

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA

RODRIGO FELIPE CANO

**PRODUÇÃO DE POLIRIBOSILRIBITOL FOSFATO POR
Haemophilus influenzae TIPO B EM BIORREATORES: UMA
REVISÃO DA LITERATURA**

OURO BRANCO - MG

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA

RODRIGO FELIPE CANO

**PRODUÇÃO DE POLIRIBOSILRIBITOL FOSFATO POR
Haemophilus influenzae TIPO B EM BIORREATORES: UMA
REVISÃO DA LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João Del Rei, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de
Bioprocessos

Orientadora: Profª. Me. Katialaine Correa de Araújo

OURO BRANCO - MG

2017

RODRIGO FELIPE CANO

PRODUÇÃO DE POLIRIBOSILRIBITOL FOSFATO POR *Haemophilus influenzae* TIPO B EM BIORREATORES: UMA REVISÃO DA LITERATURA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João Del Rei, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Aprovado em ____ / ____ / ____

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profª. Me. Katialaine Correa de Araújo
Orientador / UFSJ

Prof. Dr. Enio Nazaré de Oliveira Júnior
Avaliador / UFSJ

Prof. Me. Gabriel de Castro Fonseca
Avaliador / UFSJ

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo incondicional apoio, carinho e afeto!

À profa. Me. Katialaine Correa de Araújo pela orientação, aconselhamento, dedicação e paciência no ensino. Sua contribuição foi fundamental na existência desse trabalho. Você se tornou um espelho de profissional e educadora que almejo ser no futuro. Minha eterna gratidão!

À Caroline Nunes pela amizade, companheirismo, puxões de orelhas e pelos macarrões primavera. Sua existência contribuiu com muita paz e felicidade nesses tempos de tormenta.

Aos meus amigos e amigas pelo companheirismo, em especial pessoal da República Ventania, a Anne Caroline pelas risadas de desespero e Shanti Zumbo Coronel Guevara pelas boas doses de maluquices!

À equipe do Laboratório Desenvolvimento de Processos do Instituto Butantan, em especial Dra. Mickie Takagi por ter viabilizado meu primeiro contato com a temática, pela paciência e contribuição direta na minha formação profissional e pessoal.

A todos que contribuíram direta e indiretamente.

“A educação é um ato de amor, por isso, um ato de coragem. Não pode temer o debate. A análise da realidade. Não pode fugir à discussão criadora, sob pena de ser uma farsa.”

Paulo Freire em “Pedagogia do Oprimido” (1974)

“[...] desde a aurora da civilização as pessoas não se dão por satisfeitas com a noção de que os eventos são desconectados e inexplicáveis. Sempre ansiamos por compreender a ordem subjacente do mundo. Hoje, ainda almejamos saber por que estamos aqui e de onde viemos. O desejo profundo da humanidade pelo conhecimento é justificativa suficiente para nossa busca contínua. E nossa meta não é nada menos do que uma descrição completa do universo onde vivemos.”

Stephen Hawking em “Uma breve história do tempo” (1942)

RESUMO

Haemophilus influenzae tipo b é uma bactéria Gram-negativa responsável por infectar e ocasionar meningite e pneumonia em crianças menores de cinco anos e adultos imunologicamente debilitados. Seu polissacarídeo capsular, o poliribosilribitol fosfato, é o responsável pela sua virulência e componente principal da vacina conjugada contra Hib. No entanto, o processo de produção é demasiadamente custoso tendo em vista as numerosas etapas envolvidas e a perda de material ao longo delas. Diante do exposto, faz-se necessário investigar os gargalos de processo e identificar as melhores estratégias para aperfeiçoar a produção. Portanto, este estudo teve por objetivo coletar toda produção científica referente ao estado da arte do cultivo de Hib, identificar possíveis melhorias de processo no que diz respeito à maximização da concentração, produtividade e qualidade de polissacarídeo capsular. Diante das estratégias listadas, o uso de linhagens selvagens com múltiplas cópias do locus *cap*, otimização do meio de cultivo e cultivo contínuo demonstraram ser alternativas promissoras.

Palavras chaves: *Haemophilus influenzae* tipo b, polissacarídeo capsular, estado da arte, vacinas, estratégias de otimização.

LISTA DE ABREVIACÕES

Acetil-coA: acetil coenzima A

ATP: adenosina trifosfato

CAC: ciclo do ácido cítrico

cAMP: monofosfato cíclico de adenosina

CDP: cistidina difosfato

CHO: células de ovário de hamster chinês

CO₂: dióxido de carbono

CTE: cadeia transportadora de elétrons

D: taxa de diluição

DTP-Hib: difteria-tétano-pertussis

DTP-Hib-HepB: difteria-tétano-pertussis-hepatitae B

EI: enzima I

EII: enzima II

EIII: enzima III

F: vazão volumétrica

FeSO₄: sulfato de ferro

H⁺: próton

Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b

HPr: proteína carreadora HPr

IgA: imunoglobulina A

LPS: lipopolissacarídeo

MgSO₄: sulfato de magnésio

MP: meio de peptona de soja

NaCl: cloreto de sódio

NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NADP: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

O₂: oxigênio molecular

PEP: fosfoenolpiruvato

PRP: poliribosil ribitol

PTS: sistema fosfotransferases de açúcares do fosfoenolpiruvato

P: produto

Rpm: rotações por minuto

S: substrato

UFC: unidade formadora de colônia

μ : taxa de crescimento

$\mu_{\max}$: taxa de crescimento específico

V: volume

vvm: volume por minuto

X: concentração de biomassa

Y_{ps} : coeficiente de rendimento de produto por substrato

Y_{xs} : coeficiente de rendimento de célula por substrato

ZnSO₄: sulfato de zinco

LISTA DE IMAGENS

Figura 1. Países que introduziram a vacina contra Hib em seu programa de vacinação infantil.	12
Figura 2. Distribuição das síndromes clínicas associadas com doenças invasivas de Hib mundialmente.	18
Figura 3. (a) Arquitetura da parede celular e (b) estrutura química do LPS das bactérias gram-negativas.	19
Figura 4. Estrutura molecular do monômero dos seis sorotipos de <i>H. influenzae</i> capsular.	21
Figura 5. Transporte de glicose via sistema de fosfotransferase.	23
Figura 6. Mapa metabólito da via glicolítica de <i>H. influenzae</i> 10810 (sorotipo b).	26
Figura 7. Mapa metabólito do metabolismo de piruvato de <i>H. influenzae</i> 10810 (sorotipo b).	27
Figura 8. Mapa metabólito do ciclo do ácido cítrico de <i>H. influenzae</i> 10810 (sorotipo b).	28
Figura 9. Mapa metabólito da via das pentoses fosfato de <i>H. influenzae</i> 10810 (sorotipo b). ..	30
Figura 10. Organização geral do locus cap do <i>H. influenzae</i> capsular.	31
Figura 11. (a) Redução e transferência de citidil e (b) sítio ativos da enzima CDP-ribitol sintetase.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores de crescimento e diferenciação bioquímica das espécies do gênero <i>Haemophilus</i>	18
--	----

LISTA DE FÓRMULAS

$$PEP + Enzima\ I\ (EI) \rightleftharpoons P - EI + Piruvato \quad (\text{Eq. 1})$$

$$P - EI + HPr \rightleftharpoons P - HPr + EI \quad (\text{Eq. 2})$$

$$P - HPr + EII \rightleftharpoons P - EII + HPr \quad (\text{Eq. 3})$$

$$P - EII + EIII \rightleftharpoons P - EIII + EI \quad (\text{Eq. 4})$$

$$P - EIII + Carboidrato_{extracelular} \rightleftharpoons P - Carboidrato_{intracelular} + EIII \quad (\text{Eq. 5})$$

$$[Acúmulo] = [Entrada] - [Saida] + [Geração] + [Consumo] \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\frac{d(X.V)}{dt} = -F.X + \mu.X. \quad (\text{Eq. 7})$$

$$D = \frac{F}{V} \quad (\text{Eq. 8})$$

$$\frac{d(X)}{dt} = (\mu - D).X \quad (\text{Eq. 9})$$

$$(\mu - D).\tilde{X} = 0 \quad (\text{Eq. 10})$$

$$D = \mu \quad (\text{Eq. 11})$$

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Objetivo	13
2. METODOLOGIA.....	14
3. REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 <i>Haemophilus influenzae</i> : da descoberta à vacina.....	15
3.2 Microbiologia de <i>Haemophilus influenzae</i> e seu sorotipo tipo b.....	17
3.3 Fatores de Virulência	17
3.3.1 Lipopolissacarídeos	18
3.3.2 Polissacarídeo Capsular	20
3.3.3 IgA proteases	21
3.4 Bioquímica e Fisiologia do <i>H. influenzae</i> tipo b	22
3.4.1 Sistema de Captação de Carboidratos	22
3.4.2 Via glicolítica e Metabolismo do Piruvato	24
3.4.3 Ciclo do Ácido Cítrico Redutivo	26
3.4.4 Cadeia Transportadora de Elétrons	29
3.4.5 Via das Pentoses Fosfato	29
3.4.6 Síntese de poliribosil-ribitolfosfato	30
3.4.7 Exigências Nutricionais	32
3.5 Produção de polissacarídeo capsular por <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b.....	32
3.5.1 O estado da arte do cultivo de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b em biorreatores	33
3.6 Estratégias de otimização de crescimento microbiano e formação de produto	35
3.6.1 Uso de linhagens selvagens com múltiplas cópias do locus <i>cap</i>	36
3.6.2 Otimização do meio de cultivo.....	37
4. CONCLUSÃO.....	44
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	45

1. INTRODUÇÃO

Haemophilus influenzae tipo b (Hib) é uma bactéria Gram-negativa de extrema relevância médica responsável por provocar diversas infecções graves em crianças menores que cinco anos e indivíduos com vulnerabilidade imunológica. As patologias causadas por este agente etiológico são inúmeras, sendo a meningite e a pneumonia as mais recorrentes. Seu principal fator de virulência é o polissacarídeo capsular, contudo, demais componentes celulares também são importantes para sua permanência, a colonização e invasão nos seres humanos. As infecções por Hib foi controlada em alguns países (Figura 1) em meados de 1980 com a introdução da vacina conjugada Hib, constituída do polissacarídeo capsular conjugado com uma proteína carreadora toxoide (CHANDRAN *et al.*, 2013).



Figura 1. Países que introduziram a vacina contra Hib em seu programa de vacinação infantil.

Verde – presente; Branco – ausente.

Fonte: MORRIS *et al.* (2008).

Mesmo com as taxas de infecção baixas em alguns países, destaca-se uma grande maioria de países cuja população ainda não foi totalmente beneficiada. Por exemplo, a taxa de infecção no continente africano e asiático é de aproximadamente 1000 casos por 100000 crianças menores de 5 anos de idade. Atualmente, os países com maior incidência e mortes causadas por *H. influenzae* tipo b é a Índia, Nigéria, Etiópia, República Democrática do Congo, China, Afeganistão, Paraguai, Bangladesh, Angola e Níger (MORRIS *et al.*, 2008; CHANDRAN *et al.*, 2013).

As vacinas contra Hib são fornecidas em uma formulação conjunta com a DTP-Hib (difteria-tetanus-pertussis), DTP-Hib-HepB (difteria-tetanus-pertussis-hepatite B) ou

hexavalente, com a incorporação da vacina inativa d poliomielite. Interessantemente, o constituinte mais custoso de todas as vacinas citadas acima é o referente ao Hib (UNICEF, 2013). Portanto, a diminuição de custos de produção da vacina se torna fundamental para uma maior abrangência da vacina. Dentre as estratégias levantadas, faz-se a identificação de gargalos de processo para posteriormente traçar estratégias de maximização da produtividade e redução de perdas e gastos com insumos de produção.

1.1 Objetivo

O presente trabalho teve por objetivo realizar uma revisão de literatura sobre o estado da arte da produção de polirribosil ribitol fosfato por *Haemophilus influenzae* tipo b, mapeando a trajetória e a distribuição da produção científica, e discorrer sobre possíveis estratégias para otimizar a produção e qualidade do bioproduto.

2. METODOLOGIA

A metodologia empregada na síntese do presente material fundamentou-se nas reflexões de Ferreira (2002). Primeiramente, um levantamento bibliográfico na base de periódicos nacionais e internacionais da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) foi conduzido de modo a mapear as principais publicações referentes às palavras chaves: *Haemophilus influenzae*, sorotipo b, histórico, vacina conjugada Hib, poliribosil ribitol fosfato, metabolismo, fisiologia, etiologia, incidência, cultivo aeróbico, produção de exopolissacarídeo bacteriano e estratégias de otimização de processos bioquímicos. O material coletado foi catalogado, estudado e avaliado para posteriormente ser compilado em um resumo sistemático sobre a rede de pensamentos e conceitos que articulam os principais saberes envolvendo *H. influenzae* tipo b e a produção de polissacarídeo capsular, a citar: o histórico do microrganismo, sua importância médica, microbiologia, incidência, vacina conjugada, fatores de virulência, metabolismo central, polissacarídeo capsular e o estado da arte da produção da cápsula polissacarídica antigênica em biorreatores.

Após a avaliação do resumo, foram identificadas as limitações dos processos estabelecidos: inibição do crescimento pelo acúmulo de bioproduto, exigências nutricionais, particularidades metabólicas e instabilidade de polissacarídeo. Tais conteúdos foram extraídos em uma revisão interativa referente a biossíntese de polissacarídeo capsular em bactérias patogênicas, apresentados sob forma de uma revisão bem detalhada. Por fim, essas informações foram contrastadas com as particularidades de *Haemophilus influenzae* tipo b para discorrer sobre possíveis alternativas para maximização da produtividade, concentração, rendimento e qualidade em cultivos em biorreatores.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Haemophilus influenzae*: da descoberta à vacina

Haemophilus influenzae foi primeiramente descrito pelo microbiologista alemão Robert Koch no ano de 1883 em um estudo realizado no Egito com pacientes com conjuntivite. Koch observou que a enfermidade era causada por dois agentes distintos e descreveu que uma pequena bactéria coco bacilar gram-negativa - atualmente conhecida como *H. influenza* biogrupo *aegyptius* – era responsável pelo tipo mais brando de infecção. Em 1892, seu estudante, o renomado bacteriologista Richard Pfeiffer, isolou *H. influenzae*, naquela época intitulado como bacilo de *Pfeiffer* ou *Bacillus influenza*, de amostras da saliva e do pulmão de pacientes infectados com gripe durante a pandemia de influenza de 1889 e sugeriu que ele era o agente etiológico da doença (HARRISON *et al.*, 1989; JORDENS e SLACK, 1995; TOGNOTTI, 2003; CHANDRAN *et al.*, 2013).

Mesmo diante da incapacidade de Pfeiffer infectar animais com este isolado, a comunidade científica da época pouco questionou os seus resultados e aceitou o achado como verdadeiro por quase 25 anos. No entanto, durante outra pandemia de influenza em 1917, estudos evidenciaram que o *H. influenzae* possuía nenhuma conexão com os surtos de gripe passados e que ele compunha a flora normal do trato respiratório superior de humanos. Estudos subsequentes envolvendo o cultivo *in vitro* do bacilo de *Pfeiffer* provaram a dependência de dois fatores do sangue (X e IV) para seu crescimento. Tais resultados acrescentam justificativas suficientes para considerá-lo como uma entidade distinta, reconhecendo-o taxonomicamente como *Haemophilus influenzae* – do latim, afinidade pelo sangue (THJOTTA e AVERY, 1921; HARRISON *et al.*, 1989; JORDENS e SLACK, 1995; HEDEGAARD *et al.*, 2001; TOGNOTTI, 2003; CHANDRAN *et al.*, 2013).

No início da década de 1930, a pesquisadora Margaret Pittman revolucionou o combate contra doenças infecciosas típicas da infância com suas descobertas relacionadas ao *H. influenzae*. Pittman (1931) categorizou o *H. influenzae* em dois subgrupos: capsulares e acapsulares. No que diz respeito à linhagem capsular, esta foi caracterizada em seis sorotipos antigenicamente distintos (a ao f), sendo o sorotipo b (*Haemophilus influenzae* tipo b – Hib) o mais prevalente em infecções invasivas em crianças mundialmente – aproximadamente 95% dos casos. Estudos posteriores demonstraram que coelhos infectados com Hib produziam anticorpos que conferiam proteção específica contra o microrganismo. As descobertas de

Margaret Pittman contribuíram para os primeiros tratamentos de crianças com meningite com uso de soros anti-Hib e sulfonamidas em meados de 1930, o que resultou em uma queda significativa na mortalidade infantil (PITTMAN, 1931; LIGON, 1998; CHANDRAN *et al.*, 2013).

Em 1933, Fothergill e Wright investigaram a relação entre o poder bactericida do sangue humano de diferentes faixas etárias contra Hib e incidência de idade de casos de meningite bacteriana. Os autores observaram que os casos de infecção de Hib estão presentes majoritariamente em grupos de crianças com até cinco anos de idade. Demonstraram também que sangue de indivíduos adultos apresenta propriedades bactericidas contra Hib em função de uma atividade humoral específica ao polissacarídeo capsular (FOTHERGILL e WRIGHT, 1933; CHANDRAN *et al.*, 2013).

Ao longo dos anos seguintes, diversos eventos científicos amadureceram estratégias de combate à infecções causadas por Hib e resultaram na elaboração das primeiras vacinas contra Hib em 1970. A sua primeira geração consistiu no polissacarídeo capsular purificado (poliribosil-ribitol fosfato) e foi introduzida em meados de 1980 nos EUA, Finlândia, Canadá e Arábia Saudita. Esta vacina apresentou 90% de eficiência em crianças na faixa etária de 18 a 71 meses, contudo, sua eficácia em crianças com menos de 18 meses de idade, o grupo mais susceptível à infecção, foi quase nula (PELTOLA, 2000; CHANDRAN *et al.*, 2013).

A limitação quanto ao espectro de aplicação da primeira geração de vacina contra Hib foi sobrepujada somente em 1987 com o emprego de vacinas conjugadas, as quais eram compostas do polissacarídeo capsular associado quimicamente a uma proteína carreadora imunogênica como os toxóides diftérico e tetânico. A habilidade de potencializar a imunogenicidade de polissacarídeos via conjugação havia sido descrita na literatura desde 1929, sendo aplicada pela primeira vez na elaboração de uma vacina glicoconjugada contra Hib em 1975 (PELTOLA *et al.*, 1992; GOLDBLATT, 2000; CHANDRAN *et al.*, 2013).

Em virtude de sua eficiência comparada com a primeira geração, diversas vacinas conjugadas com diferentes proteínas carreadoras foram desenvolvidas e registradas comercialmente ao longo dos anos. Desse modo, os casos de infecções por Hib foram significativamente reduzidos em países desenvolvidos e em desenvolvimento que assimilaram vacinas conjugadas em seus programas de imunização infantil. Contudo, apesar de o número de vacinas ter crescido mundialmente, muitas crianças ainda não possuem o devido acesso a elas, principalmente aquelas provenientes de países subdesenvolvidos como a Nigéria, Etiópia e outros (CHANDRAN *et al.*, 2013).

3.2 Microbiologia de *Haemophilus influenzae* e seu sorotipo tipo b

H. influenzae é uma bactéria Gram-negativa coco-bacilar, não formadora de esporos e de flagelos, pertencente à família Pasteurallaceae, que inclui os membros do gênero *Pasteurella* e *Actinobacillus*. Esse microrganismo apresenta metabolismo respiratório fermentativo e, dentre suas exigências nutricionais, a presença de porfirinas (Fator X), como a hemina, e de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD - Fator V). A presença de tais fatores é crucial para o seu crescimento *in vitro*, de modo que podem ser utilizados como método de diferenciação entre as espécies do gênero *Haemophilus* (Tabela 1) (TEBBUTT, 1983; CHANDRAN *et al.*, 2013).

Devido ao seu metabolismo fastidioso, o *H. influenzae* é um patógeno obrigatório de seres humanos, sendo membro da microbiota do trato respiratório superior de crianças e adultos, juntamente com *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* e outros. As linhagens capsulares de *H. influenzae* são invasivas e provocam infecções mais graves comparadas com as acapsulares, uma vez que o polissacarídeo capsular está associado com o principal fator de virulência do organismo. Dentre os seis sorotipos existentes, o Hib é a linhagem mais virulenta e responsável pelas formas de infecção mais perigosas, aparecendo em até 90% dos casos de infecção por *H. influenzae* (YOVEG *et al.*, 1990; BOGAERT *et al.*, 2004; WHO, 2011; CHANDRAN *et al.*, 2013).

As infecções causadas por Hib em crianças incluem meningite, epiglote, bacteremia e doenças no trato respiratório, como pneumonia, otite, sinusite e bronquite. Segundo a Figura 2, meningite, pneumonia e epiglote são síndromes clínicas mais frequentes durante a infância. Ademais, elas são também as mais invasivas e compõem um alto índice de mortalidade e consequências permanentes após a infecção. Por esses motivos bem como pela incidência de casos (3 milhões de casos ao ano), o Hib é o agente infeccioso de maior atenção nas políticas de saúde pública de alguns países em desenvolvimento, entre eles o Brasil (WHO, 2011; CHANDRAN *et al.*, 2013; CDC, 2015).

3.3 Fatores de Virulência

As bactérias patogênicas detêm diversos mecanismos de virulência específicos que, em suma, conferem habilidade de mediar interações com seus hospedeiros. Dentre eles,

destacam-se: resistência ao sistema imunológico, infecção de tecidos, indução da resposta inflamatória e reprodução de uma maquinaria biológica para manipulação da célula-alvo (ROSADINI, 2011; KOSTYANEV e SECHANOVA, 2012).

Tabela 1 - Fatores de crescimento e diferenciação bioquímica das espécies do gênero *Haemophilus*.

Espécies	Fator X (Hemina)	Fator V (NAD)	Hemólise em sangue de rato
<i>H. aegyptius</i>	+	+	-
<i>H. ducreyi</i>	-	-	-
<i>H. influenzae</i>	+	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+

Fonte: Adaptado de NORSKOV-LAURITSEN (2014) e TEBBUTT (1983).

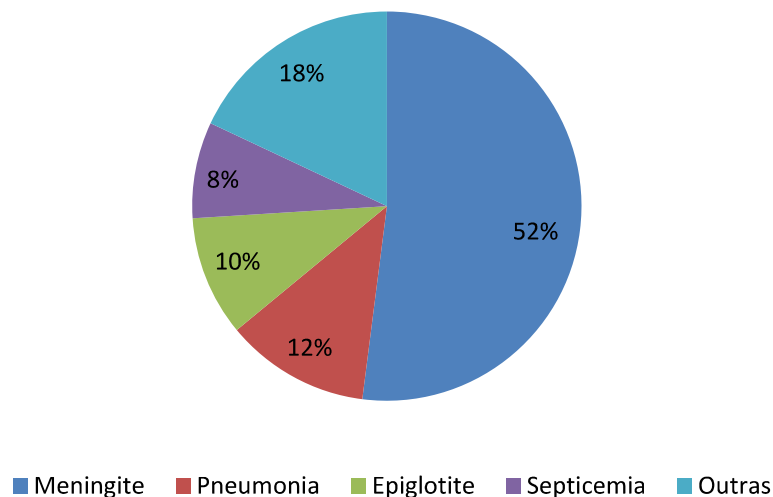


Figura 2. Distribuição das síndromes clínicas associadas com doenças invasivas de Hib mundialmente.
Fonte: Adaptado de CHANDRAN *et al.* (2013).

3.3.1 Lipopolissacarídeos

Os lipopolissacarídeos (LPS) são os maiores componentes da membrana externa de bactérias gram-negativas e são polímeros de polissacarídeos e lipídio (Figura 3.a).

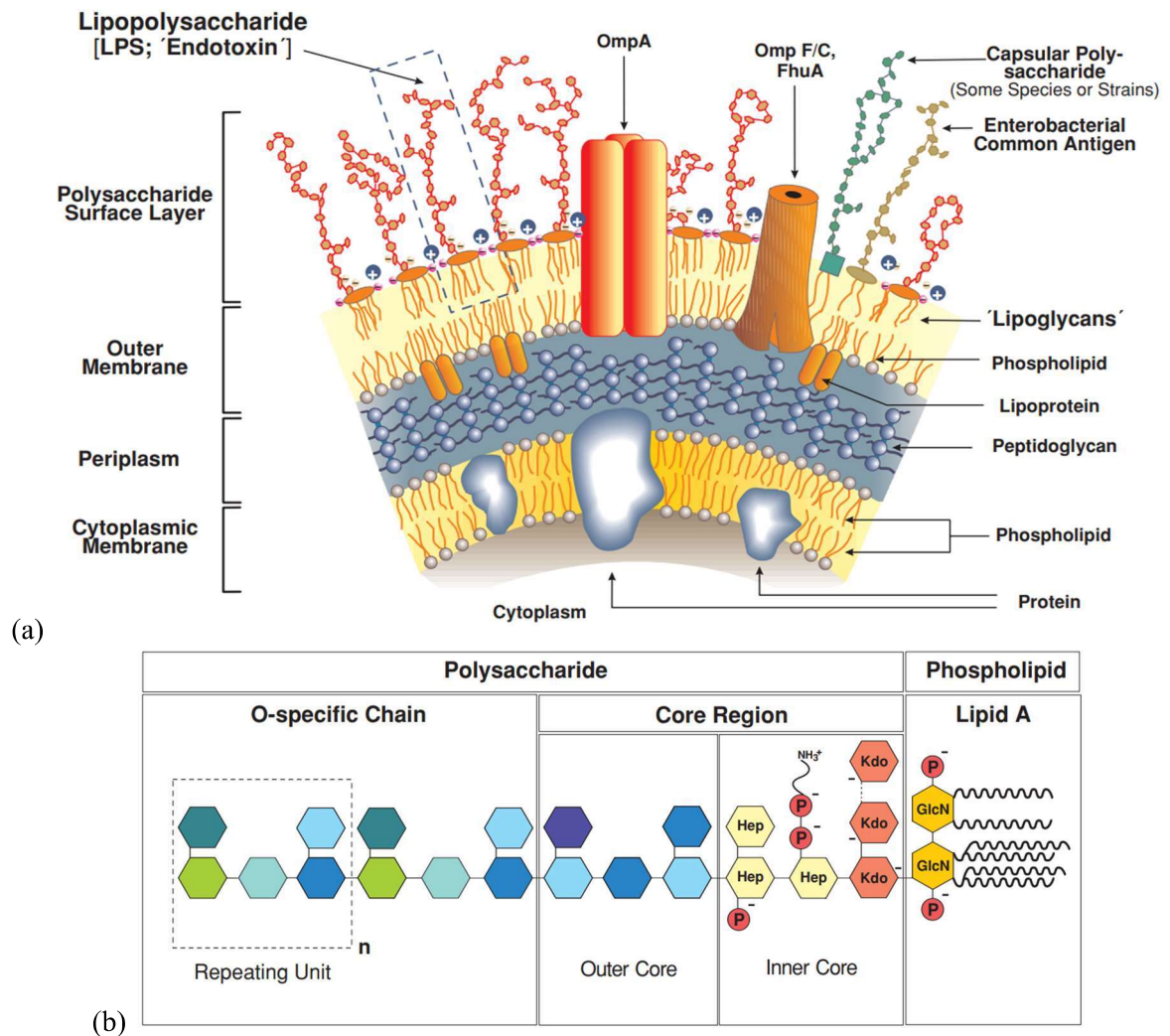


Figura 3.

Figura 3. (a) Arquitetura da parede celular e (b) estrutura química do LPS das bactérias gram-negativas.

Abreviações: GlcN, glucosamina; Kdo, ácido 2-ceto-3-deoxio-octulosônico (ácido 3-dioxi-D-mano-octulosônico); Hep, D-glicero-D-mano-heptose.

Fonte: Retirado de ALEXANDER e RIETSCHER (2001).

Conforme ilustrado pela Figura 4.b, o LPS é constituído de três domínios: lipídio A, oligossacarídeo central e polissacarídeo-O. O primeiro componente é uma região altamente conservada e composta por dois resíduos unidos por ligações β -1,6 via grupos hidroxilas presentes nos ácidos graxos. A região central consiste em duas subregiões: a externa, composta de hexoses que se estende à superfície da bactéria, e a interna, cuja estrutura compõe açúcares incomuns - como a hexose 3-desoxi-D-mano-octulosanato - que une a subregião externa ao lipídio A. Por fim, o polissacarídeo-O, também conhecido como antígeno-O, é a região mais externa do LPS e é composto por unidades repetidas de quatro a

seis açúcares cuja sequência, ligação química, quantidade de açúcares e outros fatores dependem da linhagem da bactéria (WHITE *et al.*, 2011).

Sua estrutura complexa confere uma característica anfipática, cuja porção hidrofóbica (lipídio) está embebida na membrana externa da bactéria e a porção hidrofílica (polissacarídeo) está exposta para o exterior da célula. A camada de LPS é estabilizada por íons bivalentes, resultando em membrana semipermeável de nutrientes e como uma barreira física para moléculas potencialmente tóxicas (ALEXANDER e RIETSCHER, 2001; ROSADINI, 2001; WHITE *et al.*, 2011).

Em linhagens de *H. influenzae* acapsulares, o LPS é desprovido de um polissacarídeo-O de cadeia longa e desempenham um papel crucial em sua patogênese. Isso é possível graças ao sistema de enzimas que sintetizam e modificam o LPS durante a variação de fase do microrganismo (ROSADINI, 2001).

De modo geral, as modificações são pontuais e conferem resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro, seja pela inibição por morte mediada pelo sistema complemento ou na resistência contra anticorpos. Diversas modificações de LPS em *H. influenza* foram elucidadas até o presente momento e as principais vias são: acetilação do lipídio A expressão de glicosiltransferases e galactosiltransferases específicas e incorporação de ácido siálico na região oligossacarídica central interior (ALEXANDER e RIETSCHER, 2001; ROSADINI, 2001; HERBERT *et al.*, 2003).

3.3.2 Polissacarídeo Capsular

Os polissacarídeos capsulares são polímeros altamente hidratados de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas que constituem a estrutura mais externa da superfície bacteriana. Suas repetições monoméricas podem ser de natureza homo ou heteropolimérica, e ainda possuir resíduos de moléculas orgânicas e inorgânicas em sua cadeia. Como consequência, a diversidade estrutural dos polissacarídeos capsulares proporciona propriedades físico-químicas únicas e críticas para sobrevivência do organismo em seu *habitat* natural, a citar: proteção contra dessecação, adesão à superfície, formação de biofilmes, resistência as respostas imunológicas (ROBERTS, 1995; 1996; WHITE *et al.*, 2011; KOSTYANOV e SECHANOVA, 2012).

As linhagens capsuladas de *H. influenzae* podem apresentar um entre seis tipos de cápsulas polissacarídicas antigenicamente distintas - a, b, c, d, e, f (Figura 4). O tipo b

constitui o principal fator de virulência de infecções causadas pelo Hib e confere ao microrganismo resistência à fagocitose e proteção contra digestão intracelular em neutrófilos (KOSTYANEV e SECHANOVA, 2012).

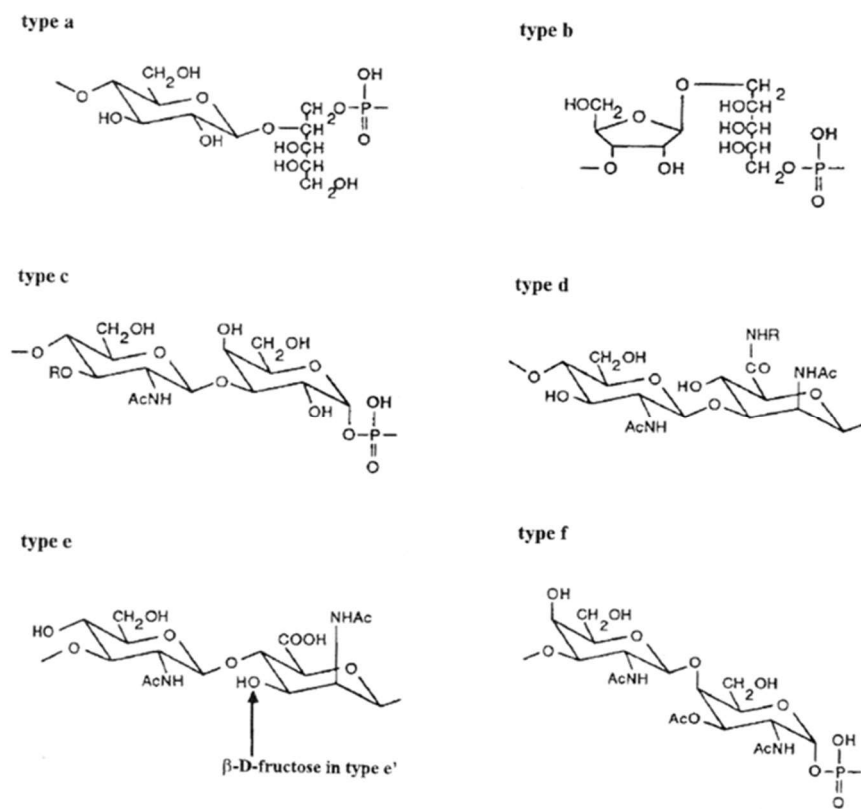


Figura 4

Figura 4. Estrutura molecular do monômero dos seis sorotipos de *H. influenzae* capsular.

Fonte: Retirado de HERBERT *et al.* (2003).

Com relação a sua estrutura química, o polissacarídeo b é um polímero de poliribosil-ribitol fosfato (PRP) e é formada por unidades equimoleculares de ribitol, ribose e fosfato. (CRISEL *et al.*, 1975).

3.3.3 IgA proteases

Imunoglobulinas A (IgA) são glicoproteínas sintetizadas e secretadas por linfócitos B em tecidos linfáticos periféricos e mucosos. Sabe-se que a IgA possui um papel importante na prevenção da ativação do sistema complemento, remoção de substâncias antigênicas sem a geração de uma resposta inflamatória e na mediação da resposta imune frente a infecção em superfícies mucosas (KERR, 1990).

Algumas bactérias altamente patogênicas, como *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*, apresentam proteases altamente específicas para a IgA. A produção de IgA proteases por *H. influenzae* está intimamente ligada à sobrevivência do microrganismo na superfície mucosa do trato respiratório superior do hospedeiro e, conseqüentemente, altos níveis de atividade enzimática contribuem na sua patogenicidade e capacidade de colonizar o hospedeiro (KERR, 1990; ROSADINI, 2011).

3.4 Bioquímica e Fisiologia do *H. influenzae* tipo b

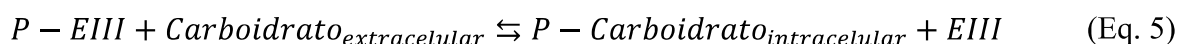
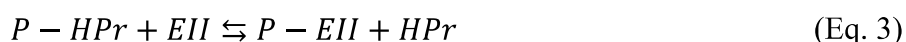
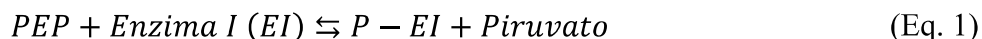
H. influenzae é uma bactéria respiro-fermentativa de crescimento fastidioso que habita diferentes ambientes no corpo humano, que variam em fonte de carbono, pH e disponibilidade de oxigênio. A sua habilidade em persistir no ser humano está intimamente relacionada ao seu repertório de vias metabólicas complexas e na capacidade em alterar a composição e atividade enzimática durante sua partenogênese. No entanto, informações sobre o fluxo metabólico de Hib ainda são escassas devido à inexistência de estudos específicos para essa linhagem. Desse modo, optou-se por sintetizar as informações referentes às linhagens acapsulares e capsulares de *H. influenzae* de modo a configurar uma idéia geral sobre o metabolismo central de Hib (OTHMAN *et al.*, 2014).

3.4.1 Sistema de Captação de Carboidratos

A rede metabólica complexa de *H. influenzae* torna-o capaz de assimilar diversas fontes de carbono, a citar: glicose, frutose, fucose, ácido siálico, glicerol, ribose, galactose, xilose e lactato. Essa flexibilidade é uma característica evolutiva das bactérias em competir por nutrientes com outros organismos e na sua adaptação frente às mudanças no ambiente durante sua patogênese. Para esse fim, faz-se necessário um mecanismo que regule efetivamente a aquisição preferencial de metabólitos de acordo com sinais externos à célula, como por exemplo, a escassez de nutriente e a disponibilidade de oxigênio (POSTMA *et al.*, 1993; MACFADYEN *et al.*, 1996; MACFADYEN e REDFIELD, 1996).

Os sistemas fosfotransferases de açúcares do fosfoenolpiruvato (PTS) são responsáveis pela captação de carboidratos e são conservados na grande maioria das bactérias, atuando no transporte e fosforilação de carboidratos, na quimiotaxia e na regulação de outras vias

metabólicas. O PTS basicamente catalisa a fosforilação concomitante a translação do carboidrato através da membrana com o fosfoenolpiruvato, um metabólito da via glicolítica, como doador de fosfato/energia e as proteínas EI, HPr, EII e EIII como intermediários da reação. As reações envolvidas no PTS de um determinado carboidrato são ilustradas abaixo (GOTTSCALK, 1985; POSTMA *et al.*, 1993).



A enzima EI e a proteína carreadora HPr (Eq. 1 e 2) são solúveis no citoplasma da célula e estão presentes em sistemas de transporte de todos os carboidratos em *E. coli* e outros microrganismos. As demais enzimas (EII e EIII) são específicas para cada carboidrato e atuam, respectivamente, na fosforilação (Eq. 3 e 4) e na formação de um canal de translocação (Eq. 5) do açúcar em questão (GOTTSCALK, 1985; POSTMA *et al.*, 1993). A Figura 5 exemplifica o PTS específico de glicose.

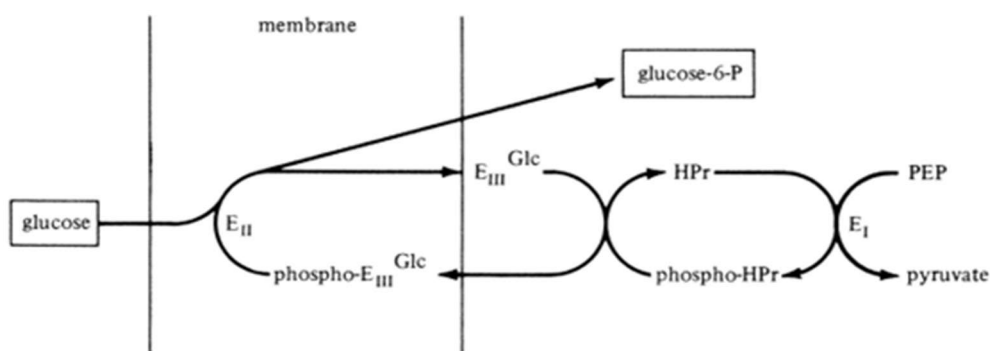


Figura 5. Transporte de glicose via sistema de fosfotransferase.
Fonte: Retirado de GOTTSCALK (1985).

A linha KW20 Rd de *H. influenzae* teve seu genoma sequenciado por Fleischmann e colaboradores (1995) e identificou-se genes (*ptsl* e *ptsH*) que expressam as proteínas EI e HPr do sistema PTS. Os autores também observaram a presença de um sistema PTS completo e específico para frutose completo homólogo aos genes *fruA* e *fruB* de *E. coli*. Estudos de Macfadyen *et al.* (1996) demonstraram o influxo de frutose na célula via sistema PTS e

confirmaram este açúcar como a fonte de carbono preferida do microrganismo (FLEISCHMANN *et al.*, 1995; MACFADYEN *et al.*, 1996)

Já as demais fontes de carbono independem do sistema PTS e sugere-se que esses açúcares são transportados via não-PTS permeases dependentes de cAMP. A aquisição de glicose ocorre via quinase dependente de ATP e pelo sistema de transporte de galactose (*mgI*) uma vez que o gene que codifica a enzima EII-glicose específica está ausente no genoma. O glicerol e o glicerol-3-fosfato podem ter sua difusão facilitada por proteínas transportadoras *glpF* e *glpT*, respectivamente, podendo ser inseridos diretamente na via glicolítica. Ademais, *H. influenzae* apresenta genes que codificam os sistemas de influxo (*mgL*) e produtos do catabolismo (*galTK*) de galactose bem como o gene que codifica a fucose permease (*fucP*) (FLEISCHMANN *et al.*, 1995; MACFADYEN *et al.*, 1996; MACFADYEN e REDFIELD, 1996).

No que diz respeito ao metabolismo de ribose e xilose, foi identificada uma alta homologia dos seus respectivos sistemas de transporte e catabolismo entre *H. influenzae* e *E. coli*. O microrganismo também fermenta ácido siálico livre devido à presença de permease específica e N-acetil manosamina liase, que cliva o ácido em piruvato e N-acetil manosamina para posteriormente ser metabolizado como frutose-6-fosfato ou assimilado à biossíntese de LPS (MACFADYEN *et al.*, 1996; MACFADYEN e REDFIELD, 1996; SONG *et al.*, 1998; SEVERI *et al.*, 2005).

Por fim, Lichtenegger e colaboradores cultivaram cepas selvagens de Hib utilizando L-lactato como fonte de carbono e observaram a presença de L-lactato desidrogenase (*lctD*) e permease (*lctP*). Resultados *in vitro* demonstram a importância de lactato como uma fonte de carbono importante e que atua como um substrato sinalizador no mecanismo de resistência do microrganismo aos anticorpos do hospedeiro, mediando alterações fenotípicas da composição do LPS e aumento na expressão de polissacarídeo capsular (LICHTENEGGER *et al.*, 2014).

3.4.2 Via glicolítica e Metabolismo do Piruvato

A glicólise é o processo em que uma molécula de glicose é convertida em duas moléculas de piruvato via uma sequência de dez reações enzimáticas específicas (Figura 6). Além de gerar pequenas quantidades de ATP e de cofatores reduzidos (NADH), essa via sintetiza importantes precursores metabólicos, como gliceraldeído-3-fosfato, fosfoenolpiruvato, piruvato e frutose-6-fosfato (LEHNINGER, 2000; KEGG, 2010).

Análises genômicas das linhagens KW20 Rd e 10810 (sorotipo b) mostraram que os genes que codificam enzimas da glicólise são altamente conservados em *H. influenzae* e que a glicólise é acionada preferencialmente para metabolizar açúcares durante os crescimentos microaeróbico e anaeróbico. Raghunathan *et al.* (2004) observou também que a piruvato quinase (2.7.1.40) exibiu-se cerca de nove vezes mais ativa em microaerobiose, indicando uma supressão no fluxo de carbono do PEP para piruvato em condições de anaerobiose (FLEISCHMANN *et al.*, 1995; TATUSOV, *et al.* 1996; RAGHUNATHAN *et al.*, 2004).

O ácido pirúvico está presente em todas as vias catabólicas de açúcares, podendo ser considerado como o eixo central do metabolismo de carboidratos (Figura 7). A partir dele, diversas biomoléculas podem ser sintetizadas por meio de diferentes vias. O destino preferencial da molécula de piruvato depende das condições fisiológicas e, portanto, das enzimas presentes. Geralmente tal condição fisiológica é uma resposta as condições ambientais. Com relação ao *H. influenzae*, o piruvato pode ser metabolizado em acetato, formato, acetil-CoA, lactato, CO₂, oxalacetato e alguns aminoácidos (KEGG, 2010; WHITE *et al.*, 2011; OTHMAN *et al.*, 2014).

O gene *fpr*, que codifica a enzima ferredoxina-NADP redutase, está ausente no genoma de *H. influenzae*, resultando na ocorrência da oxidação de piruvato à acetil-CoA somente pela ação de piruvato-formato liase (2.3.1.54) e complexo piruvato desidrogenase (1.2.4.1, 1.8.1.4 e 2.3.1.12) (KEGG, 2010).

O *H. influenzae* também converte acetil-CoA, oriundo do complexo piruvato desidrogenase e pela piruvato-formato liase (2.3.1.54) a acetato pela ação das enzimas fosfato acetiltransferase (2.3.1.8) e acetato quinase (2.7.2.1). Ambas as enzimas estão ativas tanto em microaerobiose quanto em anaerobiose, sendo a acetato quinase a mais expressa na presença de oxigênio. Ademais, as duas enzimas podem atuar na direção reversa, o que possibilita o acetato ser produto final ou substrato dependendo das condições de cultivo (RAGHUNATHAN *et al.*, 2004; WHITE *et al.*, 2011).

Nota-se que a enzima piruvato descarboxilase (6.4.1.1) está ausente no microrganismo, o que indica que carboidratos são oxidados parcialmente pela via glicolítica, nunca chegando a entrar no ramo oxidativo do ciclo de Krebs. Contudo, a presença da fosfoenolpiruvato carboxilase (4.1.1.31) possibilita a formação de oxalacetato a partir de PEP, interligando a via glicolítica com a porção redutiva do ciclo do ácido cítrico (KEGG, 2010).

Por fim, piruvato pode ser reduzido à D-lactato via ação de duas lactato desidrogenases (1.1.1.28 e 1.1.5.12) (KEGG, 2010).

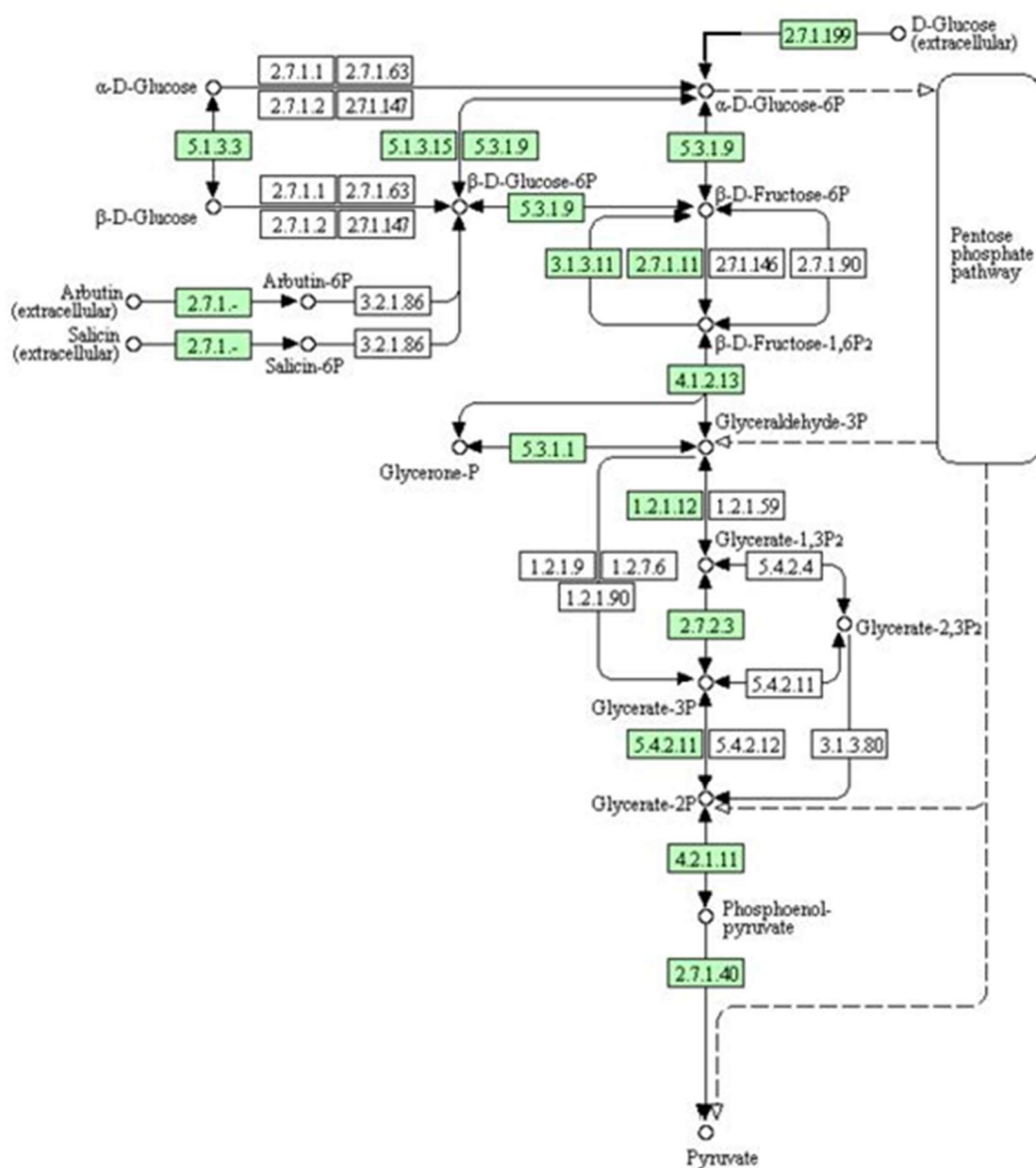


Figura 6. Mapa metabólico da via glicolítica de *H. influenzae* 10810 (sorotipo b).

Os quadrados correspondem as enzimas envolvidas na reação, sendo a cor branca e verde indicações da ausência e presença da enzima, respectivamente. Legenda: 2.7.1.199 - glicose transferase; 5.3.1.9 - glicose-6-fosfato isomerase; 3.1.3.11 - frutose-bisfosfatase; 2.7.1.11 - 6-fosfofrutoquinase; 5.1.3.15 - glicose-6-fosfato epimerase; 5.1.3.3 - aldo 1 epimerase; 2.7.1.- - fosfotransferase com um grupo álcool como aceptor; 4.1.2.13 - frutose-bisfosfato aldolase; 5.3.1.1 - triose-fosfato isomerase; 1.2.1.12 - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 2.7.2.3 - fosfoglicerato quinase; 5.4.2.11 - fosfoglicerato mutase; 4.2.1.11 - fosfopiruvato hidratase; 2.7.1.40 - piruvato quinase.

Fonte: KEGG (2010).

3.4.3 Ciclo do Ácido Cítrico Redutivo

O Ciclo do Ácido Cítrico (CAC), também conhecido como Ciclo de Krebs, é uma via multifuncional usada para oxidação do acetil-CoA em CO₂, H⁺ e cofatores reduzidos e

também para disponibiliza precursores de 10 dos 20 aminoácidos encontrados nas proteínas (Figura 8). *H. influenzae* abstém de três genes que codificam enzimas do CAC, a citrato sintetase (2.3.3.1), aconitase (4.2.1.3) e isocitrato desidrogenase (1.1.1.41 e 1.1.1.42). Como consequência, o fluxo de carbono do catabolismo de carboidratos não consegue alcançar a região oxidativa do CAC, favorecendo o acúmulo de metabólitos de oxidação incompleta como o acetato, lactato e formato (FLEISCHMANN *et al.*, 1995; KEGG, 2010; WHITE *et al.*, 2011).

Figura 7. Mapa metabólico do metabolismo de piruvato de *H. influenzae* 10810 (sorotipo b). Os quadrados correspondem as enzimas envolvidas na reação, sendo a cor branca e verde indicações da ausência e presença da enzima, respectivamente. Legenda: 4.1.1.31 – fosfoenolpiruvato carboxilase; 4.1.1.49 – fosfoenolpiruvato carboxilase; 4.4.1.5 – lactosil glutationa liase; 3.1.2.6 – hidroxiaçil glutationa hidrolase; 2.7.1.40 – piruvato quinase; 1.1.1.28 – D-lactato desidrogenase; 1.1.5.12 – D-lactato desidrogenase; 1.1.2.3 – L-lactato desidrogenase; 2.7.2.1 – acetato quinase; 2.3.1.8 – fosfato acetil transferase; 1.2.4.1 – piruvato desidrogenase; 1.8.1.4 – diidrolipoil desidrogenase; 2.3.1.12 – diidrolipoil acetil transferase; 1.1.1.40 – malato desidrogenase; 2.3.1.54 – formato C-acetil transferase; 4.2.1.2 – fumarato hidratase; 1.1.1.37 – malato desidrogenase; 1.3.5.4 – fumarato redutase; 2.3.3.13 – 2-isopropil malato sintetase; 2.3.1.9 – acetil-CoA acetil transferase; 6.4.1.2 – acetil-CoA carboxilase.

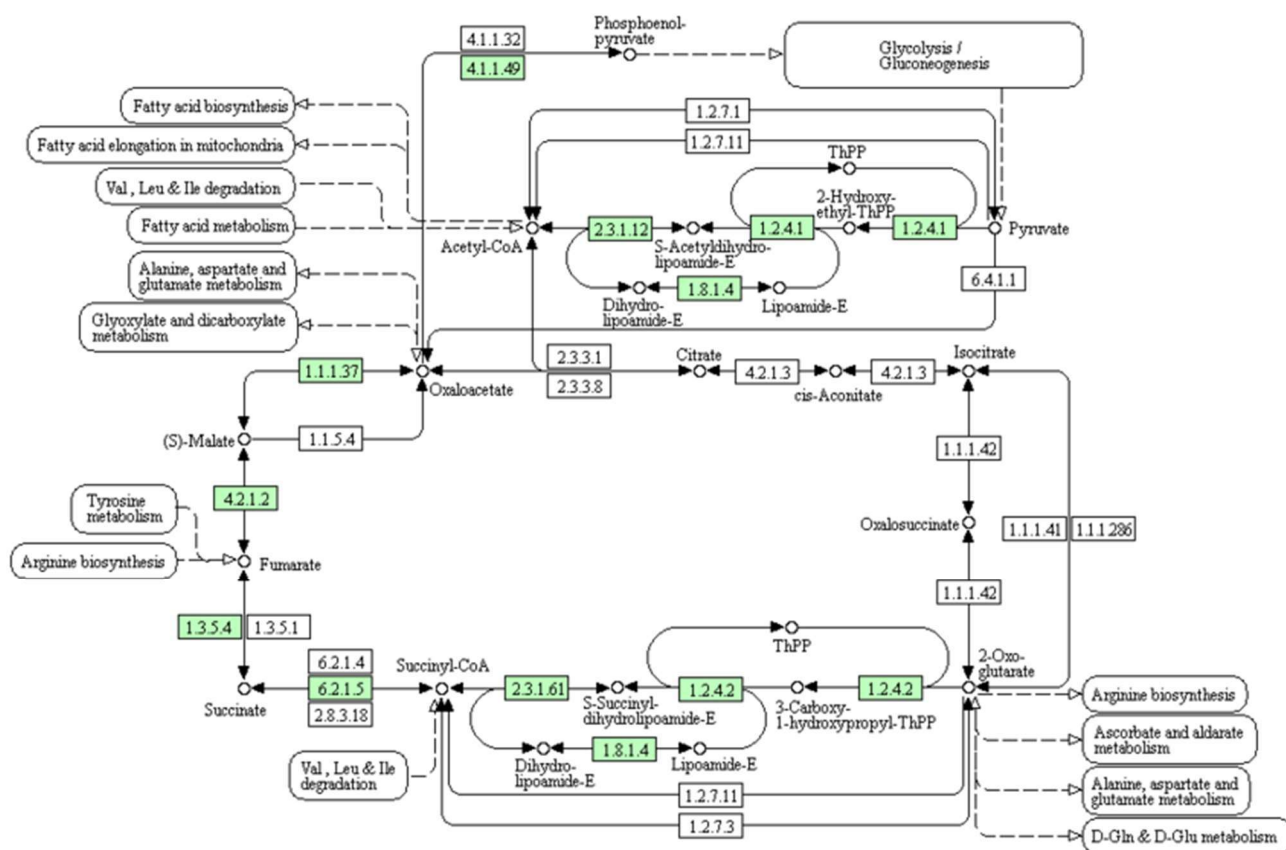


Figura 8. Mapa metabólito do ciclo do ácido cítrico de *H. influenzae* 10810 (sorotipo b). Os quadrados correspondem as enzimas envolvidas na reação, sendo a cor cinza e branca indicações da ausência e presença da enzima, respectivamente. Legenda: 4.1.1.49 – fosfoenolpiruvato carboxi quinase; 1.1.1.37 - malato desidrogenase; 4.2.1.2 – fumarato hidratase; 1.3.5.4 – fumarato redutase; 1.2.4.2 – oxoglutarato desidrogenase; 6.2.1.5 – succinato-CoA ligase; 2.3.1.61 – diidrolipoil lisina succinil transferase; 1.2.4.2 – piruvato desidrogenase; 2.3.1.12 diidrolipoil lisina acetil transferase; 1.2.4.1 – piruvato desidrogenase; 1.8.1.4 – diidrolipoil desidrogenase.

Fonte: KEGG (2010).

As deleções de alguns genes envolvidos no CAC possibilitam a existência somente da porção redutora do CAC. White *et al.* (2011) explicam que essa modificação no CAC é um alternativa metabólica encontrada em organismos anaeróbicos para não produzir cofatores reduzidos NADH e FADH₂ em demasia e assim possibilitar o balanço redox acordado com a oxidação incompleta dos substratos (FLEISCHMANN *et al.*, 1995; KEGG, 2010, WHITE *et al.*, 2011).

A porção redutora do CAC aparece ativa em *H. influenzae* tanto em condições de microaerobiose como em anaerobiose. O glutamato pode ser assimilado ao CAC via conversão em α -cetoglutarato (2-oxo-glutarate) pela ação da enzima glutamato desidrogenase, atuando como fonte alternativa de energia e de carbono para biossíntese de aminoácidos. Não obstante, observa-se que a fumarato redutase está ativa igualmente em ambas condições,

indicando que o fumarato possa ser um receptor final de elétrons no balanço redox, principalmente durante o cultivo de Hib em fonte de carbono de origem não sacarídica (FLEISCHMANN *et al.*, 1995; RAGHUNATHAN *et al.*, 2004; KEGG, 2010).

3.4.4 Cadeia Transportadora de Elétrons

A cadeia transportadora de elétrons (CTE) fundamenta-se na regeneração dos cofatores reduzidos durante o catabolismo de uma determinada fonte de carbono e na manutenção do potencial redox da célula. O *H. influenzae* apresenta semelhanças com o CTE de organismos anaeróbicos, como a presença de menaquinonas em vez das ubiquinonas no transporte de elétrons (TATUSOV *et al.*, 1996; RAGHUNATHAN *et al.*, 2004; OTHMAN *et al.*, 2014).

A CTE de linhagens de *H. influenzae* mostra-se incrivelmente versátil, com cinco desidrogenases, que transferem elétrons do L,D-lactato, formado e NADH para menaquinona, que por sua vez é regenerado por pelo menos seis redutases que transferem elétrons para diversos aceptores finais de elétrons, como o oxigênio, dimetilsulfóxido, fumarato e outros compostos nitrogenados (TATUSOV *et al.*, 1996; RAGHUNATHAN *et al.*, 2004; OTHMAN *et al.*, 2014).

3.4.5 Via das Pentoses Fosfato

A via das pentoses fosfato é uma rede de reações alternativas para metabolizar carboidratos em diversos microrganismos, incluindo o *H. influenzae* (Figura 9). Ela fornece precursores necessários para biossíntese de diversos componentes celulares bem como na geração de duas moléculas de NADPH para cada molécula de glicose-6-fosfato processada (KEGG, 2010, WHITE *et al.*, 2011).

Os genes que codificam enzimas envolvidas na via estão conservados no genoma do *H. influenzae*. A via das pentoses fosfato está ativa tanto em microaerobiose quanto em anaerobiose, contribuindo na geração de cofatores reduzidos e na produção de substratos - ribitol-5-fosfato, ribulose-5-fosfato, 5-fosfo-alfa-D-ribose difosfato, outros - para síntese de histidina, nucleotídeos e polissacarídeo capsular (TATUSOV, *et al.* 1996; RAGHUNATHAN *et al.*, 2004; KEGG, 2010, OTHMAN *et al.*, 2014).

região II específica para as demais linhagens capsulares de *H. influenzae* (KROLL e MOXON, 1988; VAN ELDERE *et al.*, 1995; SATOLA *et al.*, 2003).

Função	Exportação dependente de ATP				Biossíntese de PRP				Pós-polimerização	
	Região I				Região II				Região III	
Genes	<i>bexA</i>	<i>bexB</i>	<i>bexC</i>	<i>bexD</i>	<i>bs1</i>	<i>bs2</i>	<i>bs3</i>	<i>bs4</i>	<i>hsA</i>	<i>hsB</i>

Figura 10. Organização geral do locus cap do *H. influenzae* capsular.
Fonte: Adaptado de SATOLA *et al.* (2003).

A caracterização genética de isolados clínicos de Hib de diversas regiões do mundo mostrou que o elemento locus *cap* está parcialmente duplicado em 98% das linhagens existentes, resultando em duas cópias da região II e III e uma cópia truncada entre as regiões dos genes *bexA* e *IS1016*. Segundo Kroll e Moxon (1988), apenas uma cópia do locus é necessária para biossíntese do polissacarídeo e os autores especulam que a duplicação das regiões confere maior estabilidade contra deleção espontânea das sequências. Ademais, estudos envolvendo a amplificação do locus *cap* em cepas de Hib demonstraram que o número de cópias do elemento está intimamente relacionado à produtividade de material capsular, sendo inversamente proporcional à susceptibilidade à lise celular e opsonização via sistema complemento, maior resistência à resposta imunológica e menor aderência em células epiteliais humanas (NOEL *et al.*, 1996; KROLL e MOXON, 1998; SATOLA *et al.*, 2003).

Com relação a formação de PRP, seu mecanismo de biossíntese e regulação metabólica ainda não foram completamente elucidados. Van Eldere e colaboradores (1995) sequenciaram a região II do locus *cap* e notaram que o gene *bcs1* expressa uma enzima vital para a formação do polissacarídeo, a CDP-ribitol sintetase. Estudos subsequentes de Pereira e Brown (2004) e Zolliet *et al.* (2001) observaram que a CDP-ribitolsintetase apresenta atividade enzimática bifuncional, atuando na síntese de CDP-ribitol via redução de ribulose-5-fosfato a ribitol-5-fosfato e, posteriormente, transferência de um grupo citidil (Figura 11). Apesar do mecanismo de polimerização de PRP não ser completamente conhecido, sugere-se que o mesmo é formado pela união alternada de grupos ribose e ribitol e que a biossíntese está associada a via das pentoses fosfato, uma vez que ela envolve intermediários dessa via (VAN ELDERE *et al.*, 1995; ZOLLI *et al.*, 2001; PEREIRE e BROWN, 2004).

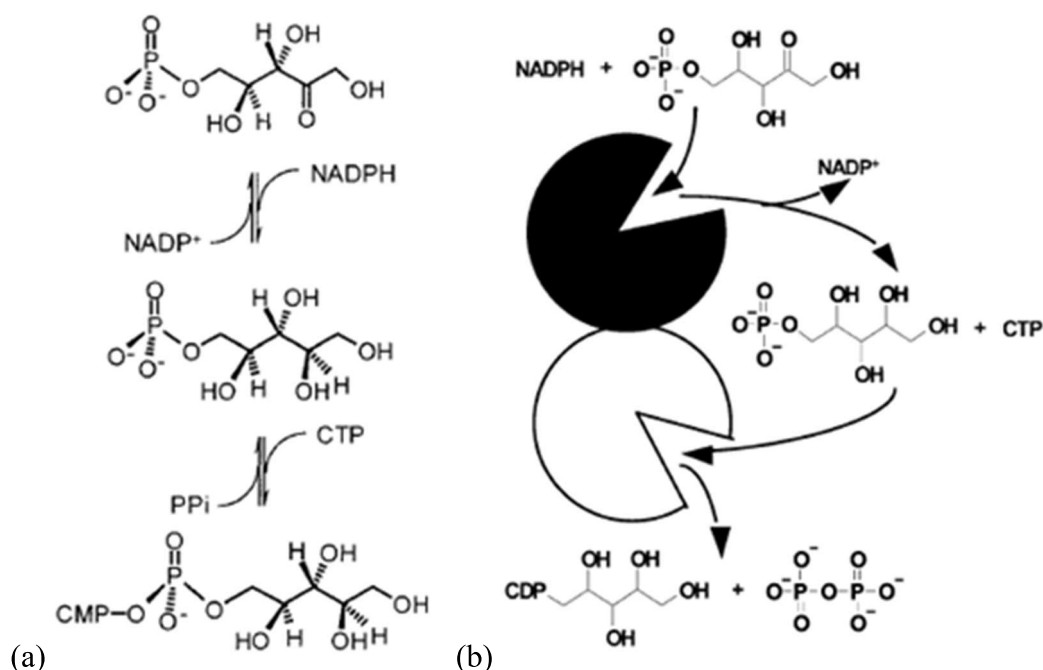


Figura 11. (a) Redução e transferência de citidil e (b) sítio ativos da enzima CDP-ribitol sintetase.
 Fonte: Retirado de PEREIRA e BORWN (2004); ZOLLI *et al.*(2001).

3.4.7 Exigências Nutricionais

A versatilidade metabólica de *H. influenzae* exige a presença de fatores de crescimentos específicos, como heme e NAD, para viabilizar sua propagação. Deleções naturais em genes que codificam enzimas da via *de novo* da síntese da piridina-nucleotídeos incapacita o microrganismo de sintetizar NAD, exceto se nicotinamida mononucleotídeo esteja presente no meio. Com relação a hemina, o *H. influenzae* não apresenta parte das enzimas necessárias para conversão de ácido aminolevulínico em protoporfirina, necessitando de heme para aquisição de ferro. Ademais, cultivos *in silico* de *H. influenzae* demonstraram que o microrganismo demanda também de arginina, glutamato, cisteína, ácido pantotênico tiamina e uracila (TATUSOV *et al.*, 1996).

3.5 Produção de polissacarídeo capsular por *Haemophilus influenzae* tipo b

O processo de produção da vacina conjugada de Hib é constituído das seguintes etapas: *upstream* (produção do lote semente, preparo do inóculo e crescimento celular), *downstream* (inativação, precipitação seletiva, sistema de filtração tangencial) e conjugação

(modificação do tamanho da cadeia do polissacarídeo capsular e sua conjugação química com um carreador proteico e purificação) (HAMIDI *et al.*, 2016). A seguir, faz-se uma revisão da literatura do estado da arte do cultivo de Hib em biorreatores e as vacinas comercializadas atualmente.

3.5.1 O estado da arte do cultivo de *Haemophilus influenzae* tipo b em biorreatores

Produções técnicas envolvendo a biossíntese de polissacarídeo capsular pelo *Haemophilus influenzae* são raras na literatura. De modo geral, todos os autores propagam Hib *in vitro* em meios de cultura complexos constituído de aminoácidos essenciais (isolados, extrato de levedura ou peptona), cloreto de sódio e tampão fosfato, suplementados com NAD e hemina. O crescimento celular foi conduzido em reatores aeróbicos, sob regime batelada simples ou alimentada, e em condições de operação semelhantes ao estado fisiológico humano - temperatura 30-37°C e pH 6-8 – onde o polissacarídeo capsular é naturalmente desprendido da superfície bacteriana para o sobrenadante (ANDERSON *et al.*, 1976; TAKAGI *et al.*, 2007). Portanto, faz-se abaixo um resumo do amadurecimento técnico-científico do cultivo de Hib em biorreatores das últimas décadas.

Estudos de Cart *et al.* (1985) relatam o uso do meio composto de peptona de soja e extrato de levedura, denominado pela sigla MP, para produção de polissacarídeo. Os autores cultivaram o Hib em batelada simples contendo meio MP sem controle de pH e vazão específica de ar de 0,25 vvm sob dois regimes de aeração superficial e submersa com agitação constante de 750 e 200 rpm, respectivamente. A concentração máxima de PRP obtida foi em em aeração superficial (260 mg/L). Anderson e Smith (1976) incrementaram o rendimento de biomassa e de PRP pela concentração do tampão fosfato e pela variação da concentração e tipo de hexoses (glicose, ribitol e ribose) (ANDERSON *et al.*, 1976; CART *et al.*, 1985).

As pesquisas sobre o cultivo de Hib retornaram somente anos mais tardes com estudos de Merrit *et al.* (2000). Um processo batelada alimentada foi proposto com intuito de maximizar a produção de biomassa e PRP. O cultivo foi conduzido em pH controlado a 7,3, temperatura a 36,5°C e oxigênio dissolvido foi mantido a 50%, alterando-se a vazão específica de ar (0,6-0,8 vvm) e a agitação (400-900 rpm). O meio de alimentação era composto por extrato de levedura 100 g/L e glicose 200 g/L e a taxa de alimentação foi ajustada de modo a manter o extrato de levedura residual a 1-2 g/L e garantir que taxa de crescimento específico seja 0,5 h⁻¹. As concentrações de biomassa e PRP obtidas para o

regime alimentado foram de 5,3 g/L e 1190 mg/L, respectivamente, em reatores de 2 L durante 16 horas de cultivo, e seus resultados foram reprodutíveis no escalonamento do processo para reatores de 500 L (MERRIT *et al.*, 2000).

Takagi *et al.* (2003) avaliou a influência de três condições de regimes, simples, descontínua com pulso de glicose e descontínua repetida, na produção de PRP. Os cultivos foram conduzidos por 24 horas em reatores de 13 L à 37°C, contendo meio MP modificado, sem controle de pH, aeração superficial sob vazão de 2 L/min e agitação entre 100-600 rpm. Apesar de coeficiente de rendimento P/X ter sido diferente para cada estratégia de cultivo, as concentrações de biomassa e PRP foram as mesmas em todos os regimes, 1,8 g/L e 132 mg/L, respectivamente. Ademais, observou-se que a produção de polissacarídeo está associada ao crescimento do microrganismo (TAKAGI *et al.*, 2003).

A partir das informações coletadas ao longo dos anos, Takagi *et al.* (2006) relataram que a otimização da produtividade de PRP está associada principalmente com três fatores: composição do meio, sistema de aeração empregado e pH. Para tanto, os autores estudaram o efeito da aeração superficial e submersa, da concentração de oxigênio dissolvido controlado a 10 e 30% da saturação do ar e a influência do controle de pH a 7,6 na produção de biomassa e PRP em meio complexo MP. Constatou-se que o controle de pH seguido do sistema de aeração foram primordiais para o aumento da produtividade de PRP ao passo que a concentração de oxigênio dissolvido pouco influenciou no processo. As condições otimizadas pelos autores foram de aeração submersa com saturação de oxigênio a 30%, sendo capaz de atingir uma produção acima de 950 mg PRP/L durante 24 horas de cultivo (TAKAGI *et al.*, 2006; 2007).

Já Silva (2010) explorou os resultados de Takagi *et al.* (2006, 2007) aplicando outras estratégias de cultivo descontínuo alimentado que resultam em maior produção PRP, a citar: adição intermitente de glicose, vazão constante, vazão exponencial e reciclo de células seguido de perfusão. A última estratégia apresentou maior concentração e produtividade de PRP (1800 mg PRP/L e 129 mg PRP/L.h) comparada com as demais relatadas até então. No entanto, constatou-se que a estratégia de melhor viabilidade econômica foi o cultivo descontínuo alimentado com vazão constante (1600 mg PRP/L e 88 mg PRP/L.h) (SILVA, 2010).

Além de aperfeiçoar o regime do processo, o autor buscou avaliar a distribuição da massa molecular e do tamanho da cadeia do polissacarídeo nos processos com intuito de atentar às recomendações de controle de qualidade estabelecidas pela Organização Mundial

da Saúde. Observou-se que o tempo de cultivo influencia negativamente na massa molecular do polissacarídeo. Ademais, Silva observou que o acúmulo de acetato ao longo do cultivo atuou inibitoriamente ao crescimento celular (WHO; 2000; SILVA, 2010).

Últimos relatos de cultivo de Hib referem-se aos trabalhos de Cintra (2014), que objetivou aperfeiçoar as condições estabelecidas (pH e temperatura) por Silva (2010), considerando a produtividade de PRP e sua massa molecular como referências. Observou-se altas temperatura e pH alcalinos favorecem à despolimerização espontânea do polissacarídeo, podendo ser potencializada com a presença de cátions mono ou bivalentes. Portanto, de acordo com seus resultados, a melhor condição de cultivo foi de pH 7,1 e temperatura de 30°C, atingindo concentração de PRP na ordem de 1400 mg/L e massa molecular de 78% maior que a descrita na literatura - pH 7,5 e 37°C (CINTRA, 2014; CINTRA e TAKAGI, 2015).

3.6 Estratégias de otimização de crescimento microbiano e formação de produto

Em tecnologia de fermentações, as estratégias de otimização de processos fundamentam-se no ajuste das condições de cultivo de modo a garantir propriedades fisiológicas ótimas do microrganismo. Essas informações são traduzidas quantitativamente na maximização de quatro parâmetros operacionais: produtividade volumétrica, concentração de produto, coeficiente de rendimento e reprodutibilidade do processo (COONEY, 1983).

Sob uma ótica econômica, a manutenção de uma alta produtividade volumétrica repercute diretamente na maximização do retorno do capital de investimento, principalmente em projetos de desenvolvimento de novos bioprocessos. Além disso, altos coeficientes de rendimento minimizam o custo de matéria prima, como meio de cultivo. Por fim, a reprodutibilidade é um elemento essencial no alcance de metas de processo bem como na redução de custo de operação (COONEY, 1983).

Com intuito de atender as condições otimizadas, faz-se necessário analisar a demanda metabólica do microrganismo em questão por meio de diversas ferramentas do conhecimento, a citar: engenharia genética, fisiologia do microrganismo, *design* do biorreatores, modelagem matemática e estatística, entre outros (COONEY, 1983). Para o presente trabalho, faz-se um resumo interativo sobre as principais estratégias de otimização que se mostraram efetivas e reprodutíveis em bioprocessos, em especial no aperfeiçoamento da produção de

exopolissacarídeos bacteriano, a citar: seleção de linhagens selvagens, elaboração de meio de cultura definido e regimes de processo.

3.6.1 Uso de linhagens selvagens com múltiplas cópias do locus *cap*

A busca por linhagens de *H. influenzae* tipo b mais eficientes na biossíntese de polissacarídeo capsular pode ser destacada com uma alternativa viável para maximização da produtividade volumétrica e concentração final de produto. Conforme descrito no item 3.4.7, estudos demonstram que mais de 98% das linhagens de Hib existentes apresentam o locus *cap* parcialmente multiplicado e que a amplificação desse elemento genético contribui na produtividade do material capsular. Kroll e Moxon (1988) observaram que a produtividade (ng PRP/10⁶ UFC) de linhagens contendo múltiplas cópias do *cap* foi proporcional ao número de cópias quando comparadas as linhagens contendo somente um locus *cap* (KROLL e MOXON, 1988).

A literatura produzida até o presente momento contém somente com cultivos de *H. influenzae* tipo b Egan e GB 3291. Sabe-se que o genoma da primeira apresenta duas cópias do locus *cap*, porém, nenhuma informação referente ao número de cópias da segunda ainda foi relatado, muito menos se isso influencia efetivamente na produtividade final do processo. Desse modo, torna-se atrativo um estudo que investigue se a amplificação do locus *cap* pode refletir na produção de PRP em biorreatores, tendo em vista a existência de linhagens com o locus *cap* com múltiplas cópias, a citar a cepa rara contendo seis cópias que fora isolada por Cerquetti e colaboradores (2006) (MERRIT *et al.*, 2000; TAKAGI *et al.*, 2003; 2006; 2007; CERQUETTI *et al.*, 2006).

Ademais, apesar de pouco encorajado pelas instituições de biossegurança, destaca-se a possibilidade de transformar o Hib em linhagens recombinante contendo locus *cap* amplificado. A técnica é bem descrita na literatura pelas metodologias propostas por Moxon *et al.* (1984) e Herriot *et al.* (1970) e corriqueiramente usada no estudo da virulência do polissacarídeo na partenogêneses de *Haemophilus*. Contudo, as regulamentações de uso de microrganismos geneticamente modificados são demasiadamente rigorosas para empregar o uso da tecnologia de DNA recombinante em patógenos e sua aplicação na produção de vacina. Tal circunstância exigiria uma avaliação de risco bem criteriosa e, não menos importante, uma unidade de produção bem sofisticada para sua viabilização, tornando essa

abordagem alternativa legalmente burocrática e economicamente custosa (HERRIOTT *et al.*, 1970; MOXON *et al.*, 1984).

3.6.2 Otimização do meio de cultivo

A formulação de meios de cultivo quimicamente definidos é apresentada como uma alternativa eficaz na otimização de processos fermentativos. Seu emprego possibilita modular a maquinaria biológica do microrganismo para um determinado foco, como produção de um bioproduto ou maximização do crescimento celular. Assim, um aumento na produtividade do processo e, conseqüentemente a redução do custo final de matérias-primas, podem ser alcançados (SINGH *et al.*, 2017).

Ademais, o uso de formulações definidas é simples para o aumento de escala e também permite uma maior conformidade no processo, uma vez que a variação de lote é reduzida quando comparada com os meios complexos. Contudo, a sua elaboração é demasiadamente trabalhosa, pois sua eficiência depende de um conhecimento profundo sobre as exigências nutricionais do organismo bem como da quantidade e qualidade desses componentes. Portanto, faz-se necessário uma abordagem estratégica em planejar os experimentos de modo que a quantidade de ensaios e o custo sejam minimizados (SINGH *et al.*, 2017).

Os meios empregados no cultivo de Hib para produção de PRP descritos na literatura são majoritariamente complexos, constituídos de extrato de levedura e caseína hidrolisada como fontes de nitrogênio, glicose ou glutamato como fonte de carbono, tampão fosfato, hemina e NAD. Alguns trabalhos sobre meios quimicamente definidos para cultivo de *H. influenzae* foram publicados, contudo, sua aplicação foi restrita a outros objetivos sem ser a de sintetizar polissacarídeo capsular. Entre todos os componentes inseridos, nota-se a presença de valina, leucina, isoleucina, serina, ácido aspartânico, ácido glutâmico, arginina, fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina, cisteína, adenina, tween 80, uracila, piridoxina, tiamina, pantotenato de cálcio, glutamina, ZnSO₄, MgSO₄, FeSO₄, NaCl, hemina e NAD. Considerando as demandas metabólicas do *H. influenzae* descritas no tópico 4.4.7, observa-se que a elaboração do meio quimicamente definido deverá conter impreterivelmente arginina, cisteína, glutamato, ácido pantotênico, tiamina, uracila, NAD, hemina e alguma fonte de carbono – frutose, lactose, glicose, entre outros. (BUTLER, 1962; HERRIOTT *et al.*, 1970; MERRITT *et al.*, 2000; COLEMAN *et al.*, 2003; TAKAGI *et al.*, 2006; 2007; SILVA, 2010).

Para tanto, a avaliação da significância do componente bem como a determinação da sua concentração ideal podem ser definidas por métodos híbridos envolvendo metodologias estatísticas, como o planejamento experimental Plakett-Burman ou Taguchi, associado com uma técnica de otimização, a citar: redes neurais artificiais ou superfície de resposta. A primeira técnica fundamenta-se na avaliação da significância estatística das variáveis em determinado componente, por exemplo, o efeito de uma determinada vitamina na concentração final de produto. Após o refinamento dos dados e a retirada das variáveis estatisticamente não interferentes, aplica-se métodos de otimização que relacionam os parâmetros estudados e posteriormente retorna as melhores condições para o fim estudado. Castro e colaboradores (1992) aumentaram cerca de 45% da produtividade de interferon gama em cultivo de células CHO somente com a definição do meio. Já Wang *et al.* (2005) reduziu significativamente o custo de produção de polissacarídeo por *Pleurotus citrinopilaetus* (CASTRO *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2017).

3.6.3 Cultivo contínuo para produção de polissacarídeo de origem bacteriana

A transição da metodologia batelada para o sistema contínuo na cadeia produtiva da indústria de transformação foi efetivamente executada por diversos setores, como a petroquímica, de alimentos e, mais recentemente, a farmacêutica. A flexibilidade na operação, a alta produtividade bem como a exigência de *facilities* menores estão entre as principais vantagens da sua implantação em comparação com a metodologia batelada. Apesar de seu emprego ainda ser escasso em plataformas biotecnológicas, o crescimento na demanda de produtos biológicos e o aumento das pressões econômicas na redução de custo de produção estão contribuindo na busca de tecnologias que operem bioprocessos continuamente (JUNBAUER, 2013; RATHORE *et al.*, 2016).

Com relação às estratégias de *upstream*, o cultivo contínuo é corriqueiramente apresentado como uma tendência no desenvolvimento e aprimoramento de processos da indústria biotecnológica. O sistema contínuo em biorreatores, também conhecido como quimiostato, tem sido estudado pela academia por mais de 75 anos, a citar: estudos de modelos cinéticos de crescimento por Monod (1942), cultivo de *Aerobactere cloacae* por Herbert *et al.* (1956), fermentação alcoólica contínua por *Saccharomyces cerevisiae* Aiba *et al.* (1968) e outros. Ademais, bioprocessos contínuos não estão restritos somente à academia, por exemplo, data-se o emprego industrial do cultivo em perfusão de culturas de hibridoma

para produção de biofármacos desde 1980, antes da sua substituição por métodos de produção utilizando microrganismo recombinante (RATHORE *et al.*, 2016).

Via de regra, o cultivo contínuo caracteriza-se por possuir uma contínua alimentação de meio de cultivo e retirada do caldo de fermentação, mantendo-se constante o volume do reator. Essa configuração possibilita manter a célula em um estado fisiológico constante mediado pelas interações físico-químicas com o ambiente (taxa de diluição e composição do meio de alimentação, por exemplo), implicando no estabelecimento do estado estacionário, ou *quasi*-estacionário, após um tempo curto de cultivo. Além das vantagens em bioprocessos, que serão descritas mais abaixo, o cultivo contínuo é considerado como uma metodologia crucial para o entendimento da fisiologia do microrganismo e, mais recentemente, como uma ferramenta na biologia molecular (ZIV *et al.*, 2013; RATHORE *et al.*, 2016).

Conforme mencionado anteriormente, a principal vantagem que sobrepõe o cultivo contínuo em relação aos demais regimes descontínuos simples ou alimentados diz respeito à operação do processo em estado estacionário (SCHMIDEL *et al.*, 2001). Em decorrência disso, diversos benefícios podem também ser considerados, a citar:

- Redução dos tempos não-produtivos e consequente aumento da produtividade;
- Obtenção de conformidade ao longo processo;
- Minimização dos efeitos inibitórios de metabólitos secundários;
- Manutenção do estado fisiológico das células;
- Integração com demais etapas da cadeia produtiva, minimizando a interfase *upstream/downstream*;
- Menor necessidade de mão-de-obra e outros.

Em contrapartida, a literatura técnica de processos fermentativos contínuos aponta alguns problemas práticos que sobrepõem suas inúmeras vantagens, podendo limitar o emprego desse regime em escala industrial. Dentre eles, pode-se destacar o investimento inicial da planta, possibilidade de ocorrência de mutações genéticas espontâneas, ocorrência de contaminações, sendo este o maior desafio operacional em processos assépticos. Contudo, a frequência e a gravidade de problemas de contaminação são decorrentes de programas de manejo de culturas celulares ineficientes que podem ser reduzidos seguindo os passos: uso de boas práticas de assepsia, redução de acidentes de trabalho, manutenção da limpeza do

laboratório/unidade, monitoramento rotineiro de contaminação, uso estratégico de repositório de células congeladas e uso de antibióticos (SCHMIDEL *et al.*, 2001; RYAN, 2008).

Para fins práticos, faz-se um breve estudo da dinâmica de um processo fermentativo genérico sob regime contínuo. Admite mistura perfeita de modo que o sistema possa ser considerado homogêneo, que o meio de alimentação seja estéril, que as vazões de alimentação e de saída de meio (F) sejam iguais e constantes.

Assim o balanço de massa do sistema contínuo é dado por

$$[Acúmulo] = [Entrada] - [Saída] + [Geração] + [Consumo] \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\frac{d(X \cdot V)}{dt} = -F \cdot X + \mu \cdot X \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde,

X = concentração de biomassa (g/L)

S = concentração de substrato (g/L)

V = volume (L)

μ = velocidade específica de crescimento (h^{-1})

Y_{xs} = fator de conversão de substrato a célula ($\text{g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)

Assumindo que volume constante durante todo o processo e definindo a variável vazão específica de alimentação (D) como a relação entre a vazão volumétrica de alimentação e o volume de reator.

$$D = \frac{F}{V} \quad (\text{Eq. 8})$$

$$\frac{d(X)}{dt} = (\mu - D) \cdot X \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde,

D = taxa de diluição (h^{-1})

No estado estacionário, as variáveis de processo são constantes e no estado de equilíbrio é assumido. Logo,

$$(\mu - D) \cdot \tilde{X} = 0 \quad (\text{Eq. 10})$$

$$D = \mu \quad (\text{Eq. 11})$$

Onde

$\tilde{X}$ = concentração de biomassa no estado estacionário (g/L)

A equação acima enuncia que, sob regime permanente, a velocidade de crescimento celular e a velocidade de retirada de célula do fermentador são equivalentes de modo que a concentração celular no reator é mantida constante. Além disso, ela indica também que a velocidade específica de crescimento celular é modulada pela vazão específica de alimentação. Tal informação é muito relevante, pois a partir da taxa de diluição é possível fixar um estado fisiológico desejável das células.

Segundo a literatura consultada, o único trabalho envolvendo a produção de polissacarídeo capsular por Hib em regime contínuo foi de Silva (2010). O autor cultivou Hib em perfusão, obtendo concentração final e produtividade de PRP na ordem de 1800 mg/L e 129 mg/L.h, respectivamente. O processo estabelecido apresentou melhores resultados comparado com os da literatura, apesar de nenhum estudo quanto à qualidade do material produzido ou sobre o efeito da taxa de diluição na fisiologia de Hib ter sido investigado (SILVA, 2010).

Comparativamente, poucas publicações sobre produção de polissacarídeo capsular bacteriano em regime contínuo estão disponíveis na literatura. De modo geral, é possível observar que não existe um comportamento comum quanto ao efeito da taxa de diluição na produtividade, concentração, qualidade e rendimento do bioproduto. Portanto, sugere-se que a expressão de polissacarídeo é modulada pela taxa de diluição e, principalmente, pela fisiologia do microrganismo em questão se encontra quando o regime foi iniciado.

Gogola-Kolling e colaboradores (2014) compararam duas estratégias de cultivo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14 ($\mu_{\max} = 1,20 \text{ h}^{-1}$) para produção de polissacarídeo capsular. Os autores observaram que a produtividade de biomassa e de polissacarídeo bem como a conversão de glicose foram maiores em cultivo contínuo que em regime batelada, apesar dos coeficientes de rendimento Y_{ps} e Y_{xs} não terem variado significativamente entre eles. Tais fatores evoluíram proporcionalmente com o aumento da taxa de diluição até $D = 0,8 \text{ h}^{-1}$ (65% de $\mu_{\max}$), atingindo valores de produtividade de bioproduto 300% maiores que o observado no regime batelada, e decresceu até atingir D_c ($D > \mu_{\max}$), no qual ocorreu um

arraste das células do reator. O consumo de glicose diminuiu com o aumento de D ao passo que a conversão de células, metabólitos secundários e bioproduto cresceram. Os resultados obtidos foram satisfatórios e os autores demonstraram sua reprodutibilidade em escalas industriais para produção de vacina contra pneumococo (GOGOLA, 2011; GOGOLA-KOLLING *et al.*, 2014).

No entanto, estudos envolvendo o cultivo contínuo de *Klebsiella pneumoniae* K1 mostraram um efeito retrógrado frente ao aumento da taxa de diluição. Mengistu e colaboradores (1993) investigaram a síntese de exopolissacarídeo pelo organismo em regime contínuo e observaram que a produtividade máxima foi presenciada em taxas de diluição baixas. Os autores refutam que baixos tempos de retenção hidráulicos resultam em uma maior oportunidade de o microrganismo usar o excesso da fonte de carbono para biossíntese de polissacarídeo. Ademais, devido à baixa velocidade de crescimento específica de *Klebsiella pneumoniae* K1, a produção de outros componentes da superfície externa da célula, como peptidoglicano e lipopolissacarídeos, são favorecidos em oposição ao polissacarídeo. Tais resultados também foram observados nos cultivos contínuos de *Pseudomonas* NCIB11264 e *Alcaligenes faecalis* (WILLIAMS e WIMPENNY, 1978; PHILLIPS *et al.*, 1983; MENGISTU *et al.*, 1993).

Paoletti e colaboradores (1996) conjecturaram que a expressão de polissacarídeo capsular em bactérias patogênicas é modulada por um mecanismo complexo que envolve a velocidade de crescimento celular do microrganismo e sua patogênese. Para os autores, as bactérias patogênicas produtoras de polissacarídeo com baixa velocidade de crescimento expressam majoritariamente componentes celulares (LPS e proteínas de membrana) associados a sua adesão ao hospedeiro, facilitando a fase de colonização. Em contrapartida, se tais microrganismos crescem em taxas maiores, a biossíntese de polissacarídeo capsular será favorecida em comparação aos demais componentes, caracterizando a condição de invasão. (PAOLETTI *et al.*, 1996; GOGOLA, 2011).

Diante do exposto, as informações discorridas acima podem ser interligadas as particularidades fisiológicas de Hib frente ao efeito da taxa de diluição. A diferenciação de fase é uma característica marcante da partenogênese do microrganismo. Sabe-se que a composição celular do microrganismo é modulada pela sua velocidade de crescimento e, principalmente, pela condição do microambiente onde ele se encontra. Durante a colonização do trato respiratório superior, componentes celulares associados ao mecanismo de adesão – LPS, proteínas de adesão, polissacarídeo capsular e proteínas de membrana – são favorecidos.

Observa-se também a espessura do polissacarídeo capsular apresenta uma menor espessura que durante a fase inicial de infecção. Após a invasão e disseminação da bactéria na corrente sanguínea, a fisiologia de Hib é remodelada e a biossíntese de capsular de maior espessura bem como mudança no fenótipo de LPS são favorecidos, permitindo sua adaptação e resistência ao sistema imune do hospedeiro, principalmente ao sistema complemento e fagocitose por células especializadas. Langfor e Moxon (1992) estudaram o efeito da velocidade de crescimento de Hib na expressão de LPS e proteínas de membranas em um quimiostato. Os autores observaram uma mudança na composição de LPS com o aumento da taxa de diluição que a produção de LPS de massa moleculares baixa acompanha em velocidades de crescimento (D) alto. Portanto, sugere-se que as hipóteses de Paoletti e colaboradores sejam possivelmente aplicáveis para *Haemophilus influenzae* tipo b e que a produção de polissacarídeo capsular em cultivo contínuo possa ser favorecida pelo incremento da velocidade de crescimento, ou em termos operacionais, com o aumento de D (TURK, 1984; LANGFOR e MOXON, 1992; CHANDRAN *et al.*, 2013).

No que diz respeito à dinâmica da massa molecular de polissacarídeo bacteriano, nenhuma informação genérica sobre o efeito da taxa de diluição em cultivo contínua foi encontrada na literatura consultada. Contudo, diante a instabilidade da molécula frente ao acúmulo de cátions monovalentes, a constante renovação de meio no biorreator possibilita o arraste desses íons para fora do sistema, podendo minimizar a despolimerização do polissacarídeo.

Uma estratégia promissora aos cultivos em geral é a realização de processos com alta densidade celular por meio do reciclo de células. Tal proposta é frequentemente aplicada em bioprocessos cujo produto está associado ao crescimento. Ela fundamenta-se na seguinte metodologia: cultivar em regime batelada alimentada o microrganismo até o crescimento microbiano começar a ser inibido pelo acúmulo de metabólitos secundários antes de iniciar o regime contínuo. Nessas condições, a fisiologia e a concentração celular do organismo são estabelecidas e mediadas pela taxa de diluição do reator, e a produtividade do bioproduto passiva de ser favorecida devida a alta densidade de células no sistema. Silva (2010) executou tal estratégia para cultivo de Hib para produção de PRP e, conforme explicitado acima, o autor obteve resultados satisfatórios comparada aos trabalhos publicados consultados. Contudo, muito ainda pode ser explorado. Xu e colaboradores (2006) desenvolveram um processo contínuo com reciclo de células em alta densidade para produção de ácido lático por *Lactobacillus paracasei* e observaram que tal estratégia aumentou a produtividade em 10

vezes comparada aos resultados tradicionais de processo. Desse modo, o emprego do processo contínuo com reciclo de células em alta densidade para biossíntese de PRP por Hib seria uma estratégia atraente tendo em vista o aumento da produtividade de PRP em função da manutenção de uma alta densidade celular.

4. CONCLUSÃO

Os estudos realizados neste trabalho resultaram nas seguintes conclusões:

- A inibição do crescimento celular pelo acúmulo de metabólitos secundários bem como a instabilidade do poliribosilribitol fosfato diante aos cátions mono ou bivalentes são os gargalos de processos relatados na literatura;
- O uso de linhagens com múltiplas cópias do locus *cap*, a otimização do meio de cultivo e o cultivo em regime contínuo demonstraram ser excelentes estratégias para otimização da concentração, produtividade e qualidade do produto;
- A dinâmica de regimes contínuos pode possibilitar a consistência da massa molecular do polissacarídeo ao longo do processo devido ao não acúmulo de íons mono ou bivalente bem como contribuir na produtividade de biomassa tendo em vista a minimização dos metabólitos secundários no reator.

Portanto, as informações a busca por regimes de processos que minimizem os efeitos inibitórios de produtos metabólitos de Hib, considerando a instabilidade química de PRP frente ao acúmulo de Na e a dinâmica da massa molecular de PRP ao longo de cultivos descontínuos tornam as informações apresentadas no presente trabalho tecnicamente atrativos para um aperfeiçoamento do processo de produção da vacina conjugada Hib.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 845-862, 1968.
- ALEXANDER, C.; RIETSCHEL, E. T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **Journal of Endotoxin Research**, v. 7, n. 3, p. 167-202, 2001.
- ANDERSON, P.; PITT, J.; SMITH, D. H. Synthesis and Release of Polyribophosphate by *Haemophilus influenzae* Type b In Vitro. **Infection and Immunity**, v. 13, n. 2, 1976.
- BOGAERT, D.; HERMANS, P. W. M.; ADRIAN, P.; RUMKE, H. C.; DE GROOT, R. Pneumococcal vaccines - an uptake on current strategies. **Vaccine**, v. 22, p. 2209-2220, 2004.
- BUTLER, L. O. A Defined Medium for *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*. **Journal of General Microbiology**, v. 27, p. 51-60, 1962.
- CASTRO, P. M.; HAYTER, P. M.; ISON, A. P.; BULL, A. T. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 84-90, 1992.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. ***Haemophilus Influenzae* type B (Hib) VIS**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/vis/vis-statements/hib.html>>. Acesso em: 19 nov 2017.
- CERQUETTI, M.; CARDINES, R.; GIUFRE, M.; CASTELLA, A.; REBORA, M.; MASTRANTONIO, P.; ATTI, M. L. C. D. Detection of Six Copies of the Capsulation b Locus in a *Haemophilus influenzae* Type b Strain Isolated from a Splenectomized Patient with Fulminant Septic Shock. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 640-642, 2006.
- CHANDRAN, A.; WATT, J. P.; SANTOSHAM, M. *Haemophilus influenza* vaccines. In: PLOTKIN, S.; ORENSTEIN, W.; OFFIT, P. (Org.). **Vaccines**. New South Wales: Saunders, 2013. p. 167-185.
- CINTRA, F. O. **Modelagem matemática e otimização da produção de exopolissacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo b**. 2014. 96 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo (Brasil).
- CINTRA, F. O.; TAKAGI, M. Study of the chemical stability of the capsular polysaccharide produced by *Haemophilus influenza* type b. **Carbohydrates Polymers**, v. 116, p. 167-172, 2015.
- COLEMAN, H. N.; DAINES, D. A.; JARISCH, J.; SMITH, A. L. Chemically Defined Media for Growth of *Haemophilus influenzae* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4408-4410, 2003.

COONEY, C. L. Strategies for Optimizing Microbial Growth and Product Formation. In: BLANCH, H. W.; PAPOUTSAKIS, E. T.; STEPHANOPOULUS, G (Org.). **Foundations of Biochemical Engineering: Kinetics and Thermodynamics in Biological Systems**, California: American Chemical Society, 1983. p. 179-198.

CRISEL, R. M.; BAKER, R. S.; DORMAN D. E. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae* type b. I Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 250, n. 13, p. 4926-4930, 1975.

DAHLQVIST, A. Determination of maltose and isomaltose activities with a glucose-oxidase reagent. **Biochemical Journal**, v. 80, p. 547-555, 1961.

FERREIRA, N. S. A. As pesquisas denominadas "estado da arte". **Educação & Sociedade**, n. 79, p. 257-272, 2002.

FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMB, J.; DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M.; McKENNEY, K.; SUTTON, G.; FITZHUGH, W.; FIELDS, C.; WIEDMAN, J. F.; PHILLIPS, C. A.; SPRIGGS, T.; HEDBLUM, E.; COTTON, M. D. UTTERBACK, T. R.; HANNA, M. C.; NGUYEN, D. T.; SAUDEK, D. M.; BRANDON, R. C.; FINE, L. D.; FRITCHMAN, J. L.; FUHRMAN, J. L.; GEOGHAGEN, N. S. M.; GNEHM, C. L.; McDONALD, L. A.; SMALL, K. V.; FRASER, C. M.; SMITH, H. O.; VENTER, J. C. Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus Influenzae* Rd. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 496-512, 1995.

FOTHERGILL, L. D.; WRIGHT, J. Influenzal Meningitis: The Relation of Age Incidence to the Bactericidal Power of Blood Against the Casual Organism. **The Journal of Immunology**, v. 24, p. 273-285, 1933.

GOGOLA, V. M. R. **Cultivo contínuo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14: metabolismo e cinética de produção de polissacarídeo capsular**. 2011. 138 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo (Brasil).

GOGOLA-KOLLING, V. M. R.; ZANARDO, R. T.; CARMO, T. S.; ZAMPOLI, N. D.; FIGUEIREDO, D. B.; GONÇALVES, V. M. Improved capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 using continuous cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 91, p. 16-22, 2014.

GOLDBLATT, D. Conjugate vaccines. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 119, n. 1, p. 1-3, 2000.

GOTTSCHALK, G. **Bacterial Metabolism**. Berlim: Springer, 1985. p. 13-35.

HAAN; A., VAN DER PUT; R. M. F., BEURRET; M. HPAEC-PAD method for the analysis of alkaline hydrolyzates of *Haemophilus influenza* type b capsular polysaccharide. **Biomedical Chromatography**, v. 27, n. 9, p. 1137-1142, 2013.

HAMID, A.; KREEFTENBERG, H.; POL L. V. D.; GHIMIRE, S.; WIELEN L. A. M.; OTTENS, M. Process development of a New *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine and the use of mathematical modeling to identify process optimization possibilities. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 3, p. 568-580, 2016.

HARRISON, L. H.; SILVA, G. A.; PITTMAN, M.; FLEMING, D. W.; VRANJAC, A.; BROOME, C. V. Epidemiology and clinical spectrum of Brazilian purpuric fever. Brazilian Purpuric Fever Study Group. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 599-604, 1989.

HERBERT, D.; ELSWORTH, R.; TELLING, R. C. The Continuous Culture of Bacteria; a Theoretical and Experimental Study. **Journal of General Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 601-622, 1956.

HERBERT, M. A. HOOD, D. W. MOXON, E. R. ***Haemophilus influenzae* Protocols**. Nova Jersey: Humana Press, 2003. 333 p.

HERRIOTT, R. M.; MEYER, E. Y.; VOGT, M.; MODAN, M. Defined Medium for Growth of *Haemophilus influenzae*. **Journal of Bacteriology**, v. 101, n. 2, p. 513-516, 1970.

HERRIOTT, R. M.; MEYER, E. M.; VOGT, M. Defined Nongrowth Media for Stage II Development of Competence in *Haemophilus influenzae*. **Journal of Bacteriology**, v. 101, n. 2, p. 517-524, 1970.

HEDEGAARD, J.; OKKELS, H.; BRUUN, B.; KILIAN, M.; MORTENSEN, K. K.; NORSKOV-LAURITSEN, N. Phylogeny of the genus *Haemophilus* as determined by comparison of partial *infB* sequences. **Microbiology**, v. 147, n. 9, p. 2599-2609, 2001.

JORDENS, J. Z.; SLACK, M. P. E. *Haemophilus influenzae*: then and now. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, p. 935-948, 1995.

JUNGBAUER, A. Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 479-492, 2013.

KEGG PATHWAY Database. Disponível em: < www.genome.jp/kegg/pathway.html>. Acesso 23 nov 2017.

KERR, M. A. The structure and function of human IgA. **Biochemical Journal**, v. 271, n. 2, p. 285-296, 1990.

KLEIN, J. O. Role of nontypeable *Haemophilus influenzae* in pediatric respiratory tract infections. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 16, n. 2, p. S5-S8. 1997.

KOSTYANEV, T. S.; SECHANOVA, L. P. Virulence factors and mechanisms of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*. **Folia Medica**, v. 54, n. 1, p. 19-23, 2012.

KROLL, J. S.; MOXON E. R. Capsulation and gene copy number at the cap locus of *Haemophilus influenzae* type b. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 2, p. 859-864, 1988.

LANGFORD, P. R.; MOXON, E. R. The dilution rate affects the outer membrane protein and lipopolysaccharide composition of *Haemophilus influenzae* type b grown under iron limitation. **Journal of Bacteriology**, v. 165, n. 8, p. 2462-2464, 1993.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. Segunda Edição . São Paulo: Sarvier, 2000. 839 p.

LICHTENEGGER, S.; BINA, I.; ROIER, S.; BAUERNFEIND, S.; KEIDEL, K.; SCHILD, S.; ANTHONY, M.; REIDL, J. Characterization of lactate utilization and its implication on the physiology of *Haemophilus influenzae*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 3-4, p. 490-498, 2014.

LIGON, B. L. Margaret Pittman: Pioneer Researcher on *Haemophilus influenzae* (1901-1995). **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 77-79, 1998.

MACFADYEN, L. P.; DOROCICZ, I. R.; REIZER, J.; JUNIOR, M. H. S.; REDFIELD, R. J. Regulation of competence development and sugar utilization in *Haemophilus influenzae* Rd by a phosphoenolpyruvate: fructose phosphotransferase system. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 941-952, 1996.

MACFADYEN, L. P.; REDFIELD, R. J. Life in mucus: sugar metabolism in *Haemophilus influenzae*. **Research in Microbiology**, v. 147, n. 6-7, p. 541-551, 1996.

MENGISTU, Y.; EDWARDS, C.; SAUNDERS, J. R. Continuous culture studies on the synthesis of capsular polysaccharide by *Klebsiella pneumoniae* K1. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 5, p. 424-430, 1994.

MERRITT, J.; ALLARD, G.; O'TOOLE, L.; SWARTZ, R.; LICARI, P. Development and scale-up of a fed-batch process for the production of capsular polysaccharide from *Haemophilus influenza*. **Journal of Biotechnology**, v. 81, n. 2-3, p. 189-197, 2000.

MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 3, p. 371-394, 1949.

MORRIS, S. K.; MOSS, W. J.; HALSEY, N. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine use and effectiveness. **The Lancet**, v. 8, p. 435-443, 2008.

MOXON, E. R.; DEICH, R. A.; CONNELLY, C. Cloning of Chromosomal DNA from *Haemophilus influenzae*: Its Use for Studying the Expression of Type b Capsule and Virulence. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 73, p. 2980-306, 1984.

NOEL, G. J.; BRITINGHAM, A.; GRANATO, A. A.; MOSSER, D. M. Effect of amplification of the Cap b locus on complement-mediated bacteriolysis and opsonization of type b *Haemophilus influenza*. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 11, p. 4769-4775, 1996.

NORSKOV-LAURITSEN, N. Classification, Identification, and Clinical Significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* Species with Host Specificity. **Clinical Microbiology Review**, v. 27, n. 2, p. 214-240, 2014.

OTHMAN, D. S. M. P.; SCHIRRA, H.; McEWAN, A. G.; KAPPLER, U. Metabolic versatility in *Haemophilus influenzae*: a metabolomic and genomic analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n.69, p. 1-10, 2014.

PAOLETTI, L. C.; ROSS, R. A.; JOHNSON, K. D. Cell Growth Rate Regulates Expression of Group B *Streptococcus* Type III Capsular Polysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 4, p. 1220-1226, 1996.

PATRICK, C. C.; PATRICK, G. S.; KAPLAN, S. L.; BARRISH, J.; MASON, E. O. Adherence Kinetics of *Haemophilus influenzae* Type b to Eucaryotic Cells. **Pediatric Research**, v. 26, n. 5, p. 500-503, 1989.

PELTOLA, H.; KILPI, T.; ANTTILA, M. Rapid disappearance of *Haemophilus influenzae* type b meningitis after routine childhood immunisation with conjugate vaccines. **The Lancet**, v. 340, n. 8819, p. 592-594, 1992.

PELTOLA, H. Worldwide *Haemophilus influenzae* Type b Disease at the Beginning of the 21st Century: Global Analysis of the Disease Burden 25 Years after the Use of the Polysaccharide Vaccine and a Decade after the Advent of Conjugates. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 302-317, 2000.

PEREIRA, M. P.; BROWN, E. D. Biunctional catalysis by CDP-ribitol synthase: convergent recruitment of reductase and cytidyltransferase activities in *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*. **Biochemistry**, v. 43, n. 37, p. 11802-11812, 2004.

POSTMA, P. W.; LENGELER, J. W.; JACOBSON, G. R. Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 3, p. 543-594, 1993.

PHILLIPS, K. R.; PIK, J.; LAWFORD, H. G.; LAVERS, B.; KLIGERMAN, A.; LAWFORD, G. R. Production of curdlan-type polysaccharide by *Alcaligenes faecalis* in batch and continuous culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, n. 10, p. 1331-1338, 1983.

PITTMAN, M. Variation of type specificity in the bacterial species *Hemophilus influenzae*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 54, n. 4, p. 471-492, 1931.

RAGHUNATHAN, A.; PRICE, N. D.; GALPERIN, M. Y.; MAKAROVA, K. S.; PURVINE, S.; PICONE, A. F.; CHERNY, T.; XIE, T.; REUKKY, T. J.; MUNSON, R.; TYLER, R. E.; AKERLEY, B. J.; SMITH, A. L.; PALSSON, B. O.; KOLKER, E. In Silico Metabolic Model and Protein Expression of *Haemophilus influenzae* Strain Rd KW20 in Rich Medium. **OMICS - A Journal of Integrative Biology**, v. 8, n. 1, p. 25-41, 2004.

RATHORE, A.; KATEJA, N.; AGARWAL, H.; SHARMA, A. K. Continuous Processing for the Production of Biopharmaceuticals. **BioPharm International**, v. 29, n. 4, p. 14-19, 2016.

RYAN, J. **Understanding and Managing Cell Culture Contamination: Technical Bulletin**. Disponível em :
e

<<http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/contamination-COR.pdf>>. Acesso em: 7 dez 2017.

ROBERTS, I. S. Bacterial polysaccharides in sickness and in health. **Microbiology**, v. 141, n. 9, p. 2023-2031, 1995.

ROBERTS, I. S. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 285-315, 1996.

ROSANDINI, C. V. **Roles of Secreted Virulence Factors in Pathogenicity of *Haemophilus influenzae*: a dissertation**. 2011. 179 f. Tese (Doutorado em Genética Molecular e Microbiologia) – Escola de Ciências Biomédicas, Universidade de Massachusetts, Worcester (EUA).

SATOLA, S. W.; SCHIRMER, P. L.; FARLEY, M. M. Complete Sequence of the *cap* Locus of *Haemophilus influenzae* Serotype b and Nonencapsulated b Capsule-Negative Variants. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3639-3644, 2003.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 2, 2001. 541 p.

SEVERI, E.; RANDLE, G.; KIVLIN, P.; WHITFIELD, K.; YOUNG, R.; MOXON, R.; KELLY, D.; HOOD, D.; THOMAS, G. H. Sialic acid transport in *Haemophilus influenzae* is essential for lipopolysaccharide sialylation and serum resistance and is dependent on a novel tripartite ATP-independent periplasmic transporter. **Molecular Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1173-1185, 2005.

SILVA; M. R. **Estratégias de cultivo para a produção de polissacarídeo capsular por *Haemophilus influenzae* tipo b e determinação de parâmetros de qualidade para o produto**. 2010. 233 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (Brasil).

SINGH, V.; HAGUE, S.; NIWAS, R.; SRIVASTAVA, A.; PASUPULETI, M.; TRIPATHI, C. K. M. Strategies for Fermentation Medium Optimization. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 2087, p. 1-16, 2017.

SONG, X. M.; FORSGREN, A.; JANSON, H. Glycerol-3-phosphate transport in *Haemophilus influenzae*: cloning, sequencing, and transcription analysis of the *glpT* gene. **Gene**, v. 215, n. 2, p. 381-388, 1998.

TAKAGI; M., CABRERA-CRESPO; J., BARUQUE-RAMOS; J., ZANGIROLAMI; T. C.; RAW; I., TANIZAKI; M. M. Characterization of Polysaccharide Production of *Haemophilus influenzae* Type b and Its Relationship to Bacterial Cell Growth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 110, n. 2, p. 91-100, 2003.

TAKAGI; M., CABRERA-CRESPO; J., ZANGIROLAMI; T. C.; RAW; I., TANIZAKI; M. M. Improved cultivation conditions for polysaccharide production by *H. influenzae* type b. **Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 182-188, 2006.

TAKAGI, M.; TANIZAKI, M. M.; ZANGIROLAMI, T. C.; CABRERA-CRESPO, J. Improvement of simple cultivation conditions for polysaccharide synthesis by *Haemophilus influenza* type b. In: MENDÉZ-VILAS, A. (Ed.). **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**. Sevilha: Formatex, 2007. v. 1, p. 602-608.

TATUSOV, R. L.; MUSHEGIAN, A. R.; BORK, P.; BROWN, N. P.; HAYES, W. S.; BORODOVSKY, M.; BUDD, K. E.; KOONIN, E. V. Metabolism and evolution of *Haemophilus influenzae* deduced from a whole-genome comparison with *Escherichia coli*. **Current Biology**, v. 6, n. 3, p. 279-291, 1996.

TEBBUTT, G. M. Evaluation of some methods for the laboratory identification of *Haemophilus influenzae*. **Journal of Clinical Pathology**, v. 36, n. 9, p. 991-995, 1983.

THJOTTA, T.; AVERY, O. T. Studies on bacterial nutrition: II. Growth accessory substance in the cultivation of *Hemophilic bacilli*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 34, n. 1, p. 97-114, 1921.

TOGNOTTI, E. Scientific triumphalism and learning from facts: bacteriology and the 'spanish flu' challenge of 1918. **Social History of Medicine**, v. 16, n. 1, p. 97-110, 2003.

TURK, D. C. The pathogenicity of *Haemophilus influenzae*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 1-16, 1984.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. Vaccine Price Data. Disponível em: <http://www.unicef.org/supply/index_57476.html>. Acesso em: 23 nov 2017.

VAN ELDERE, J.; BROPHY, L.; LOYNDS, B.; CELIS, P.; HANCOCK, I.; CARMAN, S.; KROLL, J. S.; MOXON, E. R. Region II of the *Haemophilus influenzae* Type b capsulation locus is involved in serotype-specific polysaccharidesynthesis. **Molecular Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 107-118, 1995.

WANG, J.; HU, S.; YEH, C. Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 6, p. 759-766, 2005.

WHITE, D.; DRUMMOND, J.; FUQUA, C. **The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes**. Quarta Edição. Oxford: Oxford University Press, 2011. 632 p.

WILLIAMS, A. G.; WIMPENNY, J. W. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB11264 grown in continuous culture. **Journal of General Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 47-57, 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. *Haemophilus influenzae* type b (Hib). Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/haemophilus/haemophilus_influenzae_typeb_Hib/en/>. Acesso em: 19 nov 2017.

WHO – WOLRD HEATLH ORGANIZATION. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **WHO Technical Report Series**, n. 897, p. 27-60, 2000.

XU, G.; WANG, Y.; ZHUANG, Y.; ZHANG, S.; PENG, H. Development of a continuous cell-recycle fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus paracasei*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 12, p. 2458-2463, 2006.

YOGEV, R.; ARDITI, M.; CHADWICK, E. G.; AMER, M. D.; SROKA, P. A. *Haemophilus influenza* type b conjugate vaccine (meningococcal protein conjugate): immunogenicity and safety at various doses. **Pediatrics**, v. 85, n. 4, p. 690-693, 1990.

ZIV, N.; BRANDT, N. J.; GRESHAM, D. The Use of Chemostats in Microbial Systems Biology. **Journal of Visualized Experiments**, v. 80, p. 1-10, 2013.

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