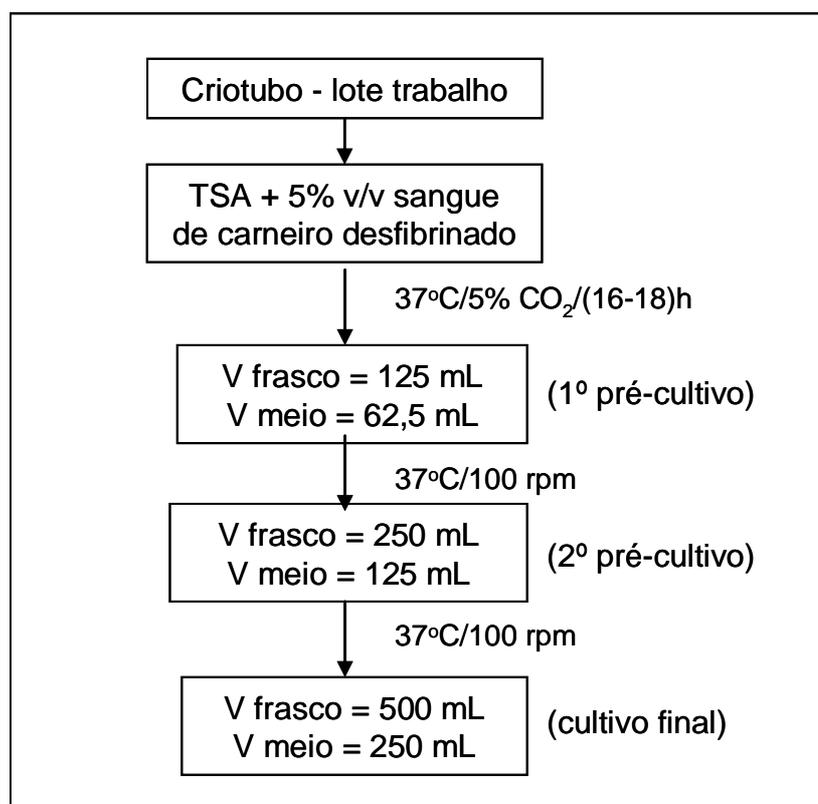


Figura 4.1 Diagrama de blocos para os experimentos em frascos cônicos

## 4.6 EXPERIMENTOS EM BIORREATOR

### 4.6.1 Batelada simples

Nos cultivos em batelada simples foi utilizado o biorreator modelo Bioflo 110 (New Brunswick, USA) com agitação mecânica e dispositivos de controle de pH e de temperatura, com capacidade de 2,5 L, contendo 1,5 L de meio de cultivo (figura 4.2). As etapas de obtenção do inóculo para o biorreator, 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> pré-cultivos foram realizadas conforme apresentado na figura 4.1. Em todos os experimentos foi utilizado um inóculo de 10% v/v que corresponde a uma concentração inicial de células de 0,1 g/L, temperatura de 37°C e agitação de 100 rpm. Empregou-se NaOH 5M nos ensaios em que o pH foi mantido constante em 7,2. Nos experimentos para avaliação da necessidade de atmosfera de nitrogênio, utilizou-se uma vazão de nitrogênio de 0,5 L/min.



Figura 4.2 Biorreator modelo Bioflo 110 capacidade 2,5L- New Brunswick, USA.

Nos experimentos em que se avaliou a concentração inibitória de lactato no crescimento e produção de polissacarídeo foi adicionado ao meio de cultivo, lactato de sódio 50% de forma a se obter uma concentração inicial de 5 g/L, 10 g/L e 20g/L.

Nos ensaios para avaliar a influência da concentração de colina inicial (5g/L e 20 g/L) no crescimento de pneumococos foi utilizada uma solução de colina 37,5%p/v.

Para avaliar a concentração de glicose e nitrogênio total, este proveniente do extrato de levedura dialisado, no processo de produção de cápsula polissacarídica empregou-se a ferramenta de planejamento experimental através do delineamento composto central rotacional (DCCR) com  $2^2$  pontos fatoriais mais 2x2 pontos axiais mais 4 pontos centrais (totalizando 12 experimentos). O emprego de DCCR, com a avaliação de cinco níveis de cada uma das variáveis (nitrogênio total e glicose) permite avaliar as respostas a partir de modelos polinomiais de segunda ordem, incluindo todos os parâmetros lineares e quadráticos, assim como as interações lineares entre nitrogênio total e glicose, como indicado na equação (em termos das variáveis codificadas):  $Y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2$ . Na tabela 4.4 são mostrados os níveis reais e codificados das variáveis estudadas.

Tabela 4.4 Variáveis analisadas no DCCR e seus respectivos níveis codificados

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Nitrogênio total (mg/mL)	0,11	0,25	0,6	0,95	1,09
Glicose (g/L)	6,0	10	20	30	34

A análise estatística foi feita no programa STATISTICA 9.1. Os efeitos de cada uma das variáveis foram estimados com 90% de confiança, avaliados pelo teste  $t$  e considerados estatisticamente significativos aqueles com  $p < 0,1$  (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

### 4.6.2 Batelada alimentada

Para os ensaios conduzidos em batelada alimentada foi utilizado o mesmo biorreator e as mesmas condições de cultivo descritas para a batelada simples com controle de pH sem adição de nitrogênio. Nos cultivos com pulso de glicose (tempo de cultivo de 5,5 horas) empregou-se uma solução de glicose 50% p/v. No experimento com pulso de glicose (solução 50 % p/v) e acetato de amônio (solução 46,2% p/v) a adição foi realizada no tempo de 4 horas de cultivo.

O experimento com alimentação contínua foi realizado com um volume inicial de meio igual a 1L contendo 20 g/L de colina. A composição do meio de alimentação era a mesma da batelada inicial só que duas vezes concentrado contendo 40g/L de glicose. Ao fim do processo, o volume de meio fermentado no vaso reacional era de 1,5 L. A estratégia seria de alimentar com a mesma taxa de consumo de glicose na etapa da batelada inicial, entretanto, isto não foi possível por conta da bomba (Masterflex L/S EASY-LOAD) disponível para efetuar o trabalho. A alimentação teve início em 5 horas de cultivo com uma vazão de meio empregada de 142,8 mL/h cerca de 3,5 vezes maior do que a desejada.

## 4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.7.1 Determinação da concentração de células

A quantificação celular foi monitorada pela medida da absorvância a 550 nm. Previamente construiu-se uma curva padrão relacionando o peso de matéria seca com a absorvância. As células (linhagem St 172/97) utilizadas na construção da curva padrão foram cultivadas em frascos cônicos de 1L contendo 500mL de meio TSB suplementado, a 37°C em agitador rotatório a 100 rpm. Após 5 horas de incubação, as células foram colhidas por centrifugação, lavadas e resuspensas em água destilada, de modo a obter-se uma suspensão concentrada. A determinação da concentração de células foi realizada transferindo-se 15 mL de suspensão para cadinhos de alumínio no total de 6 cadinhos previamente tarados. A pesagem dos

cadinhos foi realizada até obtenção de peso constante em estufa a 80°C, em balança analítica. No restante da suspensão celular foram realizadas várias diluições e suas respectivas medidas da absorvância.

A equação 4.1 descreve a correlação entre a absorvância a 550nm e a concentração celular.

$$X = \left( \frac{Abs * fdil - 0,0219}{1,9331} \right) \quad \text{Equação 4.1}$$

Onde:

X = concentração celular em peso seco (g/L) a 550nm;

Abs = absorvância em 550 nm;

fd = fator de diluição.

#### 4.7.2 Determinações de glicose e lactato

A concentração de glicose residual e lactato formado foram medidas no sobrenadante livre de células utilizando kits enzimáticos (glicose – kit Laborlab, Brasil e lactato – kit Katal, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

#### 4.7.3 Determinação da concentração de polissacarídeo

A estrutura do polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 14 foi descrita por Lindeberg e colaboradores (1977). Este polissacarídeo é composto de unidades repetitivas de um tetrassacarídeo contendo D-glicose (1 parte), D-galactose (2 partes) e N-acetil-D-glicosamina (1 parte). Uma mistura modelo destas hexoses na mesma razão molar como na estrutura do polissacarídeo foi utilizada como padrão para construção de uma curva de calibração e a concentração de polissacarídeo foi medida pelo método de Dubois e colaboradores (1956).

#### 4.7.4 Determinação da concentração do nitrogênio total

O nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl descrito na Farmacopéia Brasileira (2010).

### 4.8 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DO PROCESSO

#### 4.8.1 Processo com volume constante

##### Taxa específica de crescimento microbiano

$$\ln X = \mu_x \cdot (t - t_i) - \ln X_i \quad \text{Equação 4.2}$$

Onde:

$\mu_x$ : velocidade específica de crescimento máxima ( $\text{h}^{-1}$ )

X: concentração de células no instante t (g/L)

$X_i$ : concentração de células no instante  $t_i$  (g/L)

t: instante arbitrário t (h)

$t_i$ : instante arbitrário  $t_i$  (h)

##### Fator de rendimento de produção de polissacarídeo (g/g)

$$Y_{P/S} = -\left(\frac{\Delta P}{\Delta S}\right) = \left(\frac{P - P_0}{S_0 - S}\right) \quad \text{Equação 4.3}$$

Onde:

P: concentração de polissacarídeo (g/L)

$P_0$ : concentração inicial de polissacarídeo (g/L)

S: concentração de substrato (g/L)

$S_0$ : concentração inicial de substrato (g/L)

**Fator de rendimento para crescimento celular (g/g)**

$$Y_{X/S} = -\left(\frac{\Delta X}{\Delta S}\right) = \left(\frac{X - X_0}{S_0 - S}\right) \quad \text{Equação 4.4}$$

Onde:

X: concentração de célula (g/L)  
 X<sub>0</sub>: concentração inicial de célula (g/L)  
 S: concentração de substrato (g/L)  
 S<sub>0</sub>: concentração inicial de substrato (g/L)

**Fator de rendimento para produção de polissacarídeo e crescimento celular (g/g)**

$$Y_{P/X} = \left(\frac{\Delta P}{\Delta X}\right) = \left(\frac{P - P_0}{X - X_0}\right) \quad \text{Equação 4.5}$$

Onde:

P: concentração de polissacarídeo (g/L)  
 P<sub>0</sub>: concentração inicial de polissacarídeo (g/L)  
 X: concentração de célula (g/L)  
 X<sub>0</sub>: concentração inicial de célula (g/L)

**Fator de rendimento para formação de lactato (g/g)**

$$Y_{L/S} = -\left(\frac{\Delta L}{\Delta S}\right) = \left(\frac{L - L_0}{S_0 - S}\right) \quad \text{Equação 4.6}$$

Onde:

L: concentração de lactato (g/L)  
 L<sub>0</sub>: concentração inicial de lactato (g/L)  
 S: concentração de substrato (g/L)  
 S<sub>0</sub>: concentração inicial de substrato (g/L)

**Produtividade volumétrica (mg/L.h)**

$$Q_P = \left( \frac{P - P_0}{t_f} \right) \quad \text{Equação 4.7}$$

Onde:

P: concentração de polissacarídeo (mg/L)

P<sub>0</sub>: concentração inicial de polissacarídeo (mg/L)

T<sub>f</sub>: tempo de fermentação (h)

**4.8.2 Processos com volume variável****Fator de rendimento de produção de polissacarídeo (g/g)**

$$Y_{P/S} = \frac{(P.V)_t - (P.V)_{t_0}}{(S.V)_t - (S.V)_{t_0}} \quad \text{Equação 4.8}$$

Onde:

(P.V)<sub>t</sub> = massa de polissacarídeo no instante t

(P.V)<sub>t<sub>0</sub></sub> = massa de polissacarídeo no instante inicial

(S.V)<sub>t</sub> = massa de glicose no instante t

(S.V)<sub>t<sub>0</sub></sub> = massa de glicose no instante inicial

**Fator de rendimento para crescimento celular (g/g)**

$$Y_{X/S} = \frac{(X.V)_{t_M} - (X.V)_{t_0}}{(S.V)_{t_0} - (S.V)_{t_M}} \quad \text{Equação 4.9}$$

(X.V)<sub>t<sub>M</sub></sub> = massa de células máxima

(X.V)<sub>t<sub>0</sub></sub> = massa de células no instante inicial

(S.V)<sub>t<sub>0</sub></sub> = massa de glicose no instante inicial

(S.V)<sub>t<sub>M</sub></sub> = massa de glicose no instante de máxima concentração de células

### Fator de rendimento para produção de polissacarídeo e crescimento celular (g/g)

$$Y_{P/X} = \frac{(P.V)_t - (P.V)_{t_0}}{(X.V)_{t_M} - (X.V)_{t_0}} \quad \text{Equação 4.10}$$

Onde:

$(P.V)_t$  = massa de polissacarídeo no instante t

$(P.V)_{t_0}$  = massa de polissacarídeo no instante inicial

$(X.V)_{t_M}$  = massa de células máxima

$(X.V)_{t_0}$  = massa de células no instante inicial

### Fator de rendimento para formação de lactato (g/g)

$$Y_{L/S} = \frac{(L.V)_t - (L.V)_{t_0}}{(S.V)_{t_0} - (S.V)_t} \quad \text{Equação 4.11}$$

Onde:

$(L.V)_t$  = massa de lactato no instante t

$(L.V)_{t_0}$  = massa de lactato no instante inicial

$(S.V)_{t_0}$  = massa de glicose no instante inicial

$(S.V)_t$  = massa de glicose no instante t

### Produtividade volumétrica (mg/L.h)

$$Q_P = \frac{(P.V)_t - (P.V)_{t_0}}{t.V_t} \quad \text{Equação 4.12}$$

$(P.V)_t$  = massa de polissacarídeo no instante t

$(P.V)_{t_0}$  = massa de polissacarídeo no instante inicial

t = tempo no instante t

$V_t$  = volume de meio no instante t

## Capítulo 5

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

#### 5.1.1 Avaliação dos meios de cultivo

Os meios convencionais para o cultivo de bactérias patogênicas exigentes nutricionalmente empregam proteína de origem animal, devido à presença de fatores que somente estão presentes em compostos como o sangue, infusão de cérebro e coração (BHI). Aliada à dificuldade na utilização destes meios para se trabalhar em grande escala, o FDA e a OMS recomendam que não se utilizem componentes de origem animal na produção de vacinas, por conta de uma possível contaminação por agentes que causam a encefalite espongiforme bovina (BSE) que pode ser transmitida para humanos (WHO, 2003; De VOE, 2004).

Existe uma grande variedade de meios que são utilizados para o cultivo de penumococos, complexos como o *Brain Heart Infusion* (BHI) (JIN *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 2011), *Tood Hewith Broth* (THB), THB com extrato de levedura, semi-sintéticos contendo hidrolisado de caseína (HOEPRICH 1955; CARMO 2010; KIM *et al.*, 1996; GONÇALVES *et al.*, 2002), hidrolisado de soja (TSB) (LIBERMAN *et al.*, 2008), TSB

suplementado (PATON *et al.*, 1983), meio definido (van de RINJ e KESSELER, 1980; GOGOLA, 2011) além de meios suplementados com sangue de cavalo e extrato de levedura (RESTREPO *et al.*, 2005).

Conforme detalhado no item 4.3.1 do capítulo de materiais e métodos, foram avaliados três meios de cultivo, a saber: meio de Hoeprich, meio TSB modificado e meio de Catlin modificado. Nestes experimentos, conduzidos em frascos agitados, foi utilizada a linhagem *Streptococcus pneumoniae* 172/97, a qual, como já explicado, é uma cepa de isolada no Brasil. As modificações dos meios TSB e Catlin foram necessárias, uma vez que, em experimentos anteriores ao desenvolvimento desta tese, realizados no Laboratório de Tecnologia Bacteriana (Biomanguinhos/FIOCRUZ), se verificou que a linhagem em estudo não cresceu no meio Catlin convencional e apresentou crescimento baixo no meio TSB convencional (dados não apresentados e não publicados).

A figura 5.1 mostra que os meios TSB modificado e Catlin modificado levaram aos maiores valores de produtividade volumétrica, em torno de 3 mg/L.h. No entanto, deve-se ressaltar que o meio TSB contém peptona, que é um insumo que pode vir a dificultar o processo posterior de purificação do polissacarídeo. Por outro lado, no preparo do meio de Catlin modificado é empregado o extrato de levedura dialisado, o que minimiza problemas de interferência, conforme vem sendo utilizado para a produção industrial de polissacarídeo de *Neisseria meningitidis* sorogrupos A e C (AYMÉ, 1973). Desta forma, optou-se pelo uso do meio de Catlin modificado para dar prosseguimento aos experimentos.

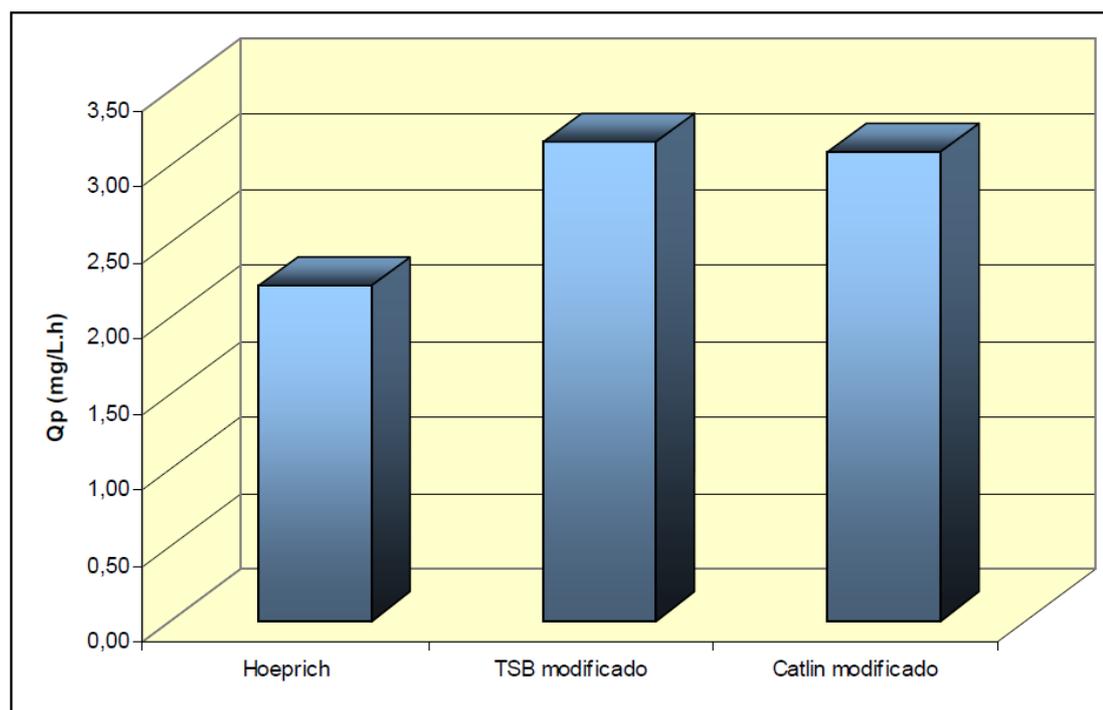


Figura 5.1. Produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) calculada em 16 horas de cultivo de *S. pneumoniae*, cepa 172/97, nos meios de Hoeprich, TSB modificado e Catlin.

### 5.1.2 Avaliação das linhagens produtoras

Foram avaliadas as cepas 172/97, 113/95 e 168/94 de *Streptococcus pneumoniae*. A escolha das linhagens foi feita com base em parâmetros importantes a serem considerados no desenvolvimento de vacinas: as três cepas são circulantes no Brasil, e foram isolados de material clínico, e apresentam susceptibilidade variada à ação de antibióticos, sobretudo em relação à penicilina, conforme informação fornecida pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

#### 5.1.2.1 Determinação do tempo ideal de coleta das células nos 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> pré-cultivos

O intuito deste experimento foi a determinação do tempo ideal de coleta das células nos pré-cultivos para garantir que as mesmas estivessem em plena atividade de crescimento e totalmente aclimatadas e, dessa forma, minimizar a fase lag do cultivo final. De acordo com dados do projeto Desenvolvimento de uma vacina

polissacarídica contra *S. pneumoniae*, desenvolvido em Bio-Manguinhos, decidiu-se padronizar o inóculo inicial proveniente do meio sólido entre 0,15-0,20 g/L, pois quando se utiliza uma concentração inferior ocorre uma fase lag muito extensa, o que acarreta em um aumento no tempo total do processo.

Nas figuras 5.2 e 5.3 estão apresentadas as cinéticas de crescimento de pneumococos sorotipo 14 linhagens 113/95, 168/94 e 172/97 nos 1º e 2º Pré-cultivos, empregando-se o meio de Catlin modificado.

Estipula-se o tempo ideal de coleta das células na fase exponencial de crescimento, tendo em vista que as mesmas estão em plena atividade. O tempo de coleta no 1º pré-cultivo para as linhagens 172/97, 168/94 e 113/95 foi quatro, três e cinco horas respectivamente. Com relação ao 2º pré-cultivo o tempo de coleta foi o mesmo para todas as linhagens, sendo de três horas.

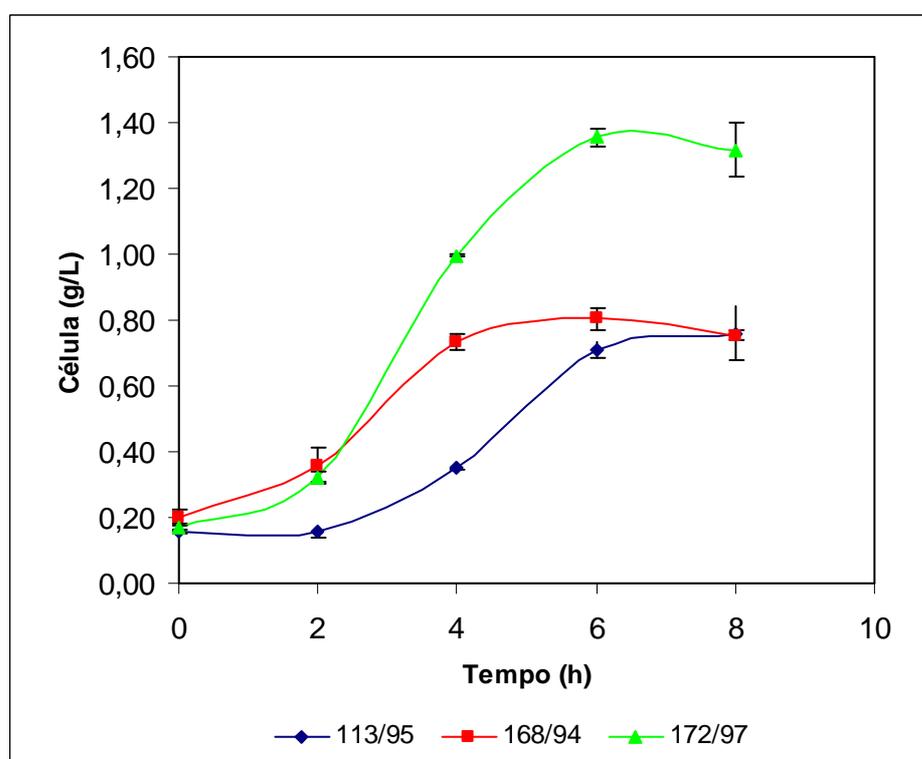


Figura 5.2 Cinética de crescimento de *S. pneumoniae* no 1º pré-cultivo. Meio de Catlin modificado em frasco agitado (três repetições em triplicata)

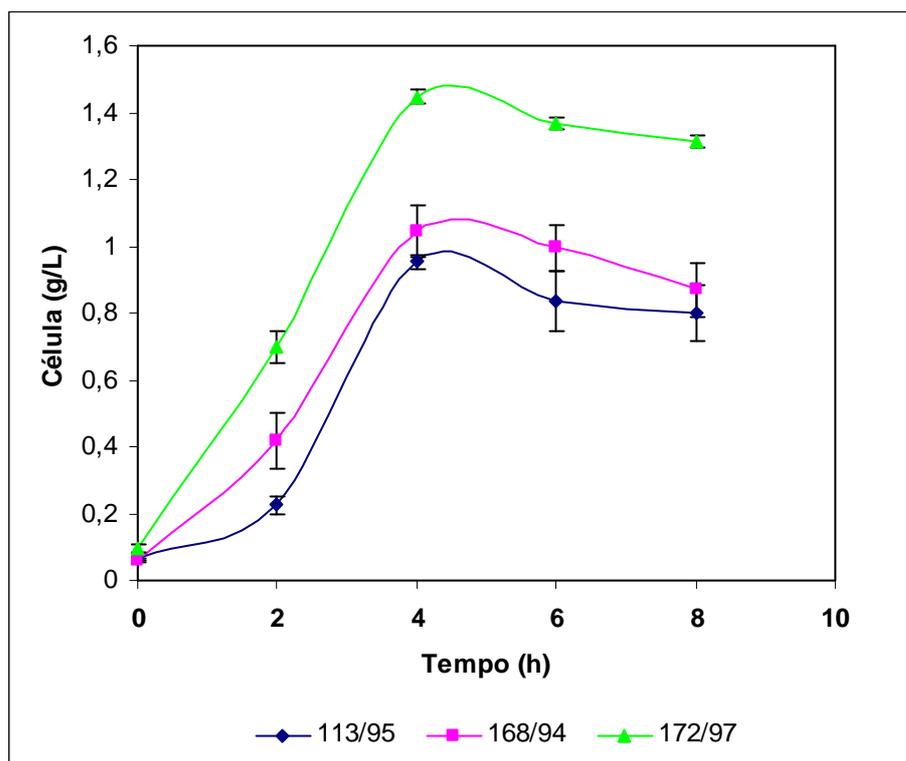


Figura 5.3 Cinética de crescimento de *S. pneumoniae* no 2º pré-cultivo. Meio de Catlin modificado em frasco agitado (três repetições em triplicata)

Foram avaliadas as variáveis de resposta ao final do cultivo, cujos resultados são apresentados na tabela 5.1.

Tabela 5.1. Variáveis de resposta da produção de polissacarídeo de *S. pneumoniae* para diferentes linhagens.

Cepa	$Q_p$ (mg P/L.h)	$Y_{P/S}$ (mg P/g S)	$Y_{X/S}$ (g X/g S)	$Y_{P/X}$ (mg P/ g X)
113/95	3,79	19,1	0,308	63,75
168/94	2,70	11,2	0,243	45,08
172/97	3,08	13,1	0,266	47,98

$Q_p$ : Produtividade volumétrica;  $Y_{P/S}$ : Fator de rendimento de produção de polissacarídeo;  $Y_{X/S}$ : Fator de rendimento para crescimento celular;  $Y_{P/X}$ : Fator de rendimento para produção de polissacarídeo e crescimento celular.

Pode-se observar um aumento de 20% na produtividade volumétrica da linhagem 113/95 em relação à cepa 172/97 e 40% quando comparado com a cepa 168/94. O rendimento de substrato em polissacarídeo foi 70% superior em relação à

cepa 168/94 e 46% maior em relação à cepa 172/97. O fator de conversão de células em produto foi 33% maior em relação à cepa 172/97 e 41% em relação à cepa 168/94.

De acordo com os dados apresentados, a cepa 113/95 se mostrou como melhor opção para o desenvolvimento do estudo realizado nesta tese. Destaca-se que não foram encontrados trabalhos na literatura empregando a cepa escolhida para a produção de polissacarídeo o que caracteriza o ineditismo deste trabalho, de caráter eminentemente exploratório.

## 5.2 BIOPROCESSO CONDUZIDO EM BATELADA

### 5.2.1 Influência do Controle do pH no Bioprocesso

*Streptococcus pneumoniae*, por se tratar de uma bactéria cujo reservatório natural é o ser humano, tem o seu pH de crescimento na faixa da neutralidade (BERGEY, 1994). Com o objetivo de conhecer e avaliar o comportamento de pneumococos, mediante condições ambientais distintas, realizou-se experimentos em frascos agitados e em biorreator de bancada, sem controle e com controle de pH.

#### 5.2.1.1 Experimentos sem controle de pH

Os experimentos foram conduzidos em bateladas realizadas em frascos de 500 mL, contendo 250 mL de meio de cultivo, agitados em agitador rotatório e em biorreator de bancada de volume nominal 2,5 L e volume útil de 1,5 L, nas condições descritas em 4.5. Foi feito o levantamento das curvas cinéticas em um tempo de cultivo de 16 horas. Durante a fase de crescimento, com duração de 8 horas, a cada intervalo de 1 hora eram retiradas alíquotas para a quantificação de células, glicose, lactato e polissacarídeo. A partir de 8 horas de cultivo, as amostragens foram realizadas em intervalo de 2 horas. As figuras 5.4 e 5.5 apresentam as curvas cinéticas para os ensaios em frascos agitados e em biorreator, respectivamente.

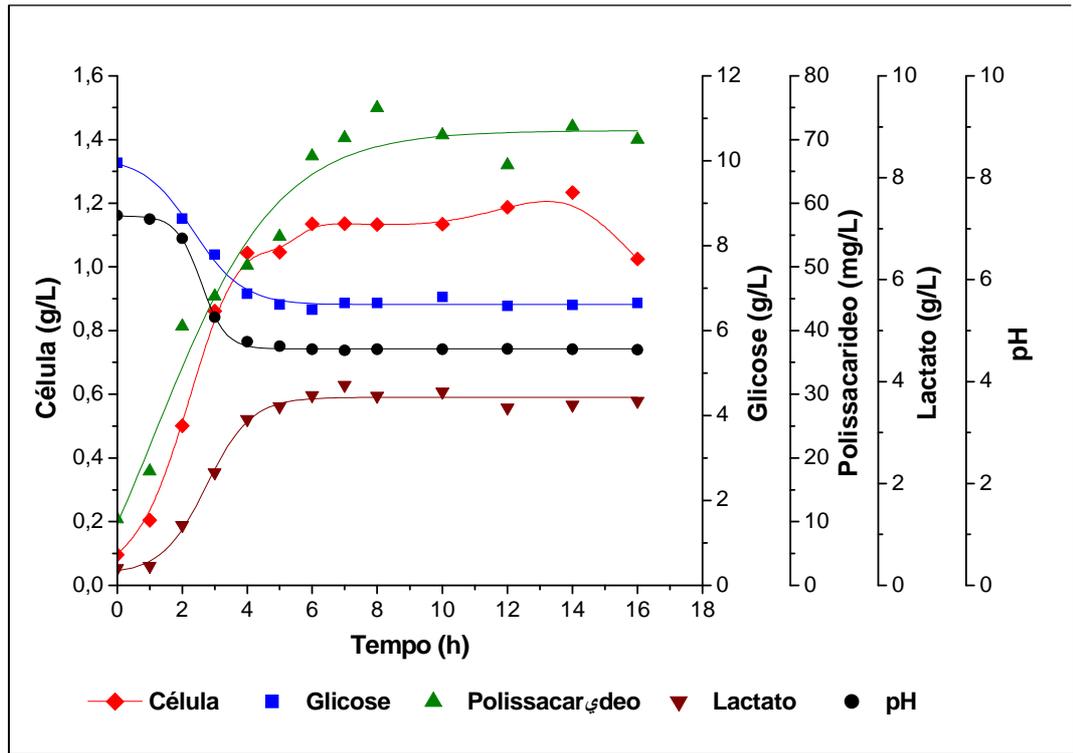


Figura 5.4. Perfil cinético de crescimento, produção de polissacarídeo, consumo de glicose e formação de lactato em meio Catlin modificado **frasco agitado** cepa 113/95. Número de repetições: 02.

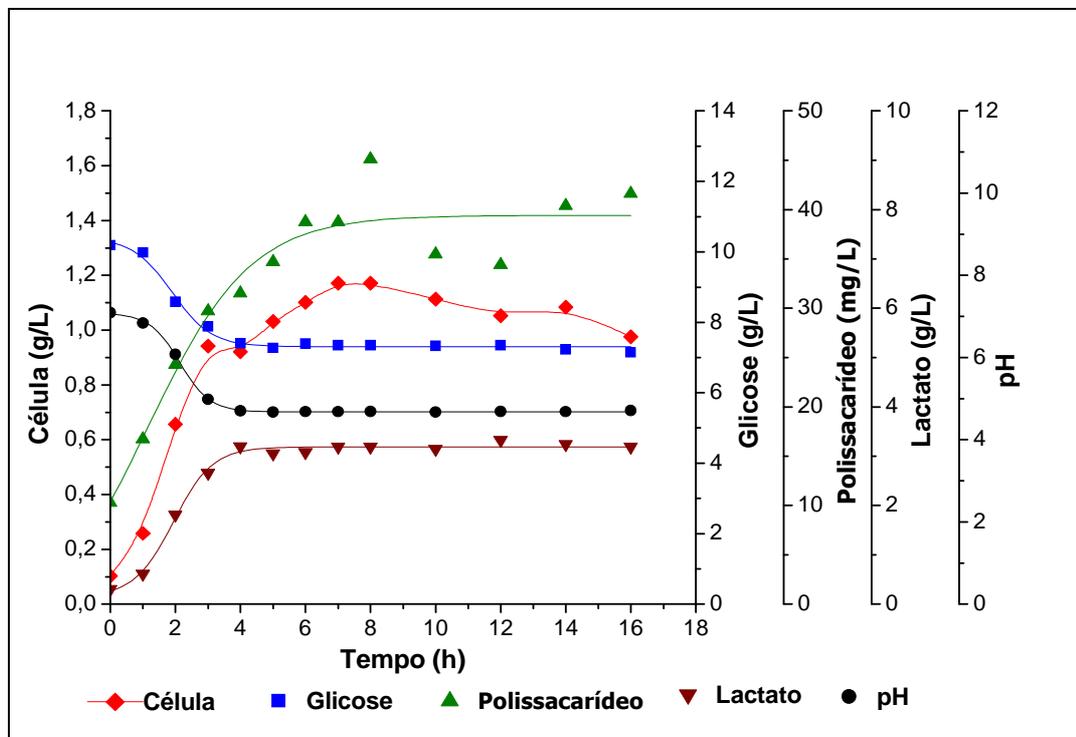


Figura 5.5. Perfil cinético de crescimento, produção de polissacarídeo, consumo de glicose e formação de lactato em meio Catlin modificado **biorreator** sem controle de pH. Cepa 113/95. Número de repetições: 02

Os perfis de crescimento, de consumo de substrato, de formação de produto e de lactato foram semelhantes nos experimentos conduzidos em frasco e biorreator sem controle de pH (Figuras 5.4 e 5.5). Em frascos agitados e em biorreator a fase exponencial de crescimento ocorreu entre 0 e 2 horas e os valores de  $\mu_x$  foram  $0,829h^{-1}$  para o frasco e  $0,927h^{-1}$  para o biorreator. A partir da 4ª hora de cultivo o pH ficou em torno de 4,7, a concentração de ácido láctico se manteve constante e observa-se uma interrupção no consumo de glicose restando 66,8% no frasco e 70,1% no biorreator. Massaldi e colaboradores (2010), cultivando outra linhagem de *S. pneumoniae* sorotipo 14 em frasco sem controle de pH, empregando meio semi-sintético observaram que a cultura se manteve estável ao longo do período estudado e quando o pH atingiu um valor de 4,75, a glicose não foi mais consumida restando 78,35% da glicose inicial, o que está de acordo com os resultados encontrados neste trabalho para os experimentos em frasco e biorreator sem controle de pH.

Os fatores de conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) e célula em produto ( $Y_{P/X}$ ) foram calculados em 8 horas de cultivo, tempo este em que não mais se observou crescimento, e as demais variáveis de resposta foram calculadas em 16 horas de cultivo. Os resultados são apresentados na tabela 5.2.

Tabela 5.2 Resultado das variáveis de resposta para cultivo de *S. pneumoniae* em meio de Catlin modificado Cepa: 113/95.

	$Q_p^a$ (mg P/L.h)	$Y_{P/S}^a$ (mg P/g S)	$Y_{X/S}^b$ (g X/g S)	$Y_{P/X}^b$ (mg P/ g X)	$Y_{L/S}^a$ (g L/ g S)
Frasco agitado	3,72	18,05	0,314	62,2	0,997
Biorreator	1,96	10,27	0,376	32,6	0,947

$Q_p$ : Produtividade volumétrica;  $Y_{P/S}$ : Fator de rendimento de produção de polissacarídeo;  $Y_{X/S}$ : Fator de rendimento para crescimento celular;  $Y_{P/X}$ : Fator de rendimento para produção de polissacarídeo e crescimento celular;  $Y_{L/S}$ : Fator de rendimento para formação de lactato. a: calculado no tempo de 16 horas de cultivo; b: calculado no tempo de 8 horas de cultivo

A produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) no cultivo em frasco foi 1,9 vezes maior do que em biorreator sem controle de pH conforme apresentado na tabela 5.2. Está descrito na literatura que a concentração de oxigênio no ambiente é um fator importante na produção da cápsula polissacarídica de pneumococos e de outros micro-organismos que são encapsulados como *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. A concentração de polissacarídeo aumenta em ambientes

com menores níveis de oxigênio (WEISER *et al.*, 2001), sugerindo desta maneira, que pela geometria do frasco ocorre uma menor disponibilidade de oxigênio no meio em relação ao biorreator que possui um *headspace* maior e, portanto possibilitando uma maior incorporação de oxigênio ao cultivo, o que ocasionaria em uma menor produção de polissacarídeo.

De acordo com Massaldi e colaboradores (2010), embora o pH seja um parâmetro rotineiramente controlado em biorreatores, existe uma escassez de trabalhos em escala de bancada empregando *S. pneumoniae* sorotipo 14 (GOGOLA, 2011), sorotipo 6B (CARMO, 2010), sorotipo 23F (GONÇALVES *et al.*, 2002).

#### 5.2.1.2 Experimentos com controle de pH

Os experimentos foram realizados em biorreator de bancada, nas mesmas condições e sistemática de amostragens e análises do experimento sem controle de pH realizado em biorreator, diferindo apenas no tocante ao controle de pH, que foi mantido em 7,2, mediante a adição de NaOH 5 M. A escolha deste valor de pH se deu em função do protocolo descrito para o sorotipo 14 (Institut Mérieux, 1980). Em paralelo foi conduzido um experimento empregando atmosfera de nitrogênio, uma vez que há trabalhos na literatura indicando este procedimento como adequado ao cultivo do agente em estudo (GONÇALVES *et al.*, 2002).

As curvas cinéticas do bioprocessamento com pH controlado são apresentadas na figura 5.6. Pode-se observar que a concentração de células, após atingir um valor máximo de 1,2 g/L, apresentou declínio decorrente de autólise. Tal fenômeno é atribuído à atividade da LytA (autolisina), uma enzima responsável pelo rompimento das ligações N-acetil-muramoil-L-alanina da peptidoglicana da parede celular (HOWARD e GOODER, 1974).

A autólise ocorreu a partir do final da fase exponencial de crescimento e tem início quando feromônios são liberados por um sistema complexo denominado *quorum sensing* (RESTREPO *et al.*, 2005), que constitui um mecanismo pelo qual a bactéria pode se comunicar em nível intercelular para monitorar sua própria densidade populacional, disparando a atividade da autolisina (STEINMOEN *et al.*, 2002). No

trabalho de Gogola (2011) empregando outra linhagem de pneumococos do sorotipo 14 em meio complexo mantendo o pH constante em 7,0 também foi observada lise, após o máximo crescimento celular.

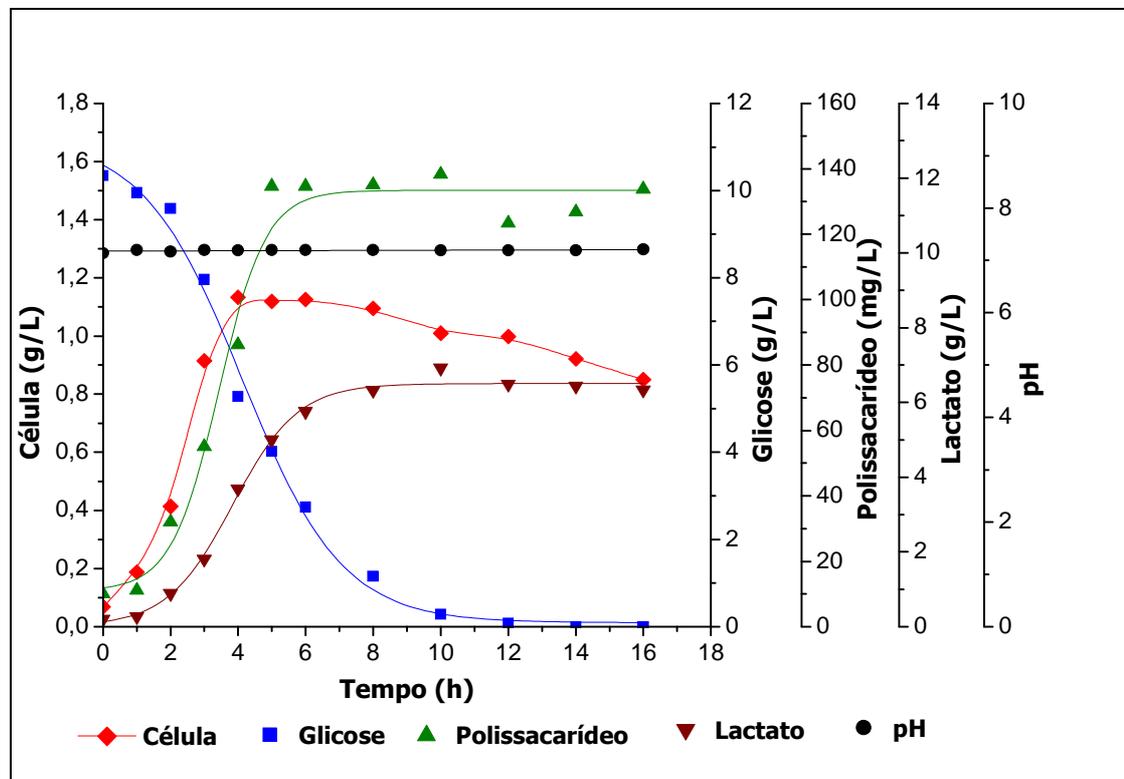


Figura 5.6. Perfil cinético de crescimento, produção de polissacarídeo, consumo de glicose e formação de lactato em meio Catlin modificado em biorreator com controle de pH. Cepa 113/95. Número de repetições: 02

O fenômeno de lise não foi observado no experimento sem controle de pH, apesar de ter alcançado a mesma concentração celular do experimento com controle de pH (Figuras 5.4 e 5.5). Este fato pode ser atribuído ao pH ótimo de atuação da autolisina que é 7,0 (HOWARD e GOODER, 1974) e o valor do pH no cultivo sem controle foi de 4,75. Cabe destacar que não se pode afirmar que nesta fase de lise cessa o crescimento, uma vez que a glicose continuou a ser consumida e o lactato sendo formado, o que também foi observado por Gogola (2011) para o sorotipo 14.

Segundo a literatura, o polissacarídeo é produzido com maior taxa durante a fase exponencial de crescimento (BERGEY, 1994) o que está de acordo com a figura 5.6. A concentração de polissacarídeo atingiu o valor máximo de 138,25 mg/L. Comparando com o experimento sem controle de pH, verifica-se que a concentração

de polissacarídeo no ponto de máximo foi 3,5 vezes superior, indicando a importância do controle dessa variável.

Para efeitos de comparação com o experimento sem controle de pH foram calculadas as variáveis de resposta, apresentadas na tabela 5.3, nos tempos de cultivo de 6 horas e 16 horas. A escolha desses tempos foi devido ao fato de que, como mostrado na figura 5.6, em 6 horas se atingiu o máximo de concentração de células e em 16 horas a glicose estava completamente esgotada.

Deve-se ainda ressaltar que não faz sentido se calcular as variáveis de resposta dependentes da concentração de células  $Y_{X/S}$  e  $Y_{P/X}$  com a concentração de células fora do ponto de máximo. Sendo assim, o cálculo de  $Y_{X/S}$  foi realizado somente em 6 horas e o cálculo de  $Y_{P/X}$  foi feito em 6 e 16 horas, porém usando o valor da concentração máxima de células. Este procedimento foi feito nos experimentos subsequentes.

Tabela 5.3 Resultado das variáveis de resposta para cultivo de *S. pneumoniae* empregando meio de Catlin modificado com controle de pH.

	Variável de resposta	Tempo de cultivo (h)	
		6	16
Com controle de pH	$Q_P$ (mg/L.h)	20,0	7,65
	$Y_{X/S}$ (g/g)	0,139	-
	$Y_{P/X}$ (mg/g)	117,93	115,74
	$Y_{P/S}$ (g/g)	16,40	11,83
	$Y_{L/S}$ (g/g)	0,730	0,592
	P (mg/L)	134,65	133,73
Sem controle de pH	$Q_P$ (mg/L.h)	4,74	1,96
	$Y_{X/S}$ (g/g)	0,356	-
	$Y_{P/X}$ (mg/g)	28,47	31,37
	$Y_{P/S}$ (g/g)	10,15	10,27
	$Y_{L/S}$ (g/g)	0,993	0,947
	P (mg/L)	38,71	41,61

Ao se avaliar os dados em 6 e 16 horas de processo, constata-se que, ao se realizar o controle de pH, houve um aumento acentuado da produtividade volumétrica e da capacidade produtiva das células, expressa pelo fator  $Y_{P/X}$ , sendo para ambos fatores cerca de 4 vezes. Já o fator  $Y_{P/S}$  não apresentou grandes diferenças ao final do processo, indicando que, no processo sem controle, enquanto não houve inibição, as células responderam de forma similar. Quando se fez controle, como a concentração de polissacarídeo praticamente não se alterou após 6 horas de cultivo, o valor de  $Y_{P/S}$  foi menor ao fim do processo, devido ao maior consumo de glicose, porém da mesma ordem de grandeza do experimento sem controle de pH.

No que diz respeito ao fator de conversão de glicose em lactato ( $Y_{L/S}$ ) tal valor foi menor para o sistema com controle. Isto se deu pelo fato de os dois experimentos terem apresentado concentrações próximas de lactato, porém o consumo de glicose foi total quando se fez o controle de pH.

Os dados sinalizam que existe a necessidade real de controle de pH, se adotando, então, este procedimento nos experimentos subseqüentes.

### 5.2.2 Efeito da atmosfera de nitrogênio no bioprocesso

De acordo com a literatura *S. pneumoniae* é um micro-organismo aerotolerante (AUZAT *et al.*, 1999) e a concentração de oxigênio no ambiente pode ser um fator importante na capacidade desta bactéria regular a produção da cápsula polissacarídica (WEISER *et al.*, 2001; WEISER, 2003). Esta habilidade está relacionada às fases de instalação da doença, conforme descrito no item 2.2. A literatura reporta alguns trabalhos onde se aplica atmosfera de nitrogênio, visando manter um ambiente de anaerobiose (GONÇALVES *et al.*, 2002, CARMO, 2010, GOGOLA, 2011). No entanto, outros trabalhos não utilizam esta abordagem como é o caso de Macha e colaboradores (2010) que encontraram uma maior concentração de polissacarídeo para uma concentração de oxigênio dissolvido de 7,6%. Macha e colaboradores (2011) inclusive empregaram 0,1-0,2 vvm de ar para a produção de *S. pneumoniae* sorotipo 6B, obtendo elevadas concentrações de polissacarídeo. Sendo

assim, para verificar a real necessidade de se manter o sistema em anaerobiose, foi conduzido um experimento com atmosfera de nitrogênio, mantida por meio de injeção de nitrogênio, a uma vazão de 0,5 L/min, mantendo constantes as demais condições de cultivo. A figura 5.7 apresenta as curvas cinéticas deste experimento, onde se verifica que a atmosfera de nitrogênio levou a resultados inferiores no que diz respeito à concentração de polissacarídeo, tendo atingido um valor de 100 mg/L ao final do cultivo. Também se verificou o fenômeno da lise de células, com perfil bastante similar ao do experimento sem controle de pH.

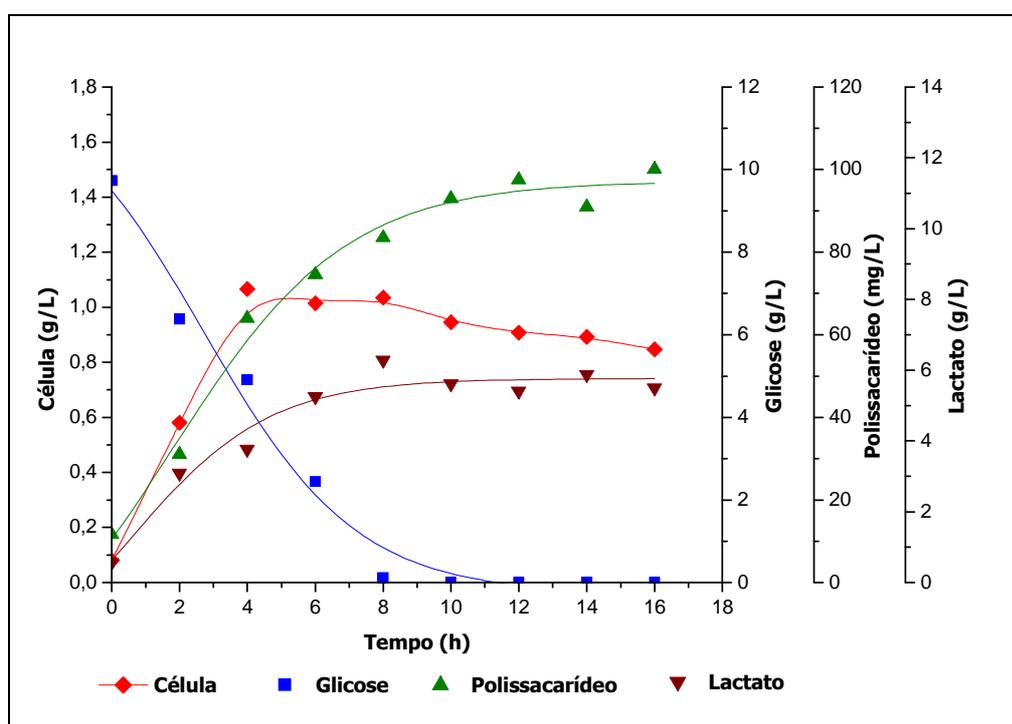


Figura 5.7. Perfil cinético de crescimento, produção de polissacarídeo, consumo de glicose e formação de lactato em meio Catlin modificado biorreator com controle de pH, mantido em atmosfera de nitrogênio. Cepa 113/95. Número de repetições: 02

Os resultados obtidos neste experimento estão coerentes com os resultados de Macha e colaboradores (2010). Estes autores mostraram que uma pequena tensão de oxigênio não afetou a expressão da cápsula. Desta forma, é razoável pensar que o ambiente do biorreator, caso mantido em atmosfera de nitrogênio, não se torna representativo do ambiente do corpo humano. Por outro lado, parece que a pequena quantidade de oxigênio decorrente do *headspace* do biorreator ou dos frascos agitados pode favorecer a expressão da cápsula, porque, de certa forma, tal condição pode ter mimetizado o ambiente natural onde as células de *S. pneumoniae*

se instalam e invadem o organismo. Jin e colaboradores (2009), trabalhando com o cultivo de sorotipo 3 em biorreator de bancada, observaram que, em cultivos estáticos, a produção do polissacarídeo foi menor quando comparada aos cultivos agitados. Porém verificaram que, em agitação superior a 180 rpm, a produção decaiu gradualmente. Outro aspecto que deve ser ressaltado é a própria composição do meio, conforme descrito no item 2.6, meios que contêm bicarbonato, mantêm uma tensão de gás carbônico, cisteína e ácido tioglicólico, que mantêm ambiente redutor. A presença dessas substâncias no meio concorre para minimizar a dissolução de oxigênio no meio.

Em face dos resultados obtidos, suportados pelos trabalhos citados na literatura, optou-se por realizar experimentos com controle de pH, sem utilização de atmosfera de nitrogênio nos experimentos subseqüentes do presente trabalho.

### **5.2.3 Avaliação da concentração de glicose e nitrogênio total no processo de produção de cápsula polissacarídica empregando planejamento experimental**

O objetivo nesta etapa do trabalho foi estudar a cinética de crescimento, consumo de substrato e produção da cápsula do sorotipo 14 em biorreator, empregando um meio de origem não animal com diferentes concentrações de glicose e nitrogênio total (extrato de levedura) utilizando a técnica de planejamento experimental, visando o aumento de produtividade da cápsula polissacarídica. Vale ressaltar que dados de avaliação dos processos de produção de polissacarídeo capsular de pneumococos com acompanhamento cinético ainda são escassos na literatura (MASSALDI *et al.*, 2010).

Com relação ao planejamento experimental, apesar da crescente utilização desta técnica nas últimas décadas para processos biotecnológicos com comprovação de sua robustez, no caso da produção de polissacarídeo de *S. pneumoniae*, estes estudos são ainda mais escassos (JIN *et al.*, 2009).

A estratégia empregada para a avaliação das duas variáveis (Nitrogênio total e Glicose inicial) foi o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com a avaliação de cinco níveis de cada uma das variáveis, permitindo identificar os

efeitos/parâmetros lineares e quadráticos de cada uma das respostas do perfil cinético, assim como as interações lineares entre as duas variáveis independentes. Este planejamento permite a avaliação de modelos polinomiais de segunda ordem, como mostrado no capítulo de Materiais e Métodos. A utilização da técnica de planejamento experimental permite avaliar o efeito e interações das variáveis escolhidas sobre as condições de processo, avaliar o erro experimental (pela repetição de experimentos no ponto central) e prever as condições que otimizam a produção da cápsula polissacarídica, buscando aumentar os níveis de produtividade dos processos. Além disso, a normalização de variáveis permite comparar o efeito de cada uma, sem a influência da grandeza da variação de cada uma delas. As técnicas de planejamento experimental foram desenvolvidas para permitir a obtenção do máximo de informações com o menor número possível de experimentos, enquanto a estratégia de avaliar um fator por vez, mantendo os demais constantes, exige um maior número de experimentos para obter estas informações.

Deve-se ainda ressaltar que, no processo em estudo, a necessidade comprovada de se realizar o controle de pH impediu que os experimentos do planejamento experimental fossem feitos em frascos agitados, como é a praxe na maioria dos trabalhos que utilizam essa ferramenta. Deste modo, os experimentos foram realizados em biorreator, nas condições detalhadas no item 4.6.1 Além disto, foi necessário o acompanhamento cinético, uma vez que é um dado importante do processo a determinação do tempo em que se observa a lise das células e como esta se relaciona com a liberação do polissacarídeo no meio de cultivo.

Os perfis cinéticos de crescimento, de consumo de glicose e de produção da cápsula polissacarídica do sorotipo 14 e de lactato estão apresentados na Figura 5.8 para cada uma das condições definidas pelo planejamento experimental, durante 16 h de processo. Este tempo foi estipulado em função dos resultados obtidos na batelada com controle de pH (item 5.2.1.2).

Na figura 5.8A observa-se a lise da bactéria na fase estacionária de crescimento para todas as concentrações de glicose e nitrogênio total estudadas. Como mencionado anteriormente, *S. pneumoniae* possui um sistema *quorum sensing* particularmente efetivo e que ativa várias autolisinas potentes, quando

certas condições são encontradas na população em crescimento, ocasionando uma extensiva morte celular (RESTREPO *et al.*, 2005). Com relação ao consumo de glicose (Figura 5.8B), observou-se que esta fonte de carbono é completamente consumida nas menores concentrações iniciais. O polissacarídeo capsular é produzido durante a fase exponencial de crescimento (Figura 5.8C) sendo de conhecimento que parte deste biopolímero está ligado à célula, podendo ser liberado durante a lise celular.

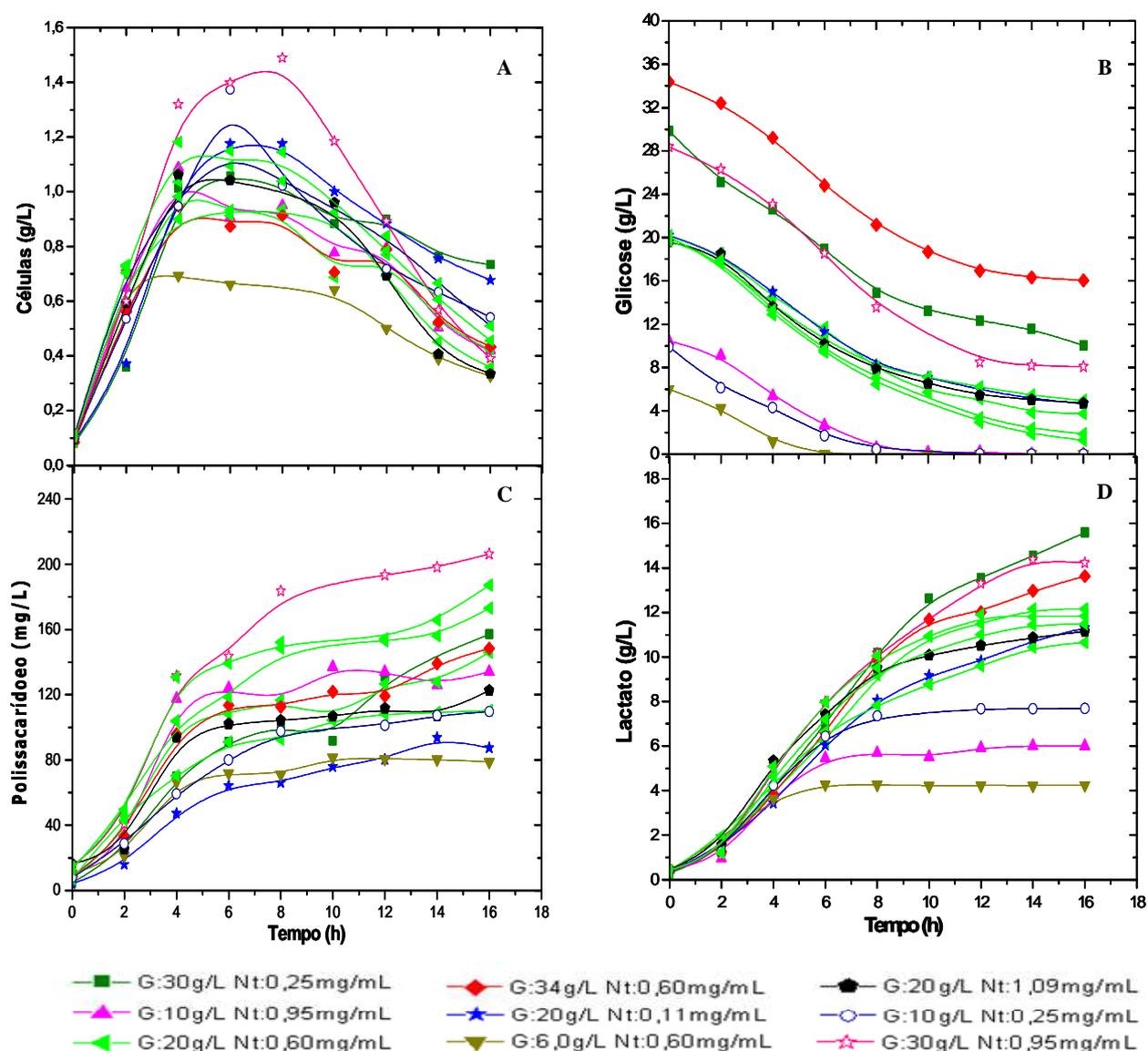


Figura 5.8. (A) Cinética de crescimento (B) Consumo de glicose (C) Produção de polissacarídeo (D) Formação de lactato de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14 em biorreator. G: Glicose, Nt: Nitrogênio total.

Como esperado, o ácido láctico foi o principal produto do metabolismo da glicose (Figura 5.8D) e a sua formação somente cessou quando também cessou o consumo de glicose. A produção de lactato é parcialmente associada ao crescimento celular, considerando que este metabólito continua a ser produzido após cessar o crescimento celular, o que também foi observado por Gonçalves e colaboradores (2002) utilizando *S. pneumoniae* 23F e o meio de Hoeprich com extrato de levedura dialisado.

Avaliando conjuntamente a cinética de crescimento, de consumo de substrato e de produção da cápsula e de lactato, verifica-se que aproximadamente até 6 h de processo ocorre aumento na produção da cápsula polissacarídica associado ao crescimento celular. Aproximadamente após este tempo de 6h, tem início a lise celular com a produção de polissacarídeo atingindo um *plateau* até 16 h de processo, na maior parte das condições testadas no planejamento experimental. Comparando, as produtividades (produção de polissacarídeo por tempo), em diferentes tempos de cultivo, foi identificada redução da produtividade com aumento do tempo de processo (Tabela 5.4), como observado nos experimentos com controle de pH. Desta forma, foi selecionado o tempo de 6 h para a avaliação dos resultados do planejamento (Tabela 5.5).

Tabela 5.4. Resultados de produtividade (Qp) para 6h e 16h de processo.

Nitrogênio total (mg/L)	Glicose inicial (g/L)	Qp 6h (mgP/L.h)	Qp 16h (mgP/L.h)
0,25	10	12,00	6,36
0,25	30	14,40	9,52
0,95	10	19,14	7,80
0,95	30	21,40	11,95
0,6	20	16,79	8,65
0,6	20	13,99	6,45
0,6	20	17,58	10,01
0,6	20	20,77	10,79
0,11	20	10,04	5,21
0,6	6	10,25	4,28
1,09	20	14,34	6,65
0,6	34	17,47	8,72

Tabela 5.5. Resultados da cinética para células, glicose residual, lactato, produção de polissacarídeo e produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) em 6h de crescimento de *S. pneumoniae* sorotipo 14 em meio de Catlin modificado em biorreator.

Nitrogênio total (mg/L)	$x_1$	Glicose inicial (g/L)	$x_2$	Células (g/L)	Glicose residual (g/L)	Lactato (g/L)	Polissacarídeo (mg/L)	$Q_P$ (mgP/L.h)
0,25	-1	10	-1	1,373	1,72	6,442	77,47	12,00
0,25	-1	30	1	1,057	18,97	6,957	91,15	14,40
0,95	1	10	-1	0,906	2,65	5,467	124,08	19,14
0,95	1	30	1	1,398	18,54	7,978	140,94	21,40
0,6	0	20	0	0,913	11,66	6,188	108,27	16,79
0,6	0	20	0	0,933	10,57	6,647	90,98	13,99
0,6	0	20	0	1,095	9,64	7,204	115,96	17,58
0,6	0	20	0	1,149	9,45	7,973	136,55	20,77
0,11	-1,41	20	0	1,1754	11,27	6,047	64,29	10,04
0,6	0	6	-1,41	0,661	0,00	4,273	71,90	10,25
1,09	1,41	20	0	1,043	10,16	7,412	99,68	14,34
0,6	0	34	1,41	0,873	24,81	6,591	113,55	17,47

No contexto da produção de vacinas o que realmente importa é, em última instância, a quantidade de doses que uma unidade de produção é capaz de obter por dia e por unidade de volume de meio reacional. Em outras palavras, a variável de resposta que melhor traduz isto é a produtividade volumétrica, uma vez que se entende por dose a massa do antígeno, no caso o polissacarídeo, em um volume de diluente.

A análise estatística da influência da concentração inicial de nitrogênio total e glicose para os resultados de produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) está apresentada no gráfico de Pareto (Figura 5.9) em 6h de cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 14. O Gráfico de Pareto ordena de forma decrescente, por meio de barras, os efeitos das variáveis (que podem ser, neste caso, lineares, interação e quadráticos), permitindo comparar os de maior influência sobre o processo.

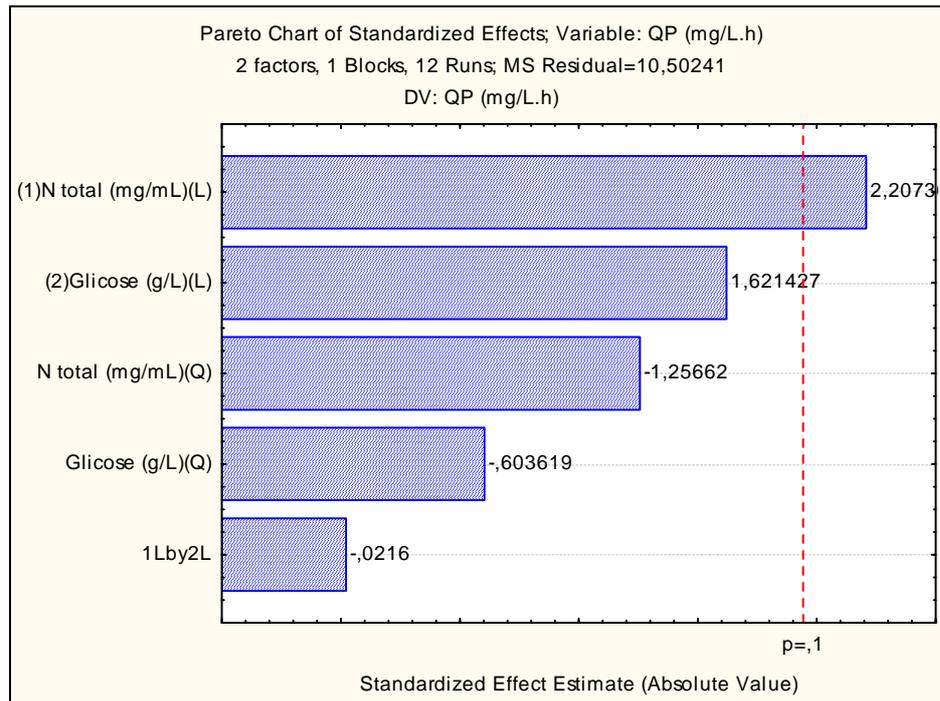


Figura 5.9. Gráfico de Pareto obtido para produtividade volumétrica pelo planejamento experimental empregando Nitrogênio total e glicose inicial. Nesta análise, a variável 1 é o nitrogênio total e 2 é a glicose inicial; (L) é o efeito linear e (Q) o efeito quadrático; a interação (linear) é identificada como 1Lby2L no Gráfico de Pareto.

Como pode ser verificada no gráfico de Pareto, a produtividade volumétrica apresentou influência estatisticamente significativa (a 90% de confiança,  $p < 0,1$ ) da concentração de nitrogênio total inicial no biorreator, com maiores resultados obtidos para concentrações superiores de nitrogênio (efeito linear positivo). A resposta de produtividade volumétrica apresentou  $R^2$  em torno de 0,6, ou seja, não foi possível obter um modelo com qualidade estatisticamente significativa para a representação do processo de produção de polissacarídeo nas condições do planejamento experimental empregado. Isto indica que um modelo quadrático do tipo que pode ser avaliado pelo DCCR não é adequado para descrever os resultados de produtividade volumétrica. O planejamento experimental realizado, para o intervalo de concentrações estudadas, não apontou influência significativa do binômio glicose x nitrogênio na principal variável de resposta que é a produtividade volumétrica. Isto não quer dizer que outras influências não devam ser estudadas, mas, para o propósito da tese, optou-se por investir na condução do processo, com o meio que resultou nos melhores resultados, apresentados no item 5.1.1.

### 5.2.4 Influência do lactato no bioprocesso

Uma questão intrigante diz respeito ao lactato. É recorrente na literatura a informação de que o lactato formado a partir do piruvato é o principal metabólito produzido por *Streptococcus* sp. para que haja a reoxidação de NADH formado durante a glicólise. Entretanto, o próprio ácido láctico provoca inibição da via glicolítica por retro-alimentação (citado em BIBAL *et al.*, 1988; EVEN *et al.*, 2002). Os resultados discutidos até aqui apontam que há uma correlação entre a concentração de lactato, o consumo de glicose e a lise das células.

Para verificar tal efeito, foram conduzidos experimentos em biorreator de bancada de volume nominal 2,5 L e volume útil de 1,5 L, conduzidos em batelada, nas condições descritas em 4.6.1. Foram avaliadas as concentrações iniciais de lactato de sódio de 5, 10 e 20 g/L, nas mesmas condições e sistemática de amostragens e análises do experimento em batelada com controle de pH. A opção de se empregar lactato de sódio ao invés de ácido láctico se deve ao fato de que o pH é mantido constante mediante a adição de NaOH, logo, no meio, se acumula lactato de sódio, e não ácido láctico.

Para efeitos de análise comparativa acerca da influência do lactato, os resultados foram agrupados de forma gráfica, segundo as concentrações medidas de células, glicose, polissacarídeo e lactato, mostradas nas figuras 5.10, 5.11, 5.12 e 5.13, respectivamente.

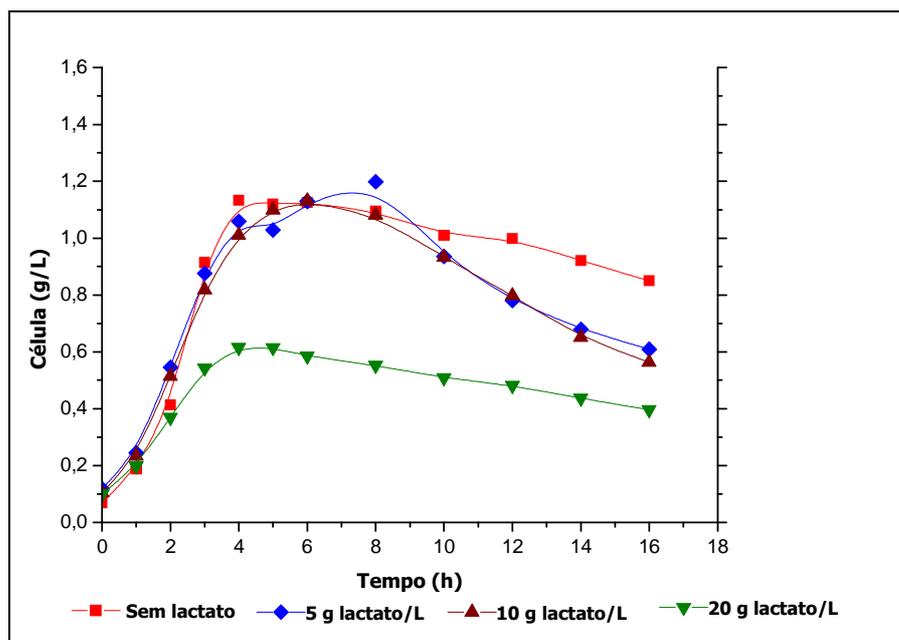


Figura 5.10. Perfil cinético de crescimento em meio Catlin modificado sem e com 5 g/L, 10 g/L e 20 g/L de lactato inicial em biorreator. Número de repetições: 02

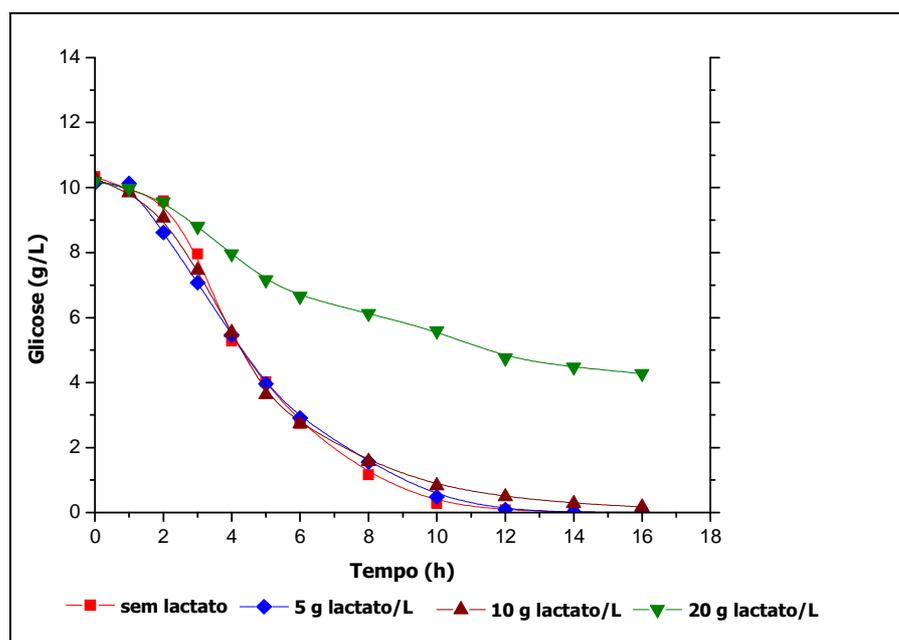


Figura 5.11. Perfil cinético de consumo de glicose em meio Catlin modificado sem e com 5 g/L, 10 g/L e 20 g/L de lactato inicial em biorreator. Número de repetições: 02

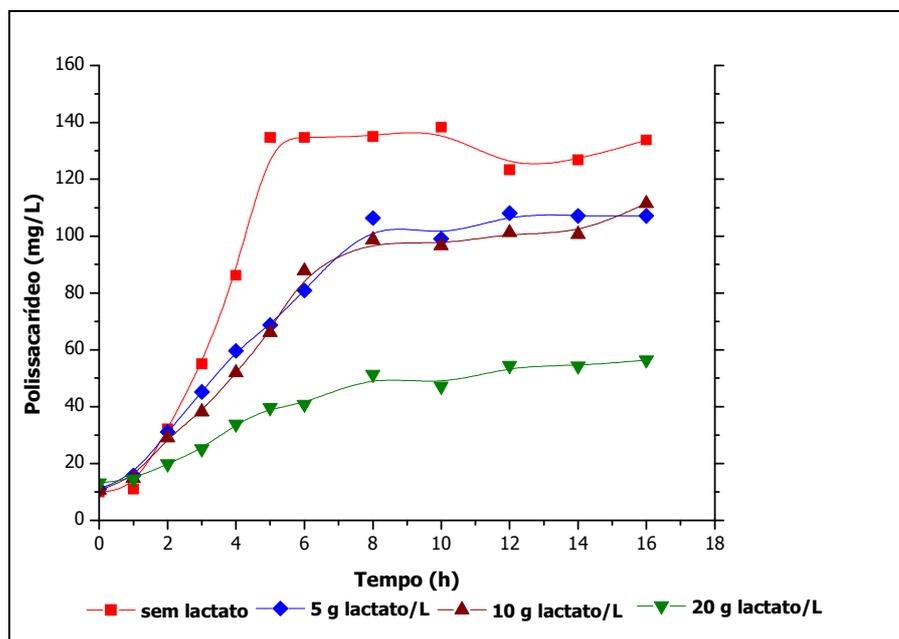


Figura 5.12. Perfil cinético de produção de polissacarídeo em meio Catlin modificado sem e com 5 g/L, 10 g/L e 20 g/L de lactato inicial em biorreator. Número de repetições: 02

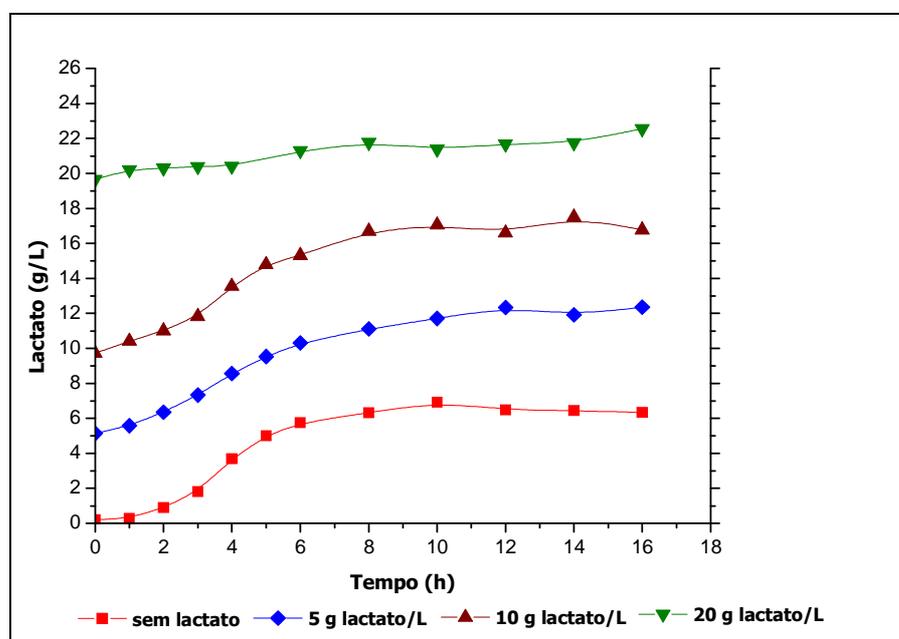


Figura 5.13. Perfil cinético de formação de lactato em meio Catlin modificado sem e com 5 g/L, 10 g/L e 20 g/L de lactato inicial em biorreator. Número de repetições: 02

Os perfis de crescimento celular e consumo de glicose foram semelhantes para os experimentos sem lactato e com a adição de 5g/L e 10 g/L de lactato, ocorrendo um consumo total de glicose, diferente do que acontece quando a concentração de lactato foi de 20 g/L, em que apenas 58% da glicose foi consumida. Excetuando o processo com adição de lactato em concentração de 20 g/L, para os demais, no tempo de cultivo entre 5 e 6 horas pode-se observar a maior concentração celular. Também se verificou que, quando a concentração de lactato produzido atingiu um valor em torno de 5,5 g/L, foi observado o início do processo de lise celular. A concentração de 20 g/L de lactato inibiu o crescimento em 2 vezes quando comparado com o experimento sem lactato. Com relação à produção do polissacarídeo, a maior ocorreu no meio sem adição de lactato, sugerindo que houve alguma inibição com a adição de lactato. No trabalho de Gonçalves e colaboradores (2002), utilizando pneumococos sorotipo 23F, foi observado que concentrações abaixo de 10 g/L de lactato foram suficientes para inibir o crescimento bacteriano, mesmo ainda existindo glicose presente no meio.

As variáveis de resposta produtividade volumétrica e fator de conversão de substrato em produto são mostradas na figura 5.14, onde se verifica que houve um decréscimo nos valores das variáveis de resposta, à medida que se aumentou a concentração de lactato. Os resultados convergem com as observações de Gonçalves e colaboradores (2003) quando afirmaram que há uma concentração crítica de lactato acima da qual ocorre inibição do crescimento.

Segundo Bibal e colaboradores (1989), as bactérias produtoras de ácido láctico apresentam um intervalo amplo no valor da concentração de ácido láctico inibitória, que é dependente do meio e das condições de cultivo, ainda que se trate da mesma linhagem.

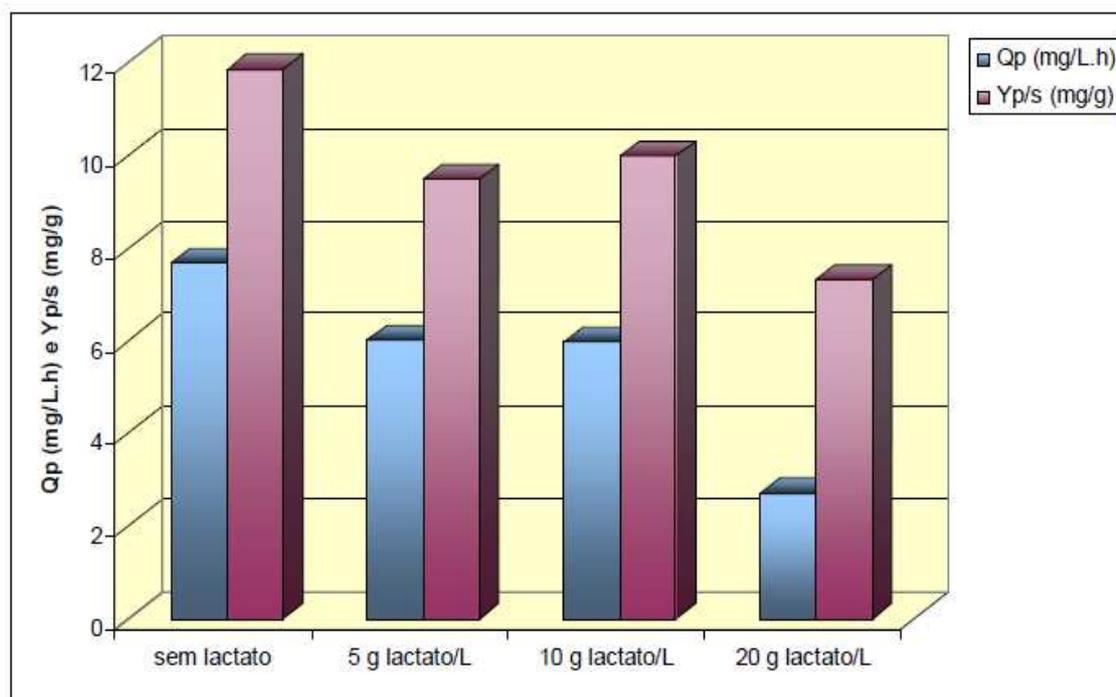


Figura 5.14.  $Q_p$  e  $Y_{p/s}$  em meio Catlin modificado com 5 g/L, 10 g/L e 20 g/L de lactato inicial em biorreator. Número de repetições: 02.

Os resultados discutidos nesta seção sugerem que não só o lactato externo provoca inibição, mas principalmente o lactato produzido pelas células. Muito provavelmente tal fenômeno está relacionado ao mecanismo de inibição da via glicolítica por retro-alimentação ou inibição por *feed-back*.

### 5.2.5 Influência da adição de colina no crescimento

*Streptococcus pneumoniae* possui uma característica especial para o seu crescimento que é a exigência de adição de colina. Este aminoálcool é incorporado no ácido teicóico e lipoteicóico que estão ligados a peptidoglicana e a membrana plasmática respectivamente (YOTHER, 2004). Considerando que a produção do polissacarídeo é associada ou parcialmente associada ao crescimento, buscou-se avaliar a influência da adição de colina no crescimento de pneumococos. As concentrações de colina selecionadas para este estudo, 5g/L e 20g/L, foram as reportadas na literatura como adequadas para suprimir a lise de *S. pneumoniae* (STORAÏ, 2008, GARCÍA *et al.*, 1999). O intuito de se evitar a lise celular visa

trabalhar em sistemas por um maior período de tempo, como é o caso de fermentações contínuas. Neste grupo de experimentos, o alvo principal foi a avaliação de crescimento. Nas figuras 5.15, 5.16 e 5.17 estão apresentados os perfis cinéticos de crescimento celular, consumo de glicose e formação de lactato, respectivamente.

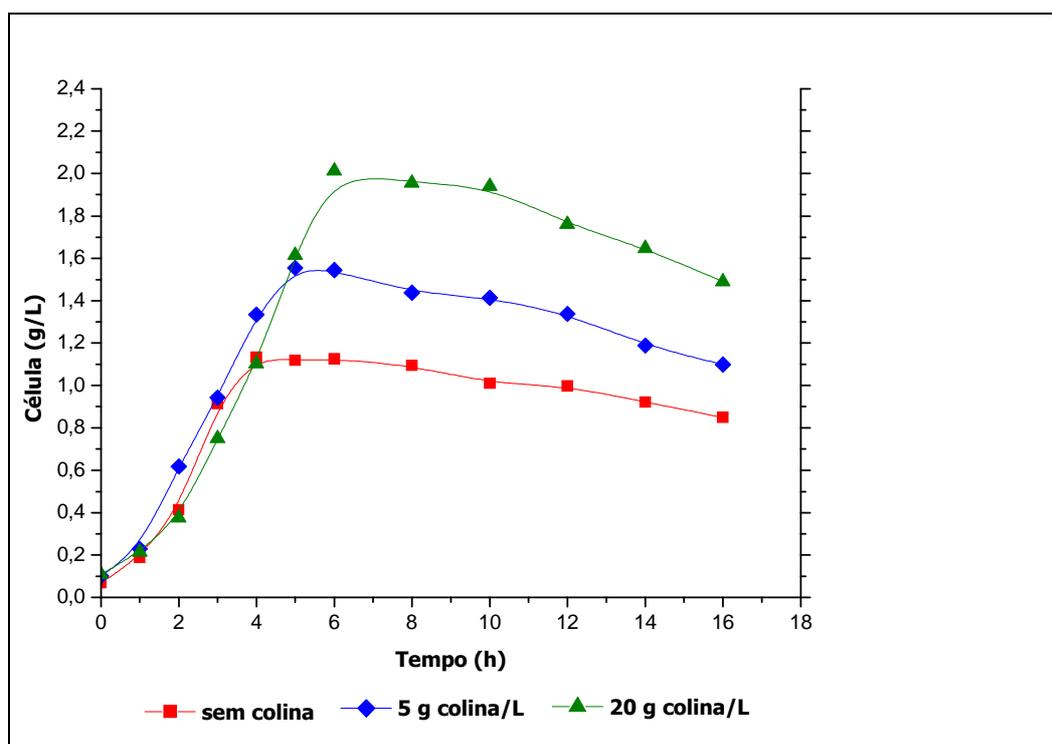


Figura 5.15. Perfil cinético de crescimento em meio Catlin modificado sem e com 5 g/L e 20 g/L de colina inicial em biorreator. Número de repetições: 02.

O tempo de cultivo no qual se observa o início da lise celular foi maior, à medida que se aumentou a concentração de colina. Embora o percentual de lise das células não tenha apresentado diferenças acentuadas, com valor em torno de 25% para os três experimentos, foi observado um maior crescimento quando se adicionou colina aos meios, de modo similar ao reportado por Storaï (2008) para os sorotipos 4, 5, 8, 20 e 33F. O aumento percentual da concentração de células foi de cerca de 40% e de 80%, para as concentrações de colina de 5 g/L e 20 g/L, respectivamente. Adicionalmente, é possível que, além da glicose, a colina possa ter sido utilizada como fonte de carbono adicional.

Em relação à lise, os resultados contrariam as expectativas de que concentrações de colina entre 5 e 20 g/L seriam suficientes para prevenir a lise celular, conforme

relatado para alguns sorotipos (STORAĪ, 2008, GARCÍA *et al.*, 1999). No entanto, Storaĭ (2008), trabalhando com 30 g/L de glicose e 5 g/L de colina, verificou que houve inibição da lise celular apenas para os sorotipos 2, 5 e 8. No caso dos sorotipos 20 e 33, que, em meio sem adição de colina, apresentavam altas taxas de lise celular, ocorreu uma lise muito discreta. Comparando com os resultados do presente estudo, pode-se afirmar que o efeito protetor da colina em relação à lise é dependente do sorotipo e das condições de cultivo.

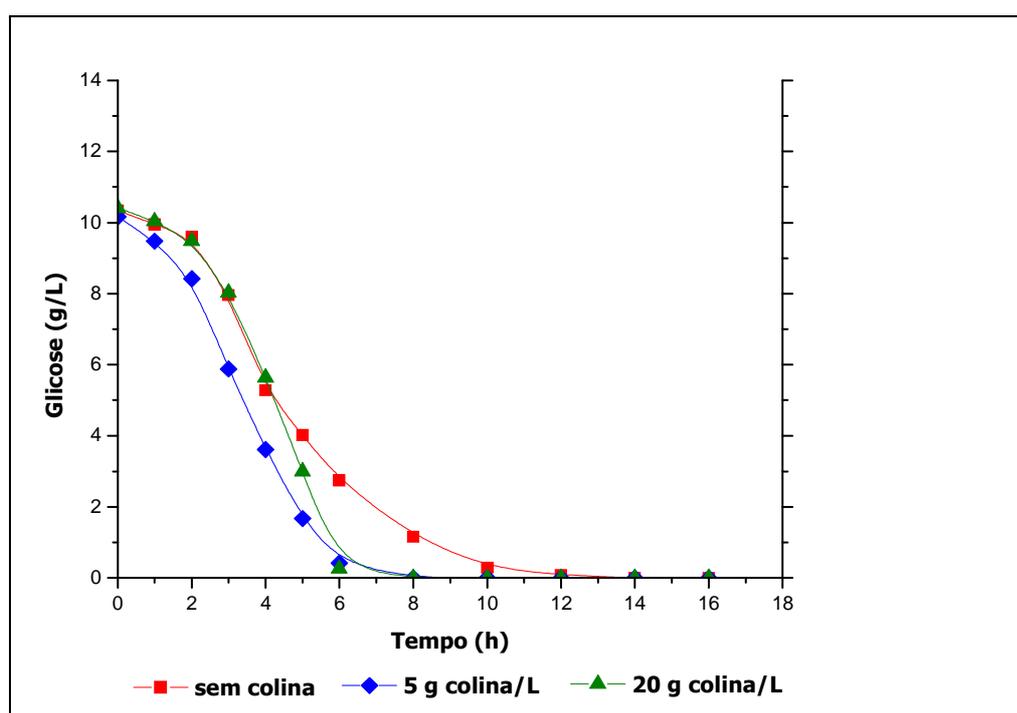


Figura 5.16. Perfil cinético de consumo de glicose em meio Catlin modificado sem e com 5 g/L e 20 g/L de colina inicial em biorreator. Número de repetições: 02.

As curvas de consumo de glicose mostradas na figura 5.16 evidenciam que nos meios em que se adicionou colina, o consumo total se deu em 8 horas de cultivo, ao passo que sem adição de colina, o consumo total se deu em 12 horas. Isto evidencia que a colina acarretou um aumento da taxa de consumo de glicose.

Em que pesem as diferenças verificadas tanto para o crescimento como para o consumo de glicose, no caso da produção de lactato (5.17), as curvas são praticamente superpostas, indicando que a colina não interferiu na sua produção. Cabe ainda destacar que não foram reportados na literatura trabalhos com a avaliação da influência da adição de colina no consumo de glicose e produção de lactato, não só para o sorotipo 14, como também para outros sorotipos.

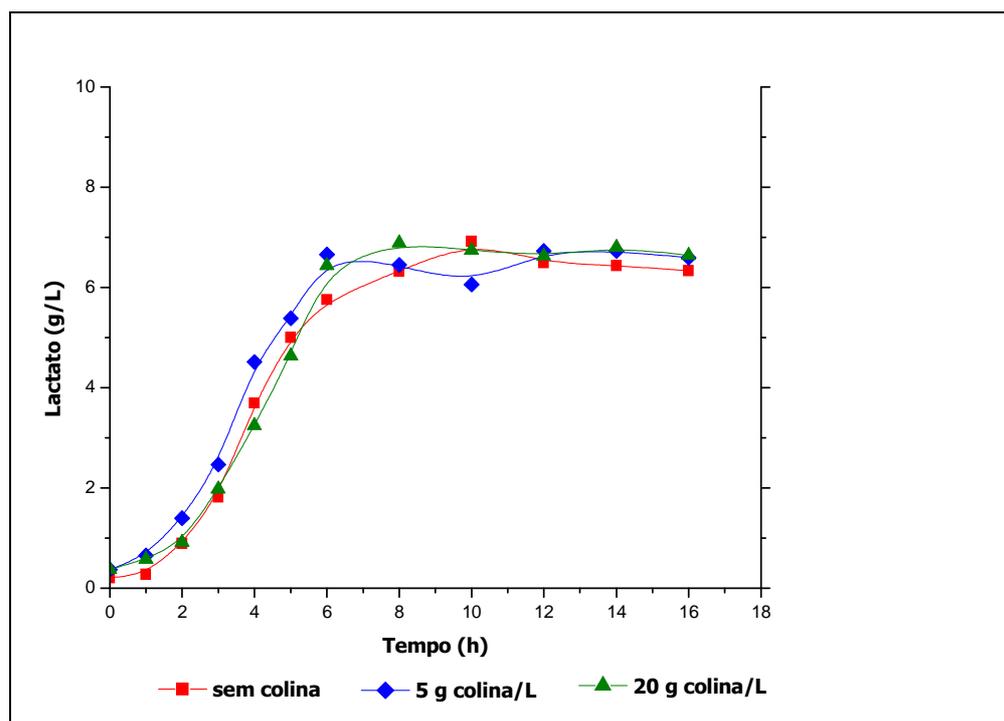


Figura 5.17. Perfil cinético de formação de lactato em meio Catlin modificado sem e com 5 g/L e 20 g/L de colina inicial em biorreator. Número de repetições: 02.

### 5.3 BIOPROCESSO CONDUZIDO EM BATELADA ALIMENTADA

Conforme apresentado anteriormente, à exceção dos experimentos sem controle de pH, sempre ocorreu consumo total de glicose. Com o intuito de estender o bioprocesso de forma a produzir mais polissacarídeo, foram realizados experimentos em batelada alimentada nas seguintes condições: alimentação com pulsos de glicose, alimentação com pulso de glicose e acetato e alimentação contínua com meio adicionado de colina. Em bioprocessos, de um modo geral, utiliza-se a adição de glicose quando este substrato é totalmente consumido. No entanto, as estratégias empregadas nos experimentos não seguiram esta regra prática. Optou-se por realizar a adição de glicose antes da fase de declínio da concentração de células, já que, nesta fase, é de se esperar que as células ainda não estejam em condição de estresse causado por carência de nutrientes.

### 5.3.1 Batelada com pulso de glicose

Os experimentos realizados em duplicata foram conduzidos em biorreator de bancada, nas condições descritas no item 4.6.2. Para evitar variação no volume de meio, na alimentação empregou-se uma solução concentrada de glicose (50% p/v). A adição foi realizada no tempo de cultivo de 5,5 horas, tempo este próximo ao ponto de máximo de concentração de células, conforme o resultado obtido na batelada simples com controle de pH (item 5.2.1.2). O volume de solução de alimentação a ser adicionado foi calculado de modo que a concentração de glicose no meio voltasse ao valor inicial de 10 g/L. Como já informado, pelo fato de a solução de alimentação ser muito concentrada, a variação de volume no biorreator após a alimentação (20 mL) foi desprezível, face ao volume de meio (1,5 L). As curvas cinéticas são apresentadas no gráfico da figura 5.18.

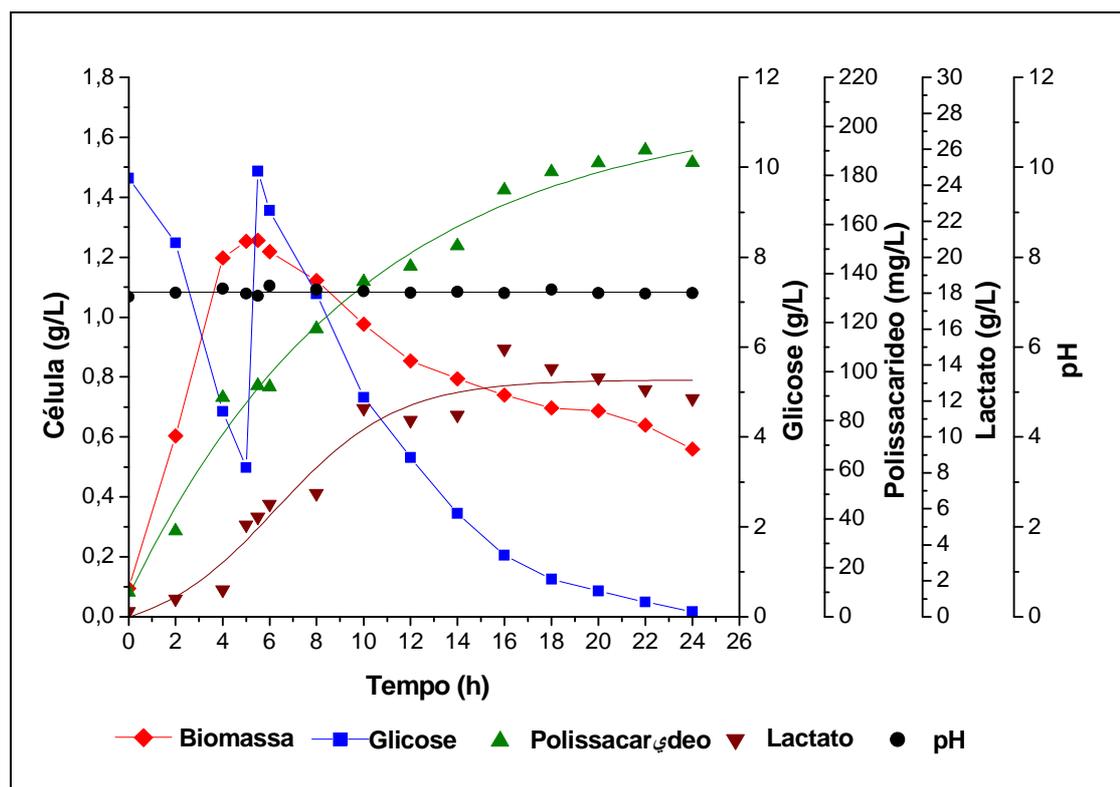


Figura 5.18. Perfil cinético de crescimento, produção de polissacarídeo, consumo de glicose e formação de lactato em meio Catlin modificado biorreator com controle de pH, com pulso de glicose em 5,5h.

Para esta modalidade de operação do biorreator, verificou-se que o consumo total de glicose ocorreu em 24 horas de cultivo. Neste tempo a concentração de polissacarídeo atingiu 190 mg/L e produção de lactato em torno de 14 g/L. Assim como ocorreu nos experimentos anteriores, observa-se o início da lise celular quando a concentração de lactato produzido atinge um valor da ordem de 6 g/L, corroborando a hipótese de que, para este sorotipo, parece que este valor de concentração de lactato dispara algum mecanismo de autólise. As variáveis de resposta estão apresentadas na tabela 5.6

Tabela 5.6 Resultado das variáveis de resposta para cultivo de *S. pneumoniae* empregando meio de Catlin modificado com controle de pH e pulso de glicose

Variável de resposta	Tempo de cultivo (h)		
	6	16	24
$Q_p$ (mg/L.h)	13,96	10,25	7,30
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,142	-	-
$Y_{P/X}$ (mg/g)	74,44	145,80	155,75
$Y_{P/S}$ (g/g)	10,60	10,53	10,40
$Y_{L/S}$ (g/g)	0,756	0,848	0,704
P (mg/L)	93,74	174,03	185,22

$Q_p$ : Produtividade volumétrica;  $Y_{P/S}$ : Fator de rendimento de produção de polissacarídeo;  $Y_{X/S}$ : Fator de rendimento para crescimento celular;  $Y_{P/X}$ : Fator de rendimento para produção de polissacarídeo e crescimento celular;  $Y_{L/S}$ : Fator de rendimento para formação de lactato; P: Concentração de polissacarídeo.

A produtividade volumétrica em 16 horas de cultivo foi 34% maior quando comparada com o experimento em batelada com controle de pH. Os fatores de conversão de glicose em produto não sofreram alteração ao longo do processo. No entanto, o rendimento de substrato em polissacarídeo foi inferior ao alcançado no processo em batelada. Isto pode ser atribuído ao fato de que este ponto é imediatamente posterior ao pulso e, neste momento, as células provavelmente ainda estavam se aclimatando à oferta maior de substrato, não respondendo de modo imediato no tocante à produção de polissacarídeo. A curva de produção de polissacarídeo (Figura 5.18) mostra que, em 6 horas, não houve alteração da concentração quando comparada ao ponto anterior.

### 5.3.2 Batelada com pulso de glicose e acetato de amônio

Neste experimento foi realizado um pulso de glicose (50% p/v) e acetato de amônio (46,2% p/v) em 4 horas de cultivo. A antecipação da adição em relação ao experimento anterior foi feita em um ponto da curva anterior ao valor máximo de crescimento celular, ou seja, anterior a fase estacionária. Desta forma, se esperou realizar o pulso durante a fase exponencial, na qual o cultivo apresenta maior atividade. De acordo com a literatura, semelhante ao que ocorre com outras bactérias lácticas, o acetato poderia ser utilizado pelo micro-organismo, desviando o metabolismo da glicose para a produção do polissacarídeo (CARMO, 2010). Hoeprich (1955) verificou que átomos de carbono marcado provenientes do acetato foram incorporados ao polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 2. A figura 5.19 mostra os perfis cinéticos do cultivo com pulso de glicose e acetato de amônio.

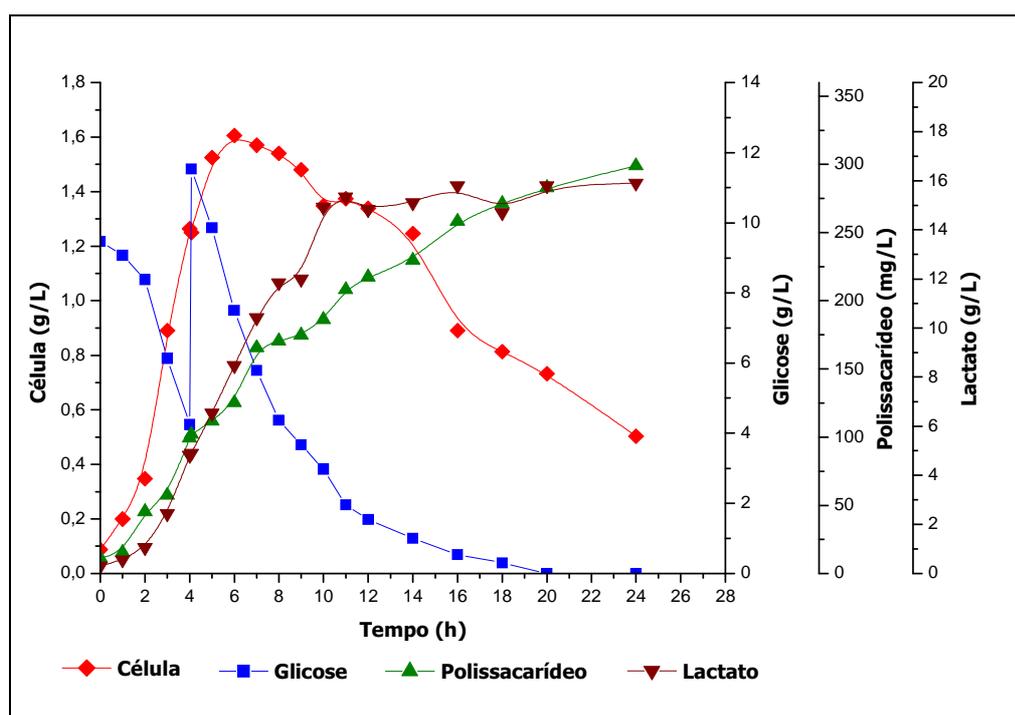


Figura 5.19. Perfil cinético de crescimento, produção de polissacarídeo, consumo de glicose e formação de lactato em meio Catlin modificado biorreator com controle de pH, com pulso de glicose e acetato de amônio em 4h.

Pode-se observar na figura 5.19 que o pulso não foi capaz de evitar a lise celular. O lactato parou de ser formado em 10 horas, apesar de ainda existir glicose presente no meio. A concentração máxima de polissacarídeo foi em torno de 300

mg/L e  $\mu = 0,929 \text{ h}^{-1}$ , que estão na mesma ordem de grandeza do valor encontrado por Carmo (2010) empregando o sorotipo 6B em meio complexo com pulso de glicose e acetato que foi de 389,3 mg/L e  $1,02 \text{ h}^{-1}$  respectivamente.

As variáveis de resposta estão apresentadas na tabela 5.7. O fator de conversão de substrato em produto foi maior em todos os tempos de cultivo analisados quando comparado com experimento com pulso de glicose, provavelmente por conta da antecipação em 1,5 horas na adição da glicose e acetato de amônio, corroborando a hipótese que a adição deve ser feita antes do cultivo atingir a fase estacionária.

Tabela 5.7 Resultado das variáveis de resposta para cultivo de *S. pneumoniae* empregando meio de Catlin modificado com controle de pH e pulso de glicose e acetato de amônio.

Variável de resposta	Tempo de cultivo (h)		
	6	16	24
$Q_P$ (mg/L.h)	19,0	15,44	18,0
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,164	-	-
$Y_{P/X}$ (mg/g)	75,10	162,75	189,61
$Y_{P/S}$ (g/g)	12,34	15,25	17,17
$Y_{L/S}$ (g/g)	0,884	0,957	0,932
P (mg/L)	125,20	258,26	299,03

O valor da produtividade volumétrica em de 6 horas de cultivo foi próximo do valor encontrado em 24 horas (tabela 5.7). No entanto, em 24 horas a concentração de polissacarídeo foi 2,4 vezes maior e verifica-se uma redução na concentração de células de 68,7%, por conta da autólise, o que do ponto de vista do processo de purificação é uma abordagem interessante. O aumento na concentração de polissacarídeo deve-se, provavelmente, as células que ainda estão viáveis e continuam produzindo polissacarídeo e a sua liberação por aquelas que já sofreram lise. Em 16 horas, a lise é de 44,6% e uma concentração de polissacarídeo de 258,26 mg/L, cerca de 13,6% (40,77 mg/L) inferior quando comparado com o tempo de 24 horas. A adição do acetato de amônio influenciou de forma positiva na produção do polissacarídeo propiciando um aumento de 62% na concentração quando comparado com o experimento somente com pulso de glicose e de 220% em relação à batelada simples.

Do ponto de vista industrial o tempo ideal de coleta do cultivo deve levar em conta o ganho em concentração de produto durante aquele período, o tempo de limpeza, preparo e ocupação do biorreator. O polissacarídeo se trata de um produto de alto valor agregado, cujo valor está em torno de R\$ 12/mg (ATCC, 2011). De um modo geral os biorreatores utilizados na sua produção possuem um volume útil menor, na ordem de centenas de litros, em relação a produtos de baixo valor agregado, cujo volume está na casa de milhares de litros.

A empresa Sanofi-Pasteur utiliza um biorreator com 1800L de meio (STORAÏ, 2008) na produção de polissacarídeo para a formulação da vacina 23-valente de pneumococos (25 µg de cada polissacarídeo/dose). Tomando como base o volume útil de 1800 L, se o cultivo fosse coletado em 16 horas estar-se-ia deixando de produzir 2.935.440 doses no caso da vacina polissacarídica. Já para a vacina conjugada como, por exemplo, a 7 valente da Wyeth, em que se utiliza 2 µg de cada polissacarídeo seriam 36.693.000 doses. Para se ter idéia do que isto significa em termos de vacinação da população, de acordo com o Censo 2010 (IBGE, 2011), a população brasileira abaixo de 4 anos é de cerca de 14 milhões, dos quais 2,3 milhões estão entre 0 e 1 ano, faixa etária alvo da vacina conjugada.

O exercício de cálculo simulado feito acima indica que, na pior das hipóteses, em havendo perdas da ordem de 50% nas etapas de purificação, 18 milhões de doses seriam suficientes para cobrir o calendário de vacinação para a faixa etária de 0-1 ano, cuja recomendação são três doses, inclusive contemplando a dose reforço para crianças de 0-6 meses.

Esta projeção indica a importância de se definir o tempo de parada do bioprocessamento visando não se ter perdas potenciais de doses de vacinas. Aliado a isto, não se pode esquecer que quanto mais polissacarídeo é liberado para o meio, mais facilitada se torna a purificação, o que reforça a idéia de coleta no tempo de 24 horas, para o ensaio conduzido nas condições do presente estudo.

### 5.3.3 Batelada com alimentação constante

Com o intuito de estender o bioprocesso, sem que ocorresse declínio na concentração celular empregou-se o meio contendo colina na concentração em que se alcançou um maior crescimento celular, 20 g/L conforme apresentado no item 5.2.4. O volume inicial de meio foi 1,0 L e optou-se realizar a alimentação com meio completo duas vezes concentrado contendo 40 g/L de glicose, visando ter um maior tempo de alimentação, além de minimizar a limitação de algum nutriente durante o processo e desta forma, promover um maior crescimento e uma maior quantidade de polissacarídeo. A alimentação foi iniciada em 5 horas de cultivo, considerando que neste tempo ainda não havia alcançado o crescimento celular máximo, conforme foi observado no item 5.2.4. A vazão de alimentação foi constante e igual a 142,8 mL/h até completar o volume de 1,5 L. Na figura 5.20 estão apresentados os perfis cinéticos do bioprocesso.

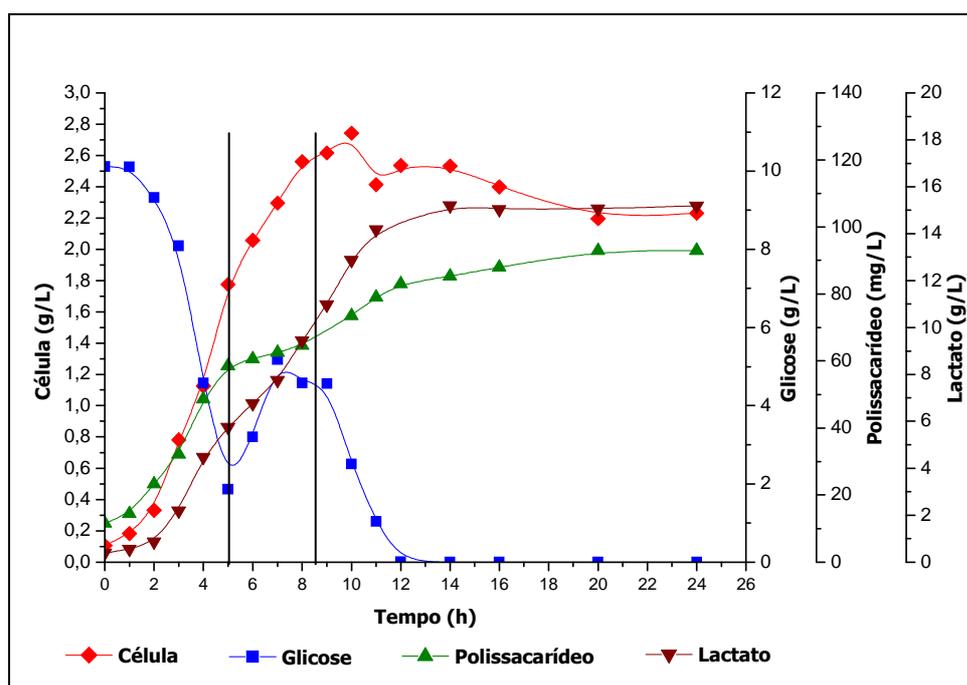


Figura 5.20. Perfil cinético de crescimento, produção de polissacarídeo, consumo de glicose e formação de lactato em meio Catlin modificado biorreator contendo 20 g/L colina, controle de pH e alimentação com vazão constante de 142,8 mL/h de meio (40 g/L glicose e 2 vezes concentrado nos demais insumos) em 5h de cultivo.

Observa-se na figura 5.20 uma diminuição da concentração de células após 10 horas de cultivo que pode ser atribuída a uma lise discreta de 18,7 %, e não a um

efeito de diluição porque neste tempo já havia encerrado a alimentação de meio. A glicose foi totalmente consumida em 12 horas e o lactato parou de ser formado em 10 horas de cultivo. Em 24 horas de cultivo a massa de polissacarídeo foi 139,43 g, duas vezes maior do que a encontrada no tempo de 6 horas e somente 10% superior ao tempo de 16 horas. A curva da concentração de glicose apresentou o perfil típico de batelada alimentada com vazão constante, onde se verifica no gráfico uma região característica de oferta de substrato maior do que o consumo, acarretando acúmulo de glicose.

Na tabela 5.8 estão apresentados os resultados das variáveis de resposta. Pode-se verificar que a produtividade volumétrica em 24 horas de cultivo com adição de colina (20 g/L) foi 5 vezes menor quando comparada com o ensaio com pulso de glicose e acetato de amônio. Isto pode ser provavelmente atribuído ao fato de que grande parte do polissacarídeo está preso a célula, conforme reportado por Gogola (2011). Conseqüentemente isto também acarretou um nítido decréscimo dos fatores de conversão  $Y_{P/X}$  e  $Y_{P/S}$  quando comparados às bateladas alimentadas com pulso de glicose e glicose-acetato. Como a produção/liberação de lactato não é afetada pela ocorrência ou não de lise, o fator  $Y_{L/S}$  foi da mesma ordem de grandeza.

Tabela 5.8. Resultado das variáveis de resposta para cultivo de *S. pneumoniae* empregando meio de Catlin modificado contendo 20 g/L colina, com controle de pH e alimentação com vazão constante de meio (40 g/L glicose e 2 vezes concentrado nos demais insumos)

Variável de resposta	Tempo de cultivo (h)		
	10	16	24
$Q_P$ (mg/L.h)	6,57	5,02	3,55
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,152	-	-
$Y_{P/X}$ (mg/g)	24,60	30,03	32,25
$Y_{P/S}$ (g/g)	3,74	3,97	3,50
$Y_{L/S}$ (g/g)	0,719	0,736	0,743
P (mg/L)	73,49	88,01	92,96

A concentração de colina interfere na forma com que a bactéria cresce. Segundo Yother e colaboradores (1998) em baixas concentrações (0,005 g/L) deste

nutriente essencial, a separação das células de pneumococos ocorre de forma normal, em diplococos ou pequenas cadeias. A figura 5.21 mostra que a adição de 20 g/L de colina promoveu o crescimento de *S. pneumoniae* em cadeias longas, por conta da inibição da lise que é promovida pela autolisina, e este fenômeno também foi verificado por Briese e Hakenbeck (1985). No trabalho de Giudicelli e Tomasz (1984), os autores demonstraram que a colina livre ocupa os mesmos sítios que permitem que a enzima reconheça e interaja com a colina ligada ao ácido teicóico, minimizando desta forma a lise celular.



Figura 5.21. Microscopia óptica (aumento de 100 x) de células em 24 horas de cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 113/95. Meio de Catlin modificado contendo 20 g/L colina, com controle de pH e alimentação com vazão constante de meio (40 g/L glicose e 2 vezes concentrado nos demais insumos).

Gogola (2011), cultivando outra cepa do sorotipo 14 em meio sintético contendo 0,5 g/L de colina, verificou que cerca de 80% do polissacarídeo fica preso à célula. E que a adição de colina nesta concentração apresentou pouco efeito na concentração de polissacarídeo livre. No trabalho de Storaï (2008), a autora verificou que a adição de colina na concentração de 5 g/L provoca um aumento na produção de polissacarídeo total (livre e preso à célula) após purificação e que difere entre os sorotipos. Para o sorotipo 33, este aumento foi de três vezes. É importante ressaltar que Storaï (2008) quantificou o polissacarídeo total (livre e preso à célula), realizando a purificação, que compreende uma etapa de lise celular. Nesse caso, era de se esperar que a concentração fosse maior. No presente estudo foi quantificado o

polissacarídeo livre, logo não se pode afirmar nada em relação ao polissacarídeo retido.

No processo de produção industrial deve-se avaliar se a introdução de uma etapa de lise das células para liberação do polissacarídeo durante o processo de purificação é vantajosa, ou seria melhor optar por um processo em que a lise ocorra durante o bioprocessamento. De fato é uma questão que se prende a uma análise de viabilidade econômica mais apurada, uma vez que, de forma geral, em processos industriais a adição de etapas significa aumento de custos de capital e operacional.

#### 5.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A figura 5.22 mostra a evolução dos estudos realizados na presente tese de doutorado, as concentrações de polissacarídeo ao final do bioprocessamento e um panorama geral da produtividade volumétrica em todos os experimentos realizados (Figura 5.23). Para efeito de ilustração, a figura 5.24 mostra o polissacarídeo de *S. pneumoniae* parcialmente purificado conforme protocolo descrito em Jin *et al.*, (2009), proveniente do ensaio batelada com pulso de glicose e acetato de amônio.

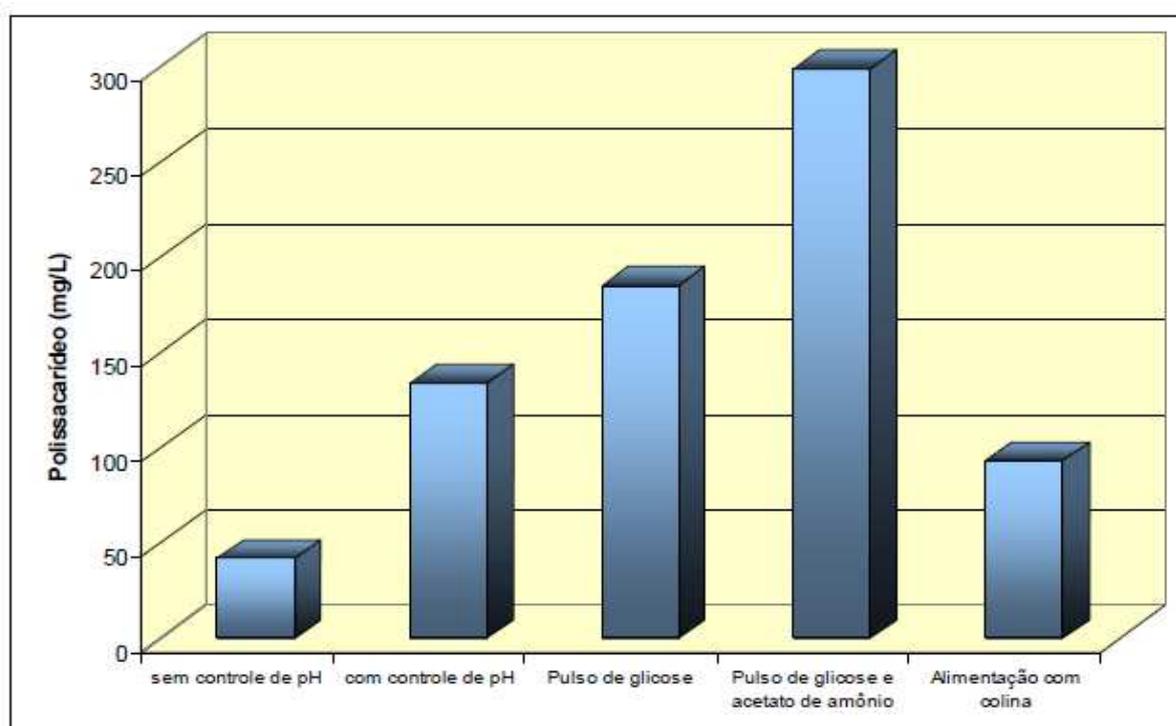


Figura 5.22. Histograma comparativo dos valores da concentração do polissacarídeo nos cultivos no final do processo.

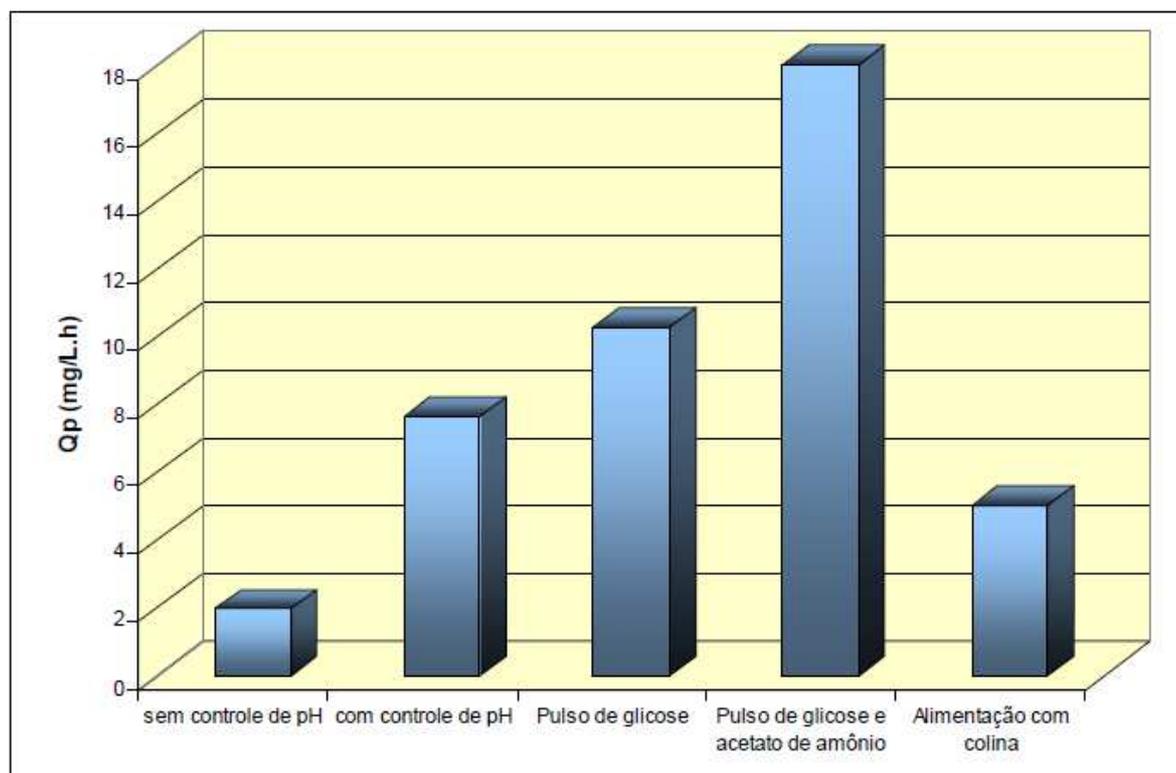


Figura 5.23. Histograma comparativo dos valores da produtividade volumétrica nos cultivos no final do processo



Figura 5.24. Amostra de polissacarídeo parcialmente purificado de *S. pneumoniae* sorotipo 14 cepa 113/95 em batelada com pulso de glicose e acetato de amônio

Quando se compara o melhor resultado encontrado neste trabalho com os dados disponíveis na literatura (Tabela 5.9) verifica-se que a concentração de polissacarídeo obtida se encontra na mesma ordem de grandeza dos dados reportados na literatura. Entretanto, deve-se ressaltar a diversidade de linhagens de sorotipos, de meios e de modo operacional do biorreator.

Tabela 5.9 Dados disponíveis na literatura para o cultivo de *S. pneumoniae* em biorreator.

Referência	Sorotipo	Meio/condução do processo	Concentração de polissacarídeo máxima (mg/L)
Gonçalves <i>et al.</i> , 2002	23F	Meio de Hoeprich modificado com extrato de levedura/batelada com pulso de glicose e acetato de amônio	240
Cruz-Leal <i>et al.</i> , 2006	23F	Meio de Hoeprich/batelada	275
Storaï, 2008	8	Meio de Hoeprich com 5 g/L de colina/batelada	480 <sup>1</sup>
Storaï, 2008	33F	Meio de Hoeprich com 5g/L de colina/batelada	650 <sup>1</sup>
Jin <i>et al.</i> , 2009	3	BHI/batelada	255
Macha <i>et al.</i> , 2010	3	Meio de Holt com peptona de soja (Hisoya)/batelada	520
Macha <i>et al.</i> , 2011	6B	Meio de Holt com peptona de soja (Hisoya)/batelada	550
Carmo, 2010	6B	Meio de Hoeprich modificado com extrato de levedura/batelada com pulso de glicose e acetato de amônio	400
Gogola, 2011	14 (linhagem 5287)	Meio de Hoeprich modificado com extrato de levedura batelada	275
Presente trabalho	14 (linhagem 113/95)	Meio de Catlin modificado com extrato de levedura/batelada com pulso de glicose e acetato de amônio	300

<sup>1</sup> Valor da concentração de polissacarídeo total

Ainda em relação aos valores listados na tabela 5.9, o maior valor encontrado se refere à quantificação de polissacarídeo total (livre e retido) e, como já mencionado, o presente estudo quantificou a concentração de polissacarídeo livre. Os trabalhos listados na tabela representam todos os reportados na literatura para o estudo cinético e/ou cultivo de *S. pneumoniae*, o que indica a grande escassez de informação. O bioprocessamento em estudo envolve não só a obtenção de uma molécula complexa, como também um metabolismo que não está completamente elucidado. Para o leitor, certamente durante o texto surgiram algumas questões que, atualmente, ainda não tem explicação reportada. Segundo Yother (2011) identificar todos os mecanismos que regulam a síntese da cápsula representará um grande avanço na compreensão desse processo tão intrincado.

Em que pesem as reflexões apontadas e a tentativa de compreender a fenomenologia do processo e o papel das variáveis que nele influenciam, a presente tese tem, na ótica da autora, uma contribuição que não é quantificável, mas que representa um grande avanço na geração de conhecimento, que é o estabelecimento de competência tecnológica.

Para entender o que isto significa, deve ser feita uma breve análise da trajetória para o desenvolvimento de uma vacina, que percorre as seguintes etapas até a sua comercialização (BOMTEMPO E BAETAS, 2005):

- (1) Pesquisa básica,
- (2) Pré-desenvolvimento,
- (3) Desenvolvimento da vacina candidata e estudos pré-clínicos,
- (4) *Scale up*, produção de lotes-piloto e aprovação para estudos clínicos e
- (5) Estudos clínicos – segurança, imunogenicidade, eficácia e pós-comercialização

Por conta disso, o tempo para o desenvolvimento de uma vacina é em média de 15 anos para ser introduzida no mercado. Atualmente, as vacinas são produtos de alto valor agregado e aparecem no mercado mundial com altas perspectivas de rentabilidade financeira para os grandes produtores mundiais (WHO, UNICEF, 2009). Desta forma, o setor, cada vez mais, se torna fortemente competitivo. Produtos obtidos rapidamente, com custo apropriado, que utilizem tecnologia de

ponta na sua produção, que cubram várias doenças, com baixos eventos adversos e alta reatividade cruzada são os mais interessantes neste mercado. Além disso, o aumento da expectativa de vida em países de economias emergentes e o aumento significativo da população mundial contribuem para o surgimento de novos mercados para o desenvolvimento de vacinas *tailor made* com aplicações específicas a determinados quadros epidemiológicos.

Ainda de acordo com Bomtempo e Baetas (2005), no Brasil existem vários grupos envolvidos com a pesquisa e desenvolvimento em vacinas, sendo a maior percentagem destes grupos voltados para as etapas básicas do desenvolvimento (etapas 1 e 2), quando comparado com as etapas finais. Estas por sua vez (etapas 3, 4 e 5), além de possuírem grupos menos numerosos, também possuem níveis de competências mais baixos, principalmente nas etapas de *scale up* e estudos clínicos. Portanto, o investimento na formação de recursos humanos é estratégico, na busca de um alto nível de desenvolvimento de processos biotecnológicos, incluindo pessoal com doutorado em desenvolvimento tecnológico e com formação para tratar as etapas de engenharia dos processos. Os resultados apresentados por estes autores remetem a questão de que grandes produtores nacionais de imunobiológicos, como Bio-Manguinhos, precisam de uma estratégia bem estruturada para absorção de profissionais e competências geradas pelo desenvolvimento de alternativas tecnológicas, aplicadas a processos biotecnológicos. Principalmente, se este desenvolvimento se aplica exatamente nas etapas de otimização de processos, *scale-up* e/ou obtenção de produtos candidatos a testes clínicos.

A competência gerada, por trabalhos como esta presente tese, se torna disponível para aplicação imediata na obtenção de moléculas polissacarídicas de origem bacteriana e consolida a formação de massa crítica na Instituição pública. Estes fatores contribuem para a competitividade dos produtos gerados por desenvolvimento tecnológico e divulgação do perfil institucional não só de absorção de tecnologias (transferências de tecnologias), mas também como parceiro para desenvolvimento conjunto com principais grupos internacionais.

A despeito da mudança de objetivos deste trabalho a partir da transferência de tecnologia da vacina 10 valente da GSK contra o pneumococo, o trabalho aqui

apresentado traz inovações de processos que não haviam sido implementados em Bio-Manguinhos até agora. A constatação do aumento significativo de produtividade volumétrica do polissacarídeo do sorotipo 14, em batelada alimentada, cria a perspectiva de estudo deste processo ou evolução para uso de cultivos contínuos na produção de cápsula bacteriana de outros micro-organismos. Vacinas conjugadas contra doenças causadas por bactérias encapsuladas têm sido largamente aplicadas em todo o mundo. A diminuição do tempo de produção destas moléculas pelo emprego destas formas de condução de processo fermentativo, podem contribuir para otimização do uso de equipamentos e áreas físicas disponíveis na instituição aumentando a capacidade produtora de Bio-Manguinhos, o que pode criar novas oportunidades de negócio no mercado de vacinas.

## Capítulo 6

# CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 6.1 CONCLUSÕES

O presente estudo não se pretende definitivo acerca do desenvolvimento do processo em estudo. Ao contrário, como toda pesquisa exploratória, pode se constituir em uma base para desenvolvimentos futuros, não só do polissacarídeo do sorotipo 14 de *S. pneumoniae*, como de outros sorotipos.

Algumas conclusões foram apresentadas ao longo do texto e no final do capítulo 5. Não obstante, essas conclusões não extinguem a discussão e reflexão acerca do tema, cabendo a esse capítulo um complemento, baseado nas deduções lógicas, fundamentadas nos textos apresentados e nos resultados decorrentes da pesquisa.

- ✓ No que diz respeito à escolha do meio de cultivo de *S. pneumoniae* para uma maior produção de cápsula, o meio de Catlin modificado se mostrou, dentre os meios avaliados a melhor opção. A sua escolha se deveu pelo motivo de ter levado a uma boa produção aliada ao fato de que o mesmo não contém

em sua composição substâncias potencialmente interferentes na etapa de purificação.

- ✓ O tempo de coleta no 1º pré-cultivo para as linhagens 172/97, 168/94 e 113/95 foi quatro, três e cinco horas respectivamente. Com relação 2º pré-cultivo o tempo de coleta foi o mesmo para todas as linhagens, sendo de três horas. A escolha se deu no tempo anterior à fase estacionária de crescimento, de modo a se trabalhar com células com alta atividade metabólica
- ✓ A cepa 113/95 foi a que levou aos melhores resultados em cultivo em frasco agitado com o meio Catlin modificado. As variáveis de resposta produtividade volumétrica, rendimento de substrato em polissacarídeo foram superiores às alcançadas pelas demais cepas estudadas.
- ✓ No processo conduzido em biorreator, o controle de pH foi uma condição importante no bioprocessamento, levando ao aumento tanto de concentração de polissacarídeo como da produtividade volumétrica, em comparação ao processo sem controle de pH
- ✓ A manutenção de atmosfera de nitrogênio não se mostrou uma boa estratégia para o cultivo, tendo em vista que as variáveis de resposta apresentaram valores inferiores aos obtidos no processo em que não se adotou este procedimento.
- ✓ Para o intervalo de concentrações estudadas, o planejamento experimental realizado, não apontou influência significativa do binômio glicose x nitrogênio na principal variável de resposta que é a produtividade volumétrica. Nas condições do estudo, foi verificada somente a influência linear da concentração de nitrogênio, para um intervalo de confiança com restrição relativamente ampla de 90%.
- ✓ No tocante à influência do lactato, os resultados sugerem que não só o lactato externo provoca inibição, mas principalmente o lactato produzido pelas células. As variáveis de resposta produtividade volumétrica e fator de conversão de substrato em produto diminuíram à medida que se aumentou a concentração de lactato externo. O processo foi fortemente inibido com a adição de lactato externo em concentração de 20 g/L

- ✓ A adição de colina ao meio favoreceu o crescimento, porém os resultados sugerem que houve um certo efeito protetor dessa substância, levando a uma minimização da lise celular.
- ✓ Nas bateladas alimentadas com pulso de glicose e glicose-acetato foram atingidos maiores valores das variáveis, com destaque para a alimentação de glicose-acetato, na qual a concentração de polissacarídeo atingiu **300mg/L**, com produtividade volumétrica de **18mg/L.h**, sendo tais valores os maiores atingidos no presente estudo. Já na alimentação com vazão constante de meio contendo colina ocorreu uma redução na produtividade.
- ✓ As estratégias estudadas e adotadas para o desenvolvimento deste bioprocessos levou a um aumento da concentração de polissacarídeo de **40mg/L** para **300mg/L**, indicando que os objetivos e metas traçados inicialmente foram atingidos.
- ✓ Empregando a linhagem 113/95, o meio de Catlin modificado e as condições de cultivo utilizadas, o pulso com glicose e acetato de amônio mostrou ser o melhor modo operacional do biorreator.

## 6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Conforme já mencionado ao longo do presente trabalho, ainda há muitos aspectos a serem estudados e avaliados. A seguir são listadas algumas sugestões para a continuidade do estudo, do ponto de vista do processo.

- ✓ Avaliar outras formas de condução de processo visando aumentar a densidade celular, considerando que o polissacarídeo é associado ao crescimento. O processo contínuo com reciclo de células se mostra uma opção interessante, que além das células retornarem ao biorreator, pode-se retirar o lactato produto inibitório do metabolismo.
- ✓ Empregar a metodologia desenvolvida para outros sorotipos que não estão contemplados na vacina 10 valente da GSK, e que possam vir a substituir os sorotipos vacinais, como por exemplo, o sorotipo 19A.
- ✓ Investir na purificação do polissacarídeo para avaliação da massa molecular das moléculas obtidas de modo a atenderem as especificações da OMS.

## Capítulo 7

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBA, S.; HUMPHREY, A. E.; MILLIS, N. F. **Biochemical Engineering**. 2.nd ed. University of Tokio Press, Tóquio, 1973. 434 p.

ANDERSEN, R. N.; GANESHKUMAR N.; KOLENBRANDER P. E. Cloning of the *Streptococcus gordonii* PK488 gene, encoding an adhesin which mediates coaggregation with *Actinomyces naeslundii* PK606. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 3, p. 981-987, 1993.

ANDERSSON, B.; BEACHEY, E. H.; TOMAS, Z. A.; TUOMANEN, E.; SVANBORG-EDÉN, C. A sandwich adhesion on *Streptococcus pneumoniae* attaching to human oropharyngeal epithelial cells in vitro. **Microb. Pathog.**, v. 4, p. 267-278, 1988.

APPELBAUM, P. C. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for drug selection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 1613–1620, 2002.

ATCC. Disponível em: <<http://www.atcc.org>>. Acesso em: 27 de nov. 2011.

AU, C. C.; EISENSTEIN, T. K. Nature of the cross-protective antigen in subcellular vaccines of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v.31, n. 1, p. 160-168, 1981.

AUSTRIAN, R. Pneumococcal infections. In: Germanier R. (ed.). *Bacterial Vaccines*. 1984. Acad Press, N Y, 257-288.

AUSTRIAN, R. and COLLINS, P. Influence of carbon dioxide in the isolation of pneumococci. **J. Bacteriol.**, v. 92, n. 5, p. 1281-1284, 1966.

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

AYMÉ, G.; DONIKIAN, R.; MYNARD, M. C.; LAGRANDEUR, G. Production and controls of serogroup A *Neisseria meningitidis*. Polysaccharide vaccine in Table ronde sur l'Immunoprophilaxie de la meningite cerebro-spinale, Le Mas D'Artigny 06570, Saint Paul da vence-France Foundation Merieux, Lyon. 4-30, 1973.

BAHLER, B. ; LEE, T. ; LOTVIN, J. A. ; RUPPEN, M. E. ; CHARBONNEAU, P. S. F. Separation of contaminants from *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide by pH manipulation. Patent No. US 7,718,791 B2. United States Patent, 2010.

BAROCCHI, M. A.; CENSINI, S.; RAPPUOLI, R. Vaccines in the era of genomics: The pneumococcal challenge. **Vaccine**, v. 25, p. 2963-2973, 2007.

BAYLEY, J. A. and OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamental**, 2 nd ed., McGraw-Hill, Inc., Nova York, 1986. 988 p.

BEREZIN, E. M. ; CARDENUTO, M. D.; FERREIRA, L. L.; OTSUKA, M.; GUERRA, M. L.; BRANDILEONE, M. C. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in nasopharyngeal carriage and invasive pneumococcal disease in São Paulo, Brazil. **Pediatric. Infect. Dis. J.**, v.26, n. 7, p. 643-645, 2007.

BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology. Section 12 Gram-positive cocci. p. 52, 1994.

BERGMAN, C.; CHI, F.; RACHID, S.; HAKENBECK, R. Mechanisms for penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Penicillin-binding cell wall metabolism. In: TUOMANEN, E. I. **The pneumococcus**. Washington, EUA: ASM Press, 2004. Cap. 3, p. 339-349.

BERRY, A. M.; ROBERT, A. L.; HANSMAN, D.; PATON, J. C. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 8, p. 2324-2330, 1989.

BERRY, A. M.; YOTHER, J.; BRILES, D. E.; HANSMAN, D. P.; PATON, J. C. Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 2037-2042, 1989.

BIBAL, B.; VAYSSIER, Y.; TOURNOU, M.; PAREILLEUX, A. Enhanced inhibitory effect of lactic acid on growth kinetics of *Streptococcus cremoris* during nutritional medium limitations. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, p. 630-635, 1989.

BIBAL, G.; GOMA, G.; VAYSSIER, Y.; PAREILLEUX, A. Influence of pH, lactose and lactic acid on the growth of *Streptococcus cremoris*: a kinetic study. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 4, n. 5, p. 340-344, 1988.

BIXLER, G. L.; PILLAI, S. The cellular basis of the immune response to conjugate vaccines. **Contrib. Microbiol. Immunol.**, v. 10, p. 18-47, 1989.

BLACK, S.; SHINEFIELD, H.; FIREMAN, B.; LEWIS, E.; RAY, P.; HANSEN, JR.; ELVIN, K.; ENSOR, K. M.; HACKELL, J.; SIBER, G.; MALINOSKI, F.; MADORE, D.; CHANG, I.; KOHBERGER, R.; WATSON, W.; AUSTRIAN, R.; EDWARDS, K. and the Northern California KAISER Permanente Vaccine Study Center Group. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 19, n. 187-195, 2000.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. M. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect. Dis.**, v. 4, p. 144-154, 2004.

BOMTEMPO, J. V.; BAETAS, R. B. G. Desenvolvimento de vacinas no Brasil: uma análise da potencialidade da P&D e das estratégias de inovação. In: Buss, P. M. ; Temporão, J. G.; Carvalheiro, J. R. **Vacinas, soros e imunizações no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2005. p. 215-244.

BRANDILEONE, M. C.; CASAGRANDE, S. T.; GUERRA, M. L.; ZANELLA, R. C.; ANDRADE, A. L.; DI FABIO, J. L. Increase in numbers of  $\beta$ -lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and impact of conjugate vaccine coverage. **J. Med. Microbiol.**, v.55, p. 567-574, 2006.

BRANDILEONE, M. C.; VIEIRA, V. S.; CASAGRANDE, S. T.; ZANELLA, R. C.; GUERRA, M. L.; BOKERMANN, S.; DE MORAES, J. C.; BALDACCI, E. R.; CHAMONE, C. B.; OLIVEIRA, M. A.; DE MATOS, D. G.; ARRUDA, T. M.; COELHO, M. F.; D'AVILA, S. M.; DOS SANTOS, A. R.; DI FABIO, J. L. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of streptococcus pneumoniae strains isolated from Brazilian children with invasive infections. Pneumococcal Study Group in Brazil for the SIREVA Project. Regional System for Vaccines in Latin America. **Microb. Drug Resist.**, v.3, n. 2, p. 141-146, 1997.

BRANDILEONE, M. C.; ANDRADE, A. L.; TELES, E. M.; ZANELLA, R. C.; YARA, T. I.; DI FABIO, J. L.; HOLLINGSHEAD, S. K. Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in Streptococcus pneumoniae isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. **Vaccine.**, v.22, n. 29-30, p. 3890-3896, 2004.

BRANDILEONE, M. C.; DE ANDRADE, A. L.; DI FABIO, J. L.; GUERRA, M. L.; AUSTRIAN, R. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. **J. Infect. Dis.**, v.15, n. 8, p. 1206-1212, 2003.

BRICKS, L. F.; BEREZIN, E. N. Impacto da vacina conjugada contra *Streptococcus pneumoniae* em doenças invasivas. **J. Pediatr.** (Rio J), v.82, suppl. 3, p. 67-73, 2006.

BRIESE, T.; HAKENBECK, R. Interaction of pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. **Eur. J. Biochem.**, v. 146, p. 417-427, 1985.

BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S.; BROOKS-WALTER, A.; NABORS, G. S.; FERGUSON, L.; SCHILLING, M.; GRAVENSTEIN, S.; BRAUN, P.; KING, J.; SWIFT, A. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. **Vaccine**, v. 18, n. 16, p. 1707-1711, 2000.

BRILES, D. E.; TART, R. C.; SWIATLO, E.; DILLARD, J. P.; SMITH, P.; BENTON, K. A.; RALPH, B. A.; BROOKS-WALTER, A.; CRAIN, M. J.; HOLLINGSHEAD, S. K.; MCDANIEL, L. S. Pneumococcal Diversity: Considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 4, p. 645-657, 1998.

BRILES, E.B. & TOMASZ, A. Pneumococcal Forssman antigen. A choline-containing lipoteichoic acid. **J. Biol. Chem.**, v. 248, n. 18, p. 6394-6397, 1973.

BRUYN, G. A.; ZEGERS, B. J.; VAN FFURTH, R. Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumonia*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14, p. 89-115, 1992.

BRYAN, J. P.; DE SILVA, H. R.; TAVARES, A.; ROCHA, H.; SCHELD, W. M. Etiology and mortality of bacterial meningitis in northeastern Brazil. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, n. 1, p. 128-135, 1990.

CANVIN, J. R.; MARVIN A. P.; SIVAKUMARAN, M.; PATON, J. C.; BOULLNOIS, G. J.; ANDREW, P. W.; MITCHELL, T. J. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. **J. Infect. Dis.**, v. 172, p. 119–123, 1995.

CARMO, T. S. **Otimização da produção de polissacarídeo do *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 6B em biorreator**. 2010. 121 f. Dissertação. (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CARVALHANAS, T. R. M. P.; BRANDILEONE, M. C. C.; ZANELLA, R. C. Meningites bacterianas. **BEPA**, n. 17, p. 15-26, 2005.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease-United States, 1998-2003. **MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.**, v. 54, p. 893-897, 2005.

Center for Disease Control and Prevention. Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **Morb. Mortal Wkly. Rep.**, v. 46, p. 1-24, 1997.

CHIOU, A. C.; ANDRADE, S. S., ALMEIDA, S. C. G.; ZANELLA, R. C. BRANDILEONE, M. C. C. Molecular assessment of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 in Brazil: evidence of clonal replacement. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 839-844, 2008.

COKERMAN, R.; ANDERSON, R.; FELDMAN, C. Pneumolysin is a vaccine and drug target in the prevention and treatment of invasive pneumococcal disease. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 59, p. 189-198, 2005.

CRAIN, M. J., WALTMAN, W. D. 2ND, TURNER, J. S.; YOTHER, J.; TALKINGTON, D. F.; MCDANIEL, L. S.; GRAY, B. M.; BRILES, D. E. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 3293-3299, 1990.

CRUZ-LEAL, Y.; MENÉNDEZ, T.; COIZEAU, E.; ESPINOSA, R. R.; CANAAN, L.; BLANCO, F.; CARMENA, T. E. T.; CHANG, J.; QUIÑONES, D.; TAMARGO, I.; CREMATA, J.; VEREZ-BENCOMO, V.; GUILLÉN, G. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative determination of capsular polysaccharide production in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 44, p. 101-108, 2006.

CSORDAS, F. C.; PERCIANI, C. T.; DARRIEUX, M.; GONÇALVES, V. M.; CABRERA-CRESPO, J.; TAKAGI, M.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; LEITE, L. C.; TANIZAKI, M. M. Protection induced by pneumococcal surface protein A (PspA) in enhanced by conjugation to *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. **Vaccine**, v. 26, p. 2925-2929, 2008.

CUESTA, G.; SUAREZ, N.; BESSIO, M. I.; FERREIRA, F.; MASSALDI, H. Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 using a modification of phenol-sulfuric acid method. **J. Microbiol. Methods**, v. 52, n. 1, p. 69-73, 2003.

DAGAN, R. Serotype replacement in perspective. **Vaccine**, 27S:C22-C24, 2009.

DATASUS, Ministério da Saúde Brasil. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br>>. Acesso em: 05 nov. 2009.

DE MORAES, C. Situação epidemiológica das meningites bacterianas no Brasil. I Simpósio Brasileiro sobre Meningites Bacterianas, São Paulo, 01 de Abril de 2011.

DE MORAES, J.C. & GUEDES, J. DA S. The epidemiology of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in a metropolitan area, Brazil, 1960-1977. **Rev Saude Publica**, v. 24, n. 5, p. 348-360, 1990.

DE OLIVEIRA, L.S.C. *Streptococcus pneumoniae* isolados simultaneamente de líquido, sangue e nasofaringe de crianças com meningites pneumocócicas: suscetibilidade, sorotipos e tipagem da PspA. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, 2007.

DE ROUX, A.; SCHMÖLE-THOMA, B.; SIBER, G. R.; HACKELL, J. G.; KUHNKE, A.; AHLERS N.; BAKER, S. A.; RAZMPOUR, A.; EMINI, E. A.; FERNSTEN, P. D.; GRUBER, W. C.; LOCKHART, S.; BURKHARDT, O.; WELTE, T.; LODE, H. M. Comparison of pneumococcal conjugated polysaccharide vaccines in the elderly adults: conjugate vaccine elicits improved antibacterial immune responses and immunological memory. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, p. 1015-1023, 2008.

De VOE, I; DABBAH, R.; SUTTON, S. The USP Perspective to Minimize the Potential Risk of TSE Infectivity in Bovine-Derived Articles Used in the Manufacture of Medical Products. **Pharmacopeial Forum**, v. 30, n. 5, p. 1911-1921, 2004.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 175, p. 350-356, 1956.

EVEN, S.; LINDLEY, N. D.; LOUBIÈRE, P.; COCAING-BOUSQUET, M. Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints. **Mol. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 1143-1152, 2002.

Farmacopéia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 5<sup>o</sup> Edição, v. 2, p. 181, 2010.

FISCHER, H. & TOMASZ, A. Peptidoglycan cross-linking and teichoic acid attachment in *Streptococcus pneumoniae*. **J Bacteriol.** v. 163, p. 43, 1985.

FRANTZ, I. D. Jr. Growth requirements of the meningococcus. **J. Bact.**, v. 43, p. 757-761, 1942.

FU, J.; BAILEY, F. J.; KING, J. J.; PARKER, C. B.; ROBINETT, R. S.; KOLODIN, D. G.; GEORGE, H. A.; HERBER, W. K. Recent Advances in the large scale fermentation of *Neisseria meningitidis* Group B for the production of an outer membrane protein complex. **Biotechnology (N Y)**, v. 23, p.170-174, 1995.

GARCÍA, E. & LÓPEZ, R. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 28, p. 553-580, 2004.

GARCÍA, P.; GONZÁLEZ, M. P.; GARCÍA, E.; LÓPEZ, R.; GARCÍA, L. LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. **Mol. Microbiol.**, v. 31, n. 4, p. 1275-1281, 1999.

GIUDICELLI, S.; TOMASZ, A. Attachment of pneumococcal autolysin to wall teichoic acids, an essential step in enzymatic wall degradation. **J. Bacteriol.**, v. 158, n. 3, p. 1188-1190, 1984.

GOGOLA, M. R. G. **Cultivo contínuo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14: metabolismo e cinética de produção de polissacarídeo capsular**. 2011. 136 f. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2011.

GONÇALVES, V. M.; ZANGIROLAMI, T. C.; GIORDANO, R. L. C.; RAW, I.; TANIZAKI, M. M.; GIORDANO, R. C. Optimization of medium and cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, p. 713-717, 2002.

GONÇALVES, V. M.; ZANGIROLAMI, T. C.; TAKAGI, M.; TANIZAKI, M. M.; GIORDANO, R. C. Cinética do cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F: inibição por lactato. In: XIV Simpósio Nacional das Fermentações, 2003, Florianópolis, 2003.

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

HANSMAN, D. & ANDREWS, G.. Hospital infection with pneumococci resistant to tetracycline. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 10, p. 2789-2791, 1995.

HANSMAN, D.; BULLEN, M. A resistant pneumococcus. **Lancet**, v. 2, p. 264-265.

HAUSDORFF, W. P. The roles of pneumococcal serotypes 1 and 5 in pediatric invasive disease. **Vaccine**, v. 25, p. 2406-2412, 2007.

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

HAUSDORFF, W. P.; FEIKIN D. R.; KLUGMAN, K. P. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. **Lancet Infect. Dis.**, v. 5, n. 2, p. 83-93, 2005.

HOEPRICH, P.D. Carbon-14 labeling of diplococcus pneumoniae. **J Bacteriol.**, v. 69, p. 682-688, 1955.

HOLLINGSHEAD S. K.; BECKER, R.; BRILES D. E. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 10, p. 5889-5900, 2000.

HOMMA, A.; MARTINS, R. M.; JESSOUROUN, E.; OLIVA, O. Desenvolvimento Tecnológico: elo deficiente na inovação tecnológica de vacinas no Brasil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, RJ. 2003. v. 10, sup. 2, p. 671-696.

HORNE, D. & TOMASZ, A. Pneumococcal Forssman antigen: enrichment in mesosomal membranes and specific binding to the autolytic enzyme of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 161, p. 18-24, 1985.

HOSKINS, J.; ALBORN, W. E. JR.; ARNOLD, J.; BLASZCZAK, L. C.; BURGETT, S.; DEHOFF, B. S.; ESTREM, S. T.; FRITZ, L.; FU, D. J.; FULLER, W.; GERINGER, C.; GILMOUR, R.; GLASS, J. S.; KHOJA, H.; KRAFT, A. R.; LAGACE, R. E.; LEBLANC, D. J.; LEE, L. N.; LEFKOWITZ, E. J.; LU, J.; MATSUSHIMA, P.; MCAHREN, S. M.; MCHENNEY, M.; MCLEASTER, K.; MUNDY, C. W.; NICAS, T. I.; NORRIS, F. H.; O'GARA, M.; PEERY, R. B.; ROBERTSON, G. T.; ROCKEY, P.; SUN, P. M.; WINKLER, M. E.; YANG, Y.; YOUNG-BELLIDO, M.; ZHAO, G.; ZOOK, C. A.; BALTZ, R. H.; JASKUNAS, S. R.; ROSTECK, P. R. JR.; SKATRUD, P. L.; GLASS, J. I. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. **J. Bacteriol.**, v. 18, n. 19, p. 5709-5717, 2001.

HOWARD, L. V.; GOODER, H.; Specificity of the Autolysin of *Streptococcus* (Diplococcus) *pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 117, n. 2, p. 796-804, 1974.

IBGE. Censo Demográfico. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

INSTITUT MERIEUX. Procédé de purification de polysides de *Streptococcus pneumoniae* et vaccine à base de polysides ainsi purifiés. Brevet Belge, déposée par la société anonyme dite: Institut Merieux no 8026320. European patent B74899. 1980.

JEDRZEJAS, M.J. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. **Microbiol Mol. Biol. Rev.**, v. 65, n. 2, p. 187-207, 2001.

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

JIN, SHENG-DE; KIM, YOUNG-MIN; KANG, HEE-KYOUNG; SEUNG-JIN, JUNG; KIM, D. Optimization of Capsular Polysaccharide Production by *Streptococcus pneumoniae* Type 3. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 19, n. 11, p. 1374–1378, 2009. DOI: 10.4014/jmb.0903.03027.

JUNG, SEUNG-JIN; SEO, EUN-SEONG; YUN, SANG-IL; MINH, B. N.; JIN, SHENG-DE; RYU, HWA-JA; KIM, D. Purification of capsular polysaccharide produced by *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 21 n. 7, p. 734–738, 2011. DOI: 10.4014/jmb.1010.10043.

KADIOGLU, A.; WEISER, J. N.; JAMES C. PATON, J. C.; ANDREW, P. W. The role of *Streptococcus pneumonia* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, n. 4, p. 288-301, 2008.

KELLY, S. J. & JEDRZEJAS, M. J. Structure and molecular mechanism of a functional form of pneumolysin: a cholesterol-dependent cytolysin from *Streptococcus pneumoniae*. **J. Struct. Biol.**, v. 132, n. 1, p. 72-81, 2000.

KIM, S. N.; MIN, K. K.; KIM, S. H.; CHOI, I. H.; LEE, S. H.; PYO, S. N.; RHEE, D. K.; Optimization of culture conditions for production of pneumococcal capsular polysaccharide type I. **J. Microbiol.**, v. 34, n. 2, p. 179-183, 1996.

KIRKHAM, L. A.; KERR, A. R.; DOUCE, G. R.; PATERSON, G. K.; DILTS, D. A.; LIU, D. F.; MITCHELL, T. J. Construction and immunological characterization of a novel nontoxic protective pneumolysin mutant for use in future pneumococcal vaccines. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 586-593, 2006.

KO, A. I.; REIS, J. N.; COPPOLA, S. J.; GOUVEIA, E. L.; CORDEIRO, S. M.; LÔBO, T. S.; PINHEIRO, R. M.; SALGADO, K.; RIBEIRO DOURADO, C. M.; TAVARES-NETO, J.; ROCHA, H.; GALVÃO REIS, M.; JOHNSON, W. D. JR.; RILEY, L. W. Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningitis in Salvador, Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, n. 1, p. 78-86, 2000.

KORCHEV, Y. E.; BASHFORD, C. L.; PEDERZOLLI, C.; PASTERNAK, C. A.; MORGAN, P. J.; ANDREW, P. W.; MITCHELL, T. J. A conserved tryptophan in pneumolysin is determinant of the characteristics of channels formed by pneumolysin in cells and planar lipid bilayers. **Biochem. J.**, v. 329, p. 571-577, 1998.

LAVAL, C. B.; DE ANDRADE, A. L.; PIMENTA, F. C.; DE ANDRADE, J. G.; DE OLIVEIRA, R. M.; SILVA, S. A.; DE LIMA, E. C.; FABIO, J. L.; CASAGRANDE, S. T.; BRANDILEONE, M. C. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. **Clin Microbiol Infect.** v. 12, n. 1, p. 50-55, 2006.

LEE, C. J & BANKS, S. D. Virulence, immunity, and vaccine related to *Streptococcus pneumoniae*. **Cri. Rev. Microbiol.**, v. 18, p. 89-114, 1991.

LIBERMAN, C.; TAKAGI, M.; CABRERA-CRESPO, J.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; DIAS, W. O.; LEITE, L. C.; GONÇALVES, V. M. Pneumococcal whole-cell vaccine: optimization of cell growth of unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* in bioreactor using animal-free medium. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 35, n. 11, p. 1441-1445, 2008.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial-Engenharia Bioquímica**. 1a. ed. São Paulo, Edgard Blücher, v. 2, 2001. 541 p.

- LINDBERG, B.; LONNGREN, J.; POWELL, D. A. Structural studies on the specific type-14 pneumococcal polysaccharide. **Carbohydr. Res.**, v. 58, n. 1, p. 177-186, 1977.
- LOCK, R. A.; HANSMAN, D.; PATON, J. C. Comparative efficacy of autolysin and pneumolysin as immunogens protecting mice against infection by *Streptococcus pneumoniae*. **Microb. Pathog.**, v. 12, p. 137-143, 1992.
- LOPEZ, R.; GARCÍA, J. L.; GARCÍA, E.; RONDA, C.; GARCÍA, P. Structural analysis and biological significance of the cell wall lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophage. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 79, p. 439-447, 1992.
- LUND, E. & HENRICHSEN, J. Laboratory Diagnosis, Serology and Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. Methods in Microbiology Academic Press, London, New York and San Francisco. v. 12, p. 242-262, 1978.
- MACHA, C.; YERUVA, S.; DABRAL, A.; PENMETSA, M.; PERICHERLA, H.; MAMIDALA, P.; NANNA, R. Effect of complex nitrogen source on production of capsular polysaccharide by *Streptococcus pneumoniae* – 6B. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 3, n. 3, p. 288-290, 2011.
- MACHA, C.; YERUVA, S.; MAMIDALA, P.; NANNA, R. S. Optimization of capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* type 3 growth in a semi defined medium. **J. Cell Tissue Research**. V. 10, n. 3, p. 2318-2324, 2010.
- MAGEE, A. D. & YOTHER, J. Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3755-3761, 2001.
- MAIO, M. T. **Uma abordagem de metabolômica no estudo comparativo do metabolismo de glucose e galactose no patógeno humano *Streptococcus pneumoniae***. 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina, Universidade do Algarve, Faro, Algarve, 2010.
- MÄKELÄ, P. H.; BUTLER, J. C. History of pneumococcal immunization. In: SIBER, G. R.; KLUGMAN, K. P.; MÄKELÄ, P. H. **Pneumococcal vaccines**. Washington, EUA: ASM Press, 2008. Cap. 2, p. 19-29.
- MALLEY, R.; LIPSITCH, M.; STACK, A.; SALADINO, R.; FLEISHER, G.; PELTON, S.; THOMPSON, C.; BRILES, D.; ANDERSON, P. Intranasal immunization with killed unencapsulated whole cells prevents colonization and invasive disease by encapsulated pneumococci. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4870-4873, 2001.
- MASSALDI, H.; BESSIO, M. I.; SUÁREZ, N.; TEXEIRA, E.; ROSSI, S.; FERREIRA, F. Features of bacterial growth and polysaccharide production of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 55, p. 37-43, 2010.
- MCDANIEL, L.S.; YOTHER, J.; VIJAYAKUMAR, M.; MCGARRY, L.; GUILD, W. R.; BRILES, D. E. Use of insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA). **J. Exp. Med.**, v. 165, p. 381-394, 1987.

MCDANIEL, L. S.; SHEFFIELD, J. S.; DELUCCHI, P.; BRILES, D. E. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more capsular type. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 222-228, 1991.

MENCHEN, D. SUS terá vacina gratuita contra pneumonia, meningite e otite em 2010. Folha de São Paulo, Rio de Janeiro. Disponível em <<http://www1.folha.uol.com.br>>. Acesso em: 18 ago. 2009.

MENDES, C.; SADER, H.; DAINESI, S. M.; DIAS, C. G.; COSCINA, A.; ZOCCOLI, C.; DA SILVA, J. F.; MAGALHÃES, M.; TEIXEIRA, L. M.; SOUZA, H. H.; OPLUSTIL, C. P.; ANDRADE, M. G.; MIMIÇA, L.; MIMIÇA, I. I. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Sparfloxacin, Relative to Other Oral Antibiotics Against 1,125 Bacterial Isolates from 10 Medical Centers in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 2, n. 1, p. 18-24, 1998.

MENEZES, A. P. O.; CAMPOS, L. C.; DOS SANTOS, M. S.; AZEVEDO, J.; DOS SANTOS, R. C. N.; CARVALHO, M. G. S.; BEALL, B. W.; MARTIN, S. W.; SALGADO, K.; REIS, M. G.; KO, A. I.; REIS, J. N. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000–2007. **Vaccine**, v. 29, p. 1139–1144, 2011.

MIYAJI, E. N.; FERREIRA, D. M.; LOPES, A. P. Y.; BRANDILEONE, M. C. C.; DIAS, W. O.; LEITE, L. C. C. Analysis of serum cross-reactivity and cross-protection elicited by immunization with DNA vaccines against *Streptococcus pneumoniae* expressing PspA fragments from different clades. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 9, p. 5089-5090, 2002.

MOFFITT, K. L.; MALLEY, R. Next generation pneumococcal vaccines. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 23, p. 407-413, 2011.

MOSCOSO, M.; GARCÍA, E. Transcriptional regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae*: a bioinformatics analysis. **DNA Research.**, 2009. DOI: 10.1093/dnares/dsp007.

OBARO, S.; ADEGBOLA, R. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. **J. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 98-104, 2002.

OGUNNIYI, A. D.; FOLLAND, R. L.; BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; PATON, J. C. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3028-3033, 2000.

OGUNNIYI, A. D.; GRABOWICZ, M.; BRILES, D. E.; COOK, J.; PATON, J. C. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 350-357, 2007.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE - OPAS. Informe Regional SIREVA II, 2010: datos por país y grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* em procesos invasores. Washington, D.C., OPAS, 2011. 306 p.

OSELKA, G. W. Prevention of pneumococcal disease in Brazil. **J. Pediatr** (Rio J)., v. 79, n. 3, p. 195-196, 2003.

PATON, J. C.; LOCK, R. A.; HANSMAN, D. J. Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 40, p. 548-552, 1983.

PLETZ, M. W.; MAUS, U.; KRUG, N.; WELTE, T.; LODE, H. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 32(3), p. 199-206, 2008

PNEUMOADIP. Disponível em: <http://preventpneumo.org>. Acesso em: 02 nov. 2009.

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

PRYMULA, R.; PEETERS, P.; CHROBOK, V.; KRIZ, P.; NOVAKOVA, E.; KALISKOVA, E.; KOHL, I.; LOMMEL, P.; POOLMAN, J.; PRIEELS, J. P.; SCHUERMAN, L. Pneumococcal capsular polysaccharide conjugates to protein d for prevention acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and non-typable *Haemophilus influenzae* a randomized double-blind efficacy study. **Lancet**, v. 367, p. 740-748, 2006.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 3, n. 5, p. 445-450, 2000.

RESTREPO, A. V.; SALAZAR, B. E.; AGUDELO, M.; RODRIGUEZ, C. A.; ZULUAGA, A. F.; VESGA, O. Optimization of culture conditions to obtain maximal growth of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **BMC Microbiol.**, v. 5, n. 34, 2005. DOI:10.1186/1471-2180-5-34.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2a ed.. Casa do Pão, Campinas, Brasil, 2005. 358 p.

RONDA, C.; GARCÍA, J. L.; GARCÍA, E.; SÁNCHEZ-PUELLES, J. M.; LÓPEZ, R. Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the *lytA* gene in *Streptococcus pneumoniae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 164, n. 3, p. 621-624, 1987.

RUBINS, J. B.; PADDOCK, A. H.; CHARBONEAU D.; BERRY, A. M.; PATON, J. C.; JANOFF, E. N. Pneumolysin in pneumococcal adherence and colonization. **Microb. Pathog.**, v. 25, p. 337-342, 1998.

RUSSEL, H.; THARPE, J. A.; WELLS, D. E.; WHITE, E. H.; JOHNSON, J. E. Monoclonal antibody recognizing a species-specific protein from *Streptococcus pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 2191-2195, 1990.

SAMPSON, J. S.; FURLOW, Z.; WHITNEY, A. M.; WILLIAMS, D.; FACKLAM, R.; CARLONE, G. M. Limited diversity of *Streptococcus pneumoniae* *psaA* among pneumococcal vaccine serotypes. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1967-1971, 1997.

SCHRAG, S. J.; MCGEE, L.; WHITNEY, C. G.; BEALL, B.; CRAIG, A. S.; CHOATE, M. E.; JORGENSEN, J. H.; FACKLAM, R. R.; KLUGMAN, K. P. Emergence of *Streptococcus pneumoniae* with Very-High-Level Resistance to Penicillin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 8, p. 3016-3023, 2004.

SEO, J.Y.; SEONG, S. Y.; AHN, B. Y.; KWON, I. C.; CHUNG, H.; JEONG, S. Y. Cross-protective immunity of mice induced by oral immunization with pneumococcal surface adhesin an encapsulated in microspheres. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 3, p. 1143-1149, 2002.

SESSEGOLO, J.F.; LEVIN, A. S.; LEVY, C. E.; ASENSI, M.; FACKLAM, R. R.; TEIXEIRA, L. M. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Brazil from 1988 to 1992. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 4, p. 906-911, 1994.

SORENSEN, U.B.S.; BLOM, J.; BIRCH-ANDERSEN, A.; HENRICHSEN, J. Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 1890-1896, 1988.

STEINMOEN, H.; KNUTSEN, E.; HÅVARSTEIN, L. S. Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. **PNAS**, v. 99, n. 11, p. 7681–7686, 2002.

STORAÏ, J. **Analyse métabolique et transcriptomique de *Streptococcus pneumoniae* em lien avec la production de polysaccharide capsulaire.** 2008. 264 f. Ph.D Thesis (Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries) – Institut National des Science Appliquées de Toulouse, Université de Toulouse, 2008.

SUTCLIFFE I & RUSSEL R. Lipoproteins of gram-positive bacteria. **J Bacteriol.**, v. 177, p. 1123-1128, 1995.

SUTMÖLLER, F.; FERRO, Z. P.; ASENSI, M. D.; FERREIRA, V.; MAZZEI, I. S.; CUNHA, B. L. Etiology of acute respiratory tract infections among children in a combined community and hospital study in Rio de Janeiro. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, n. 4, p. 854-860, 1995.

SWIATLO, E.; McDANIEL, S.; BRILES, D. E.; HAKENBECK, R. Choline-Binding proteins. In: TUOMANEN, E. I. **The pneumococcus.** Washington, EUA: ASM Press, 2004. Cap. 4, p. 49-60.

TAI, S. S. *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 32, n. 3, p. 139-153, 2006.

TALBIRD, S. E.; TAYLOR, T. N.; CAPORALE, J.; ISMAILA, A. S.; GOMEZ, J. Residual economic burden of *Streptococcus pneumoniae*- and nontypeable *Haemophilus influenzae*- associated disease following vaccination with PCV-7: A multicountry analysis. **Vaccine**, v. 28, p. 14-22, 2010.

TALKINGTON, D. F.; BROWN, B. G.; THARPE, J. A.; KOENIG, A.; RUSSELL, H. Protection of mice against fatal pneumococcal challenge by immunization with pneumococcal surface adhesin A (PsaA). **Microb. Pathog.**, v. 21, p. 17-22, 1996.

TAM, R. & SAIER, J. R. M. H. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptor of bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 57, p. 320-346, 1993.

TANIAI, H.; IIDA, K.; SEKI, M.; SAITO, M. M.; SHIOTA, S.; NAKAYAMA, H.; YOSHIDA, S. Concerted Action of Lactate Oxidase and Pyruvate Oxidase in Aerobic Growth of *Streptococcus pneumoniae*: Role of Lactate as an Energy Source. **J. Bacteriol.** v. 190, n. 10, p. 3572–3579, 2008.

TART, R.C. ; MCDANIEL, L. S.; RALPH, B. A.; BRILES, D. E. Truncated *S. pneumoniae* PspA molecules elicit cross-protective immunity against pneumococcal challenge in mice. **J. Infect. Dis.**, v. 173, p. 380-386, 1996.

TAUNAY, A. E. ; AUSTRIAN, R.; LANDGRAF, I. M.; VIEIRA, M. F.; MELLES, C. E. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolated from cerebrospinal fluid in 1977-1988 in Sao Paulo City, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 32, n. 1, p. 11-15, 1990.

TEIXEIRA, L. M.; ANDRADE, J. R. C.; LOURENÇO, N. J. Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro. **Rev. Micobiol.**, v. 19, p. 93-99, 1988.

TOMASZ, A. Building and breaking of bonds in the cell wall of bacteria: The role for autolysin. In: C. Nombela, **Microbial cell wall synthesis and autolysis**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. p. 3-12, 1984.

TOMASZ, A. Surface components of *Streptococcus pneumoniae*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 3, p. 190-221, 1981.

TOMASZ, A.; ALBINO, A.; ZANATI, E. Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. **Nature**, v. 227, p. 138-140, 1970.

TOMASZ, A.; ZANATI, E.; ZIEGLER, R. DNA uptake during genetic transformation and growing zone of the cell envelope. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 68, p. 1848-1852, 1971.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 827 p.

TUOMANEN, E.; LIU, H.; HENGSTLER, B.; ZAK, O.; TOMASZ, A. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. **J. Infect. Dis.**, v. 151, p. 859-868, 1985.

TUOMANEN, E.; RICH, R.; ZAK, O. Induction of pulmonary inflammation by components of the pneumococcal cell surfacel. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 135, p. 869-874, 1987.

van de RIJN, I.; KESSLER, R. E. Growth characteristics of group A streptococci in a new chemically defined medium. **Infect. Immun.**, v. 27, n. 2, p. 444-448, 1980.

WALTMAN, W.D.I.; MCDANIEL, L. S.; GRAY, B. M.; BRILES, D. E. Variation in the molecular weight of PspA (pneumococcal surface protein A) among *Streptococcus pneumoniae*. **Microb. Pathog.**, v. 8, p. 61-69, 1990.

WEISER J. N. Modulating production of pneumococcal capsular polysaccharide. Patent No. US 6,642,017 B2. United States Patent, 2003.

WEISER, J. N. The pneumococcus: why a commensal misbehaves. **J. Mol. Med.**, v. 88, p. 97-102, 2010.

WEISER, J. N.; BAE, D.; EPINO, H.; GORDON, S. B.; KAPOOR, M.; ZENEWICZ, M.; SHCHEPETOV, M. Changes in availability of oxygen accentuate differences in capsular polysaccharide expression by phenotypic variants and clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 9, p. 5430-5439, 2001.

WHO Guidelines on Transmissible Spongiform Encephalopathies in relation to Biological and Pharmaceutical Products, 2003. Disponível em <<http://www.who.int/biologicals>>. Acesso em: 13 jan. 2011.

WHO, UNICEF, World Bank. State of the world's vaccines and immunization, 3rd ed. Geneva, World Health Organization, 2009. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/2009>>. Acesso em: 15 abril 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. MASTER PLAN. Development of a Conjugated Vaccine against *Streptococcus pneumoniae*. Pan American Health Organization. 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization. WHO position paper. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, v. 82, p. 93-104, 2007.

YOSHIOKA, C. R. M.; MARTINEZ, M. B.; BRANDILEONE, M. C. C.; SELMA B. RAGAZZI, S. B.; GUERRA, M. L. S.; SANTOS, S. R.; HUEI H. SHIEH, H. H.; GILIO, A. E. Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antimicrobial susceptibility. **J. de Pediatria**, v. 87, n.1, p. 70-75, 2011.

YOTHER, J. Capsule. In: TUOMANEN, E. I. **The pneumococcus**. Washington, EUA: ASM Press, 2004. Cap. 3, p. 30-48.

YOTHER, J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and others bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 65, p. 563-581, 2011.

YOTHER, J.; LEOPOLD, K.; WHITE, J.; FISCHER, W., Generation and properties of a *Streptococcus pneumoniae* mutant which does not require choline or analogs for growth. **J. of Bacteriol.**, v. 180, n. 8, p. 2093-2101, 1998.

## ANEXOS

## ANEXO 1 - TRABALHO COMPLETO

LEAL, M. L. M.; PEREIRA JR. N.; PEREIRA, D. S. G.; LARENTIS, A. L.; COUTO, M. A. P. G.; JESSOUROUN, E. Desenvolvimento de um meio de cultivo para obtenção de polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, 2011.

# Desenvolvimento de um meio de cultivo para Obtenção de Polissarídeo Capsular de *Streptococcus pneumoniae* Sorotipo 14

Maria de Lourdes M. Leal<sup>1</sup>, Nei Pereira Jr.<sup>2</sup>, Denise G. Pereira<sup>1</sup>,  
Ariane L. Larentis<sup>1</sup>, Maria Antonieta G. P. Couto<sup>2</sup> e Ellen Jessouroun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fundação Oswaldo Cruz – Bio-Manguinhos – Laboratório de Tecnologias Bacterianas  
CEP 21040-900 Rio de Janeiro – RJ – E-mail: [mleal@bio.fiocruz.br](mailto:mleal@bio.fiocruz.br)

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro – Depto. Engenharia Bioquímica – Escola de Química

## RESUMO

As taxas de morbidade e mortalidade associadas ao *Streptococcus pneumoniae* permanecem muito elevadas mundialmente. Apesar da terapia antimicrobiana estar disponível, a doença pneumocócica é responsável por mais de um milhão de mortes anualmente em todo o mundo. As vacinas comerciais são eficazes e seguras, cuja base é a cápsula polissacarídica, principal fator de virulência de pneumococos. O objetivo deste trabalho foi estudar a cinética de crescimento, consumo de substrato e produção da cápsula do sorotipo 14 em biorreator, empregando um meio de origem não animal com diferentes concentrações de glicose e nitrogênio total (extrato de levedura) utilizando a técnica de planejamento experimental. Os melhores resultados de produtividade específica ( $q_p$ ) obtidos foram na faixa de 20 mg/L.g cel.h e corresponderam às menores concentrações de glicose inicial e ao nitrogênio total acima de 0,8 mg/mL.

**Palavras-chave:** *Streptococcus pneumoniae*, polissacarídeo, planejamento experimental, DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional), vacina

## INTRODUÇÃO

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococos) é um patógeno humano importante que apresenta uma diversidade de manifestações clínicas como otite média, sinusite, pneumonia meningite e bacteremia. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a doença pneumocócica é responsável por 1,6 milhões de mortes por ano no mundo. Estima-se que 0,7-1 milhão destas mortes é de crianças < 5 anos de idade, cuja maioria vive em países em desenvolvimento. Estima-se que o pneumococo também seja o principal agente causador de pneumonias, em quase todas as faixas etárias (WHO, 2007). No Brasil, após a introdução da vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b o pneumococo passou a ser a segunda maior causa de meningites bacterianas em crianças. Apesar dos antibióticos disponíveis, a doença pneumocócica continua a ser um grande problema de saúde pública, devido à disseminação global de cepas multiresistentes a estes medicamentos. Em função deste quadro, a prevenção através da imunização é de extrema importância no combate da doença.

A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência de pneumococo, e constitui-se de um polímero de grande variabilidade química e estrutural sendo responsável

pela classificação deste microrganismo em mais de 90 sorotipos. Esta estrutura é a camada mais externa do envoltório bacteriano; a sua espessura e composição química protegem o microrganismo dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Weinberger et al, 2009). No Brasil, o sorotipo 14 é o mais prevalente em crianças < 5 anos, sendo responsável por 39,8% da doença pneumocócica e o mais associado à resistência à penicilina (28,9%) dos isolados de meningites para a mesma faixa etária (Organización Panamericana de la Salud, 2010).

Atualmente, as vacinas disponíveis no mercado para a prevenção da doença pneumocócica são a vacina polissacarídica 23-valente composta de 23 polissacarídeos livres recomendada para o uso em adultos e as vacinas conjugadas recomendadas para crianças < 2 anos de idade. No Brasil, em 2010, o Programa Nacional de Imunizações iniciou a implementação do uso da vacina 10-valente (PHiD-CV) produzida pela Glaxo Smith Klein Biologicals (GSK) e que a partir de 2011 fará parte do calendário básico de vacinação da criança específico para menores de um ano (Ministério da Saúde-Brasil, 2010). Esta vacina contempla três sorotipos (1, 5 e 7F) que não estão incluídos na vacina 7-valente e possui uma cobertura  $\geq 80\%$  para a maioria das regiões do mundo (Hausdorff, 2000).

*S. pneumoniae* é classificada como uma bactéria anaeróbica aerotolerante e nutricionalmente exigente, requerendo um meio complexo para o seu crescimento. Sob condições anaeróbicas obtém energia para o seu crescimento e divisão celular realizando fermentação homolática, cujo produto final do metabolismo da glicose é o ácido lático (Glass et al, 2001). Os meios clássicos empregados para o cultivo de pneumococos utilizam componentes de origem animal. Porém a OMS recomenda a utilização de materiais protéicos de origem não animal. Na década de 80 o Instituto Merieux utilizou um meio semi-sintético contendo hidrolisado ácido de caseína (Hoeprich, 1955) como fonte de nitrogênio para a produção de polissacarídeo capsular de pneumococos. Seguindo essa diretriz da OMS, neste trabalho buscou-se um meio alternativo para o cultivo e produção de polissacarídeo capsular de pneumococos. O meio de Catlin foi descrito originalmente para o cultivo de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B (Fu et al, 1995). Segundo a literatura (Rastrepo et al, 2005), existem algumas substâncias que são essenciais para o crescimento de pneumococos e que não estão contempladas no meio de Catlin MC6, tais como: colina, glutamina, asparagina, sulfato de manganês e um agente redutor (ácido tioglicólico). Além destes insumos também se adicionou extrato de levedura como fonte de nitrogênio e vitaminas ao MC6.

Finalmente, apesar de existirem várias vacinas eficazes contra pneumococos, estudos relativos ao cultivo bacteriano visando ao aumento de produtividade da cápsula polissacarídica ainda são escassos. Neste contexto, o objetivo do trabalho consiste no estudo da cinética de crescimento, consumo de substrato e produção da cápsula do sorotipo 14 utilizando diferentes concentrações de glicose e nitrogênio total utilizando a técnica de planejamento experimental.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Microrganismo:** A Linhagem 113/95 de *S. pneumoniae* sorotipo 14 foi fornecida pelo Instituto Adolfo Lutz, SP, Brasil. A partir da ampola liofilizada preparou-se uma suspensão de células em TSB com 20% v/v de glicerol estocada em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Meio:** Empregou-se o meio de Catlin modificado Bio (Fu et al, 1995) contendo sulfato férrico ao invés de citrato férrico, diferentes concentrações iniciais de glicose (6, 10, 20, 30 e 34 g/L) e de extrato de levedura dialisado em termos de nitrogênio total (0,11, 0,25, 0,6, 0,95, 1,09 g/L). Foram adicionados outros componentes presentes no meio de Hoeplich (1955). Composição final do meio de Catlin modificado Bio (L de meio): 5,8 g NaCl; 4,0 g  $K_2HPO_4$ ; 3,9 g ácido glutâmico; 1,0g  $NH_4Cl$ ; 1,0g  $K_2SO_4$ ; 0,5 g L-serina; 0,4 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ; 0,25 g L-glicina; 0,15 g L-arginina; 0,1 g L-cisteína.HCl; 0,028 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,0312 g ácido cítrico; 2,31 mg  $Fe_2(SO_4)_3$ ; 10 mg cloridrato de colina (Sigma); 625 mg glutamina; 100 mg asparagina; 0,36 mg  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 1,0 g bicarbonato de sódio; 1 mL ácido tioglicólico 10% v/v. O dialisado de extrato de levedura foi preparado de acordo com Ayme et al (1973). Os componentes do meio foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22  $\mu m$ . Empregou-se delineamento composto central rotacional (DCCR) a cinco níveis de cada uma das variáveis com triplicata no ponto central (glicose: 20 g/L e nitrogênio total: 0,6 g/L) para a definição da concentração de glicose e extrato de levedura.

**Cultivo:** A suspensão bacteriana foi semeada em garrafa de Roux contendo TSA com 5% de sangue de carneiro desfibrinado com auxílio de pérolas de vidro e incubou-se a 37°C em atmosfera com 5% de  $CO_2$  por 16 h. As células foram ressuspensas com 10 mL de meio de cultivo e transferidas para dois frascos cônicos de 125 mL contendo 62,5 mL de meio, de modo que a absorvância inicial (550 nm) fosse 0,3 (primeiro pré-cultivo). Após incubação por 4 h a 37°C e 100 rpm, dois frascos cônicos de 250 mL contendo 112,5 mL de meio eram inoculados com 12,5 mL da suspensão e incubados nas mesmas condições citadas. Este segundo pré-cultivo serviu de inóculo para o biorreator, na proporção de 10% v/v. Os cultivos foram realizados em biorreator de 2 L (Bioflo 110, New Brunswick, USA) contendo 1,5 L de meio a 37°C e velocidade de agitação de 100 rpm. O pH foi mantido constante a 7,2 pela adição de NaOH 5 M. A cada 2 horas eram feitas amostragens para a quantificação de células, glicose, lactato e polissacarídeo.

**Métodos analíticos:** As células foram quantificadas por leitura da absorvância do cultivo a 550 nm, correlacionada a uma curva de massa seca previamente construída, empregando meio isento de células como branco. Amostras do cultivo foram centrifugadas a 9500 x g, a 4°C por 20 min e os sobrenadantes utilizados para as quantificações de glicose residual, de lactato produzido, utilizando os kits enzimáticos glicose-oxidase (Laborlab, Brasil) e lactato-desidrogenase (Katal, Brasil), respectivamente. O polissacarídeo também foi determinado nos sobrenadantes, após diálise, pelo método clássico do fenol-sulfúrico (Dubois et al, 1956). O polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 14 (PCS 14) é um heteropolissacarídeo neutro formado por unidades repetitivas de um tetrassacarídeo composto por 1 unidade de D-glicose, 2 unidades de D-galactose e 1 unidade de N-acetil-D-glicosamina (Lindberg et al, 1977). Uma solução com a mesma composição e razão molar presente no PCS 14 foi utilizada como padrão para a construção da curva de calibração. A diálise foi realizada contra água destilada (corte da membrana: 12-14 kDa - 48h/4°C) para a remoção da glicose residual e de possíveis interferentes. O nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl (Farmacopéia Brasileira, 2010).

**Análise estatística:** A análise estatística foi feita no programa STATISTICA 9.1. Os efeitos de cada uma das variáveis foram estimados a 95% de confiança, avaliados pelo teste *t* e considerados estatisticamente significativos aqueles com  $p < 0,05$  (Rodrigues e Iemma,

2005). O emprego de DCCR, com a avaliação de cinco níveis de cada uma das variáveis permite avaliar as respostas a partir de modelos polinomiais de segunda ordem, incluindo todos os parâmetros lineares e quadráticos, assim como as interações lineares entre Nitrogênio total e Glicose, como indicado na equação (em termos das variáveis codificadas):  $Y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2$ .

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1A observa-se a lise da bactéria na fase estacionária de crescimento para todas as concentrações de glicose e nitrogênio total estudadas. *S. pneumoniae* possui um sistema *quorum sensing* particularmente efetivo e que ativa várias autolisinas potentes, quando certas condições são encontradas na população em crescimento, ocasionando uma extensiva morte celular (Restrepo et al, 2005). Com relação ao consumo de glicose (Figura 1B), observou-se que esta fonte de carbono é completamente consumida nas menores concentrações iniciais. O polissacarídeo capsular é produzido durante a fase exponencial de crescimento (Figura 1C) e é de conhecimento que parte deste biopolímero está ligada à célula, podendo ser liberado durante a lise celular. Como esperado, o ácido lático foi o principal produto do metabolismo da glicose (Figura 1D) e a sua formação somente cessou quando também cessou o consumo de glicose. A produção de lactato é parcialmente associada ao crescimento celular, considerando que este metabólico continua a ser produzido após cessar o crescimento celular, o que também foi observado por Gonçalves et al (2002) utilizando *S. pneumoniae* 23F e o meio de Hoeprich com extrato de levedura dialisado.

A produtividade específica ( $q_p$ ) foi eleita como variável de resposta para avaliação dos experimentos, pelo fato da concentração de células aumentar durante o cultivo descontínuo, sendo mais interessante analisar os valores das produtividades com relação à concentração de células em um dado instante. Considerando a ausência de lise bacteriana com 6 h de cultivo optou-se por este tempo para o cálculo das  $q_p$ s (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados de produtividade específica ( $q_p$ ) após 6h de crescimento de *S. pneumoniae* sorotipo 14 em meio de Catlin modificado Bio em biorreator.

Nitrogênio total (mg/L)	$x_1$	Glicose (g/L)	$x_2$	$q_p$ (mgPS/L.g cel.h)
0,25	-1	10	-1	8,7
0,25	-1	30	1	13,6
0,95	1	10	-1	21,1
0,95	1	30	1	15,3
0,6	0	20	0	18,4
0,6	0	20	0	15,0
0,6	0	20	0	16,1
0,6	0	20	0	18,1
0,11	-1,41	20	0	8,5
0,6	0	6	-1,41	15,5
1,09	1,41	20	0	13,7
0,6	0	34	1,41	20,0

A análise estatística da influência da concentração inicial de nitrogênio total e glicose foi realizada para os resultados de célula, glicose residual, polissacarídeo, lactato e produtividade específica após 6h de crescimento de *S. pneumoniae* sorotipo 14. A

concentração de células apresentou influência da interação linear entre a concentração de nitrogênio total e de glicose no biorreator. A produção de polissacarídeo só dependeu do nitrogênio total, com maiores resultados obtidos para concentrações superiores de nitrogênio. A concentração de lactato dependeu da glicose inicial (os dois parâmetros, linear e quadrático, foram estatisticamente significativos). Os dados indicam que a produção de lactato aumenta com maiores concentrações de glicose (confirmado pelo parâmetro linear positivo), mas atinge um valor máximo similar para concentrações acima do ponto central (efeito quadrático negativo). No caso da glicose residual após 6h de crescimento, somente o efeito linear da glicose foi estatisticamente significativo e positivo, com  $p < 0,05$  (como verificado na Figura 1B, comparando experimentos com a mesma concentração de glicose, o resultado é praticamente o mesmo para as diferentes concentrações de nitrogênio, mostrando que nitrogênio total inicial não apresentou efeito estatisticamente significativo, uma vez que  $p > 0,05$ ).

Para os dados de produtividade específica  $q_p$  mostrados na Tabela 1, os efeitos linear e quadrático do nitrogênio total e a interação entre esta variável com a concentração inicial de glicose, obtidos pela análise estatística a 95% de confiança, foram estatisticamente significativos e podem ser descritos pela equação em termos das variáveis codificadas ( $x_1$  e  $x_2$ ). O modelo ( $q_p = 17,3 + 2,7 x_1 - 2,9 x_1^2 - 2,7 x_1 x_2$ ) foi validado pelo coeficiente de correlação ( $R^2$  em torno de 0,85) e pela análise de variância (ANOVA), indicando que é capaz de representar os dados experimentais com boa concordância entre os valores experimentais e os preditos pelo modelo, sendo possível, desta forma, obter a superfície de resposta (Figura 1E).

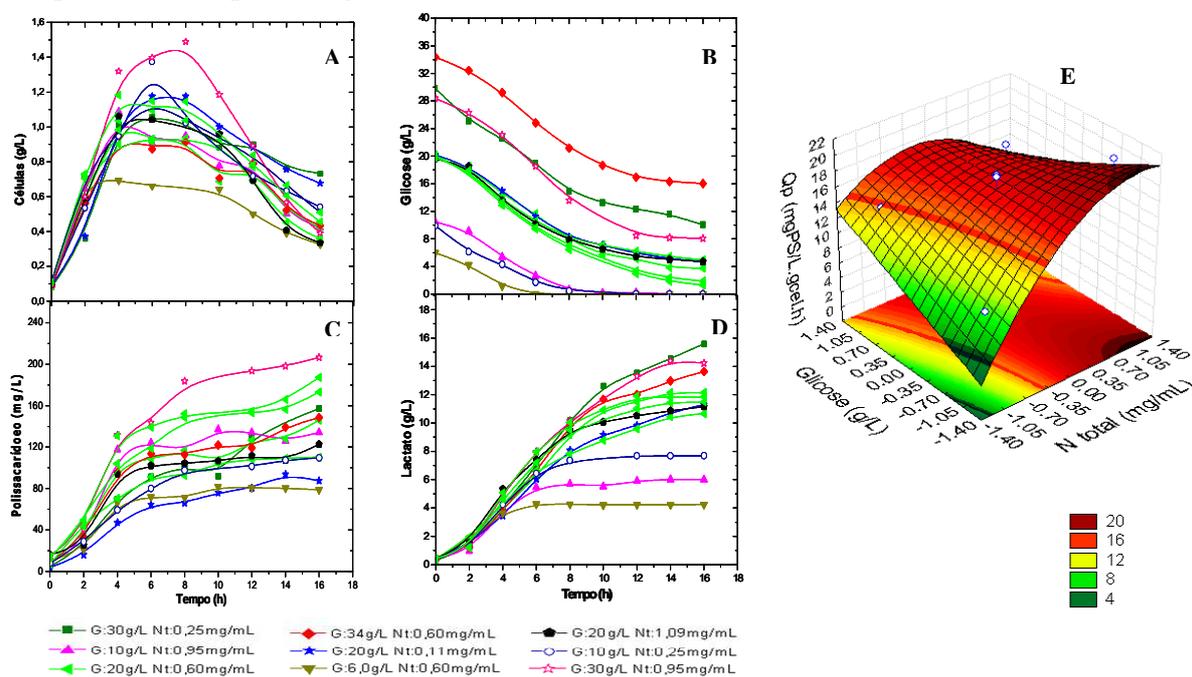


Figura 1. (A) Cinética de crescimento (B) Consumo de glicose (C) Produção de polissacarídeo (D) Formação de lactato de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14 em biorreator. G: Glicose, Nt: Nitrogênio total. (E) Superfície de resposta indicando a influência do nitrogênio total e da concentração inicial de glicose obtida a partir do modelo para  $q_p$  (mgPS/L.g cel.h).

A superfície de resposta para a produtividade específica mostrou que as condições que maximizam a resposta desejada ( $q_p$  acima de 20 mgPS/L.g cel.h) correspondem às maiores concentrações de nitrogênio total no biorreator (acima de 0,6 em termos da variável codificada, que corresponde a 0,80 mg/mL) e para as menores concentrações de glicose inicial (entre -1 e 1,41 em termos da variável codificada, correspondendo a 10 e 6 g/L, respectivamente), conforme Figura 1E.

## CONCLUSÕES

A utilização da técnica de planejamento experimental permitiu avaliar o efeito e interações da concentração de glicose e nitrogênio total obtendo-se o máximo de informações (incluindo avaliação dos erros experimentais) com o menor número possível de experimentos visando ao aumento dos níveis de produção de polissacarídeo. Os efeitos linear e quadrático de glicose não foram estatisticamente significativos sobre a produtividade específica. As condições que maximizaram a produtividade específica ( $q_p$  de 20 mgPS/L.g cel.h) correspondem às concentrações de nitrogênio total acima de 0,80 mg/mL e às menores concentrações de glicose inicial (abaixo de 10 g/L).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayme, G., Donikian, R., Mynard, M. C., Lagrandeur, G. (1973) Production and Controls of Serogroup A *Neisseria meningitidis* Polysaccharide Vaccine. In: Table Ronde Sur L'Immunoprophilaxie de la Meningite Cerebro-Spinale. Edition Fondation Merieux, Lyon (France).
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. vol. 28, no. 3, p. 350-356.
- Farmacopéia Brasileira (2010). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 5ª edição, v. 2, p. 181
- Fu, J., Bailey, F.J, King, J.J, Parker, C.B, Robinett, R.S, Kolodin, D.G., George, H.A., Herber, W.K. (1995). Recent Advances in the large scale fermentation of *Neisseria meningitidis* Group B for the production of an outer membrane protein complex. *Biotechnology*. v. 13, p.170-174.
- Glass, J. I., Hoskins, J., Alborn Jr., et al. (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 19, p. 5709-5717.
- Gonçalves, V. M., Zangirolami, T. C., Giordano, R. L. C., Raw, I, Tanizaki, M. M., Giordano, R. C. (2002). Optimization of medium and cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 59, p. 713-717.
- Hausdorff, W. P., Bryant, J., Paradiso, P. R., Siber, G. R. (2000). Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: Implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clinical Infectious Diseases*. v. 30, p. 100-121.
- Hoeprich, P. D. (1955). Carbon-14 labeling of diplococcus pneumoniae. *Journal of Bacteriology*, v. 69, p. 682-688.
- Institut Merieux (1980). *Procédé de purification de polyosides de Streptococcus pneumoniae et vaccine à base de polyosides ainsi purifiés*. Brevet Belge (Belgian patent) 80 26320.

Lindberg, B., Lönngrén, J., Powell, D.A. (1977), Structural studies on the specific type-14 pneumococcal polysaccharide. *Carbohydrate Research*, v. 58, p. 177-186.

Ministério da Saúde, Brasil. Data-SUS Brasil. <http://www.saude.gov.br>. Acesso: 11/03/2011.

Organización Panamericana de la Salud (2010). Informe Regional de SIREVA II, 2009: datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, em processos invasores. *Regulaciones Sanitarias Internacionales, Alerta y Respuesta y Enfermedades epidêmicas* (HSD/IR).

Restrepo V. P., Salazar B. E., Agudelo, M., Rodriguez, C.A., Zuluaga, A. F., Vesga, O. (2005), Optimization of culture conditions to obtain maximal growth of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Microbiology*, v. 5, n. 34, p. 1-8.

Rodrigues, M. I., Iemma, A. F. (2005), Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos – Uma estratégia seqüencial de planejamentos, Editora Casa do Pão Editora, Campinas, Brasil.

Weinberger, D.M., Trzcinski, K., Lu, Y., Bogaert, D., Brandes, A., Galagan, J., Anderson, P.W., Malley, R., Lipsitch, M. (2009), Pneumococcal capsular polysaccharide structure predicts serotype prevalence. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 6, e1000476, p. 1-9.

World Health Organization (2007), Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*, v. 82, n. 12, p. 93-104.

## ANEXO 2 - ARTIGO

LEAL, M. L. M.; PEREIRA, D. S. G.; JESSOUROUN, E.; COUTO, M. A. P. G.; PEREIRA JR., N. Investigation of cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 5, 2011. ISSN: 0717-3458. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.info> DOI: 10.2225/vol14-issue5-fulltext-6.

## Investigation of cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 14

Maria de Lourdes Moura Leal<sup>1</sup> ✉ · Denise da Silva Gomes Pereira<sup>1</sup> · Ellen Jessouroun<sup>1</sup> ·  
Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto<sup>2</sup> · Nei Pereira Jr<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico-Bio-Manguinhos, Laboratório de Tecnologia Bacteriana, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica, Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos, RJ, Brasil

✉ Corresponding author: mleal@bio.fiocruz.br  
Received February 21, 2011 / Accepted June 7, 2011  
Published online: September 15, 2011  
© 2011 by Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

**Abstract** *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is among the most significant causes of bacterial disease in humans. Capsular polysaccharide (CPS) production is essential for pneumococcal virulence. Pneumococcal CPS has been widely used as vaccine antigen. This study is focused on the influence of culture conditions of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 as for developing an industrial method for polysaccharide production. The pH proved to be a highly important variable in batchwise culture. Using the pH control all glucose added was consumed resulting in a four-fold increase in polysaccharide productivity relative to cultivation without pH control. *S. pneumoniae* is a lactic acid bacterium, so named for its primary metabolic byproduct (lactate), which has an inhibitory effect on cell growth in concentrations ranging from 4 to 5 g/L. An increase of 30% in polysaccharide productivity was observed using glucose pulses with 5.5 hrs of growth, resulting in a maximum polysaccharide concentration of 185.2 mg/L. Our data suggest the possibility of using a medium of non-animal origin and employing pH control for the cultivation of pneumococcus to produce a polysaccharide vaccine.

**Keywords:** polysaccharide capsular, vaccine, *Streptococcus pneumoniae*

### INTRODUCTION

*Streptococcus pneumoniae* is an important pathogen in young children and older adults and causes invasive disease, meningitis, and otitis media worldwide. More than 90 pneumococcal serotypes have been identified, and each possesses an immunologically distinct capsular polysaccharide which is the main bacterial virulence factor (Bogaert et al. 2004; Garau and Calbo, 2007; Weinberger et al. 2009).

The impact of pneumococcal disease on young children is a matter of great concern in developing countries, where the disease causes estimated 1.2 million deaths of young children annually (Hausdorff et al. 2000).

In South America the pneumococcal disease incidence and the mortality rates in children below 5 years of age vary a lot among different countries. Brazil, Peru, Bolivia and Colombia presented disease incidence from 750 to 1,000 cases per 100,000 inhabitants in 2000. On the other hand Guyana, Paraguay and Suriname presented higher incidence (2,000-3,000 cases/100,000). However in the same period Brazil and Bolivia displayed higher mortality rates (80-160 deaths/100,000). Moreover Argentina and Uruguay showed low mortality rates (ca of 10 deaths/100,000) and an incidence

average of 1,000 cases/100,000 inhabitants. Chile was the only country with low rates of mortality (5 deaths/100,000) and disease incidence (250 cases/100,000) ([www.preventpneumo.org](http://www.preventpneumo.org)) in that year. Nowadays Brazil shows 15% of bacterial meningitis caused by *S. pneumoniae*. In this country, pneumococcal meningitis has presented an incidence coefficient of 7.5 per 100,000 inhabitants in children under five years, in the last 10 years ([www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs)). Data from Vaccine Regional System II in 2009 for pneumococcus disease in Latin America, show the serotype 14 as the most prevalent in 58% of the countries. In Brazil it has been accounted almost 40% of pneumococcal infections in children below 5 years of age caused by serotype 14. Penicillin resistance is detected in 29% of meningitis isolates (Organización Panamericana de la Salud, 2010).

The bacterial capsule has been used as an antigen in pneumococcal vaccines since the 1980s which led to the development of a 23-valent polysaccharide vaccine that have proven to be efficacious against pneumococcal disease in adults (Institut Merieux, 1980). However, pneumococcus polysaccharide vaccines are not effective in young children and have a low efficacy in older adults. Because polysaccharide antigens are T-independent molecules, they do not induce immunological memory and long-lasting immune response (Weintraub, 2003). Therefore, these antigens will likely be replaced by new, conjugated vaccines whose efficacy depends on the inclusion of prevalent regional serotypes to be successful in protection. Pneumococcal conjugated vaccines have been licensed around the world, beginning with a seven-valent from Pfizer (formerly Wyeth) against serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F (Jefferies et al. 2010). More recently, a 10-valent from GSK (Sinflorix) and 13 valent from Pfizer (Prenar 13) vaccines were licensed in Brazil.

Although *S. pneumoniae* disease and new vaccines has been extensively studied, few publications have focused on different fermentation processes and bioreactor up-scale cultivation currently used in vaccine antigens production. Considering that the serotype 14 is one of the most prevalent in Brazil and in other South American countries, this study estimated the kinetic parameters and evaluated the PSC production yield of serotype 14 cultivation in 2.5 liter-bioreactor.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Microorganism and stock cultures**

*S. pneumoniae* serotype 14 strain St 113/95 was clinically isolated and is deposited in the Instituto Adolfo Lutz, Seção de Bacteriologia, SP, Brazil. Stock cultures of *S. pneumoniae* 14 were grown in non-animal Tryptic soy broth (TSB) for 5 hrs at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and maintained in a deep freezer (-70°C) in the same medium, supplied with 20% (v/v) glycerol.

### **Medium composition and preparation**

A modified Catlin medium (Catlin Bio) was specially developed for this study. The original Catlin 6 (Fu et al. 1995) was added by Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (2.31 mg/L) instead of iron citrate. The other components added were: 10 mg of choline, 625 mg of L-glutamine, 100 mg of asparagine, 360 mg of MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 mL of thioglycolic acid (10% v/v) and 1 g NaHCO<sub>3</sub> in 1 L of the final medium. The other components added were: 10 mg of choline, 625 mg of L-glutamine, 100 mg of asparagine, 360 mg of MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O and 50 mL of dialyzed yeast extract solution (90 g/L) in 1 L of the final medium. The lower molecular weight fraction obtained from yeast extract dialysis was prepared using membrane cut-off 12-14 kDa in distilled water. All medium components were sterilized by passage through a 0.22 µm polyetersulfone membrane.

### **Bioreactor batch cultivation**

To prepare the inoculum for the experiment in bioreactor, a frozen stock (1 mL) of *S. pneumoniae* culture was used to inoculate a TSA (trypticase soy agar) Roux bottle, supplemented with 5% (v/v) sheep blood and incubate at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 16 hrs. After incubation, the cells were transferred to two 125 mL flasks containing 62,5 mL of Catlin Bio medium at an optical density (OD<sub>550nm</sub>) of 0.4 as the first pre-culture. After 4 hrs of growth, the flasks were used to prepare the second pre-culture in 250 mL flasks containing 125 mL of Catlin Bio medium. The second pre-culture, after 4 hrs of incubation, was used to inoculate a 2.5 L bioreactor. A 10% v/v of inoculum was used in the bioreactor step. Batch

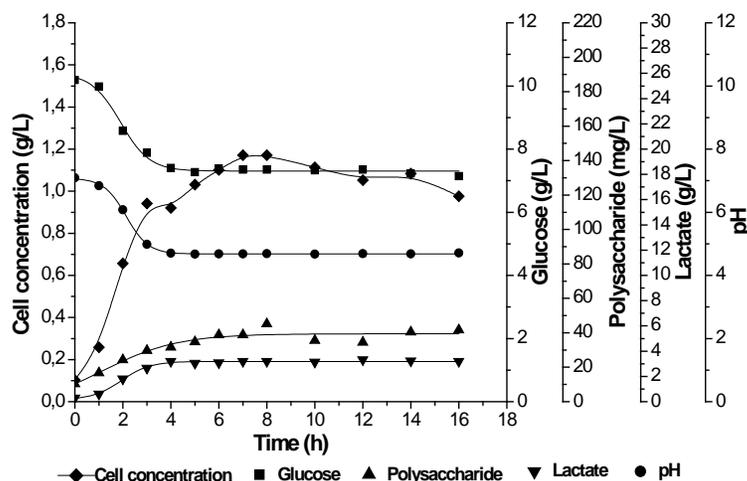
cultures were carried out in 2.5-L bioreactor (Bioflo 110, New Brunswick, USA) with 1.5 L of medium, at 37°C and 100 rpm. Comparative studies without and with pH control (pH 7.2) were performed by addition of 5 M NaOH (Institut Merieux 1980). Glucose was added (20 mL of a 50% w/v solution) after 5 hrs and 30 min of growth.

### Analytical methods

The culture broth samples were centrifuged at 9,500 g for 30 min at 4°C. Then, the cell-free supernatants were filtered through 0.20- $\mu$ m membrane filter and used for chemical analyses of glucose, lactic acid and PSC concentrations. The glucose and lactic acid concentrations were measured using the enzymatic-colorimetric assay oxidase enzyme kit (Laborlab, Brazil) and lactate dehydrogenase enzyme kit (Katal Biotecnológica, Brazil), respectively. The CPS production, in each one hour of growth, was determined by the method of Dubois (Dubois et al. 1956), after extensive dialysis against distilled water. A model mixture of the hexoses in the same molar ratio as in the polysaccharide structure was used as the standard for the calibration curve (Cuesta et al. 2003). A correlation between dry cell concentration and optical density (550 nm) was previously done to be used to evaluate the bacteria growth in the bioreactor.

### RESULTS AND DISCUSSION

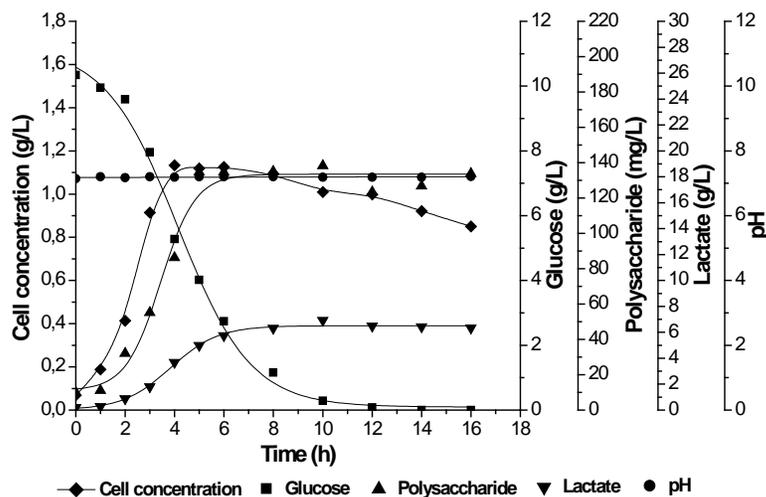
Accordingly to kinetic profiles of bioreactor cultures showed in Figure 1, the polysaccharide production was associated to cell growth without pH control. There was no lag phase, because the cells immediately entered the exponential phase growth, indicating that they were adapted to the culture conditions. The cell growth profiles were similar in the shaker flask and bioreactor scales, displaying the same specific growth rate ( $\mu_x = 0.75 \text{ h}^{-1}$ ) (data not shown).



**Fig. 1** Kinetic profile of growth, polysaccharide production, glucose consumption and lactic acid formation in Catlin Bio medium. Bioreactor without pH control. Strain 113/95. Number of repetitions: 02.

The glucose consumption and the lactic acid production, the main byproduct of pneumococci glucose metabolism (Hoskins et al. 2001), ceased after 4 hrs of fermentation. The production of lactic acid caused a decrease in pH (pH = 4.7), which may have led to a halt in glucose uptake. The amount of glucose reached a residual level of 70% of the initial concentration, indicating the importance of pH control during bacterial growth.

The results of the experiment with pH control are depicted in Figure 2, which shows that the rate of polysaccharide production is clearly associated with cell growth. The value of specific growth rate ( $\mu_x = 0.853 \text{ h}^{-1}$ ) was greater than the one obtained without pH control, reinforcing the importance of this variable. In contrast to the results of culture condition without pH control, in 10 hrs of pH-controlled fermentation, the glucose was entirely consumed, even after cell growth had ceased. The secretion of lactic acid was only partially associated with cell growth, as indicated by its continued production even after cell growth cessation. This type of kinetic behaviour of lactic acid fermentation has been previously reported (Gonçalves et al. 2002).



**Fig. 2** Kinetic profile of growth, polysaccharide production, glucose consumption and lactate formation in modified Catlin Bio medium. Bioreactor with pH control. Strain 113/95. Number of repetitions: 02.

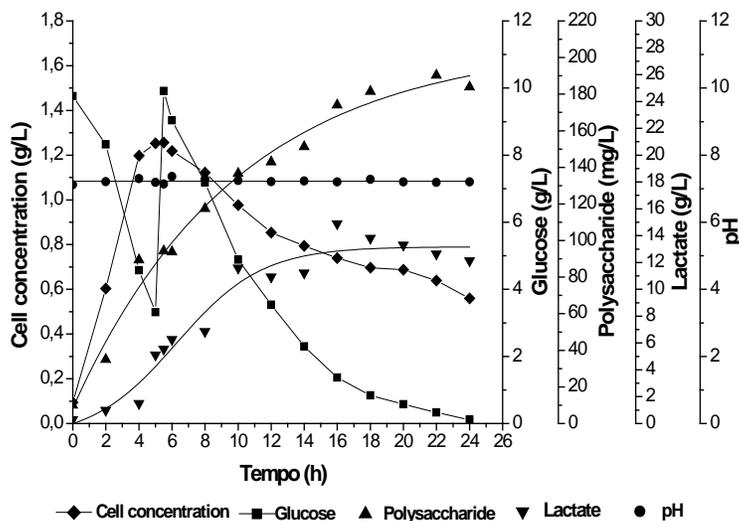
The polysaccharide volumetric productivity ( $Q_P$ ) at 16 hrs of fermentation with pH control was approximately four times higher than the fermentation without pH control.

With the goal of improving the production of PSC, a pulse of glucose was fed into the bioreactor at 5.5 hrs of batch fermentation. Usually, glucose is added in fed batch fermentation when the substrate is completely consumed; however, we fed the bioreactor at the end of the exponential growth phase because at the stage, the cell metabolic activity had not yet been reduced. To avoid a change in the working volume in the bioreactor, the feeding medium contained a 50% w/v concentration of glucose. Thus, the variation in volume resulting from the addition of glucose was negligible ( $\leq 20 \text{ mL}$ ).

Using pH control, the glucose was completely consumed (Figure 3) in 24 hrs, at which time the lactate concentration was 12.1 g/L.

Cell growth has ceased when the concentration of lactic acid reached approximately 4 to 5 g/L, as was observed in batchwise experiment, which suggests that this metabolite may inhibit bacterial growth. By employing acid casein hydrolysate and dialyzed yeast extract in the growth of *S. pneumoniae* serotype 23F, Gonçalves et al. (2002) observed that the lactic acid-inhibiting concentration of bacterial growth was close to 10 g/L. In contrast, with a glucose pulse and pH control, we found that polysaccharide production continued even after cell growth has ceased, as is typical of a process whose production kinetic is partially associated with cell growth. Under certain conditions of growth, several factors that are not well understood in growing population display a particularly effective quorum sensing system that activates several potent autolysins (Restrepo et al. 2005). Among various autolysins LytA seems to be the major pneumococcal lysin. This enzyme is an amidase that cleaves the N-acetyl-muramoyl-L-alanine bound of pneumococcal peptidoglycan (Balachandran et al. 2001; Kadioglu et al. 2008). The

cell lysis, which has been described as a phenomenon that occurs around the last part of the exponential phase of growth, accelerated the CPS liberation. Gonçalves et al. (2006) found that a portion of the polysaccharide by serotype 23F was trapped in the cell wall, and its release was also linked to cell lyses. The patent of the Merieux Institut (1980) also describes cell lyses as a way to increase the amount of polysaccharides recovered. In the downstream process of CPS recover the rapid lysis upon exposure to sodium deoxycholate is based on its capacity of triggering the LytA activity (Garcia et al. 1999).



**Fig. 3 Kinetic profile of growth, polysaccharide production, glucose consumption and lactate formation in Catlin Bio medium.** Bioreactor with pH control and glucose addition time 5 hrs and 30 min. Strain 113/95.

It is shown in Figure 3 that cell growth declined even after the addition of glucose, probably due to the complete consumption of an essential nutrient. The results suggest that other nutrients could be essential to prevent bacterial lysis. Choline chloride added to the growth medium has been shown to inhibit LytA pneumococcal autolysin. This amino alcohol prevents the LytA attachment to wall teichoic acids avoiding cell lysis. Culture media added of 2% of choline induces the loss of autolytic properties of autolysin that is detected normally in the last part of exponential phase of pneumococcus growth. The lack of choline in *S. pneumoniae* culture media modifies the peptidoglycane synthesis (Garcia et al. 1999). In our study the choline concentration in Catlin Bio medium was 0,1% which seems to be lower than the amount described in the literature to bacterial lysis inhibition. Nonetheless, the growth limitation by essential nutrients in Catlin Bio medium and also the avoidance of bacterial lysis should be better studied in future experiments.

The increasing polysaccharide concentration after cell growth cessation may be ascribed to cell lyses, which led to a greater release of polysaccharide into the culture medium. The total amount of polysaccharide after cell growth is partially related to the release by cell lyses and also the production of viable cells, still consuming the glucose as nutrient. In the present work, the final polysaccharide concentration after a glucose pulse and pH control was 185.2 mg polysaccharide/L. Other groups have reported a polysaccharide concentration produced by *S. pneumoniae* serotype 23F in the same order of magnitude as that obtained in this work. Gonçalves et al. (2002) and Cruz-Leal et al. (2006) worked with the same polysaccharide and reported concentrations of 240 mg/L and 250 mg/L, respectively. In addition Sheng-De et al. (2009) found 255 mg/L of serotype 3. The variables related to serotype 14 CPS production of the study are in accordance to the literature and are in Table 1.

The volumetric productivity of polysaccharide was 10.25 mg/L.h at 16 hrs of fermentation with pH control and the addition of glucose. This productivity corresponded to increases of 1.3 and 5.2 fold when compared to the experiment operated batchwise without and with pH control, respectively.

## CONCLUDING REMARKS

The pH proved to be an important variable in batch culture for the production of polysaccharide by *S. pneumoniae*. An approximately four-fold increase in volumetric productivity was achieved by using pH control during fermentation. The addition of glucose to the fermentation broth had a significant effect on polysaccharide productivity, corresponding to an increase of 30% over the productivity of simple batchwise fermentation. It is noteworthy that cell lyses was related to an increase in polysaccharide release, which may also be ascribed to CPS production by the remaining viable cells because glucose continued to be consumed after cell growth has ceased. The results are of interests because strategies for increasing polysaccharide recuperation in downstream step are vital for lowering the process costs of obtaining a capsular polysaccharide for use as a vaccine against pneumococcal disease.

**Table 1. Results of response variables for cultivation of *S. pneumoniae* Catlin Bio medium.** Strain: 113/95. Results obtained between the initial time and 16 hrs of cultivation.

Experiment	$Y_{P/S}^a$ (mg P/g S)	$Q_P^a$ (mg P/L.h)	$X_{max}$ (g/L)	$L_{max}$ (g/L)	$P_{max}$ (mg/L)
without pH control	10.02	1.96	1,17	3.21	39.19
with pH control	12.85	7.73	1.13	6.50	132.34
with pulse of glucose 5,5h <sup>b</sup>	10.29	10.25	1.25	13.36	185.22

$X_{max}$ : maximum cell concentration;  $L_{max}$ : maximum lactate concentration;  $P_{max}$ : maximum polysaccharide concentration;  $Y_{P/S}$ : cell yield;  $Q_P$ : volumetric productivity. a: Calculation of coefficients  $Y_{P/S}$  and  $Q_P$  with 16 hrs of culture. b: Experiment with pH = 7,2 control.

## REFERENCES

- BALACHANDRAN, P.; HOLLINGSHEAD, S.K.; PATON, J.C. and BRILES, D.E. (2001). The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *Journal of Bacteriology*, vol. 183, no. 10, p. 3108-3116. [\[CrossRef\]](#)
- BOGAERT, D.; DE GROOT, R. and HERMANS, P.W. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 4, no. 3, p. 144-154. [\[CrossRef\]](#)
- CRUZ-LEAL, Y.; MENÉNDEZ, T.; COIZEAU, E.; ESPINOSA, R.R.; CANAAN, L.; BLANCO, F.; CARMENATE, T.; CHANG, J.; QUIÑONES, D.; TAMARGO, I.; CREMATA, J.; VEREZ-BENCOMO, V. and GUILLÉN, G. (2006). Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative determination of capsular polysaccharide production in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *Biotechnology Applied Biochemistry*, vol. 44, no. 2, p. 101-108. [\[CrossRef\]](#)
- CUESTA, G.; SUAREZ, N.; BESSIO, M.I.; FERREIRA, F. and MASSALDI, H. (2003). Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 using a modification of phenol-sulfuric acid method. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 52, no. 1, p. 69-73. [\[CrossRef\]](#)
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. and SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, vol. 28, no. 3, p. 350-356. [\[CrossRef\]](#)
- FU, J.; Bailey, F.J.; King, J.J.; Parker, C.B.; Robinett, R.S.; Kolodin, D.G.; George, H.A. and Herber, W.K. (1995). Recent advances in the large scale fermentation of *Neisseria meningitidis* Group B for the production of an outer membrane protein complex. *Nature Biotechnology*, vol. 13, no. 2, p. 170-174. [\[CrossRef\]](#)
- GARAU, J. and CALBO, E. (2007). Capsular types and predicting patient outcomes in pneumococcal bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 45, no. 1, p. 52-54. [\[CrossRef\]](#)
- GARCÍA, P.; GONZÁLEZ, M.P.; GARCÍA, E.; LÓPEZ, R. and GARCÍA, J.L. (1999). LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Molecular Microbiology*, vol. 31, no. 4, p. 1275-1281. [\[CrossRef\]](#)
- GONÇALVES, V.M.; ZANGIROLAMI, T.C.; GIORDANO, R.L.C.; RAW, I.; TANIZAKI, M.M. and GIORDANO, R.C. (2002). Optimization of medium and cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F. *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 59, no. 6, p. 713-717. [\[CrossRef\]](#)
- GONÇALVES, V.M.; TAKAGI, M.; CARNEIRO, S.M.; DE CAMPOS GIORDANO, R. and TANIZAKI, M.M. (2006). Introduction of air in the anaerobic culture of *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F induces the release of

- capsular polysaccharide from bacteria surface into the cultivation medium. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 101, no. 5, p. 1009-1014. [\[CrossRef\]](#)
- HAUSDORFF, W.P.; Bryant, J.; PARADISO, P.R. and SIBER, G.R. (2000). Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 30, no. 1, p. 100-121. [\[CrossRef\]](#)
- HOSKINS, J.; ALBORN JR, W.E.; ARNOLD, J.; BLASZCZAK, L.C.; BURGETT, S.; DEHOFF, B.S.; ESTREM, S.T.; FRITZ, L.; FU, D.J.; FULLER, W.; GERINGER, C.; GILMOUR, R.; GLASS, J.S.; KHOJA, H.; KRAFT, A.R.; LAGACE, R.E.; LEBLANC, D.J.; LEE, L.N.; LEFKOWITZ, E.J.; LU, J.; MATSUSHIMA, P.; MCAHREN, S.M.; MCHENNEY, M.; MCLEASTER, K.; MUNDY, C.W.; NICAS, T.I.; NORRIS, F.H.; O'GARA, M.; PEERY, R.B.; ROBERTSON, G.T.; ROCKEY, P.; SUN, P.; WINKLER, M.E.; YANG, Y.; YOUNG-BELLIDO, M.; ZHAO, G.; ZOOK, C.A.; BALTZ, R.H.; JASKUNAS, S.R.; ROSTECK JR., P.R.; SKATRUD, P.L. and GLASS, J.I. (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *Journal of Bacteriology*, vol. 183, no. 19, p. 5709-5717. [\[CrossRef\]](#)
- INSTITUT MERIEUX. (1980). Procédé de purification de polyosides de *Streptococcus pneumoniae* et vaccin à base de polyosides ainsi purifiés. Brevet Belge, déposée par la société anonyme dite: Institut Merieux no. 8026320. European patent B74899.
- JEFFERIES, J.M.; SMITH, A.J.; EDWARDS, G.F.S.; MCMENAMIN, J.; MITCHELL, T.J. and CLARKE, S.C. (2010). Temporal analysis of invasive Pneumococcal clones from Scotland illustrates fluctuations in diversity of serotype and genotype in the absence of pneumococcal conjugate vaccine. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 48, no. 1, p. 87-96. [\[CrossRef\]](#)
- KADIOGLU, A.; WEISER, J.N.; PATON, J.C. and ANDREW, P.W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 6, no. 4, p. 288-301. [\[CrossRef\]](#)
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. (2010). Informe Regional de SIREVA II, 2009: datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores. *Regulaciones Sanitarias Internacionales, Alerta y Respuesta y Enfermedades epidémicas* (HSD/IR), Washington D.C.
- RESTREPO, V.P.; SALAZAR, B.E.; AGUDELO, M.; RODRIGUEZ, C.A.; ZULUAGA, A.F. and VESGA, O. (2005). Optimization of culture conditions to obtain maximal growth of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Microbiology*, vol. 5, no. 34, p. 1-8. [\[CrossRef\]](#)
- SHENG-DE, J.; KIM, Y.-M.; KANG, H.-K.; JUNG, S.-J. and KIM, D. (2009). Optimization of capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 19, no. 11, p. 1374-1378.
- WEINBERGER, D.M.; TRZCINSKI, K.; LU, Y.-J.; BOGAERT, D.; BRANDES, A.; GALAGAN, J.; ANDERSON, P.W.; MALLEY, R. and LIPSITCH, M. (2009). Pneumococcal capsular polysaccharide structure predicts serotype prevalence. *PLoS Pathogens*, vol. 5, no. 6, p. e1000476. [\[CrossRef\]](#)
- WEINTRAUB, A. (2003). Immunology of bacterial polysaccharide antigens. *Carbohydrate Research*, vol. 338, no. 23, p. 2539-2547. [\[CrossRef\]](#)

#### How to reference this article:

LEAL, M.M.; PEREIRA, D.S.G.; JESSOURON, E.; COUTO, M.A.P.G. and PEREIRA, N. (2011). Investigation of cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 14, no. 5. <http://dx.doi.org/10.2225/vol14-issue5-fulltext-6>