



Produção de soroalbumina por rota
fermentativa utilizando *Pichia pastoris*

Samir Kalaoun Filho

Projeto de Final de Curso

Orientadores

Rodrigo Pires do Nascimento

Amaro Gomes Barreto Júnior

Agosto de 2017

PRODUÇÃO DE SOROALBUMINA POR ROTA FERMENTATIVA UTILIZANDO *PICHA PASTORIS*

Samir Kalaoun Filho

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

Maria Alice Zarur Coelho, DEB-EQ/UFRJ

Celuta Sales Alviano, IMPG-CCS/UFRJ

Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana, IQ/UERJ

Orientado por:

Prof. Rodrigo Pires do Nascimento, DEB-EQ/UFRJ

Prof. Amaro Gomes Barreto Junior, DEQ-EQ/UFRJ

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Agosto de 2017

Kalaoun Filho, Samir.

Produção de soroalbumina por rota fermentativa utilizando *Pichia pastoris*/Samir Kalaoun Filho. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2017.

xii, 62 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2017.

Orientadores: Rodrigo Pires do Nascimento e Amaro Gomes Barreto Júnior

1. Albumina. 2. Fermentação. 3. *Pichia pastoris*. 4. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Rodrigo Pires do Nascimento e Amaro Gomes Barreto Júnior. I. Título.

Aos meus pais e irmã, pela educação,
incentivo e amor incondicional.

*“As circunstâncias do nascimento de alguém são irrelevantes;
é o que você faz com o dom da vida que determina quem você é.”*

Takeshi Shudo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, como não poderia deixar de ser, agradeço aos meus pais, Sandra e Samir, pela educação, disciplina, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e incentivando em todas as decisões que tomei na vida, até mesmo quando decidi não seguir o aparente “fácil” caminho da Medicina, como quase todos na família. Sem vocês, o caminho não seria tão rico e frutificante e perderia o total sentido. Obrigado por confiarem no meu potencial. Vocês são os meus exemplos e meus heróis.

Agradeço também a minha irmã, que chegou ao mundo há seis anos, tornando-o mais alegre, leve e puro, me fazendo relembrar todas as boas memórias de infância, que na correria do dia-a-dia ficariam esquecidos. A você, desejo um futuro brilhante e que sua vida, que está apenas começando, seja repleta de alegria e amor.

Durante esses cinco anos e meio de graduação na UFRJ, fiz muitas amizades que tornaram toda essa jornada mais fácil e que levarei para a vida. Além dos amigos de faculdade, pude aprender e muito com os excelentes professores desta instituição, com agradecimento especial para aos Professores Magali Cammarota, Heloísa Lajas, Verônica Calado e Fábio Toniolo, por me apoiarem e auxiliarem sem medir esforços, para que meu sonho de estudar no MIT se realizasse. Aos professores Rodrigo Pires e Amaro Gomes, sou grato pela orientação neste trabalho e pelos ensinamentos nos cursos de microbiologia industrial e transferência de massa, respectivamente.

Já no MIT, agradeço aos Professores Jean-François Hamel, Mary Caulfield e Barry Johnston por todo o incrível aprendizado e suporte. Aos amigos de intercâmbio, um obrigado especial à Malena, Ray, Amy, Reggie e aos brazucas do ITA, especialmente ao Lucas. Agradeço a todos do laboratório *Chemical Biological Engineering Lab* do MIT, local este onde foram realizados todos os experimentos. Com agradecimentos especiais à Brooke, Jiyoung, Leia, Alex, Connor, Nathaniel e Douglas.

Já aos colegas de estágio, um abraço especial para Audrey e Shannon, da Shell Américas, e Pedro, da Shell Brasil.

Agradeço à Priscilla, Suzana e Fernanda, pela amizade, ensinamentos e paciência durante minha iniciação científica no LTA.

Agradeço aos Professores Vânia e Marco Antônio que, ainda no colégio EME, lecionaram com maestria, me incentivando cada vez mais a buscar o conhecimento.

Por último, mas não menos importante, agradeço ao CNPq e ao programa “Ciência sem Fronteiras” por proporcionarem esta ímpar experiência em minha vida que foi a ida ao MIT. Sem o apoio do Governo Federal, este estudo não seria possível.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro Químico.

PRODUÇÃO DE SOROALBUMINA POR ROTA FERMENTATIVA UTILIZANDO *PICHIA PASTORIS*

Samir Kalaoun Filho

Agosto, 2017

Orientadores: Prof. Rodrigo Pires do Nascimento, D.Sc., EQ/UFRJ

Prof. Amaro Gomes Barreto Junior, D.Sc., EQ/UFRJ

A produção de macromoléculas biológicas, tais como as proteínas, é um dos principais ramos de estudo da indústria biotecnológica. A soroalbumina humana (HSA) é a proteína mais abundante do plasma sanguíneo, apresentando funções vitais de manutenção da pressão osmótica sanguínea, manutenção do pH e transporte de moléculas. O principal método utilizado para obter a HSA hoje, é o fracionamento por etanol a frio a partir de amostras de sangue obtidos via doação, sendo um processo limitado pela quantidade de sangue doado. A fim de evitar o uso de sangue como fonte de HSA e mitigar alguns dos riscos associados a este procedimento, métodos alternativos para produzir a soroalbumina humana estão sendo explorados. A HSA recombinante (rHSA) surge como uma alternativa à HSA plasmática. A rHSA pode ser desenvolvida e expressa como uma forma alternativa de soroalbumina em sistemas biológicos (bactérias, leveduras, plantas e animais) de expressão. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi estudar o uso de *Pichia pastoris* como um sistema de expressão biológica para a produção de soroalbumina de rato recombinante (rMSA), proteína com alto grau de semelhança à HSA, via promotor constitutivo P_{GAP}. Esta espécie de levedura é comumente utilizada para expressar proteínas em função do seu rápido crescimento, menor sensibilidade às alterações nutricionais e ambientais, e capacidade de atingir altas densidades celulares durante o cultivo. A metodologia consistiu na utilização de frascos agitados e experimentos em biorreator para análise do crescimento celular, produção de proteínas, concentração de glicose no meio e análise do gás de exaustão. Após os experimentos, a qualificação dos bioprodutos foi realizada por eletroforese em gel, e para mensurar a acurácia dos resultados, um balanço de massa de carbono foi proposto. Os experimentos para a produção de rMSA foram considerados bem-sucedidos, mesmo produzindo pequena quantidade de proteínas quando comparado à literatura. Apesar de se almejar valores de produção de rMSA entre 3 g/L e 10 g/L, os experimentos realizados alcançaram produções de aproximadamente 0,3-0,4 g/L. Já em relação ao crescimento celular, pode-se observar que as leveduras atingiram valores de concentração de até 8 g/L, concentrações estas consideradas baixas de acordo com a literatura. Novos estudos da produção de rHSA e análogos deverão ser conduzidos para otimizar a produção por rota fermentativa e, em seguida, sistemas de separação e purificação da proteína em questão devem ser estudados. Adicionalmente, ainda há alguns desafios e debates em torno da utilização de soroalbumina, que discutem o papel e a eficácia da proteína em tratamentos médicos, revisando os critérios utilizados para a regulação de seu uso.

ÍNDICE

Capítulo 1. Revisão bibliográfica	1
1.1. Soroalbumina humana	2
1.2. Aplicações e demanda de HSA.....	5
1.3. Métodos tradicionais de obtenção de HSA	8
1.3.1. Soroalbumina humana plasmática (pHSA)	9
1.3.2. Soroalbumina humana recombinante (rHSA).....	11
Capítulo 2. Justificativa do estudo	14
2.1. <i>Pichia pastoris</i> e a produção de HSA recombinante	14
2.2. Obtendo rHSA via promotor constitutivo P_{GAP} em <i>Pichia pastoris</i>	19
Capítulo 3. Objetivos.....	25
3.1. Objetivo geral.....	25
3.2. Objetivos específicos	25
Capítulo 4. Metodologia	26
4.1. A cultura microbiana.....	26
4.2. Experimentos em frascos agitados e a escolha do meio de cultura	27
4.2.1. Meios de cultura.....	27
4.2.2. Parâmetros dos experimentos em frascos agitados	28
4.2.3. Determinação de densidade ótica (DO)	29
4.2.4. Determinação de peso seco celular (DCW)	29
4.2.5. Análise de concentração de proteínas em solução	29
4.2.6. Dos frascos agitados ao biorreator	29
4.3. Operação do biorreator	30
4.3.1. Configuração do biorreator	30
4.3.2. Monitoramento e controle dos experimentos	31
4.3.3. Parâmetros dos experimentos no biorreator.....	32
4.3.4. Análise de concentração de glicose.....	33
4.4. Qualificação das proteínas produzidas	33
Capítulo 5. Resultados e discussão.....	34
5.1. Crescimento celular nos experimentos em frascos agitados	34
5.2. Produção proteica nos experimentos em frascos agitados	36
5.3. Escolha do meio de cultura	37

5.4. Experimentos em biorreator	38
5.4.1. Batelada 0	39
5.4.2. Batelada 1	40
5.4.3. Batelada 2	42
5.5. Qualificação das proteínas produzidas	46
5.6. Balanço de massa de carbono	47
5.7. Cálculo de parâmetros de produção	48
Capítulo 6. Conclusão.....	49
Capítulo 7. Desafios futuros.....	51
Capítulo 8. Referências bibliográficas	53
Capítulo 9. Apêndices.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas terciária e de preenchimento de espaço da HSA, coloridas por estrutura secundária	4
Figura 2. Diagrama esquemático do limite de aproximação de moléculas de HSA	5
Figura 3. Estrutura da HSA e a localização do radical cisteína-34 (Cys34)	5
Figura 4. Efeitos fisiológicos da soroalbumina	6
Figura 5. Mercado (em toneladas) da HSA ao longo de 20 anos	7
Figura 6. Distribuição do mercado mundial de soroalbumina - 2015/2016	8
Figura 7. Processo Cohn de fracionamento do plasma humano	10
Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura da <i>P. pastoris</i> (aumento de 1600x).....	14
Figura 9. Alta densidade celular de cultura de <i>P. pastoris</i>	15
Figura 10. Rota metabólica do metanol em <i>Pichia pastoris</i>	16
Figura 11. Diagrama genérico de um vetor de expressão utilizado em <i>P. pastoris</i>	18
Figura 12. Expressão heteróloga intra ou extracelular de proteínas em <i>P. pastoris</i>	18
Figura 13. Rota global das reações que compõem a etapa da glicólise.....	20
Figura 14. Desidrogenação do gliceraldeído-3-fosfato catalisada pela GAP	21
Figura 15. Vetor série pGAPZ/pGAP α para expressão de rHSA em <i>P. pastoris</i> via P _{GAP}	23
Figura 17. Biorreator Sartorius Biostat A Plus utilizado no estudo	30
Figura 18. Esquema resumido do biorreator e seus equipamentos.....	31
Figura 16. Desvio da lei de Lambert-Beer em soluções muito concentradas.....	34
Figura 20. Comparação de DO ₆₀₀ médio ao longo do tempo entre meios BSM e Kobayashi	35
Figura 21. Correlação entre DO ₆₀₀ e peso seco celular (DCW)	35
Figura 22. Comparação de DCW médio ao longo do tempo entre meios BSM e Kobayashi	36
Figura 23. Comparação de produção de proteínas entre meios BSM e Kobayashi.....	37
Figura 19. Desvio de linearidade da análise de concentração de glicose	39
Figura 24. Diminuição drástica de volume durante a batelada 0.....	40
Figura 25. Perfil de concentrações do experimento em biorreator – Batelada 1	41
Figura 26. Comparação de perfis de crescimento celular entre Batelada 1 e experimentos em frascos agitados	42

Figura 27. Meio BSM de aparência normal à esquerda e meio BSM de coloração amarelada à direita.....	43
Figura 28. Perfil de concentrações do experimento em biorreator – Batelada 2.....	43
Figura 29. Perfis de crescimento celular dos experimentos realizados	44
Figura 30. Resultados de ambas as bateladas, evidenciando semelhança entre dados..	45
Figura 31. Gel resultante da análise de SDS-PAGE.....	46
Figura 32. Estimativa da concentração de CO ₂ produzido a partir do balanço de massa de carbono.....	48
Figura 33. Fluxograma de um processo de produção e purificação de soroalbumina	51
Figura A. Fracionamento de plasma sanguíneo pelo método de Cohn	59
Figura B. Metabolismo global de fontes de carbono em <i>Pichia pastoris</i>	62
Figura C. Resultados de DO600 para diferentes frascos agitados.....	63
Figura D. Coeficiente global de transferência de O ₂	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de proteínas quanto à função	1
Tabela 2. Classificação de proteínas quanto à solubilidade	2
Tabela 3. Similaridade entre sequência de soroalbuminas em diferentes espécies	3
Tabela 4. Estrutura do estudo de produção de rMSA via fermentação em <i>P. pastoris</i> . 26	
Tabela 5. Composição do meio de cultura BSM	27
Tabela 6. Composição do meio de cultura Kobayashi	27
Tabela 7. Parâmetros dos experimentos em frascos agitados.....	28
Tabela 8. Parâmetros dos experimentos em biorreator de bancada.....	32
Tabela 9. Parâmetros de produção em frascos agitados e biorreator.....	48
Tabela A. Possíveis promotores indutíveis para expressão em <i>Pichia pastoris</i>	60
Tabela B. Possíveis promotores constitutivos para expressão em <i>Pichia pastoris</i>	61
Tabela C. Vantagens da utilização de <i>P. pastoris</i> em sistemas de expressão frente à <i>S. cerevisiae</i>	61

NOMENCLATURA

Símbolo	Descrição
bp	Par de bases
ADP	Adenosina difosfato
AOX	Álcool oxidase
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Soroalbumina bovina
Da	Dalton
DCW	Peso seco celular
DHA	Diidroxiacetona
DHAP	Diidroxiacetona fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
F ₆ P	Frutose-6-fosfato
FBP	Frutose-1,6-bifosfato
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH	Glutationa
HSA	Soroalbumina humana
kg _{pc}	Quilograma de peso corporal
MM	Massa molecular
MSA	Soroalbumina de rato
OD	Oxigênio dissolvido
rHSA	Soroalbumina humana recombinante
rMSA	Soroalbumina de rato recombinante
PEP	Fosfoenolpiruvato
pHSA	Soroalbumina humana plasmática
pH	Potencial hidrogeniônico
Xu ₅ P	Xilulose-5-monofosfato
r/2	Força iônica

Capítulo 1. Revisão bibliográfica

Uma das fontes de grande procura na indústria biotecnológica durante as últimas décadas tem sido a produção de macromoléculas biológicas, tais como as proteínas. Desde enzimas utilizadas em lavagem de roupas até proteínas aplicadas a tratamentos médicos de doenças raras, o mundo da química de proteínas sofreu notável evolução. A purificação de proteínas se expande anualmente e já atinge a marca de bilhões de dólares ao ano, fazendo com que empresas no ramo da biotecnologia, que fornecem equipamentos de adsorção, ultrafiltração e fermentadores, rapidamente busquem acompanhar e capturar esta fatia crescente e de suma importância do mercado da biotecnologia (Harrison et al., 2003).

É usual ouvirmos falar a respeito da importância das proteínas em nosso organismo. Elas estão presentes em todos os seres vivos, desde organismos microscópicos até os mais complexos, como grandes animais e plantas, e participam de praticamente todos os processos celulares, desempenhando um vasto conjunto de funções no organismo, como a replicação do DNA, a resposta aos estímulos externos, funções mecânicas e estruturais, a catálise de reações bioquímicas e o transporte de moléculas (Genton et al., 2010). A Tabela 1 apresenta algumas das principais funções das proteínas em nosso organismo, com seus respectivos exemplos.

Tabela 1. Classificação de proteínas quanto à função

Função	Exemplo
Enzimas	Ribonuclease, celulase, tripsina e DNA polimerase
Proteínas de transporte	Hemoglobina, soroalbumina e mioglobina
Proteínas estruturais	Colágeno, queratina e elastina
Proteínas de movimento	Actina, miosina e tubulina
Proteínas nutritivas e de reserva	Ovoalbumina e Caseína
Proteínas de defesa	Anticorpos, fibrinogênio e trombina
Proteínas hormonais/reguladoras	Insulina e hormônio do crescimento

Fonte: Adaptado de Harrison et al. (2003)

As proteínas são macromoléculas formadas por uma ou várias cadeias de aminoácidos, sendo que alguns podem ser sintetizados pelo organismo humano e outros precisam ser fornecidos via alimentação (Voet e Voet, 2004). Para formarem a proteína, os resíduos individuais de aminoácidos são unidos entre si através de ligações peptídicas, e a sequência de

aminoácidos em cada proteína é pré-definida pela sequência de um gene, a qual está codificada no código genético de cada ser vivo.

Dentre as diversas maneiras de se classificar proteínas, a que se destaca no âmbito deste trabalho de conclusão de curso é a classificação quanto à solubilidade, pois é desta metodologia que surge a classe das albuminas. Esta classe é formada por proteínas solúveis em água e em soluções salinas pouco concentradas e que também são sensíveis ao calor, causando a sua desnaturação.

A Tabela 2 resume as principais características de cada classe de proteínas, sendo elas: albuminas, globulinas, glutelinas, prolaminas, protaminas e escleroproteínas.

Tabela 2. Classificação de proteínas quanto à solubilidade

Classe	Características importantes
Albuminas	Solúveis em água e em soluções salinas diluídas, coaguláveis pelo calor e ricas em aminoácidos essenciais, particularmente lisina.
Globulinas	Insolúveis em água e solúveis em solução fracamente salina, coaguláveis pelo calor.
Glutelinas	Solúveis em soluções ácidas e alcalinas diluídas, não coaguláveis pelo calor. São ricas em aminoácidos essenciais.
Prolaminas	Solúveis quase exclusivamente em álcool a 70%. São extremamente pobres em lisina e triptofano.
Protaminas	Proteínas de baixo peso molecular, solúveis em água, não coaguláveis pelo calor.
Escleroproteínas	Insolúveis em água, soluções ácidas e básicas diluídas. São proteínas estruturais.

Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2008)

A proteína em estudo faz parte das classes das albuminas e das proteínas de transporte, sendo denominada soroalbumina humana, ou albumina de soro humano, ou ainda HSA, sigla em inglês para *Human Serum Albumin*.

1.1. Soroalbumina humana

A soroalbumina humana (HSA) é sintetizada à taxa de 150 – 250 mg/kg_{PC} pelos hepatócitos, células localizadas no fígado, e seguem para o plasma sanguíneo, onde permanecem ativas de 18 a 21 dias, em condições fisiológicas (Falcão et al., 2011). Ela é a

proteína mais abundante do plasma sanguíneo, podendo representar até 60% do total de proteínas plasmáticas. A HSA tem as vitais funções de manutenção da pressão osmótica sanguínea, manutenção do pH e de transporte de moléculas, tais como vitaminas, enzimas, íons metálicos, hormônios e demais substâncias (Taguchi et al. 2012 e Matejtschuk et al., 2000). Dentre os exemplos de moléculas transportadas pela soroalbumina, temos os hormônios produzidos pela tireoide, hormônios lipossolúveis, ácidos graxos livres e bilirrubina não-conjugada. Também segundo Taguchi et al. (2012), devido às funções supracitadas, a HSA é uma proteína de alta importância para tratamentos de queimaduras, perda de sangue e formulação de novos medicamentos, aquecendo ainda mais a indústria de biotecnologia.

A molécula de HSA é uma proteína de cadeia única relativamente pequena, com cerca de 600 resíduos de aminoácidos e massa molecular, que difere entre autores, girando em torno de 66.000-69.000 Da (Nurdiansyah et al., 2016, Taguchi et al., 2012 e Matejtschuk et al., 2000). Diferentemente de outras proteínas encontradas no plasma sanguíneo, a HSA não é glicosilada, ou seja, não há o acréscimo de monômeros de açúcar à estrutura da soroalbumina.

Ainda em relação às características estruturais da molécula de HSA, investigações foram realizadas a fim de se determinar o grau de conservação entre aminoácidos presentes na proteína de soroalbumina em diferentes espécies animais. As análises apresentadas na Tabela 3 demonstram o alto grau de conservação entre aminoácidos presentes na proteína de HSA e soroalbumina originárias de orangotangos, bovinos e ratos.

Tabela 3. Similaridade entre sequência de soroalbuminas em diferentes espécies

Conservação da sequência de aminoácidos da HSA em diferentes espécies			
Espécies	% Conservação	MM (Da)	Fonte
<i>Homo sapiens</i> (Homem)	100%	69.367	Nurdiansyah et al., 2016
<i>Pongo abelli</i> (Orangotango)	99%	69.480	
<i>Bos taurus</i> (Gado)	77%	66.463	Ge et al., 1998
<i>Mus musculus</i> (Rato)	72%	65.858	Ohtani et al., 1997
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Coelho)	45%	-	Decker, 2000
<i>Gallus gallus</i> (Galinha)	47%	69.918	Nurdiansyah et al., 2016
<i>Naja naja</i> (Cobra)	32%	69.799	
<i>Xenopus laevis</i> (Sapo)	38%	70.500	
<i>Salmo salar</i> (Peixe)	28%	67.151	
<i>Petromyzon marinus</i> (Lampreia)	15%	159.094	

A conservação da sequência de aminoácidos da HSA é altamente benéfica para os estudos científicos relacionados a esta proteína. A similaridade entre proteínas permite que se utilize sistemas de produção de soroalbuminas de ratos ou bovinos, MSA e BSA, respectivamente, quando a produção de HSA esbarra em questões de biossegurança e bioética em relação à clonagem de proteínas humanas, por exemplo.

Como já mencionado na Tabela 1, a soroalbumina faz parte de uma classe de proteínas altamente solúveis em água e em soluções salinas pouco concentradas e que também são desnaturáveis na presença de calor. A Figura 1 evidencia tanto a estrutura terciária quanto o modelo de preenchimento de espaço da molécula de albumina de soro humano.

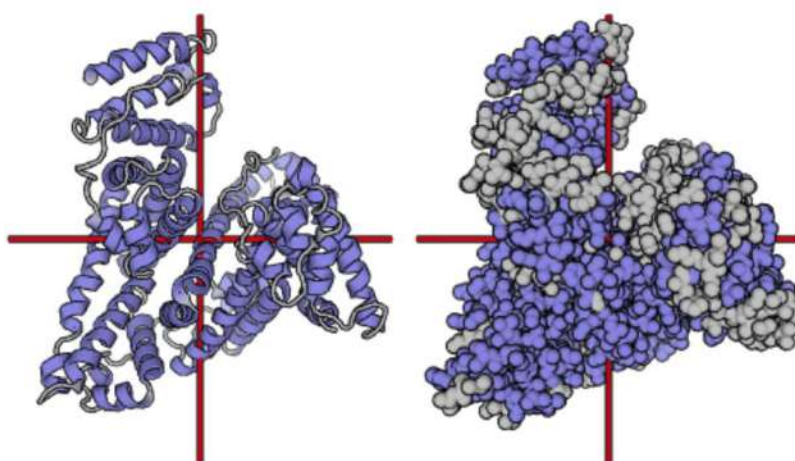


Figura 1. Estruturas terciária e de preenchimento de espaço da HSA, coloridas por estrutura secundária

Fonte: Modelagem 3D via RSCB *Protein Data Bank* e Bhattacharya et al. (2000)

Através da Figura 1, pode-se observar que a HSA apresenta uma estrutura globular, característica esta que a confere uma alta solubilidade em água. O modelo da estrutura também evidencia as inúmeras estruturas nomeadas alfa-hélices presentes na molécula de HSA.

A solubilidade em água da soroalbumina humana é otimizada pela ligação de moléculas de água à superfície da molécula da proteína devido a associação de grupos carregados e polares. O estudo realizado por Van Oss e Good (1988) observou que a albumina de soro humano possui duas camadas de água ao seu redor. Na camada próxima à HSA, as moléculas de água são quase totalmente orientadas, com os átomos de hidrogênio voltados para a superfície da albumina, enquanto os átomos de oxigênio ficam afastados da superfície da proteína. Na segunda camada de moléculas de água, a maioria das moléculas de água (70%) não são orientadas. Estas camadas de hidratação promovem a solubilidade da soroalbumina humana, mantendo uma distância entre as superfícies das moléculas de HSA. Esse fenômeno é exemplificado na Figura 2:

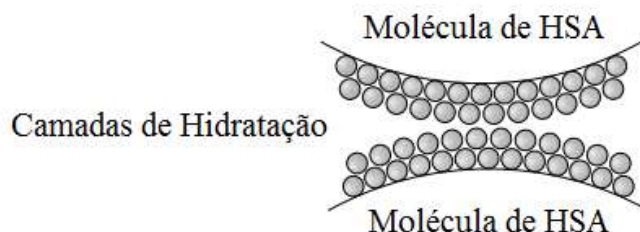


Figura 2. Diagrama esquemático do limite de aproximação de moléculas de HSA

Fonte: Adaptado de Van Oss e Good (1988)

Além de todas as características supracitadas, segundo Taguchi et al. (2012) e Quinlan et al. (2004), a HSA apresenta propriedades antioxidantes, devido a presença de:

- Radical cisteína-34 (vide Figura 3), que se liga a moléculas de óxido nítrico (NO). O radical cisteína-34 apresenta um grupo tiol, contendo o radical sulfidrílico (-SH). A HSA é responsável por 80% dos radicais tiol na circulação sanguínea;

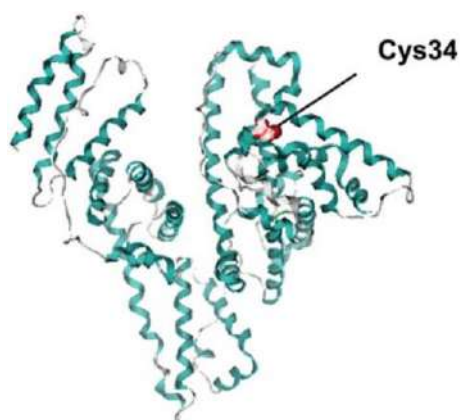


Figura 3. Estrutura da HSA e a localização do radical cisteína-34 (Cys34)

Fonte: Taguchi et al. (2012)

- Sítios de ligação de alta afinidade e de baixa especificidade, que se ligam a bilirrubina e radical heme;
- Radical N-terminal, que se liga aos elementos Cobre, Crômio e Níquel.

1.2. Aplicações e demanda de HSA

A albumina humana é um medicamento com um vasto histórico clínico e é utilizada há mais de 50 anos em diferentes contextos (Matejtschuk et al., 2000). Esta proteína, já em solução coloidal, é vastamente usada em pacientes graves como reposição volêmica, durante traumas, cirurgias e perda de sangue, e sua fundamentação teórica é baseada em dois aspectos; o primeiro

é seu papel na recuperação de pressão osmótica plasmática, contribuindo na manutenção do volume intravascular. Já o segundo aspecto está associado aos níveis séricos de albumina, que é um marcador de gravidade do estado do enfermo. Quanto menor seu nível sérico, maior é a gravidade do caso (Falcão et al., 2011).

No Brasil, a HSA é mais reconhecida por seus nomes comerciais, sendo o mais conhecido deles o Albumax. Outros nomes comerciais para a HSA incluem *Albuminar*, *Blaubimax*, *Beribumi* ou *Plasbumin 20*, por exemplo. No entanto, a soroalbumina não pode ser comprada nas farmácias convencionais, sendo administrada apenas em hospitais por indicação médica. As aplicações de tratamentos via soroalbumina estão esquematizadas na Figura 4:



Figura 4. Efeitos fisiológicos da soroalbumina

Fonte: Adaptado de Falcão et al. (2011)

Segundo Sumi et al. (1999), Matejtschuk et al. (2000) e He et al. (2011), nas últimas décadas, a soroalbumina vem sendo utilizada em maiores volumes do que qualquer outra solução biofarmacêutica disponível, e sua fabricação em todo o mundo é da ordem de centenas de toneladas por ano, gerando valores de 1 a 2 bilhões de dólares.

De acordo com as estatísticas publicadas pela *Food and Drug Organization* do Ministério da Saúde dos EUA, US\$ 21.600.000 foram gastos nos primeiros 9 meses do ano de 2008 com a compra de frascos de albumina humana. Este foi o maior custo para um único fármaco utilizado em hospitais norte-americanos registrado naquele ano. Paralelamente, Boldt (2010) afirma que os custos com HSA podem corresponder de 10 a 20% dos custos totais de fármacos em uma unidade de tratamento intensivo (UTI). A Figura 5 ilustra o crescimento do mercado de soroalbumina entre o período de 1984 até 2014:

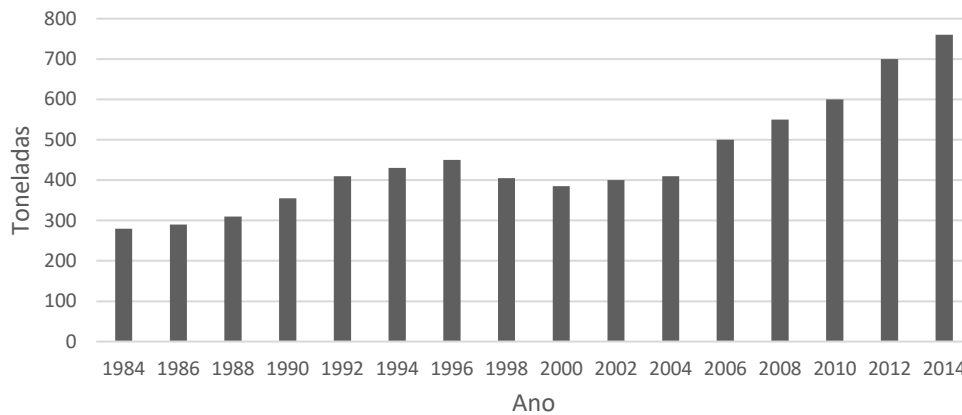


Figura 5. Mercado (em toneladas) da HSA ao longo de 20 anos

Fonte: Dados da *International Plasma Fractionation Association*

A estrutura do mercado farmacêutico mundial pode ser vista como grandes oligopólios, dada a presença de multinacionais de grande porte que influenciam o comportamento do setor. Em nível nacional, a presença de empresas menores não muda as características estruturais do setor farmacêutico. Elas, como no caso do Brasil, reagem às decisões das empresas maiores (Fardelone e Branchi, 2006).

Ainda segundo Fardelone e Branchi (2006) e Gadelha et al. (2003), as empresas que lideram este setor são de grande porte e atuam de forma globalizada. Normalmente são empresas sediadas nos EUA e na União Europeia, onde os processos de fusão e incorporação já vêm sendo realizados desde os anos de 1980, buscando a hegemonia em seus segmentos para reforçar suas posições frente ao mercado consumidor.

A empresa especializada em pesquisa de mercado *Transparency* argumenta que o mercado global de albumina pode ser segmentado em quatro diferentes setores: Europa, América do Norte, Ásia-Pacífico e o resto do mundo. A América do Norte, entre os demais setores, domina o mercado, impulsionada em grande parte pelos EUA. As razões para a posição de liderança do mercado norte-americano, como já mencionado, é a robusta presença da indústria farmacêutica.

Europa e Ásia-Pacífico também contribuem consideravelmente para o mercado global de HSA, sendo que a China é o principal mercado para a soroalbumina na região asiática. O progresso tecnológico de formulação de medicamentos e o maior acesso às tecnologias oferecem uma oportunidade aos investidores de países cujas economias estão em desenvolvimento, principalmente na região Ásia-Pacífico, segundo relatório da *Transparency Market Research*.

Segundo a FEBRAFAR, Federação Brasileira das Redes Associativistas e Independentes de Farmácias, é possível constatar o aumento da importância relativa dos países

emergentes quando se compara a distribuição dos mercados de fármacos ao longo do tempo. Em 2006, os EUA respondiam por 41% do mercado mundial, os principais mercados da Europa, por 19%, enquanto os emergentes eram responsáveis por 14% da receita global. Já em 2011, o mercado americano passou a representar 34%, os europeus, 17% e os emergentes, 20%.

A previsão para 2016/2017 é que o mercado americano será 31% do total, os cinco principais mercados europeus, 13%, e os mercados emergentes serão 30% do mercado global, segundo consultor da FEBRAFAR.

A Figura 6 ilustra a distribuição, entre os períodos de 2015 e 2016, do volume consumido (em toneladas) de HSA, utilizando-se a supracitada metodologia de divisão de mercado proposta pela empresa *Transparency*.



Figura 6. Distribuição do mercado mundial de soroalbumina - 2015/2016

Fonte: Dados da *Transparency Market Research*

Em termos de produção nacional, a plataforma AliceWeb reporta que no ano de 2016, a balança comercial brasileira apresentou um déficit de cerca de 1,6 bilhão de reais em relação a exportação/importação de anti-soros, outras frações do sangue e produtos imunológicos modificados, mesmo obtidos por via biotecnológica. É também importante frisar que as exportações destes produtos geram apenas 8 milhões de reais como fator positivo para a balança comercial brasileira, evidenciando que a produção nacional é de baixíssima expressão.

1.3. Métodos tradicionais de obtenção de HSA

Devido a sua importância clínica, baixa disponibilidade e altos custos, é de suma importância o entendimento e desenvolvimento de metodologias para a produção de HSA de forma a atender à crescente demanda por este fármaco.

Atualmente, o principal método utilizado para obter a HSA é o fracionamento por etanol a frio a partir de amostras de sangue obtidos via doação. A soroalbumina produzida por

este método é conhecida como HSA plasmática (pHSA). O processo é limitado pela quantidade de sangue doado, que é especialmente baixa em países em desenvolvimento, como China e Brasil.

A fim de evitar o uso de sangue como fonte de HSA e mitigar alguns dos riscos associados a este procedimento, métodos alternativos para produzir a soroalbumina humana estão sendo explorados. A HSA recombinante (rHSA) surge como uma alternativa à pHSA. A rHSA pode ser desenvolvida e expressa como uma forma alternativa de soroalbumina em sistemas de expressão biológicos tais como bactérias, leveduras, plantas transgênicas e animais transgênicos (Chen et al., 2013).

Um dos questionamentos cruciais para os novos métodos de produção de HSA é se a produção em grande escala de rHSA pode ser mais econômica do que o fracionamento de plasma sanguíneo humano a frio, que produz a pHSA. Para alcançar tal objetivo, há a necessidade de se atingir elevados níveis de expressão da proteína recombinante, com o uso de meios de cultura acessíveis e processamentos de downstream, como a separação e purificação da proteína, eficientes e baratos (Heinzle et al., 2006).

1.3.1. Soroalbumina humana plasmática (pHSA)

Atualmente, a soroalbumina é majoritariamente obtida pela extração de plasma humano através do fracionamento por etanol a frio, procedimento baseado no método de Cohn, originado em 1946. Esse método é usualmente combinado com técnicas de purificação, como etapas de cromatografia, por exemplo (Burnouf, 1995).

O princípio do método de Cohn baseia-se na precipitação das proteínas plasmáticas pela combinação de diferentes concentrações de etanol à baixa temperatura, a partir de ajustes de pH e constante dielétrica, para precipitação seletiva das diferentes proteínas desejadas (More e Harvey, 1991).

As baixas temperaturas utilizadas, sempre menores que 0° C, são uma proteção contra o fenômeno não desejado da desnaturação de proteínas do plasma humano, que pode ocorrer devido a presença de solventes orgânicos no meio, como no caso do etanol (Harrison et al., 2003).

O princípio do método utilizado parece simples, porém, em termos práticos, obter a soroalbumina plasmática se torna um processo muito mais complexo. Como fase inicial, há a adição de pequenas quantidades de etanol a frio, removendo fibrinogênio do plasma sanguíneo como o crio-precipitado. A fase crio-sobrenadante segue para a remoção de substâncias específicas, tais como antitrombinas, proteínas C, proteínas S e fator IX complexo, que

compõem a fração I. Subsequentemente, aumentando-se a concentração de etanol no sobrenadante I para 25% a pH 6,9, as imunoglobulinas são precipitadas (fração II+III) enquanto a albumina permanece em solução (sobrenadante II+III). A albumina é então isolada da maioria dos outros contaminantes de plasma, principalmente as globulinas α e β , que são precipitadas pela adição de etanol a uma concentração final de 40%. Isto é realizado em dois estágios no processo de Cohn, gerando as frações IV-1 e IV-4. Numa etapa final, a soroalbumina presente no sobrenadante IV-4 é precipitada perto do seu ponto isoelétrico, gerando a fração V (Matejschuk et al., 2000).

A Figura 7 ilustra de forma geral os passos envolvidos na obtenção da pHSA a partir do plasma humano. Em adição, a Figura A, no capítulo de apêndices, apresenta os passos envolvidos para a obtenção de HSA e também de outros produtos gerados a partir do plasma humano, com seus respectivos parâmetros, como concentração de etanol, concentração de proteína, força iônica, temperatura e pH.

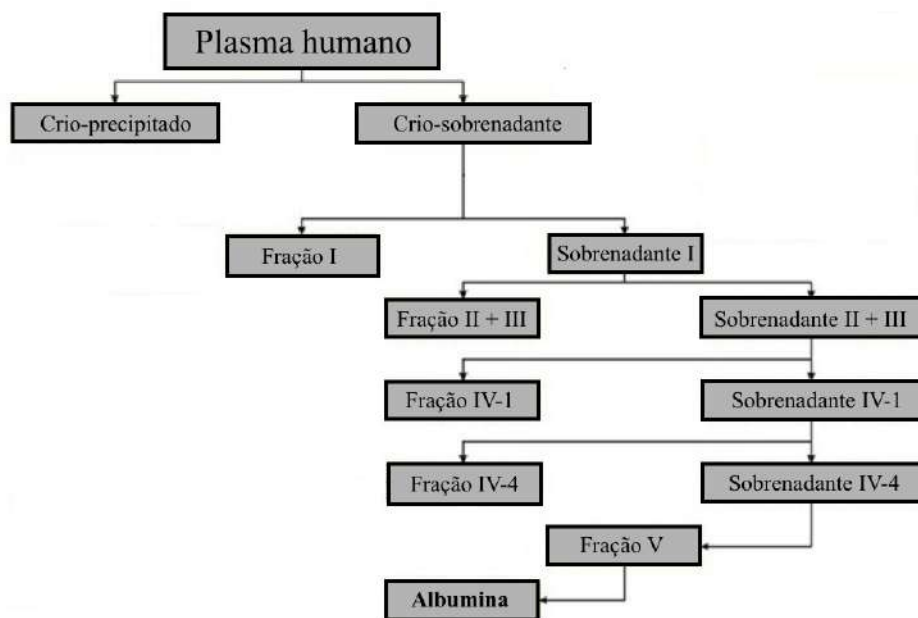


Figura 7. Processo Cohn de fracionamento do plasma humano

Fonte: Adaptado de Balajthy et al. (2011)

É válido salientar que neste processo, após a precipitação seletiva das proteínas, as frações obtidas (I a V, como ilustrado na Figura 7) são geralmente separadas do sobrenadante via centrifugação.

Em adição aos passos listados na Figura 7, Boldt (2010) relata os cuidados a serem tomados após a obtenção da pHSA na fração V. Para a inativação de patógenos, a pHSA deve ser pasteurizada por pelo menos 10 horas à temperatura de 60°C. Com base nesta etapa de inativação dos agentes patogênicos envolvidos, considera-se que as preparações de albumina não apresentam qualquer risco de transmissão de infecções. Adicionam-se até 3,2 g/L de

octanoato de sódio e 4,29 g/L de acetiltriptofano como agentes estabilizadores. As soluções de pHSA são então dissolvidas em solução salina contendo 154 mmol/litro de cloreto de sódio.

Tal método tem a vantagem de produzir soluções de pHSA livres de isoaglutininas ou substâncias características dos diferentes grupos sanguíneos e por isso, podem assim ser administradas independentemente do grupo sanguíneo do receptor.

No entanto, o método de obtenção de pHSA possui algumas desvantagens além da complexidade intrínseca ao método. A primeira desvantagem está relacionada ao fato de se utilizar plasma sanguíneo de terceiros. Esse procedimento aumenta os riscos de alastramento de doenças transmissíveis pelo sangue, como hepatite e HIV, por exemplo (Chen et al., 2013 e He et al., 2011).

De fato, Zhang et al. (2006) relatam que a coleta ilegal e o manejo incorreto de plasma sanguíneo fizeram com que o HIV se espalhasse rapidamente, criando o que são conhecidas como aldeias de HIV na Província de Henan, localizada na China.

Para eliminar o risco potencial de contaminação viral, as agências reguladoras de todo o mundo hoje incentivam as empresas farmacêuticas a usar fontes não derivadas de animais para a produção farmacêutica, de acordo com Merten (2006).

Uma segunda desvantagem do método de fracionamento por etanol a frio é a total dependência de fornecimento e estoques de plasma sanguíneo, em grandes quantidades (Chen et al., 2013 e Dong et al., 2012). Em diversos momentos da história, foram relatados que a escassez de plasma humano levou a um rápido aumento no preço da pHSA.

He et al. (2011) argumentam que o desenvolvimento de um método de baixo custo para a produção de HSA recombinante é essencial como uma alternativa mais segura e potencialmente ilimitada à pHSA. Os riscos de contaminação e o fornecimento incerto de plasma sanguíneo alavancam o desenvolvimento de bioprocessos voltados para a produção de HSA recombinante.

1.3.2. Soroalbumina humana recombinante (rHSA)

Como o mercado de HSA comercial aumenta continuamente em todo o mundo, HSA recombinante (rHSA) oferece uma maneira altamente atrativa para atender a demanda atual e futura, evitando os riscos atrelados à produção de pHSA.

As propriedades físico-químicas e imunoquímicas da rHSA foram previamente analisadas (Ohtani et al., 1998 e Bosse et al., 2005) e são consideradas totalmente compatíveis em termos de segurança, eficácia e tolerabilidade às características da HSA plasmática.

Durante os últimos anos, diversos sistemas de expressão foram estudados e utilizados para a produção de HSA recombinante, incluindo *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, animais transgênicos e plantas transgênicas. As leveduras são consideradas sistemas de expressão tradicionais (Chuang e Otagiri, 2007) e entre as diferentes espécies de plantas transgênicas para expressão da rHSA, a semente de arroz apresenta grande potencial, devido ao seu baixo custo de produção e alta disponibilidade (Huang et al., 2007).

Atualmente, o uso de microrganismos para a produção de HSA recombinante é preferível ao uso de animais e plantas transgênicas, por exemplo. Essa tendência é explicada pela preocupação da sociedade frente aos maus tratos aos animais e também a produção de alimentos geneticamente modificados.

Segundo a empresa especializada em pesquisa de mercado *Transparency*, há uma crescente preocupação ética em torno da rHSA extraída de fetos bovinos, procedimento este visto como uma técnica bastante cruel, além de produzir uma HSA recombinante com alto teor de impurezas, necessitando de maior atenção durante os processos de separação e purificação.

Já em relação as plantas transgênicas, como o uso de sementes de arroz para a expressão de rHSA, a principal preocupação é a disseminação não intencional do gene modificado na cadeia alimentar. Segundo Fox (2003), embora ao longo da história tenham sido tomadas medidas de contenção destes genes modificados, tais como zonas de isolamento, ainda assim ocorreram incidentes de escape transgênico.

Outro fator de alerta para a utilização de plantas transgênicas na cadeia de obtenção de soroalbumina está relacionado à alta dosagem de HSA necessária em aplicações clínicas. A produção em larga escala de rHSA requereria a utilização de vastos campos de arroz transgênico, gerando preocupações ambientais correlacionadas a disseminação da mutação, além de gerar uma possível competição de cultivos entre mercados farmacêutico e alimentício (He et al., 2011).

O conceito de se produzir rHSA em microrganismos como sistemas de expressão se baseia no consumo de fontes de carbono e outros elementos do meio de cultura, que são convertidos em biomassa celular, subprodutos e HSA recombinante (Harrison et al., 2003).

Ao se utilizar sistemas de expressão, tipicamente, o microrganismo é transfectado com um plasmídeo, de DNA circular, que contém uma sequência promotora altamente eficiente que corrobora em elevados níveis de expressão da proteína almejada (Harrison et al., 2003).

A expressão de proteínas recombinantes pode ser moldada de acordo com a necessidade, ou ainda realizada de forma contínua. Este controle é determinado por sequências

de DNA que antecedem os genes de interesse, os chamados promotores. Esses promotores indicam para a célula a partir de que ponto a expressão da proteína deve ser realizada, além de indicar a quantidade a ser produzida. As proteínas podem ser expressas de maneira constitutiva, ou seja, produzida continuamente, ou induzida, que corrobora para uma produção intermitente e dependente da presença de um indutor. A principal diferença entre estes tipos de promotores, constitutivo ou induzível, é que o promotor constitutivo mantém, de forma constante, a expressão da proteína de interesse ao longo do crescimento celular, enquanto o promotor induzível necessita que um indutor seja adicionado ao meio de cultura, tal como uma substância química, hormônio, mudança de temperatura ou mudança de pH (Santos e Resende, 2015).

A tecnologia do DNA recombinante possibilita a produção de rHSA em grandes quantidades em diferentes sistemas de expressão, através dos promotores. O entendimento do dogma central da biologia molecular é essencial para a produção de proteínas recombinantes, uma vez que a produção de rHSA compreende os três processos principais que a célula utiliza para que a informação genética seja expressa: replicação, transcrição e tradução (Miyamoto, 2013). De maneira geral, esses são os passos necessários para decifrar a mensagem genética presente no DNA e expressá-la na forma de proteína.

Como já mencionado, o ceticismo ronda a produção de rHSA devido à constante busca por elevados níveis de expressão da rHSA, utilizando-se a menor quantidade de recursos possível ao longo do bioprocessamento, tanto em termos de meio de cultura e biorreatores, quanto em termos de processos de separação e purificação. Apesar disso, investimentos nesta tecnologia já não são mais apenas especulação. Como exemplo, duas plantas industriais, cada uma com uma capacidade anual de 12,5 toneladas, foram construídas no Japão e utilizam as leveduras *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae* como sistemas de expressão. A primeira destas plantas foi anunciada pela Mitsubishi Pharma Corporation, hoje Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, ao fim da década de 90. Já a segunda planta é propriedade da Kaketsuken e teve seus pedidos de licença de funcionamento depositados em 2005 (Ilgen et al., 2005). Hoje ambas as empresas possuem a rHSA em seus catálogos de produtos, porém passam por problemas envolvendo acusações de corrupção e fraudes de testes de seus medicamentos, de acordo com o The Japan Times.

Este trabalho tange a produção de rHSA utilizando a levedura *Pichia pastoris* como sistema de expressão. Assim, o tópico a seguir especifica o método atual de produção de HSA recombinante, além de introduzir *Pichia pastoris*, uma levedura vastamente utilizada na expressão da soroalbumina humana recombinante.

Capítulo 2. Justificativa do estudo

2.1. *Pichia pastoris* e a produção de HSA recombinante

Atualmente, HSA recombinante é majoritariamente produzida em *Pichia pastoris* (Figura 8), através da utilização de metanol como indutor do promotor induzível AOX (álcool oxidase) presente neste microrganismo (Chen et al., 2013).

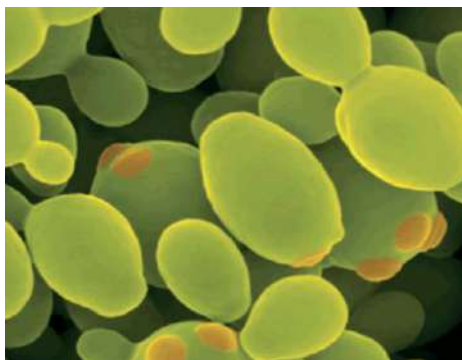


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura da *P. pastoris* (aumento de 1600x)

Fonte: Dennis Kunkel Microscopy, Inc. (2011)

Pichia pastoris é uma espécie de levedura comumente usada para expressar proteínas, em especial para a produção de rHSA. As leveduras são pequenos organismos unicelulares eucarióticos, que podem crescer como células individualizadas ou agrupadas. Elas são bem caracterizadas e vastamente utilizadas em escala industrial. Em adição, comparado a outros sistemas baseados em eucariotos superiores, como as culturas de células de mamíferos, este sistema é considerado de uso rápido, fácil e mais econômico (Gellissen, 2000).

Em termos de aplicação de leveduras na indústria, além de serem utilizadas para a produção de proteínas recombinantes, elas são tradicionalmente usadas para produção de álcool em fermentações anaeróbias, panificação e extrato de levedura, como aditivo alimentar.

Em relação à taxonomia, *Pichia pastoris* pertence ao Reino *Fungi*, Divisão *Eumycota*, Subdivisão *Ascomycotina*, Classe *Hemoascomycetes*, Ordem *Endomycetales*, Família *Saccharomycetaceae*, Subfamília *Saccharomycetoideae*. É importante também comentar que, recentemente, a levedura *P. pastoris* passou por reclassificações e atualmente pertence a um novo gênero denominado *Komagataella*. Porém, a nomenclatura *Pichia pastoris* ainda é a mais difundida e utilizada no meio acadêmico e industrial, frente à *Komagataella pastoris* (Kurtzman, 2009).

Pichia pastoris possui uma taxa específica de crescimento (μ) superior à taxa de crescimento de células de mamíferos, cerca de 0,15-0,18 h⁻¹ (tempo de duplicação de 4,6 horas)

contra $0,02 \text{ h}^{-1}$ (tempo de duplicação de 29 horas), taxa específica de crescimento de células estaminais cardíacas (Jahic et al., 2012 e Bearzi et al., 2007). Além de possuírem um crescimento de maior rapidez, as células da levedura em questão são menos sensíveis às alterações nutricionais e ambientais, tais como temperatura e pH, quando comparadas a células de mamíferos.

Outra vantagem da utilização desta espécie de levedura está relacionada às altas densidades celulares obtidas durante seu cultivo (aproximadamente 130 g/L) e, conseqüentemente, à obtenção de níveis superiores das proteínas expressas (Cregg e Cereguino, 2000). A Figura 9 ilustra a alta densidade celular do cultivo de células de *Pichia pastoris*, que pode ser até dez vezes maior do que a de culturas de *Saccharomyces cerevisiae*.

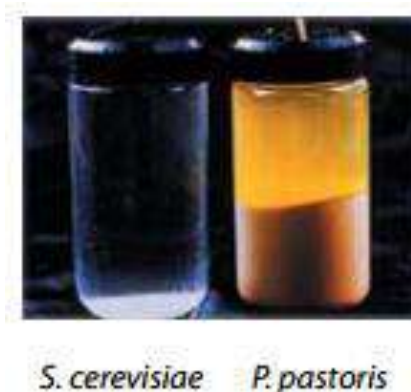


Figura 9. Alta densidade celular de cultura de *P. pastoris*

Fonte: pGAPZ α *Pichia pastoris* Expression Vectors – Thermo Fisher Scientific

Segundo Silva (2010) e Hollenberg e Gellissen (1997), um número restrito de espécies pertencentes aos gêneros *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis* e *Pichia* são capazes de utilizar metanol como fonte única de carbono. *Pichia pastoris* é uma destas espécies, sendo então uma levedura metilotrófica. Nessa espécie de levedura, o metanol é oxidado pela ação de álcool oxidases, em organelas celulares denominadas peroxissomos, originando formaldeído (HCHO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é em seguida decomposto em oxigênio molecular (O) e água (H_2O) por ação de catalases. O formaldeído é então utilizado tanto na rota catabólica, para a obtenção de energia, quanto na rota anabólica, para obtenção de biomassa (Silva, 2010).

Na rota catabólica, o formaldeído finalmente deixa o peroxissomo, sendo oxidado por enzimas denominadas desidrogenases localizadas no citoplasma, formando então o dióxido de carbono (CO_2). Estas reações são responsáveis pela fonte de energia das células de *Pichia pastoris* quando crescem exclusivamente em metanol.

Já na rota anabólica, o formaldeído restante é assimilado para formar constituintes celulares, obtendo-se assim, biomassa. Trata-se de uma rota cíclica que se inicia com a condensação do formaldeído com xilulose-5-monofosfato, reação esta catalisada por uma outra

enzima localizada no peroxissomo, a diidroxiacetona sintase (DHAS). Os produtos dessa reação, gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona, saem do peroxissomo e regeneram, em três etapas, a xilulose-5-monofosfato (Soares, 2011).

A rota do metanol nas células de *Pichia pastoris* é resumidamente elucidada na Figura 10, onde a numeração corresponde a diferentes enzimas envolvidas nas respectivas etapas.

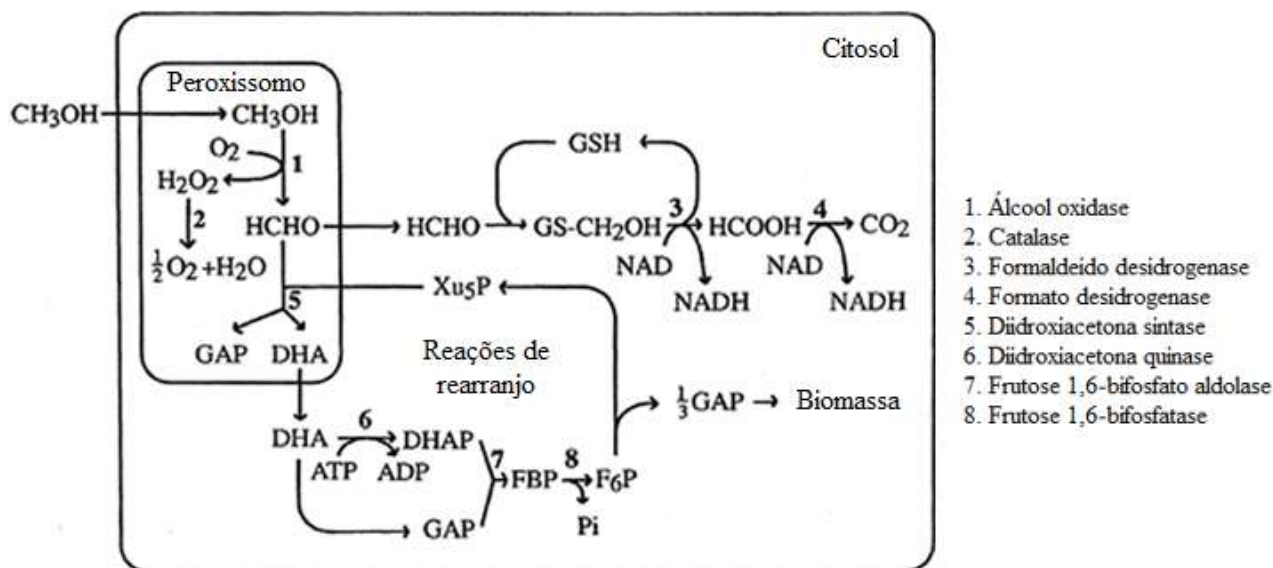


Figura 10. Rota metabólica do metanol em *Pichia pastoris*

Fonte: Adaptado de Cregg e Cereguino (2000)

Na levedura em questão, as enzimas álcool oxidases (AOX) são codificadas por dois genes bastante estudados e conhecidos, gerando a AOX1 (álcool oxidase 1) e a AOX2 (álcool oxidase 2). A enzima AOX1 possui a mesma atividade específica que a AOX2, porém seu nível de expressão é muito mais elevado, devido ao seu promotor ser mais forte. Segundo Cregg e Cereguino (2000), AOX1 é responsável por cerca de 85% da atividade de álcool-oxidase nas células da *Pichia pastoris*.

As enzimas AOX têm baixa afinidade por O_2 e as leveduras metilotróficas, como no caso de *Pichia pastoris*, compensam esta deficiência sintetizando grandes quantidades desta enzima (Cregg e Cereguino, 2000 e Jahic, 2003). Os promotores destes genes são estritamente controlados pela fonte de carbono (metanol) presente no meio de cultura. Isto possibilita o controle preciso da expressão da proteína de interesse, no caso, a rHSA. De forma geral, o controle preciso do promotor induzível da expressão enzima AOX1, conhecido também como P_{AOX1} , faz com este seja o promotor induzível mais utilizado para expressão de proteínas recombinantes atualmente (Lünsdorf et al., 2011).

Das enzimas da rota do metanol, apresentada na Figura 10, as enzimas álcool oxidases (AOX) estão presentes em altos níveis no crescimento celular em metanol, mas não são

detectáveis em células da levedura crescendo em outras fontes de carbono, como glicose, glicerol ou etanol, por exemplo. Isso se deve ao fato do promotor do gene AOX1 (P_{AOX1}) ser fortemente reprimido quando as células crescem em outras fontes de carbono que não o metanol. Ou seja, a presença de metanol como fonte de carbono é essencial para a indução de altos níveis de expressão quando se utiliza o P_{AOX1} para tal (Tschopp et al., 1987 e Coudec e Baratti, 1980).

A fim de se utilizar tal promotor P_{AOX1} para a expressão de HSA recombinante, é necessário transformar a levedura a fim de inserir as informações necessárias para a produção da proteína de interesse. Segundo Soares (2011) e Sreekrishna et al. (1997), o método de transformação mais utilizado em *P. pastoris* é o de integração de cromossomos. Este método oferece vantagens frente a outros meios de transformação, como: estabilidade da informação inserida e a consequente expressão, maior controle do sítio de integração e a capacidade de construir variados modos de integração (Sreekrishna et al. 1997).

A expressão de qualquer gene inserido na levedura *P. pastoris* requer três passos básicos: a inserção do gene de interesse num vetor de expressão, a introdução do vetor de expressão no genoma da *P. pastoris* e, finalmente, a análise e seleção das leveduras transformantes. Segundo Silva (2010), os vetores de expressão em leveduras, que são veículos de clonagem que permitem que os fragmentos de DNA de interesse sejam introduzidos e replicados na célula, são usualmente compostos por:

- Cassete de expressão – promotor constitutivo ou indutível, gene acoplado ou não a sequências sinalizadoras (com códons selvagens ou otimizados) e um fragmento de terminação de transcrição;
- Sequência de replicação por integração;
- Marcador de seleção (autotrofismo ou antibióticos, por exemplo, que selecionam as leveduras que sofreram a transformação com sucesso);
- Origem de replicação bacteriana e um marcador de seleção bacteriana, que facilitam o armazenamento e amplificação do vetor, geralmente de *E. coli*.

No caso específico da produção tradicional de rHSA via *Pichia pastoris*, os cassetes de expressão possuem o promotor indutível de gene AOX1 (P_{AOX1}), o gene sintético da proteína HSA com códons otimizados para a levedura *P. pastoris* e o fragmento de terminação da transcrição do gene AOX1. Na Figura 11 é possível observar um diagrama generalizado de um vetor de expressão utilizado na expressão de proteínas recombinantes em *Pichia pastoris*.

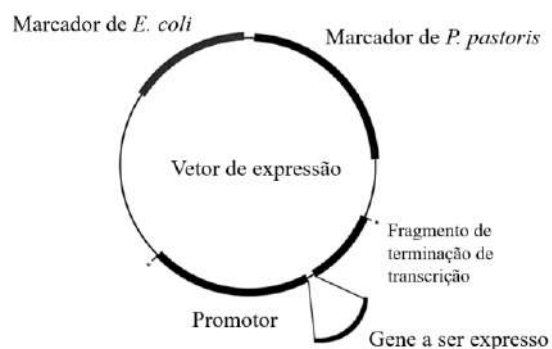


Figura 11. Diagrama genérico de um vetor de expressão utilizado em *P. pastoris*

Fonte: Adaptado de Cregg e Cereguino (2000)

Após a clonagem dos vetores de interesse, ocorrem a transformação da *Pichia pastoris*, seguida da manutenção deste DNA nas células hospedeiras. A seleção dos transformantes, ou seja, as células de *P. pastoris* que realmente obtiveram o gene para a expressão da rHSA, pode ser obtida através de marcas de seleção, baseadas em resistência a antibióticos, ou ainda, por auxotrofia, baseada na complementação nutricional de deficiências genéticas, focando na incapacidade da levedura não transformada de sintetizar algum composto necessário à sua sobrevivência (Dos Santos, 2012).

Ao fim, como uma vantagem adicional desta levedura, a expressão da HSA recombinante em *P. pastoris* pode se dar intracelularmente ou extracelularmente. Ao se excretar a rHSA, as etapas de separação e purificação são simplificadas, já que demais proteínas endógenas estarão em menor concentração no meio de cultura, que conterá majoritariamente a soroalbumina humana recombinante em sua composição proteica (Cregg e Cereguino, 2000). Para que a excreção da rHSA ocorra, é necessário a adição de uma sequência sinal que direcione a proteína para o meio extracelular. Ainda segundo Cregg e Cereguino (2000), ácido fosfatase (POH1) e o fator (α -MF) de *Saccharomyces cerevisiae* são os sinalizadores de excreção de maior sucesso e os mais utilizados nos vetores de expressão para *Pichia pastoris*.

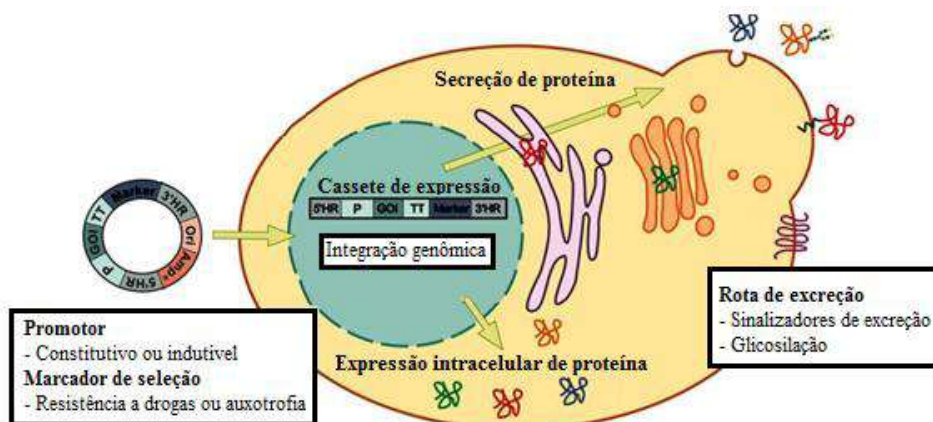


Figura 12. Expressão heteróloga intra ou extracelular de proteínas em *P. pastoris*

Fonte: Adaptado de Ahmad et al. (2014)

Ao fim do processo, a taxa de expressão de HSA recombinante em *Pichia pastoris* em meio rico em metanol via P_{AOX1} pode exceder 10 g/L, segundo Dong et al. (2012), Kobayashi (2000) e Chen et al. (2013).

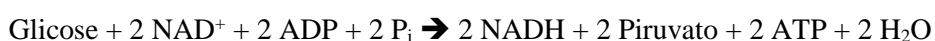
2.2. Obtendo rHSA via promotor constitutivo P_{GAP} em *Pichia pastoris*

Apesar dos promotores indutíveis permitirem um mecanismo de controle da expressão gênica, as aplicações práticas destes sistemas são limitadas pela heterogeneidade transcricional ao nível celular, pela toxicidade dos indutores e pelos efeitos pleiotrópicos mediados pelos indutores (Qin et al., 2011, Khlebnikov et al., 2000 e Siegele e Hu, 1997). Estas dificuldades evidenciam a necessidade de se aprofundar os estudos de sistemas de expressão baseados em promotores constitutivos, que asseguram a homogeneidade transcricional sem a presença de um indutor no sistema.

Buscando alternativas ao método de obtenção de rHSA a partir do promotor indutível AOX1, diversas pesquisas foram realizadas a fim de obter um processo constitutivo para a produção de soroalbumina recombinante, ou seja, produzindo-se rHSA de maneira contínua, sem a utilização de um indutor no bioprocessamento.

Como já mencionado, a indução do promotor AOX1 é feita através da presença de metanol. Esta substância, no entanto, é um material inflamável, tóxico e de dispendioso manuseio e estocagem em escala industrial. Como solução, a transformação de *Pichia pastoris* com um promotor constitutivo de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAP) elimina a necessidade de um passo de indução com metanol (Cereguino et al., 1999) e permite a utilização de um meio rico em glicose como fonte de carbono.

No metabolismo da levedura *Pichia pastoris*, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é uma enzima de suma importância durante a glicólise. A glicólise é uma sequência metabólica composta por dez reações catalisadas por enzimas livres no citosol, na qual a glicose é oxidada produzindo moléculas de piruvato, ATP e NADH, que serão introduzidos na cadeia respiratória ou na fermentação, dependendo do ambiente em que o organismo se encontra (Nelson e Cox, 2008). A equação e a rota globais da glicólise são apresentadas a seguir e na Figura 13, respectivamente.



Na primeira reação da glicólise, a glicose é fosforilada, com o gasto de uma molécula de ATP, formando uma molécula de glicose-6-fosfato e uma molécula de ADP. Essa reação é catalisada pela enzima hexoquinase e é irreversível sob condições fisiológicas, o que impede que a molécula de glicose deixe a célula após a sua entrada, na forma de glicose-6-fosfato. Ao adicionar o grupo fosfato à molécula de glicose, ela adquire uma carga negativa, o que torna impossível sua passagem, sem gasto de energia, pela membrana celular, mantendo-a no interior da célula (Figura 13).

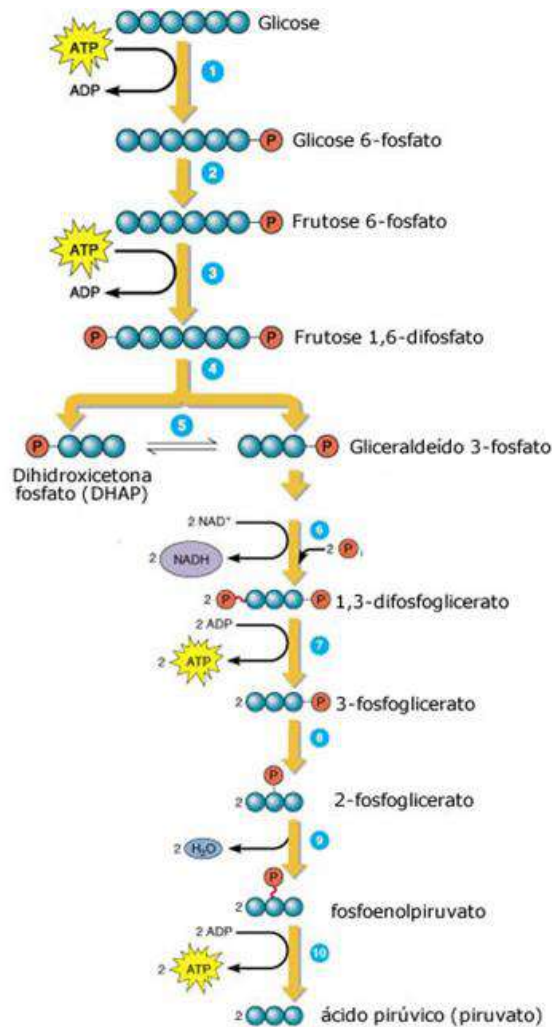


Figura 13. Rota global das reações que compõem a etapa da glicólise

Fonte: Adaptado de Benjamin Cummings (2001)

Na segunda reação, catalisada pela enzima glicosefosfato-isomerase, também denominada fosfoexose isomerase, a glicose-6-fosfato, uma aldose, é convertida via processo de isomerização reversível em frutose-6-fosfato, uma cetose. Essa reação é vista como uma preparação para as subsequentes duas reações.

Durante a terceira reação, há o gasto de outra de molécula de ATP para fosforilar a frutose-6-fosfato e convertê-la em frutose-1,6-disfosfato. Esta reação também é irreversível,

catalisada pela enzima fosfofrutoquinase. Após esta reação, a molécula se encontra simétrica para que ocorra uma etapa de clivagem na reação seguinte.

Já na quarta reação, temos a clivagem da frutose-1,6-difosfato e a formação de duas trioses, o gliceraldeído-3-fosfato e a dihidroxiacetona (ou diidroxiacetona) fosfato. A catálise é mediada pela enzima aldolase. A quinta reação está atrelada à isomeria entre o gliceraldeído-3-fosfato e a dihidroxiacetona fosfato. Estas trioses são facilmente conversíveis reversivelmente pela enzima triosefosfato isomerase.

Finalmente, entramos na sexta reação da glicólise. É nesta etapa que temos a gliceraldeído-3-fosfato hidrogenase como catalisador da reação. O gliceraldeído-3-fosfato é desidrogenado pelo NAD^+ (que é convertido a NADH) e fosforilado por um fosfato inorgânico, dando origem à molécula 1,3-difosfoglicerato.

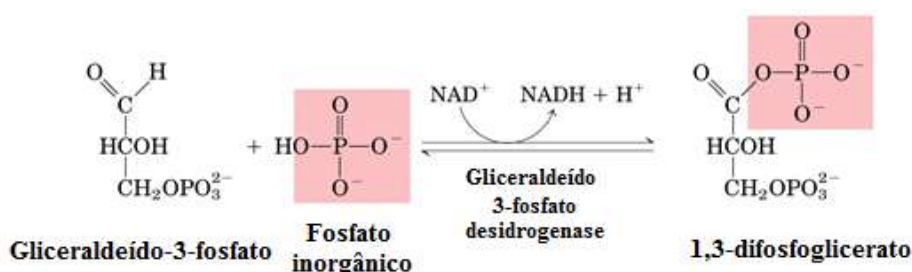


Figura 14. Desidrogenação do gliceraldeído-3-fosfato catalisada pela GAP

Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2008)

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é uma proteína homotetramérica, ou seja, formada por quatro meros idênticos, com 333 resíduos de aminoácidos, peso molecular de 35,4 kDa e, como já mencionado, é expressa constitutivamente sob o controle do seu promotor P_{GAP} (Waterham et al., 1997).

As reações subsequentes à ação da enzima gliceraldeído-3-fosfato consistem em:

- Reação 7: Formação de 3-fosfoglicerato a partir de 1,3-difosfoglicerato, catalisada por 1,3-BiP glicerato cinase. ADP recebe o grupo fosfato, dando origem a uma molécula de ATP;
- Reação 8: Formação do 2-fosfoglicerato a partir do 3-fosfoglicerato, catalisada por fosfogliceromutase;
- Reação 9: Formação de uma molécula de água e uma de fosfoenolpiruvato (PEP), através da desidratação da molécula 2-fosfoglicerato, catalisada pela enzima enolase;
- Reação 10: Formação de molécula de ATP e piruvato, através da transferência do grupo fosfato do PEP para uma molécula de ADP, catalisada pela enzima piruvato cinase.

Ao fim da glicólise, a molécula de piruvato pode ser encaminhada ao ciclo de Krebs ou a diferentes rotas fermentativas, como as fermentações alcoólica ou láctica. O metabolismo completo de diferentes fontes de carbono, tais como glicose ou metanol, é ilustrado na Figura B, no capítulo de apêndices.

O promotor P_{GAP} é geralmente utilizado para a produção de proteínas atóxicas ou que não inibem o crescimento da levedura *P. pastoris*. A principal vantagem de se utilizar este promotor constitutivo, além da não utilização de metanol, está atrelada ao fato de que a produção da proteína de interesse será proporcional à massa celular presente no cultivo.

Segundo Çalik et al. (2015), P_{GAP} é um promotor dependente da fonte de carbono presente no meio para a expressão de proteínas em *P. pastoris*. Os níveis de expressão mais elevados são obtidos quando se utiliza a glicose como fonte de carbono. A expressão constitutiva sob o controle do promotor P_{GAP} em meio rico em glicose pode produzir concentrações da proteína de interesse comparáveis aos rendimentos da expressão via promotor indutível P_{AOX1} em meio rico em metanol (Fedosov et al., 2002 e Waterham et al., 1997). Quando se utiliza um meio com uma fonte de carbono mais complexa, tal como um meio rico em glicerol, os níveis de expressão do promotor P_{GAP} decaem pela metade. E, ao se utilizar o mesmo meio utilizado na expressão do promotor P_{AOX1} , ou seja, o metanol, os níveis de expressão do promotor P_{GAP} decaem 66%, segundo Cereghino e Cregg (2000), mostrando que o promotor P_{GAP} de fato tem níveis de expressão mais elevados quando se utiliza a glicose como fonte de carbono.

A fim de se utilizar o P_{GAP} para a expressão de HSA recombinante, é necessário transformar a levedura inserindo as informações necessárias para a produção da proteína de interesse. Novamente, assim como na produção de rHSA via P_{AOX1} , faz-se uso de plasmídeos para a transformação da *P. pastoris*. Como já dito, este método oferece diversas vantagens, tal como a boa estabilidade da informação inserida e a consequente expressão.

Segundo Qin et al. (2011), o promotor P_{GAP} possui o tamanho de 477 bp, enquanto o P_{AOX1} possui 960 bp. Esta diferença de tamanho, que beira os 50%, faz com que o promotor P_{GAP} seja considerado mais adequado para a geração e replicação eficientes de cassetes de expressão e consequentes bibliotecas de organismos recombinantes.

Segundo Cregg (1999), quase todos os plasmídeos de *P. pastoris* disponíveis são vetores do tipo shuttle, ou seja, podem ser propagados em duas diferentes espécies de micro-organismos. No caso dos vetores para *Pichia pastoris*, os plasmídeos podem ser propagados tanto em *Escherichia coli* quanto em *P. pastoris*.

Diversos plasmídeos são comercializados para a expressão em *P. pastoris*, tais como: PHWO10 com o marcador selecionável HIS4 (Waterham et al., 1997) e os plasmídeos das séries pGAPZ e pGAP α da empresa Invitrogen, que possuem marcador de seleção de resistência à Zeocina®). Além do marcador de seleção, os plasmídeos das séries pGAPZ e pGAP α apresentam um cassete de expressão constituído pelo promotor constitutivo P_{GAP}, fragmentos de terminação de transcrição (AOX1 TT e cyc1 TT) e origem de replicação (pUC ori), para propagação do plasmídeo.

As séries pGAPZ e pGAP α são utilizados para a produção de proteínas intracelularmente e extracelularmente, respectivamente (Cregg, 1999), visto que a última possui o fator α -MF, como visto na Figura 15, uma sequência sinal que direciona a proteína produzida para o meio extracelular.

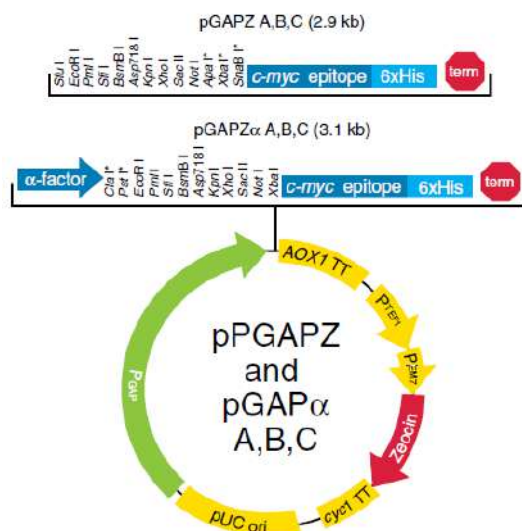


Figura 15. Vetor série pGAPZ/pGAP α para expressão de rHSA em *P. pastoris* via P_{GAP}

Fonte: Invitrogen – Thermo Fisher Scientific

Em suma, a soroalbumina humana é uma proteína de transporte que desempenha funções de suma importância em nosso organismo e é de interesse da sociedade que esta proteína seja produzida em prol da saúde pública, para tratamentos de doenças crônicas e quadros emergenciais. Há duas formas principais de se produzir a HSA: a primeira é a obtenção desta proteína diretamente do plasma sanguíneo, obtendo-se a pHSA, e a segunda é viabilizada por meio da utilização de micro-organismos, tal como a *Pichia pastoris*, para a expressão de rHSA.

A produção de HSA plasmática (pHSA) está atrelada a diversas dificuldades de obtenção de plasma humano, a matéria prima do processo, e a problemas relacionados a contaminações do produto final.

A levedura *P. pastoris* é comumente utilizada para a expressão de proteínas recombinantes, devido a seu rápido crescimento, cultivos em altas densidades celulares, modificações pós-traducionais, dentre outras vantagens. Utilizando esta levedura, a HSA recombinante (rHSA) pode ser produzida via promotores indutíveis ou constitutivos, sendo P_{AOX1} e P_{GAP} os promotores mais utilizados de cada tipo de promotor, respectivamente. O promotor P_{AOX1} necessita da presença de metanol, substância tóxica e difícil manipulação em escala industrial, para que a expressão de rHSA ocorra. Já o promotor P_{GAP} dispensa a etapa de indução via metanol e expressará a rHSA proporcionalmente ao crescimento das células.

O sistema de expressão em questão é capaz de produzir soroalbumina humana recombinante, de maneira constitutiva e, secretar o bioproduto para o meio extracelular, facilitando assim as etapas de separação e purificação da proteína. Estudos têm demonstrado que, em cenários mais conservadores, a levedura *Pichia pastoris* é capaz de produzir até 3 g/L de soroalbumina via promotor P_{GAP} (Ohtani et al., 1997). Em contra-partida, cenários mais otimistas resultam em rendimentos similares à produção de rHSA via P_{AOX1} , em torno de 10 g/L (Fedosov et al., 2002).

Capítulo 3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho baseia-se na avaliação de uma das metodologias de produção de soroalbumina recombinante, estudando-se a produção de soroalbumina por rota fermentativa em *Pichia pastoris*, mediada pelo promotor P_{GAP} que, ao contrário do promotor P_{AOX1} , não oferece riscos e dificuldades atrelados à etapa de indução por metanol.

Por questões de ética em pesquisa e limitações no estudo de clonagem de proteínas humanas, o problema foi solucionado utilizando-se uma proteína análoga à HSA para expressão em *Pichia pastoris*, a soroalbumina de rato (MSA). Devido à baixa variação nas sequências de aminoácidos das proteínas MSA e HSA, vide Tabela 3, as duas proteínas se comportam de forma semelhante em diferentes condições de pH e temperatura, por exemplo (Ohtani et al., 1997).

3.2. Objetivos específicos

Para atingir o objetivo geral acima mencionado, foram propostos diferentes objetivos específicos a serem concluídos ao longo do estudo, tais como:

- Estudo e seleção de meio de cultura ótimo em frascos agitados;
- Análise de crescimento celular e produção de proteínas extracelulares;
- Crescimento de *P. pastoris* em frascos agitados para a inoculação do biorreator;
- Monitoramento e controle remoto das condições experimentais do biorreator;
- Qualificação dos bioprodutos formados;
- Balanço de massa de carbono.

Capítulo 4. Metodologia

Para se atingir o objetivo geral e os diversos objetivos específicos supracitados, diversos experimentos foram realizados no *Chemical Biological Engineering Laboratory*, na *Massachusetts Institute of Technology*. A metodologia destes experimentos é enunciada a seguir.

4.1. A cultura microbiana

Como origem de todo o estudo, as células de *P. pastoris* foram cedidas gentilmente pelo Departamento de Biologia da *Massachusetts Institute of Technology*, e já sofreram métodos de transformação para possuírem os genes necessários para a produção de rMSA via P_{GAP}. Tais células foram cultivadas em meio de cultura YPD e posteriormente conservadas em glicerol (30%), em temperatura de -80°C. Já no momento apropriado de utilização das células, o descongelamento se deu em banho-maria a 35°C. Após o descongelamento e obtenção da amostra de células, foi realizado o planejamento de experimentos, que possui três etapas distintas, como observado na Tabela 4.

Tabela 4. Estrutura do estudo de produção de rMSA via fermentação em *P. pastoris*

	Objetivo	Ferramenta
Primeira etapa	<ul style="list-style-type: none"> - Comparação de meios de cultura - Observação de cinética de crescimento - Observação de produção de proteína - Produção de biomassa para inóculo da 2ª etapa 	<ul style="list-style-type: none"> - Experimentos em frascos agitados - Métodos analíticos: <ul style="list-style-type: none"> • DO, DCW; • <i>BioRad Assay</i>.
Segunda etapa	<ul style="list-style-type: none"> - Monitorar e controlar parâmetros: <ul style="list-style-type: none"> • Temperatura; • pH; • Agitação; • Oxigênio dissolvido. - Observação de produção de proteína 	<ul style="list-style-type: none"> - Experimentos em biorreator de bancada - Métodos analíticos: <ul style="list-style-type: none"> • DO, DCW; • <i>BioRad Assay</i>; • Glicose.
Terceira etapa	<ul style="list-style-type: none"> - Qualificação de bioprodutos - Balanço de massa do processo: <ul style="list-style-type: none"> • Fontes de carbono; • Proteínas produzidas; • CO₂; • Biomassa. 	<ul style="list-style-type: none"> - Métodos analíticos <ul style="list-style-type: none"> • Espectrômetro de massa • Eletroforese em gel • Dados das etapas anteriores

4.2. Experimentos em frascos agitados e a escolha do meio de cultura

O crescimento de *Pichia pastoris* e a produção de rMSA via P_{GAP} estão fortemente atrelados ao meio de cultura utilizado. É por esta razão que, a etapa de seleção de um meio de cultura apropriado ao experimento é de fundamental importância.

4.2.1. Meios de cultura

Segundo Huang et al. (2015), Schilling et al. (2001) e Kobayashi et al. (2000), dois meios de cultura são utilizados para a produção de proteínas recombinantes em *P. pastoris* via P_{GAP}. O primeiro meio de cultura, e também o mais difundido, é o BSM (do inglês, *Basal Salts Medium*), de composição listada na Tabela 5. Já o segundo meio de cultura é o meio Kobayashi, que surge como uma modificação do meio BSM, tendo como modificação principal a presença de timina, como fonte de vitamina, ao invés de apresentar biotina, como visto no meio BSM. A composição do meio Kobayashi também é listada na Tabela 6.

Tabela 5. Composição do meio de cultura BSM

Basal Salts Medium (BSM)	
Componente	Concentração
1. Hexametáfosfato de Sódio	167 mL/L
2. CaSO ₄ .2H ₂ O	0,93 g/L
3. K ₂ SO ₄	18,2 g/L
4. KOH	4,13 g/L
5. MgSO ₄ .7H ₂ O	14,9 g/L
6. Biotina	0,87 mg/L
7. Elementos traço PTM1	4,35 mL/L
8. Glicose	20 g/L
9. HCl	Suficiente para atingir pH 5,0

Fonte: Schilling, Goodrick e Wan (2001)

Tabela 6. Composição do meio de cultura Kobayashi

Kobayashi	
Componente	Concentração
1. Hexametáfosfato de Sódio	167 mL/L
2. CaSO ₄ .2H ₂ O	0,6 g/L
3. K ₂ SO ₄	9,5 g/L
4. MgSO ₄ .7H ₂ O	7,8 g/L
5. KOH	2,6 g/L
6. Tiamina	0,2 mg/L
7. Elementos traço PTM1	1,6 mL/L
8. Glicose	20 g/L
9. HCl	Suficiente para atingir pH 5,85

Fonte: Kobayashi et al. (2000)

A solução de elementos traço PTM1 consiste em: CuSO₄.5H₂O - 6,00 g/L, NaI - 0,08 g/L, MnSO₄.H₂O - 3,36 g/L, Na₂MoO₄.2H₂O - 0,20 g/L, H₃BO₃ - 0,02 g/L, CoCl₂ - 0,82 g/L, ZnCl₂ - 20,00 g/L, FeSO₄.7H₂O - 65,00 g/L, Biotina - 0,2 g/L, H₂SO₄ (95%-98%) - 5,00 mL/L.

4.2.2. Parâmetros dos experimentos em frascos agitados

A fim de escolher o melhor meio de cultura para a continuação dos estudos de produção de rMSA, ensaios em frascos agitados foram realizados para se comparar os meios de cultura BSM e Kobayashi (Tabela 7). Foram analisados o crescimento da levedura e também a produção de proteínas totais.

Tabela 7. Parâmetros dos experimentos em frascos agitados

Experimentos em frascos agitados	
Número de ensaios	6 Frascos - 3 BSM e 3 Kobayashi
Incubadora	New Brunswick Shaker Innova 43
Agitação	230 ± 20 - Cino (1999)
Temperatura	30°C - Cino (1999)
pH	5,0
Volume total dos frascos	125 mL
Volume utilizado	20-40 mL
Duração dos experimentos	72 horas

Como observações em relação aos parâmetros dos experimentos em frascos agitados, é importante frisar que:

- Os frascos utilizados possuíam volume total de 125 mL, porém apenas 20-50 mL de suas capacidades foram utilizados, evitando qualquer limitação de aeração do meio de cultura;
- A duração dos experimentos em frascos agitados foi modelada a partir da taxa específica de crescimento (μ) da *P. pastoris*, cerca de 0,15-0,18 h⁻¹ (Jahic et al., 2012). Avaliou-se que após 3 dias de incubação, a partir de uma DO₆₀₀ inicial de 0,2, a biomassa já teria crescido e atingido concentrações consideradas aceitáveis para evitar falta de nutrientes e/ou dificuldade de aeração do meio.

Já em relação aos métodos analíticos utilizados durante esta fase do estudo, tem-se as análises de densidade ótica (DO), peso seco de células (DCW, do inglês *Dry Cell Weight*), e concentração de proteínas em solução, realizada pela análise denominada *BioRad Assay*.

4.2.3. Determinação de densidade ótica (DO)

A densidade ótica foi obtida através da espectrofotometria em um Amersham Biosciences Ultrospec 2100 Pro, em um comprimento de onda de 600 nm. Amostras foram coletadas do experimento e inseridas em cubetas, em triplicatas, para a posterior leitura espectrofotométrica (Kobayashi et al., 2000).

4.2.4. Determinação de peso seco celular (DCW)

Outro parâmetro importante para a análise dos resultados é o peso seco celular (DCW), que pôde ser obtido através do cálculo da diferença de peso inicial e peso final de uma amostra da suspensão celular, sempre em triplicata. O peso inicial foi obtido a partir da coleta de determinado volume de amostra de suspensão celular do experimento, que foi filtrada à vácuo, e coletada em um papel de filtro. Já o peso final foi obtido ao se secar a amostra do papel de filtro por 24 horas em estufa a 80°C. Ao se associar os valores de DO_{600} e DCW, foi possível criar uma curva padrão para a fácil conversão de valores de densidade ótica em valores de DCW, resultado este em base mássica (g_{DCW}/L). Segundo Guo et al. (2011), a correlação esperada se encontra próxima de $100 DO_{600} = 22,9 g_{DCW}/L$.

4.2.5. Análise de concentração de proteínas em solução

A produção de proteínas foi analisada por meio do ensaio *BioRad*, capaz de ilustrar a concentração de proteínas através do método colorimétrico de Bradford. Para a análise de produção de proteínas, a amostra de suspensão celular do experimento foi centrifugada por 5 min a 5000g (aproximadamente 6500 rpm) em uma centrífuga Eppendorf 5417C, separando as células (como corpo de fundo) e o sobrenadante. A análise *BioRad* foi baseada na leitura espectrofotométrica, também em um espectrofotômetro Amersham Biosciences Ultrospec 2100 Pro, no comprimento de onda de 595 nm, das amostras obtidas e a posterior comparação com uma curva padrão, produzida a partir de kits de químicos específicos para esta análise, para determinar a concentração de proteínas na solução de interesse (Sedmack e Grossberg, 1977).

4.2.6. Dos frascos agitados ao biorreator

As culturas presentes nos frascos agitados foram utilizadas como inóculo para a partida de futuros ensaios em biorreatores. Conforme realizado por Mao et al. (2015), a biomassa de levedura produzida foi centrifugada (5 min a 5000g) e utilizada diretamente como uma cultura de iniciação para inocular ensaios em biorreatores, que, além de economizar tempo e material

laboratorial, permitiu alcançar uma DO_{600} inicial de 0,2 nos experimentos em biorreator de 2 litros.

4.3. Operação do biorreator

Após a realização dos experimentos em frascos agitados, o próximo passo do estudo foram os experimentos em biorreator de bancada. O biorreator e todo o maquinário utilizados fazem parte do Sartorius Biostat A Plus Bioreactor Setup, com capacidade total de 2 litros, equipamento este gentilmente doado pela *Sartorius Stedim Biotech Company* ao *Chemical-Biological Engineering Laboratory*, conforme ilustrado na Figura 17:



Figura 16. Biorreator Sartorius Biostat A Plus utilizado no estudo

4.3.1. Configuração do biorreator

Em termos de sensores, sistemas de aquecimento/resfriamento, entradas e saídas do biorreator, o sistema em questão foi equipado com (Figura 18):

- Entrada e aspersores de ar na parte inferior do vaso;
- Entrada e bomba para alimentação de meio de cultura/antiespumante;
- Entrada e bomba para alimentação de solução ácida (HCl 2,0 M);
- Entrada e bomba para alimentação de solução básica (NaOH 2,0 M);
- Exaustão de gás produzido;
- Ponto para coleta de amostras na parte superior do vaso;
- Jaqueta de aquecimento;
- *Cooling finger*;

- Termômetro;
- pHmetro;
- Medidor de oxigênio dissolvido (OD)

É válido ressaltar que, acoplado à exaustão de gás produzido, havia um condensador que impedia a fase líquida de ser carregada junto à fase gasosa para fora do biorreator. Adicionalmente, todas as entradas e saídas possuíam filtros, que diminuía a probabilidade do sistema ser contaminado por micro-organismos externos ao sistema.

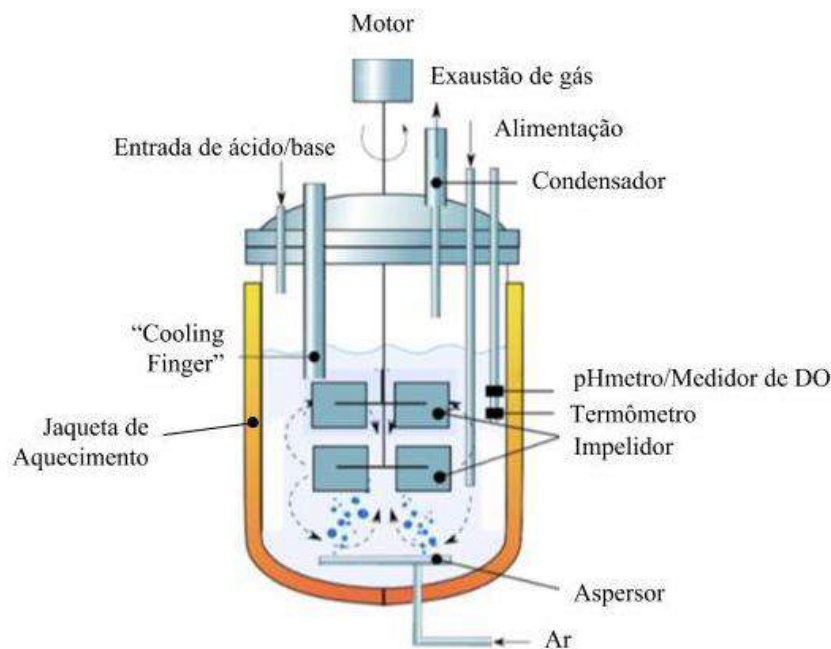


Figura 17. Esquema resumido do biorreator e seus equipamentos

Fonte: Adaptado de Wikimedia Commons

4.3.2. Monitoramento e controle dos experimentos

Ainda em quesito de ferramentas disponíveis para os experimentos desta segunda etapa do estudo, o biorreator em questão continha uma estação de controle conectada ao software *PI Process Book*, cedido e implementado pela empresa *OSIsoft*, em parceria com o *Chemical-Biological Engineering Laboratory*. Através deste software, diversos parâmetros foram passíveis de serem monitorados e também remotamente controlados, graças à unidade de controle anexa ao biorreator. Dentre os parâmetros que podiam ser variados se utilizando o *PI Process Book*, pode-se citar:

- Agitação (conexão com o motor dos impelidores);
- Temperatura (conexão com o termômetro, jaqueta de aquecimento e *cooling finger*);

- Oxigênio dissolvido (conexão com o medidor de DO e motor dos impelidores);
- pH (conexão com o pHmetro, bomba de ácido e bomba de base);
- Adição de antiespumante.

4.3.3. Parâmetros dos experimentos no biorreator

Diante de todas as funcionalidades que o biorreator oferece, foram concebidos os experimentos necessários para esta segunda fase do estudo. A Tabela 8 resume os parâmetros utilizados nos experimentos em biorreator.

Tabela 8. Parâmetros dos experimentos em biorreator de bancada

Experimentos em biorreator de bancada	
Número de ensaios	3 bateladas
Meio de cultura	Escolhido a partir dos experimentos em frascos agitados
Oxigênio dissolvido	20% - Baumann et al. (2007)
Agitação	Variável, para manter DO constante
Aeração	1 vvm
Temperatura	30°C - Cino (1999)
pH	5,0
Volume total do biorreator	2 litros
Volume utilizado	1,5 litro
Duração dos experimentos	120 horas
Impelidores	Rushton (2x)
Diâmetro dos impelidores	6,5 cm
Distância entre impelidores	6 cm
Distância do impelidor inferior ao fundo	4,3 cm
Altura do biorreator	25 cm

Como observações em relação aos parâmetros dos experimentos em biorreator de bancada, é importante se observar que:

- O regime de alimentação escolhido foi o de batelada.
- Para fins de análise de resultados, as diferentes bateladas foram denominadas Batelada 0, Batelada 1 e Batelada 2.

- A utilização de apenas 1,5 litro da capacidade total de 2 litros objetivou evitar qualquer limitação de aeração do meio de cultura, procedimento similar ao realizado nos experimentos em frascos agitados.
- A exaustão de gás do biorreator estava diretamente conectada a um espectrômetro de massa.

Os métodos analíticos utilizados durante esta segunda fase do estudo foram compostos por métodos anteriormente aplicados (Capítulo 4.2.3. ao 4.2.5.), como análises de densidade ótica (DO), peso seco de células e *BioRad Assay*, mas também por novas análises, como a análise de concentração de glicose no meio de cultura e a coleta de dados para a análise de produção de CO₂.

4.3.4. Análise de concentração de glicose

A análise de concentração de glicose consiste no analisador comercial denominado *YSI 2900 Biochemistry Analyzer*, que utiliza reações enzimáticas como princípio para quantificar a glicose presente no meio.

4.4. Qualificação das proteínas produzidas

A qualificação das proteínas produzidas durante o bioprocessamento foi determinada através do ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida, acrescido de dodecil sulfato de sódio, resultando na técnica conhecida como SDS-PAGE (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamida Gel Electrophoresis*), segundo Heinzle et al. (2006).

Capítulo 5. Resultados e discussão

5.1. Crescimento celular nos experimentos em frascos agitados

Ao longo das 72 horas de experimentos em frascos agitados, o crescimento celular foi determinado por meio de medições de DO_{600} para ambas as condições de diferentes meios de cultura.

Os valores de DO_{600} ilustram o crescimento das células de *P. pastoris* nas amostras analisadas pois este parâmetro segue a lei de Lambert-Beer, que estabelece que a absorbância de uma solução é diretamente proporcional a sua concentração e a espessura que a luz atravessa. Como a espessura que a luz deve atravessar é constante em um espectrofotômetro, a absorbância será diretamente proporcional à concentração celular das amostras. Na prática, porém, é importante se trabalhar na faixa de linearidade da lei de Lambert-Beer, sempre diluindo as amostras com meio de cultura estéril quando DO_{600} ultrapassar o valor de 1,0, pois a partir deste resultado, os desvios de linearidade do modelo são consideráveis, como a Figura 18 ilustra:

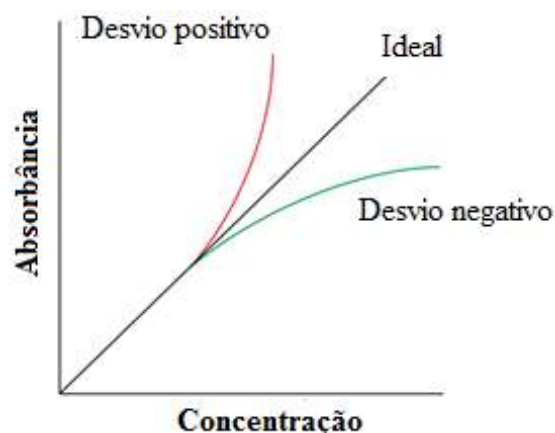


Figura 18. Desvio da lei de Lambert-Beer em soluções muito concentradas

Fonte: Adaptado de Analytical Chemistry – UC Davis

A Figura 19 ilustra o comportamento de DO_{600} médio (produto da média de DO_{600} das triplicatas de cada meio de cultura) ao longo do tempo. Já a Figura C, no capítulo de apêndices, representa as medições de DO_{600} ao longo do tempo para cada um dos seis frascos agitados separadamente. É válido ressaltar que as barras de erro ilustradas nos gráficos ao longo do capítulo de resultados foram obtidas a partir do cálculo do desvio padrão entre as triplicatas das análises de densidade ótica, DCW e *BioRad Assay*, por exemplo.

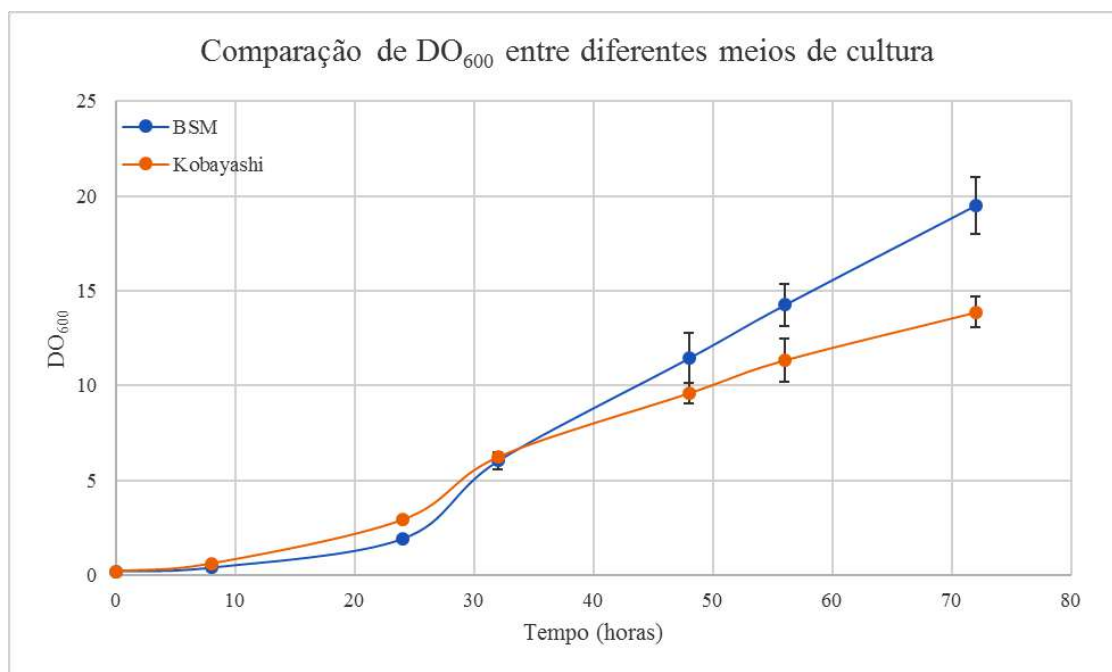


Figura 19. Comparação de DO₆₀₀ médio ao longo do tempo entre meios BSM e Kobayashi

Como observado na Figura 19, os frascos contendo meio BSM apresentaram maior crescimento celular, alcançando densidades óticas próximas a 20. Já as células em meio Kobayashi, apresentaram crescimento menor, alcançando DO₆₀₀ próximas de 13. Para avaliar o crescimento celular em termos mássicos, foram analisados também os resultados de DCW.

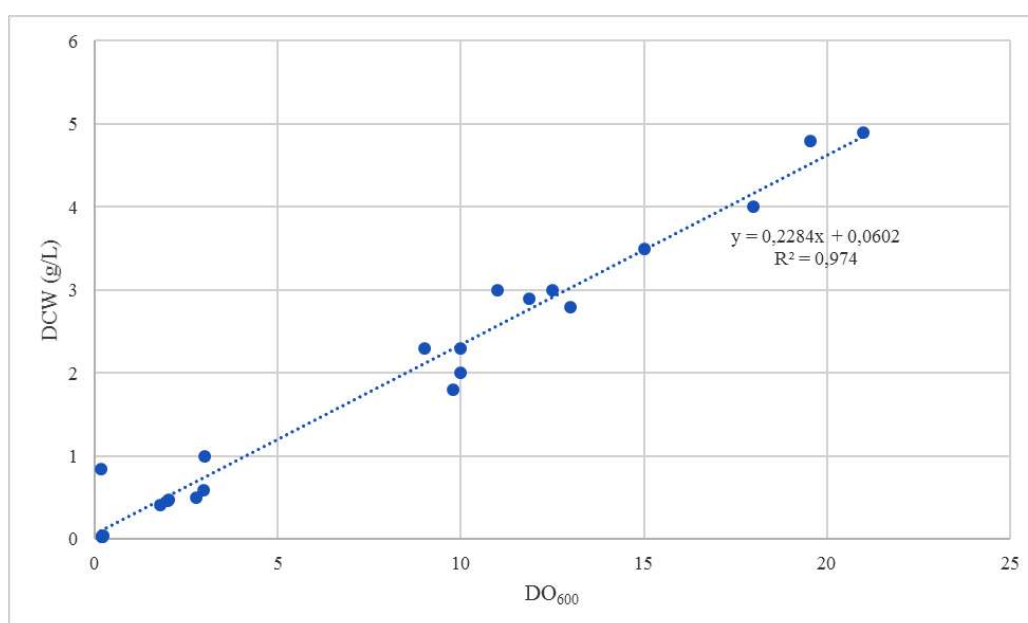


Figura 20. Correlação entre DO₆₀₀ e peso seco celular (DCW)

Os resultados da análise de DCW para o meio BSM (Figura 20) ilustram boa correlação entre peso seco celular e DO₆₀₀ ($R^2=0,974$), e se assemelham à equação descrita por Guo et al. (2011).

$$\text{Equação resultante: } DCW \text{ (g/L)} = 0,2284 * DO_{600} + 0,0602$$

$$\text{Equação de Guo et al. (2011): } DCW \text{ (g/L)} = 0,229 * DO_{600}$$

A partir da correlação obtida pela análise de peso seco celular, foi possível gerar um gráfico de DCW *versus* tempo, dado pela Figura 21.

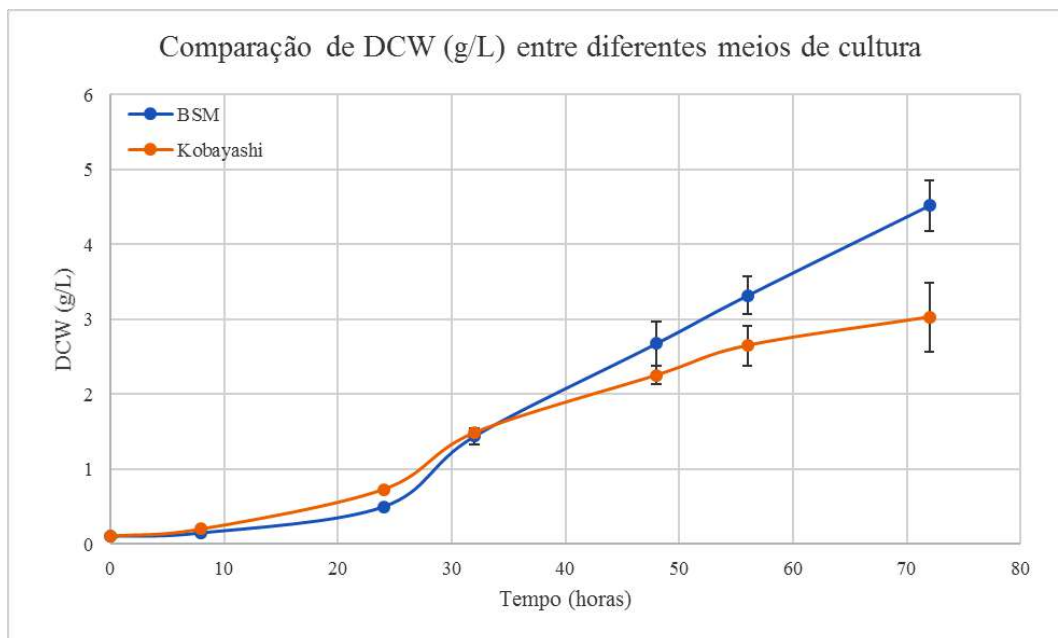


Figura 21. Comparação de DCW médio ao longo do tempo entre meios BSM e Kobayashi

Apesar de observar maior crescimento celular no meio BSM do que no meio Kobayashi, ambos os meios apresentaram crescimento celular abaixo do esperado, de acordo com a taxa específica de crescimento citada por Jahic et al. (2012), de aproximadamente $0,15$ a $0,18 \text{ h}^{-1}$. Ao se realizar uma regressão exponencial sobre os dados obtidos, obtém-se taxas específicas de crescimento de $0,056 \text{ h}^{-1}$ e $0,0483 \text{ h}^{-1}$ para os meios de cultura BSM e Kobayashi, respectivamente. Uma das hipóteses geradas e possível campo de estudo futuro é a toxicidade da soroalbumina para a *Pichia pastoris*, que explicaria as baixas taxas de crescimento encontradas, visto que a proteína recombinante seria tóxica ao microrganismo utilizado no bioprocesso.

5.2. Produção proteica nos experimentos em frascos agitados

A produção de proteínas extracelulares foi avaliada nos tempos de 48 e 72 horas, via *BioRad Assay* (Figura 22).

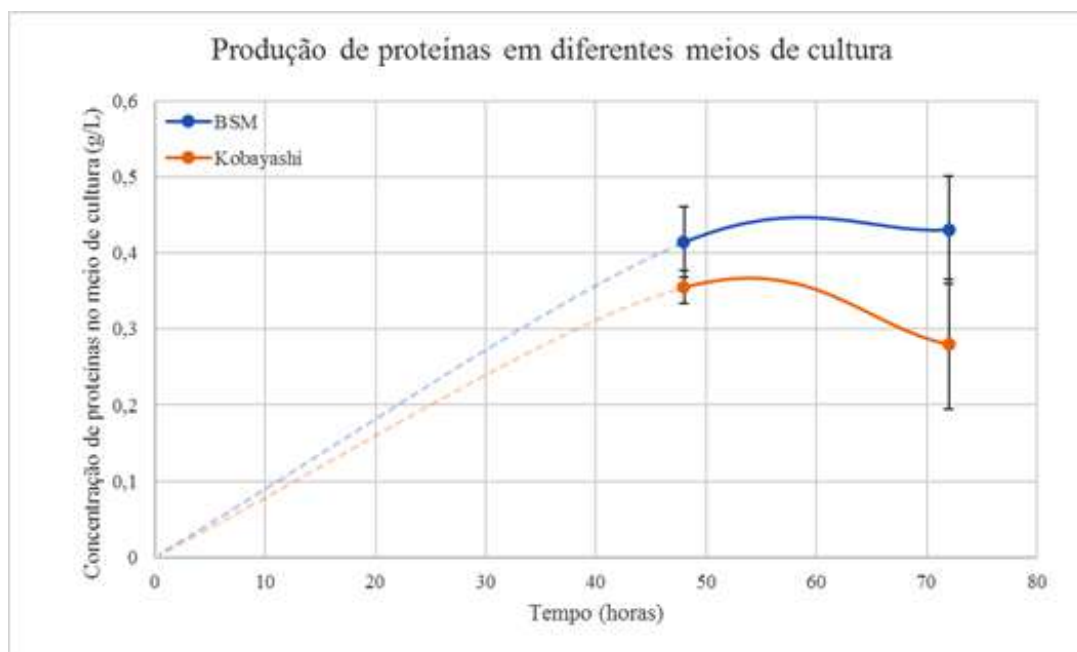


Figura 22. Comparação de produção de proteínas entre meios BSM e Kobayashi

Por não possuir uma medição de concentração de proteínas durante as primeiras horas, o comportamento da curva de produção de proteínas foi de difícil interpretação. Foi possível observar que a produção de proteínas utilizando o meio BSM, foi ligeiramente maior, quando comparada à condição utilizando o meio Kobayashi. Porém, devido aos desvios padrões associados às medições, esta conclusão foi incerta.

Foi de possível constatação a produção reduzida de proteínas em comparação com os dados da literatura. Ohtani et al. (1997) constata que foi possível se produzir até 3 g/L de soroalbumina via P_{GAP} . Porém, os resultados dos experimentos em frascos agitados revelaram que a máxima concentração obtida de soroalbumina foi próxima a 0,4 g/L.

5.3. Escolha do meio de cultura

Dentre uma gama de meios de cultura a serem escolhidos, temos os meios classificados como complexos e aqueles classificados como quimicamente definidos, baseando-se no conhecimento, ou não, de suas exatas composições químicas. Um meio quimicamente definido é aquele no qual todos os componentes químicos e suas concentrações são conhecidos. Já um meio complexo é aquele no qual a exata constituição química não é conhecida. Geralmente, meios complexos apresentam diversos extratos de animais, peixes, leveduras ou vegetais, que fornecem nutrientes, vitaminas e minerais necessários, porém de forma não definida, devido à oscilação de composições que estes extratos apresentam.

Como é parte de um dos objetivos deste trabalho, o balanço de massa de carbono exige que sejam utilizados meios de cultura quimicamente definidos. Meios complexos podem

apresentar mais de uma fonte de carbono e em concentrações iniciais desconhecidas e muitas vezes de difícil análise. Assim, a utilização de meios quimicamente definidos facilitará a execução de um balanço de massa ao fim do experimento, visto que todo carbono que adentra o sistema será proveniente da fonte de carbono única e definida e também da biomassa inicial de *P. pastoris*.

Ao fim das 72 horas de experimento, os frascos que possuíam BSM como meio de cultura apresentavam, em média, 4,5 g/L de biomassa e 0,42 g/L de proteínas extracelulares. Já os frascos com meio Kobayashi apresentavam, em média, 3 g/L de biomassa e 0,28 g/L de proteínas extracelulares. Por apresentar melhores resultados de crescimento celular e também produção de proteínas extracelulares, o meio BSM foi escolhido como o meio a ser utilizado nos experimentos em biorreator. Adicionalmente, a biomassa em meio BSM serviu como inóculo para os experimentos em biorreator, objetivando-se obter uma DO_{600} inicial de 0,2 no biorreator. A partir de amostras com 4,5 g/L de biomassa, foram necessários cerca de 20 mL para alcançar a DO_{600} inicial necessária.

Em suma, a biomassa de *P. pastoris* deve apresentar cinéticas de crescimento similares, tanto em experimentos de frascos agitados quanto em experimentos em um biorreator. A observação do crescimento desta levedura em frascos agitados permite a modelagem da cinética de crescimento da *P. pastoris* e assim, planejar experimentos mais complexos, tais como os ensaios em um biorreator, utilizando informações obtidas durante os experimentos de frascos agitados (Jahic et al., 2002). Dada a relativa simplicidade dos experimentos em frascos agitados, quando se compara com ensaios em biorreatores, a observação do sistema nos permite a rápida solução de possíveis complicações tais como a falta de crescimento celular ou agitação demasiadamente alta, por exemplo.

5.4. Experimentos em biorreator

Primeiramente, o regime de alimentação escolhido foi o de batelada pois, ao se analisar os resultados de Heyland et al. (2010), observou-se que a batelada alimentada, apesar de fornecer resultados ligeiramente melhores em termos de crescimento celular e produção de proteínas, não confere grandes diferenças nas conclusões finais do estudo que justifiquem a utilização e implementação de novas bombas, sistemas de controle e interface com o *PI Process Book*, por exemplo.

Baumann et al. (2007) demonstra que os níveis de oxigênio dissolvido influenciam significativamente a produtividade proteica e ainda ressalta que a produção de albumina pode

atingir seu rendimento máximo em condições de concentração baixa de oxigênio, como a condição de 20% escolhida.

As análises de concentração de glicose no meio se basearam em reações enzimáticas como princípio. Enzimas reagem com a glicose e geram determinado sinal elétrico, que é decodificado e disponibilizado ao usuário já em unidades de concentração de glicose (g/L). O método, porém, apresentou uma limitação relacionada à perda de correlação linear em concentrações de glicose superiores a 15 g/L, exigindo se diluir amostras sempre que necessário para evitar a região de não linearidade (Figura 23).

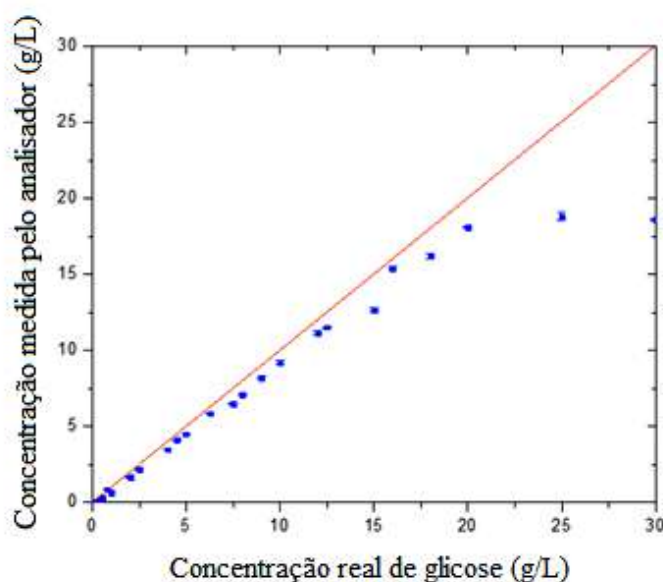


Figura 23. Desvio de linearidade da análise de concentração de glicose

Fonte: Informação interna do *Chemical-Biological Engineering Laboratory*

A exaustão de gás do biorreator estava diretamente conectada a um espectrômetro de massa, que seria de fundamental importância para a construção do balanço de massa na terceira etapa do estudo.

5.4.1. Batelada 0

A primeira batelada do estudo, batelada 0, apresentou graves problemas de operação logo no segundo dia de experimento e por consequência, foi considerada inconclusiva para o estudo. A dificuldade de operação se deu por um erro de calibração do medidor de oxigênio dissolvido, que gerou um problema de leitura do real teor de oxigênio dissolvido no meio. Durante o período da noite, entre os dias 1 e 2, o medidor interpretou que os níveis de oxigênio dissolvido estariam baixos e, para elevar estes níveis a 20%, a unidade de controle elevou a taxa de agitação dos impelidores do biorreator. Porém, por possuir uma calibração problemática, as medições de oxigênio dissolvido nunca atingiam o valor requerido pela central de controle

(20%) e assim, a agitação à altas taxas se manteve por horas, gerando espuma e aumentando a pressão interna do biorreator. Como consequência do aumento de pressão e geração de espuma no sistema, foi iniciado um processo de refluxo do meio de cultura para os reservatórios anexos ao biorreator, como o de ácido e base. Pela manhã, o biorreator já apresentava volume de meio de cultura muito inferior ao volume inicial (1,5 L), como observado na Figura 24, evidenciando a perda de matéria no sistema.

Acredita-se também que parte do líquido tenha sido carregado pelo gás, devido às altas taxas de rotação dos impelidores, sobrecarregando o filtro presente na exaustão de gás, que necessitou ser trocado.

Apesar de inconclusiva, a partir da batelada 0 e das dificuldades atreladas a ela, foram implementadas novas ferramentas de monitoramento e controle remoto, como alarmes de temperatura e agitação e também revisão da metodologia de calibração do eletrodo de medição de oxigênio dissolvido, para garantir que as futuras bateladas não sofressem do mesmo problema.



Figura 24. Diminuição drástica de volume durante a batelada 0

5.4.2. Batelada 1

Já a segunda batelada do estudo, a batelada 1, não apresentou quaisquer problemas operacionais em relação ao biorreator. A inoculação deste experimento também foi realizada utilizando-se a biomassa proveniente dos ensaios em frascos agitados, visto o pequeno intervalo de tempo entre os ensaios. Antes da inoculação, a DO_{600} da biomassa foi avaliada e, devido as condições não ótimas para crescimento durante a estocagem (20°C e 50 rpm), esta apresentou taxas de crescimento baixas, como esperado (de aproximadamente 20, ao fim dos experimentos em frascos agitados, para 24). A fim de se iniciar o experimento com uma DO_{600} de 0,2 aproximadamente, foram necessários cerca de 15 mL de biomassa advinda dos frascos em estoque.

Ao longo das 120 horas de experimento, foram avaliados crescimento celular (medido em DO_{600} e convertido a (g/L) pela correlação com DCW), concentração de glicose e produção de proteínas, como ilustra a Figura 25.

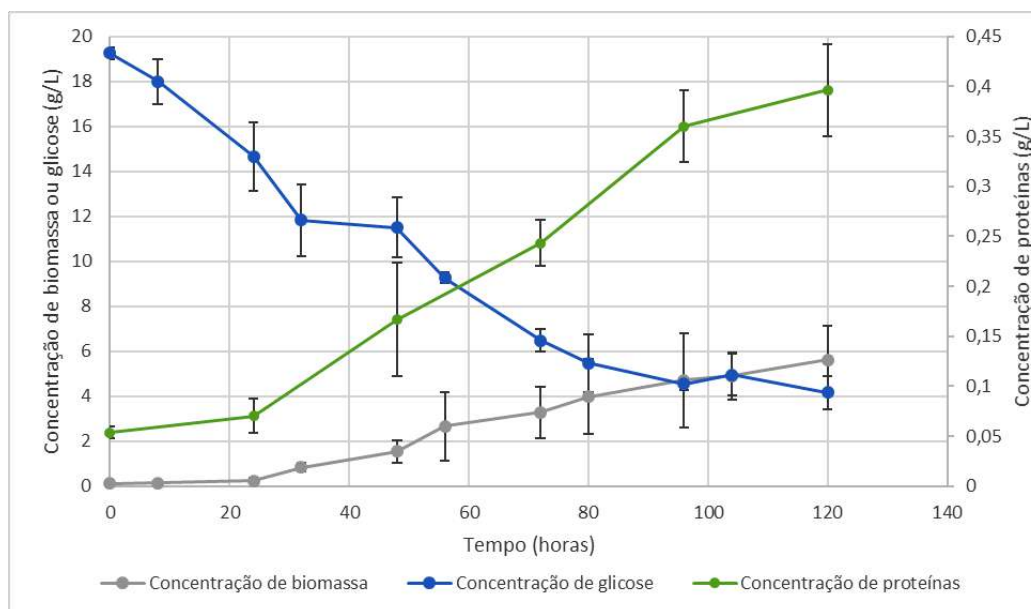


Figura 25. Perfil de concentrações do experimento em biorreator – Batelada 1

A produção de proteínas de aproximadamente 0,33 g/L (quando se desconta a concentração de proteínas já existente no tempo 0 de experimento), além de ter sido inferior à encontrada por Ohtani et al. (1997), foi também menor do que a produção de proteínas resultante dos experimentos em frascos agitados, que culminaram em produção de aproximadamente 0,42 g/L. Foi possível notar também que a concentração de proteínas inicial difere de zero, evidenciando que a separação de células do meio de cultura apresentou eficiência reduzida, afinal parte das proteínas produzidas durante os ensaios em frascos agitados foi transposta ao biorreator juntamente com o inóculo de células.

As concentrações de glicose decaíram ao longo do experimento, partindo de 20 g/L para aproximadamente 4 g/L, após 120 horas. O decréscimo era esperado, já que a glicose foi a fonte de carbono para as leveduras durante o experimento. Além disso, a concentração final de glicose de cerca de 4 g/L mostrou que o experimento foi bem dimensionado, com fonte de carbono suficiente para o tempo proposto do ensaio.

Já em relação ao crescimento celular, foi possível observar que as leveduras cresceram consideravelmente, porém, mais lentamente do que nos experimentos anteriores, em frascos agitados (Figura 26). A taxa específica de crescimento encontrada durante a Batelada 1 equivaleu a $0,036 \text{ h}^{-1}$, enquanto taxas específicas de crescimento de $0,056 \text{ h}^{-1}$ e $0,0483 \text{ h}^{-1}$ foram obtidas para os experimentos em frascos agitados contendo meios de cultura BSM e Kobayashi, respectivamente. Adicionalmente, todos os experimentos até então mostraram taxas específicas

de crescimento muito abaixo da reportada por Jahic et al. (2012), de aproximadamente 0,15 a 0,18 h⁻¹.

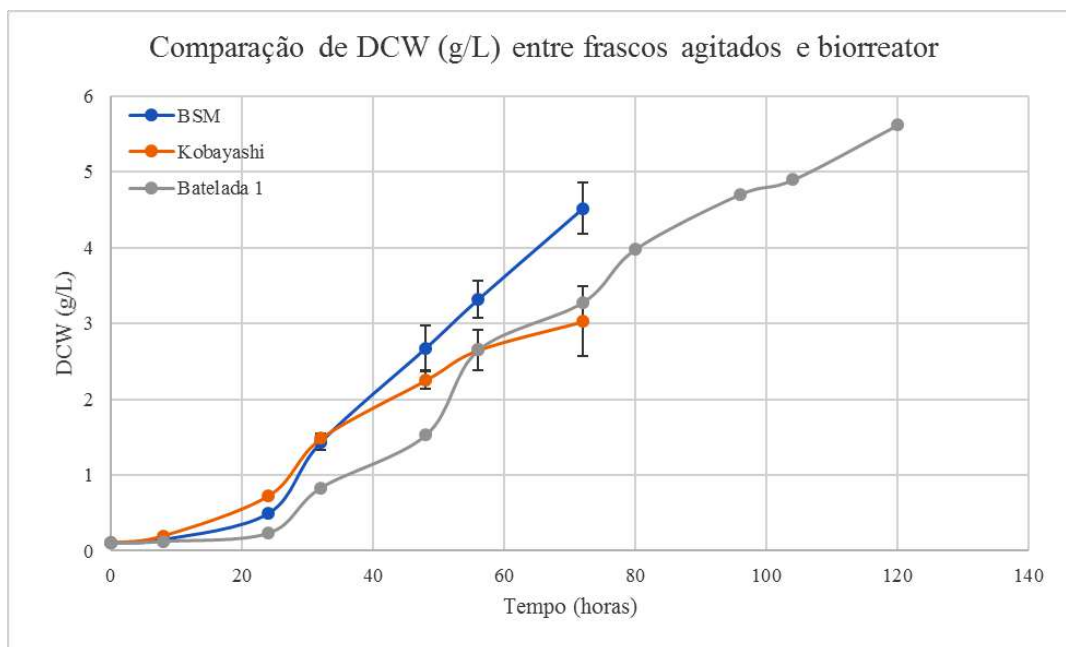


Figura 26. Comparação de perfis de crescimento celular entre Batelada 1 e experimentos em frascos agitados

O gás de exaustão que deixa o biorreator teoricamente deveria ser encaminhado e analisado pelo espectrômetro de massa conectado à linha de gás. Porém, ao realizar o procedimento de coleta de dados do equipamento, foi observado que nenhuma vazão de gás foi detectada pelo mesmo. A causa mais provável para este incidente seria a de um possível entupimento da linha de gás que conecta o biorreator ao espectrômetro de massa, gerada pelo problema operacional durante a Batelada 0. Como precaução, o equipamento em questão foi colocado em manutenção e a capacidade de se analisar o gás que deixa o biorreator foi impossibilitada, impactando então um dos objetivos deste estudo.

5.4.3. Batelada 2

A terceira batelada do estudo, a batelada 2, teve como função comprovar os dados obtidos na batelada anterior (já que a batelada 0 foi malsucedida), como uma duplicata.

O primeiro desafio encontrado ocorreu durante a etapa de preparo do meio de cultura BSM. Usualmente, a formulação do meio de cultura BSM gera uma solução translúcida, porém, desta vez, foi obtida uma solução de cor amarelada, como mostra a Figura 27. Como o preparo foi efetuado dentro de todo o protocolo, não se detectando quaisquer erros operacionais, os ensaios foram continuados.

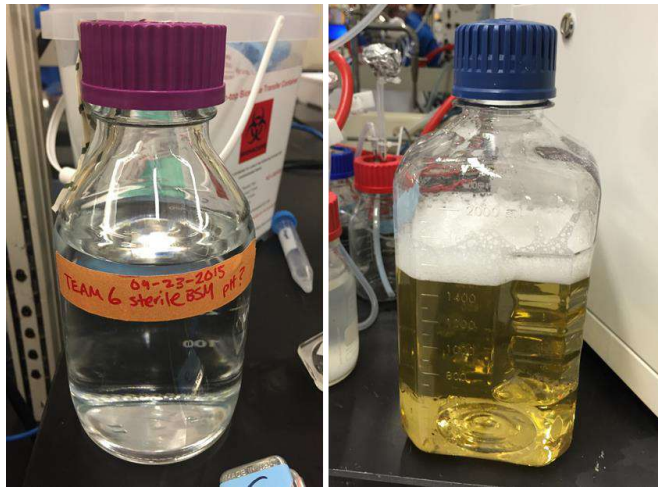


Figura 27. Meio BSM de aparência normal à esquerda e meio BSM de coloração amarelada à direita

O inóculo deste ensaio foi oriundo de outros experimentos em frascos agitados, que apresentaram resultados similares aos primeiros ensaios em frascos agitados realizados, descritos no capítulo 5.1. A fim de se iniciar o experimento com uma DO_{600} de 0,2 aproximadamente, foram necessários aproximadamente 18 mL de biomassa advinda dos frascos agitados.

A operação do biorreator em si desta vez também não foi problemática, onde a temperatura, pH, oxigênio dissolvido foram mantidos praticamente constantes ao longo de todo o experimento. O crescimento celular, concentração de glicose e produção de proteínas ao longo do experimento estão ilustrados na Figura 28.

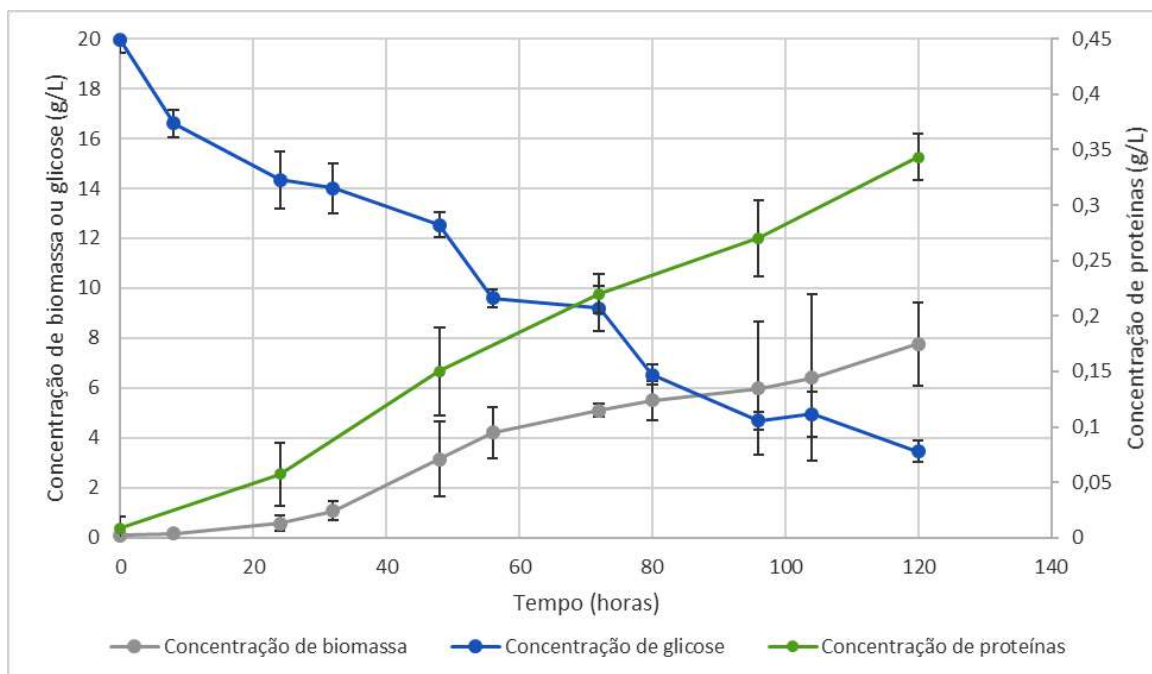


Figura 28. Perfil de concentrações do experimento em biorreator – Batelada 2

A produção de proteínas de aproximadamente 0,33 g/L foi similar à produção encontrada durante a batelada 1, que produziu cerca de 0,3 g/L. Porém, ambas as bateladas apresentaram concentrações de proteínas inferiores às encontradas por Ohtani et al. (1997), equivalente a 3 g/L.

Foi possível se observar que, após revisitar a metodologia de separação de células e meio de cultura entre os experimentos em frascos agitados e biorreator, elevando o tempo de centrifugação de 5 minutos para 6 minutos, a concentração de proteínas inicial foi próxima de zero, evidenciando uma separação de células do meio de cultura mais eficiente, se comparada à batelada 1.

As concentrações de glicose decaem ao longo do experimento, partindo de 20 g/L para cerca de 3,5 g/L, após 120 horas, valor este semelhante encontrado durante a batelada 1, que obteve uma concentração final de glicose igual a 4 g/L.

Já em relação ao crescimento celular, foi possível observar que as leveduras atingiram os maiores valores de concentração dentre todos os experimentos, cerca de 8 g/L. A taxa específica de crescimento encontrada durante a Batelada 2 equivaleu a $0,037 \text{ h}^{-1}$, valor este muito semelhante ao obtido durante a batelada 1, enquanto taxas específicas de crescimento de $0,056 \text{ h}^{-1}$ e $0,0483 \text{ h}^{-1}$ foram obtidas para os experimentos em frascos agitados contendo meios de cultura BSM e Kobayashi, respectivamente (Figura 29). Novamente, o experimento não atingiu taxas específicas de crescimento reportadas na literatura.

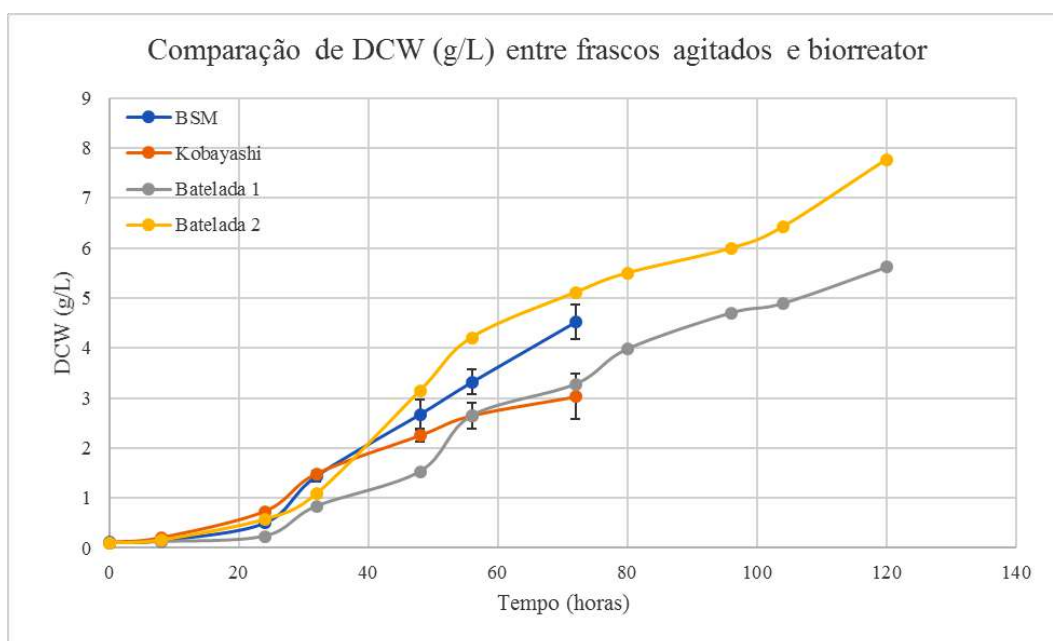


Figura 29. Perfis de crescimento celular dos experimentos realizados

Comparando os perfis de concentração entre as duas bateladas, foram observados perfis bastante semelhantes, corroborando para uma boa confiabilidade dos resultados do experimento (Figura 30).

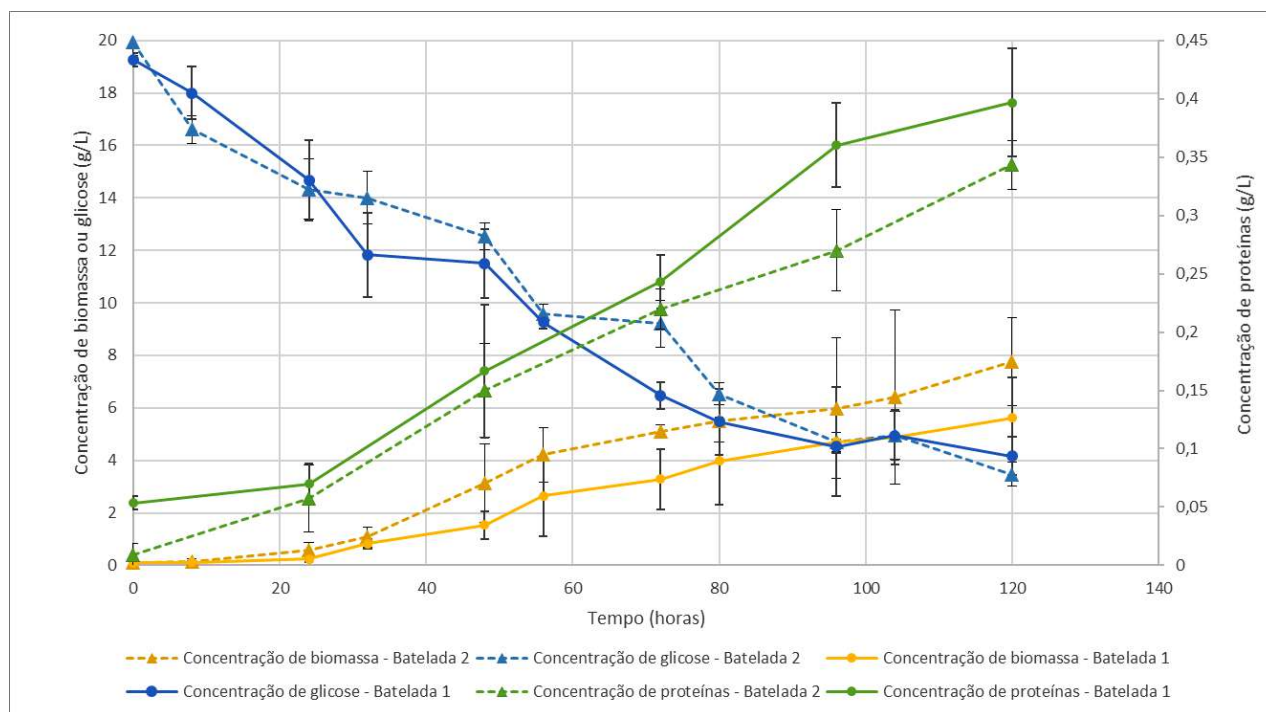


Figura 30. Resultados de ambas as bateladas, evidenciando semelhança entre dados

Diversas hipóteses foram levantadas para explicar a baixa produção de proteínas extracelulares encontrada em todos os experimentos, tanto em frascos agitados quanto biorreator. A primeira delas seria a possibilidade de as proteínas produzidas estarem sendo retidas e aderidas entre a membrana celular e a parede celular das células de levedura. Assim, um possível tratamento com enzimas quitinase iria solubilizar a parede celular da levedura, rica em quitina, e expor quaisquer proteínas que estivessem retidas na membrana celular. A segunda hipótese é de que as proteínas estavam sendo produzidas e não sendo enviadas para o meio extracelular corretamente. Com isso, haveria um acúmulo de proteínas produzidas no interior da célula, que não eram contabilizadas pela análise de concentração de proteínas. Um possível tratamento de lise celular, como o uso de ultrassom e pérolas de vidro, exporia as proteínas ao meio extracelular, viabilizando a quantificação destas durante as análises de concentração de proteínas totais. A terceira hipótese é de que a transformação e seleção das leveduras não fora eficiente e, como consequência, teríamos leveduras não capazes de expressar o gene de interesse. A última hipótese levantada seria a da toxicidade da soroalbumina para a *Pichia pastoris*, que também explicaria as baixas taxas de crescimento encontradas, visto que a proteína recombinante seria tóxica ao microrganismo utilizado no bioprocessamento.

5.5. Qualificação das proteínas produzidas

A produção de proteínas de fato ocorreu durante os experimentos. Nas bateladas em biorreator, foi obtido aproximadamente 0,30 g/L de proteínas no meio extracelular. O próximo passo foi caracterizar tais proteínas e confirmar se o que estava sendo produzido era realmente a proteína de interesse, e não proteínas celulares nativas. Para isto aplicou-se a metodologia de SDS-PAGE, que envolve a migração de partículas em gel durante a aplicação de uma diferença de potencial, separando as moléculas de acordo com seu tamanho (Figura 31).

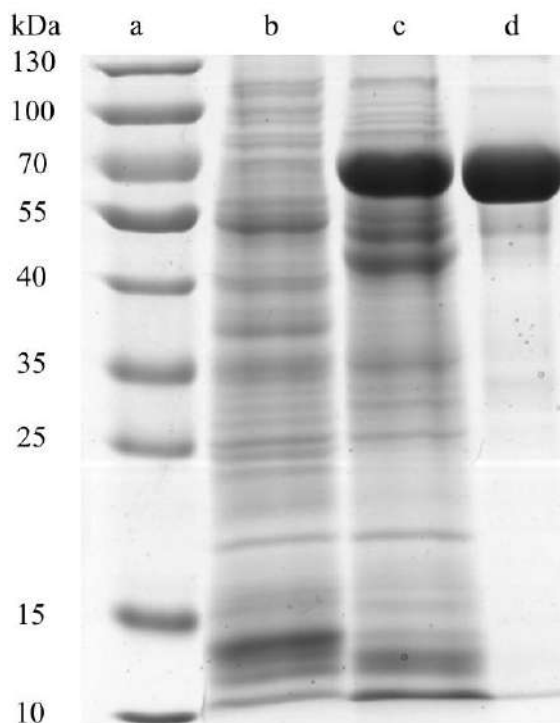


Figura 31. Gel resultante da análise de SDS-PAGE

A primeira coluna à esquerda, coluna (a), representa um padrão de migração (*Precision Plus Protein Standard – BioRad*), onde é possível identificar a massa molar aparente (kDa) das moléculas a partir da parada de migração no gel. Já a coluna (b) representa um controle negativo, ou seja, um meio isento de rMSA. A coluna (c) representa a amostra do meio extracelular da batelada 2 e a coluna (d) representa um controle positivo, contendo BSA comercial.

Como reportado na literatura, a molécula de MSA possui massa molecular aparente próxima de 66 kDa (Ohtani et al., 1997). E foi exatamente nesta região, próxima dos 70 kDa, que foram detectadas bandas fortemente coradas nas colunas c e d, corroborando para ideia de que a *P. pastoris* estava de fato produzindo majoritariamente a rMSA e não outras proteínas.

5.6. Balanço de massa de carbono

Inicialmente, foi objetivado realizar um balanço de massa de carbono para validar o estudo, quantificando o teor de carbono de fontes de carbono e produtos do biorreator, analisando a composição do gás de saída com espectrometria de massa, tomando medidas de concentração de glicose e quantificando a produção de proteína secretada. O balanço de massa de carbono deveria confirmar que a entrada de carbono é aproximadamente igual à produção de carbono do biorreator, assegurando que a matéria não é criada ou excluída no sistema. Segundo Huang et al. (2015), uma precisão de 90% já seria considerada aceitável.

Porém, como mencionado anteriormente, a análise do gás de exaustão do biorreator não foi possível de ser realizada devido a problemas técnicos com o espectrômetro de massa. Assim, o objetivo de se avaliar a acurácia das medições de concentrações celular, proteica, glicose e CO₂ via balanço de massa foi impactado negativamente. Porém, o balanço de massa de carbono pôde ser utilizado para se estimar o que seria a produção de CO₂ pelo sistema, considerando que o balanço de massa de carbono tivesse uma concordância de 100% entre carbono que adentra o sistema e carbono que deixa o sistema.

Em relação ao teor de carbono, a fonte de carbono para *P. pastoris* foi estritamente obtida pelo consumo de glicose, que apresenta 40% de carbono. A biomassa que consumiu tal fonte de carbono apresenta 50% de carbono em sua constituição, enquanto que a proteína produzida apresenta 45% de carbono. Finalmente, o gás carbônico é composto por 27% de carbono.

A partir das informações de concentrações e teores de carbono, calculou-se a concentração média de CO₂ para ambas as bateladas: 11,5 g/L e 8 g/L, para as bateladas 1 e 2, respectivamente. Adicionalmente, gerou-se uma curva de concentração de CO₂, baseada no balanço de massa de carbono, ao longo do tempo (Figura 32).

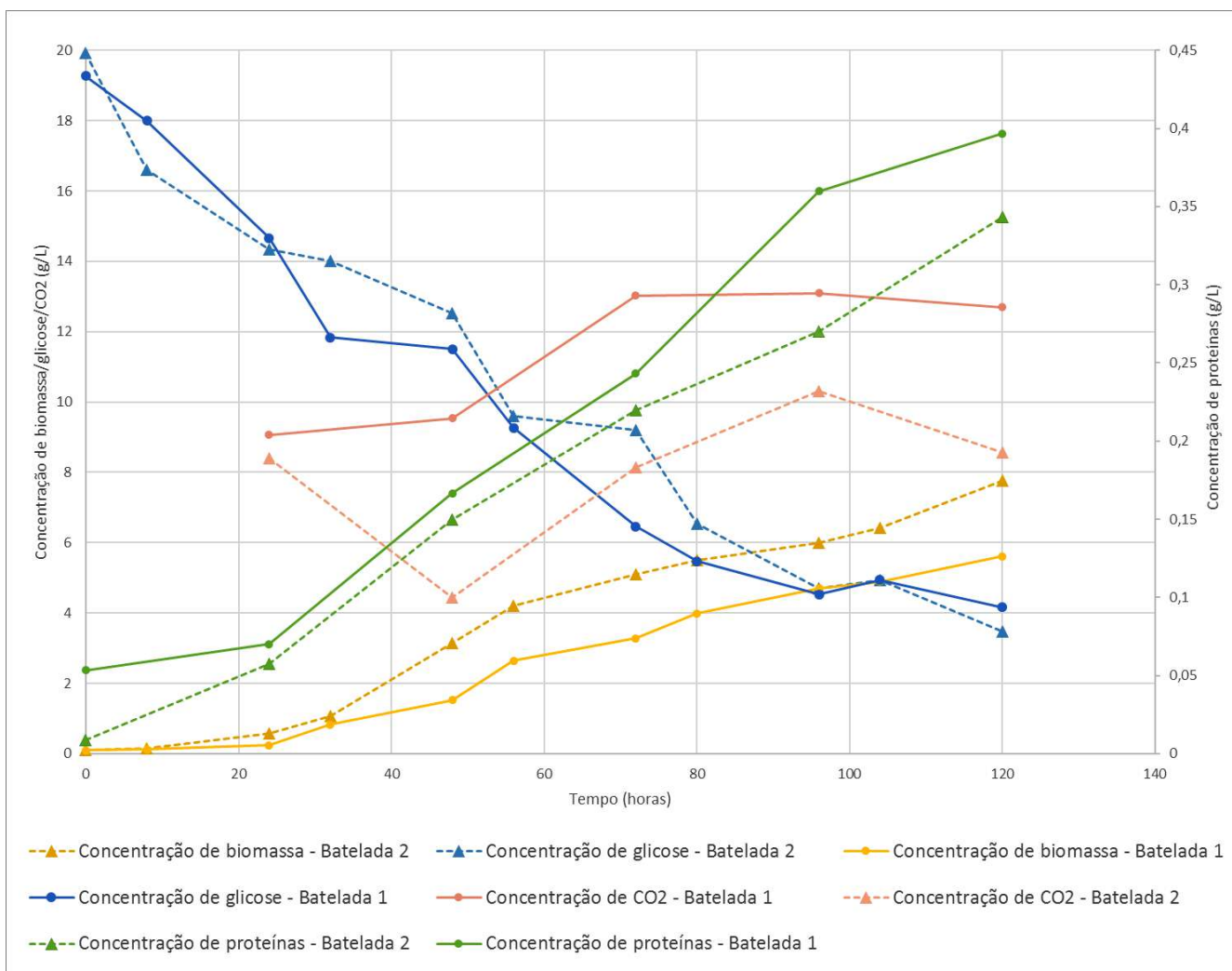


Figura 32. Estimativa da concentração de CO₂ produzido a partir do balanço de massa de carbono

5.7. Cálculo de parâmetros de produção

Os resultados de produção de biomassa e proteínas e consumo de glicose permitem também o cálculo de alguns parâmetros de produção, tais como a taxa de consumo de substrato (ds/dt), o fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$), fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e fator de conversão de produto em células ($Y_{X/P}$), como elucidado na Tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros de produção em frascos agitados e biorreator

	Unidades	Frascos (BSM)	Biorreator – Batelada 1	Biorreator – Batelada 2
ds/dt	$g_{\text{substrato}}/h$	-	0,13	0,14
$Y_{X/S}$	$g_{\text{biomassa}}/g_{\text{substrato}}$	-	0,37	0,47
$Y_{P/S}$	$g_{\text{produto}}/g_{\text{substrato}}$	-	0,02	0,02
$Y_{X/P}$	$g_{\text{biomassa}}/g_{\text{produto}}$	10,24	16,07	22,92

Capítulo 6. Conclusões

A maioria dos objetivos do estudo, que tangiam a análise de diferentes meios de cultura, experimentos em frascos agitados, operação de biorreator, análise de crescimento celular e formação de bioprodutos e balanço de massa de carbono, foram alcançados, apesar de alguns problemas técnicos relacionados à operação do biorreator e do espectrômetro de massa.

Os experimentos para a produção de rMSA foram considerados bem-sucedidos, mesmo produzindo pequena quantidade de proteínas quando comparado à literatura. Apesar de se almejar valores de produção de rMSA entre 3 g/L e 10 g/L (Ohtani et al., 1997 e Fedosov et al., 2002), os experimentos realizados em frascos agitados e biorreator alcançaram produções de aproximadamente 0,3-0,4 g/L. Já em relação ao crescimento celular, foi possível observar que as leveduras atingiram valores de concentração de até 8 g/L, concentrações estas consideradas baixas, visto que tal sistema de expressão pode alcançar concentrações de até 130 g/L, segundo Cregg e Cereguino (2000). Tal crescimento celular foi refletido nos valores para a taxa específica de crescimento, próxima de 0,04 e 0,05 h⁻¹, muito abaixo do reportado por Jahic et al., (2012), que obteve valores próximos a 0,15-0,18 h⁻¹.

Era de se esperar que os experimentos em biorreator apresentassem melhores resultados quanto a crescimento celular e produção de proteínas, quando comparados aos experimentos em frascos agitados, visto que o controle dos parâmetros no biorreator se dava de maneira mais precisa, almejando-se valores de pH, temperatura e oxigênio dissolvido, por exemplo, ótimos para o sistema de expressão, segundo a literatura. Porém, isto não se confirmou, já que as maiores produções de proteínas foram observadas nos experimentos em frascos agitados.

Os resultados de produção de biomassa e proteínas evidenciam que a produção de rMSA se deu de forma constitutiva, ou seja, sempre atrelada ao crescimento da levedura. Isto ilustrou o lado positivo de se utilizar promotores constitutivos ao invés de promotores indutíveis, que dependem da concentração de determinada substância no meio para que a geração do bioproduto de interesse ocorra.

Em suma, pode-se concluir que o objetivo geral do trabalho foi alcançado, produzindo-se soroalbumina recombinante via fermentação em *Pichia pastoris*, mediada pelo promotor P_{GAP}. Já os objetivos específicos apresentaram tanto êxitos quanto resultados inconclusivos. O estudo e seleção de meio de cultura ótimo em frascos agitados resultaram na escolha do meio BSM para o prosseguimento dos demais experimentos. A análise de crescimento celular e produção de proteínas extracelulares resultaram em dados que, apesar de estarem abaixo do relatado pela literatura, são concretos e de suma importância para a análise do bioprocessamento. O crescimento de *P. pastoris* em frascos agitados também foi útil para a inoculação dos

experimentos em biorreator. Já o biorreator e ferramentas anexas ao mesmo foram causas de alguns dos problemas operacionais relatados ao longo do experimento, como o medidor de oxigênio dissolvido e o espectrômetro de massa. Devido a estes contratemplos, o objetivo específico de se analisar um balanço de massa de carbono do sistema foi drasticamente afetado, impossibilitando mensurar o CO₂ advindo da fermentação. Como forma alternativa de se utilizar os dados obtidos e o balanço de massa, optou-se por calcular os valores esperados para a produção de CO₂ durante a fermentação.

Capítulo 7. Desafios futuros

Os parâmetros e modos de operação do biorreator (tais como batelada, batelada alimentada e sistema contínuo), a composição do meio de cultura, as condições de transferência de oxigênio (K_{La}), o pH e a temperatura afetam a produção de rMSA, e deverão ser estudados, a fim de se otimizar a produção da proteína de interesse.

Novas bateladas em biorreator também permitirão a análise do gás de exaustão que, por problemas técnicos, não pôde ser analisado e utilizado como peça importante para completar o balanço de massa de carbono do sistema.

Após se otimizar a produção de rMSA via fermentação em *Pichia pastoris* utilizando-se o promotor P_{GAP} , estudando-se a influência de diferentes parâmetros, é necessário também se entender a separação e purificação da proteína produzida. Existe uma grande diversidade de métodos visando a separação de biomoléculas e, como usualmente se pretende separar e purificar proteínas, houve um grande desenvolvimento de diversas técnicas e metodologias de separação destes bioprodutos. O fluxograma apresentado na Figura 33 ilustra possíveis exemplos para um processo de produção industrial de produção de soroalbumina, com as respectivas etapas de separação e purificação.

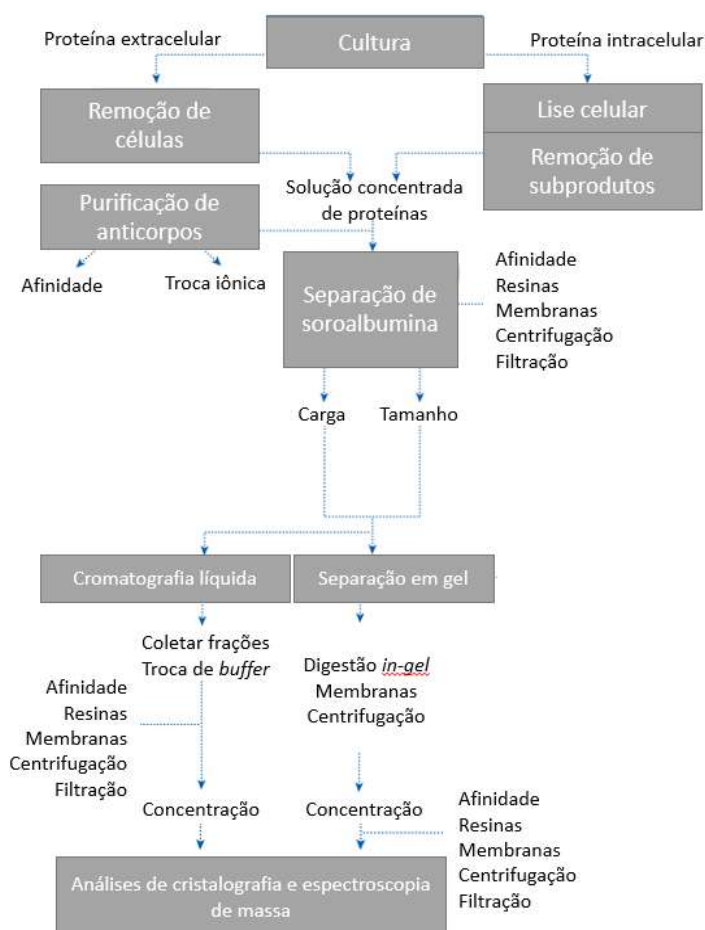


Figura 33. Fluxograma de um processo de produção e purificação de soroalbumina

Adicionalmente, ainda há alguns desafios e debates em torno da albumina, que discutem o papel e a eficácia da proteína em tratamentos médicos, revisando os critérios utilizados para a regulação de seu uso. Segundo Falcão et al. (2011), há vertentes de estudo que apontam um possível malefício em relação ao uso de albumina em pacientes em estado grave e Vincent et al. (2003) relata que os efeitos adversos consequentes da administração de albumina estão associados a danos significativos nos rins de alguns pacientes. Já segundo Matos et al. (2005), caso os critérios de utilização da albumina em tratamentos sejam revistos em âmbito nacional, cerca de até 60% das prescrições de albumina poderão não se enquadrar nas recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a ANVISA.

Capítulo 8. Referências bibliográficas

- AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98 (12), p. 5301-5317, 2014.
- BAIRAGI, U.; MITTAL, P.; MISHRA, B. Albumin: a versatile drug carrier. *Austin therapeutics*, v. 2 (2), p. 1021, 2015.
- BALAJTHY, Z.; ARADI, J.; CSOZ, E.; SCHOLTZ, B.; SZATMARI, I., TOZSER, J.; VARGA, T. Molecular therapies. *University of Debrecen*, 2011.
- BEARZI, C.; ROTA, M.; HOSODA, T.; TILLMANN, J.; et al. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci, USA*, v. 104, p. 14068-14073, 2007.
- BHATTACHARYA, A. A.; CURRY, S.; FRANKS, N. P. Binding of the General Anesthetics Propofol and Halothane to Human Serum Albumin. High Resolution Crystal Structures. *J. Biol. Chem*, 275, 2000.
- BOLDT, J. Use of albumin: an update. *Br J Anaesth*, 104 (3), p. 276-284, 2010.
- BOSSE, D.; PRAUS, M.; KIESSLING, P.; NYMAN, L.; ANDRESEN, C.; WATERS, J.; SCHINDEL, F. Phase I comparability of recombinant human albumin and human serum albumin. *J Clin Pharmacol*, v. 45 (1), p. 57-67, 2005.
- BURNOUF, T. Chromatography in plasma fractionation: Benefits and future trends. *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.*, 664, p. 3-15, 1995.
- ÇALIC, P.; ATA, Ö.; GÜNES, H.; MASSAHI, A.; BOY, E.; KESKIN, A.; Öztürk, S.; Zerze, G. H.; Özdamar, T. H. Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters, *Biochemical Engineering Journal*, v. 95, p. 20-36, 2015.
- CHEN, Z.; HE, Y.; SHI, B.; YANG, D. Human serum albumin from recombinant DNA technology: challenges and strategies. *Biochim. Biophys*, 1830, p. 5515-5525, 2013.
- CHUANG, V. T. G.; OTAGIRI, M. Recombinant human serum albumin. *Drugs Today*, v. 43 (8), p. 547-561, 2007.
- COUDEC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 44, p. 2279-2289, 1980.

- CREGG, J.M. Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, em: FERNANDEZ, J.M.; HOEFFLER, J.P. Gene Expression Systems Using Nature for the Art of the Expression, *Elsevier Inc.*, p. 157-191, 1999.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, v. 16 (1), p. 23-52, 2000.
- DECKER, J. M. 11th Hour: Introduction to Immunology. *Wiley*, 2000.
- DONG, Y.; ZHANG, F.; WANG, Z.; HAO, A.; JIANG, B.; TIAN, M.; LI, O.; JIA, Q.; WANG, S.; XIU, Z. Extraction and purification of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris* broths using aqueous two-phase system combined with hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A.*, v. 1245, p; 143-149, 2012.
- DOS SANTOS, A. F. Construção de cassetes de expressão lineares e transformação de *Kluyveromyces marxianus* para expressão de proteínas heterólogas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Programa de pós-graduação em bioquímica agrícola, 2012.
- ERSTAD, B. L. Viral infectivity of albumin and plasma protein fraction. *Pharmacotherapy*. v. 16 (6), p. 996-1001, 1996.
- FALCÃO, H.; JAPIASSÚ, A. M. Uso de albumina humana em pacientes graves: controvérsias e recomendações. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 23 (1), p. 87-95, 2011.
- FARDELONE, L. C.; BRANCHI, B. A. Mudanças recentes no Mercado farmacêutico. *Revista FAE, Curitiba*, v.9 (1), 2006.
- FEDOSOV, S. N.; BERGLUND, L.; FEDOSOVA, N. U.; NEXO, E.; PETERSEN, T. E. Comparative analysis of cobalamin binding kinetics and ligand protection for intrinsic factor, transcobalamin, and haptocorrin. *J Biol Chem*, v. 277, p. 9989-10085, 2002.
- FOX, J. L. Puzzling industry response to ProdiGene fiasco. *Nat Biotechnol*, v. 21 (1), p. 3-4, 2003.
- GADELHA, C. A. G.; QUENTAL, C.; FIALHO, B. C. Saúde e inovação: uma abordagem sistêmica das indústrias da saúde. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, 2003.
- GE, S.; KOJIO, K.; TAKAHARAM A.; KAJIYAMA, T. Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: influence of the phase separation on protein adsorption patterns. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*. v. 9 (2), p. 131-150, 1998.

- GENTON, L.; MELZER, K.; PICHARD, C. Energy and macronutrient requirements for physical fitness in exercising subjects. *Clinical Nutrition*, 29 (4), p. 413-423, 2010.
- HARRISON, R. G.; TODD, P. W.; RUDGE, S. R.; PETRIDES, D. P. Bioseparations science and engineering. 1st edition, New York, *Oxford University Press*, 2003.
- HE, Y.; NING, T.; XIE, T.; QIU, Q.; Zhang, L.; Sun, Y.; YANG, D. Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (47), 19078–19083, 2011.
- HEINZLE E.; BIWER, A. P.; COONEY, C. L. Development of Sustainable Bioprocesses Modeling and Assessment. *Wiley*, 2006.
- HERMANN, J. R. Protein and the Body. Oklahoma Cooperative Extension Service, Division of Agricultural Sciences and Natural Resources, Oklahoma State University, 1995.
- HEYLAND, J.; FU, J.; BLANK, L. M.; SCHMID, A. Quantitative Physiology of *Pichia pastoris* during glucose-limited high-cell density fed-batch cultivation for recombinant protein production. *Biotechnology and bioengineering*, v. 107 (2), p.357-368, 2010.
- HOLLENBERG, C. P.; GELLISSSEN G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Current opinion in biotechnology*, v. 8 (5), p. 554-560, 1997.
- ILGEN, C.; CEREGHINO, J.; CREGG, J. *Pichia pastoris*. In: Gellissen, G.: Production of recombinant proteins. Wiley-VCH, Weinheim, p. 143-162, 2005.
- JAHIC, M.; ROTTICCI-MULDER, J. C.; MARTINELLA, M.; HULT, K.; ENFORS, S. O. Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. *Bioproc. Biosyst. Eng.*, v. 24, p. 385-393, 2002.
- KAKETSUKEN. Human blood serum albumin. Press release translation from Nikkei Sangyo Shinbun, 2000.
- KHLEBNIKOV, A.; RISA, O.; SKAUG, T.; CARRIER, T. A.; KEASLING, J. D. Regulatable arabinose-inducible gene expression system with consistent control in all cells of a culture. *J Bacteriol*, v. 182 (24), p. 7029-7034, 2000.
- KOBAYASHI, K.; KUWAE, S.; OHYA, T.; OHDA, T.; OHYAMA, M.; OHI, H.; TOMOMITSU, K.; OHMURA, T. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *J Biosci Bioeng*, v. 89, p. 55-61, 2000.

- KOBAYASHI, K. Production of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Downstream*, v. 31, p. 5.
- KURTZMAN, C. M. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 36, p. 1435, 2009.
- MAJOREK, K. A.; POREBSKI, P. J.; DAVAL, A.; ZIMMERMAN, M. D. JABLONSKA, M. D.; MINOR, W. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*, 52 (3-4), p. 174-182, 2012.
- MATEJTSCHUK, P.; DASH, C. H.; GASCOIGNE, E. W. Production of human albumin solution: a continually developing colloid. *British Journal of Anaesthesia*, 85 (6), p. 887-895, 2000.
- MATOS, G. C.; ROZENFELD, S. Avaliação do uso de albumina humana em hospital do Rio de Janeiro, Brasil. *Rep Public Health*, 21 (4), p. 1224-1233, 2005.
- MERTEN, O. W. Virus contaminations of cell cultures - A biotechnological view. *Cytotechnology*, v. 39, p. 91-116, 2002.
- MIYAMOTO, C. A. Produção de Proteínas Recombinantes em *Escherichia coli*. AEMS – Faculdades integradas de Três Lagoas. *Revista conexão eletrônica*, v. 10, p. 220-233, 2013.
- MORE, J. E.; HARVEY, M. J. Purification Technologies for Human Plasma Albumin. Blood Separation and Plasma Fractionation. Edited by James Robinson Harris, United Kingdom, 261-306, 1991.
- MYBURGH, J.; COOPER J.; FINFER, S., et al. SAFE Study Investigators; Australian and New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials Group; Australian Red Cross Blood Service; George Institute for International Health Saline. Albumin for fluid resuscitation in patients with traumatic brain injury, *N Engl J Med*, vol. 357, p. 874-884, 2007.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. *W. H. Freeman*, 5th edition, 2008.
- NETO, O. S. O. Identificação e análise funcional de sinais de secreção de *Pichia pastoris*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, Programa de pós-graduação em biologia molecular, 2012.
- NURDIANSYAH, R.; MUHAIMIN, R.; WIDODO. A comparative analysis of serum albumin from different species to determine a natural source of albumin that might be useful for human therapy. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 11 (3), p. 243-249, 2016.

- OHTANI, W.; NAWA, Y.; TAKESHINA, K.; HIDEKI, K.; KOBAYASHI, K.; OHMURA, T. Physicochemical and Immunochemical Properties of Recombinant Human Serum Albumin from *Pichia pastoris*. *Analytical Biochemistry*, 1997.
- QIN, X.; QIAN, J.; YAO, G.; ZHUANG, Y.; CHU, J. GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol*, v. 77, p. 3600-3608, 2011.
- QUINLAN, G. J.; MUMBY, S.; MARTIN, G. S.; BERNARD, G. R.; GUTTERIDGE, J. M.; EVANS, T. W. Albumin influences total plasma antioxidant capacity favorably in patients with acute lung injury. *Crit Care Med*, 32 (3), p. 755-759, 2004.
- SANTOS, A. K.; RESENDE, R. R. Produção de proteínas recombinantes humanas. *Nanocell News*, v. 2 (8), 2015.
- SEDMACK, J. J.; GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry*, v. 79, p. 544, 1977.
- SIEGELE, D. A.; HU, J. C. Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proc Natl Acad Sci*, v. 94 (15), p. 8168-8172, 1997.
- SILVA, J. R. S. N. Construção de vetores para superexpressão da proteína L1 do do HPV16 em *Pichia pastoris*. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto de Química, 2010.
- SOARES, M. A. Expressão em *Pichia pastoris* e imunoproteção da proteína BmTI de *Rhipicephalus microplus*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Programa de pós-graduação em ciência animal, 2011.
- SREEKRISHNA, K.; BRANKAMP, R. G.; KROPP, K. E.; BLANKENSHIP, D. T.; TSAY, J.; SMITH, P. L.; WIERSCHKE, J. D.; SUBRAMANIAM, A.; BIRKENBERGER, L. A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, v. 190 (1), p. 55-62, 1997.
- STRONG, L. E.; KIRK, R. E.; OTHMER D. F. Blood fractionation, *Encyclopedia of Chemical Technology*, v. 2, p. 566, 1948.
- SUMI, A.; OKUYAMA, K.; KOBAYASHI, K.; OHTANI, W.; OHMURA, T.; YOKOYAMA, K. Purification of recombinant human serum albumin – efficient purification using streamline. *Bioseparation*, 8, p. 195–200. 1999.
- SVEDBERG, T.; SJOGREN, B. The molecular weights of serum albumin and of serum globulin. *J. Am. Chem. Soc.*, 50 (12), p. 3318–3332, 1928.

- TAGUCHI, K.; CHUANG, V. T. G.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M. Pharmaceutical Aspects of the Recombinant Human Serum Albumin Dimer: Structural Characteristics, Biological Properties, and Medical Applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, volume 101, Issue 9, p. 3033-3046, 2012.
- TSCHOPP, J.; SVERLOW, F. G.; KOSSON, R.; CRAIG, W.; GRIN, L. High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, v. 5, p. 1305-1308, 1987.
- VAN OSS, C. J.; GOOD, R. J. Orientation of the water molecules of hydration of human serum albumin. *J. Protein Chem.*, v. 7, p. 179, 1988.
- VINCENT, J. L.; WILKES, M. M.; NAVICKIS, R. J. Safety of human albumin-serious adverse events reported worldwide in 1998–2000, *Br J Anaesth*, vol. 91, p. 625-630, 2003.
- VOET, D.; VOET J. G. *Biochemistry*. 3^a ed. Wiley, Hoboken, 2004. 1 v.
- WATERHAM, H. R.; DIGAN, M. E.; KOUTZ, P. J.; LAIR, S. V.; CREGG, J. M. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, v. 186 (1), p. 37-44, 1997.
- Xinhua News Agency. Drug watchdog tightens supervision of albumin medicine. Beijing Review. April 4, 2007. Disponível em: http://www.bjreview.com.cn/health/txt/2007-04/04/content_60856.htm. Acessado em 25 de janeiro de 2017.
- ZHANG, W.; HU, D.; XI, Y.; ZHANG, M.; DUAN, G. Spread of HIV in one village in central China with a high prevalence rate of blood-borne AIDS. *Int J Infect Dis*, v. 10, p.475-480, 2006.
- ZHANG, A. L.; LUO, J. X.; ZHANG, T. Y.; PAN, W. Y.; TAN, Y. H.; FU, C. Y.; TU, F. Z. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Mol Biol Rep*, v. 36 (6), p. 1611-1619, 2009.

Capítulo 9. Apêndices

Um dos processos mais importantes para precipitar proteínas é o processo de Cohn, que purifica proteínas terapêuticas a partir de plasma humano. Este processo utiliza etanol a temperaturas abaixo de 0° C para minimizar a desnaturação das proteínas pelo solvente orgânico. As variáveis que são manipuladas ao longo do processo de Cohn são: pH, força iônica e a concentração de etanol. A força iônica é mantida baixa, o que facilita a precipitação das proteínas.

O método de Cohn é utilizado para a obtenção de diversos produtos terapêuticos, tais como albumina, plasminogênio, protrombina, isoglobulinas e globulinas.

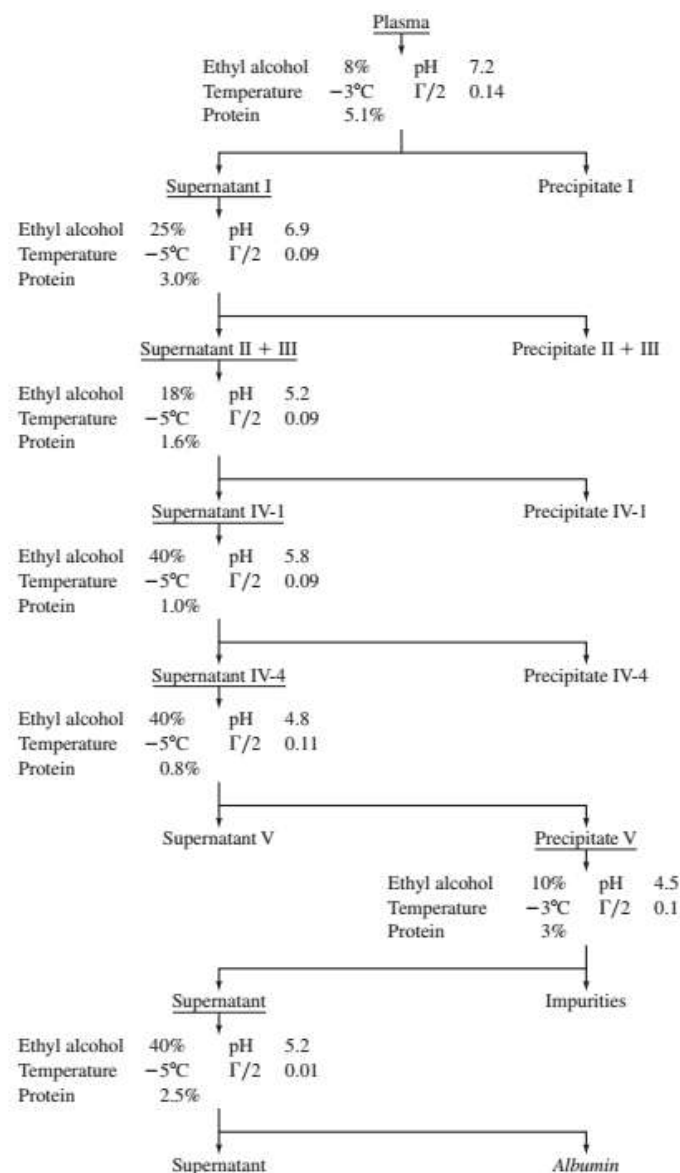


Figura A. Fracionamento de plasma sanguíneo pelo método de Cohn

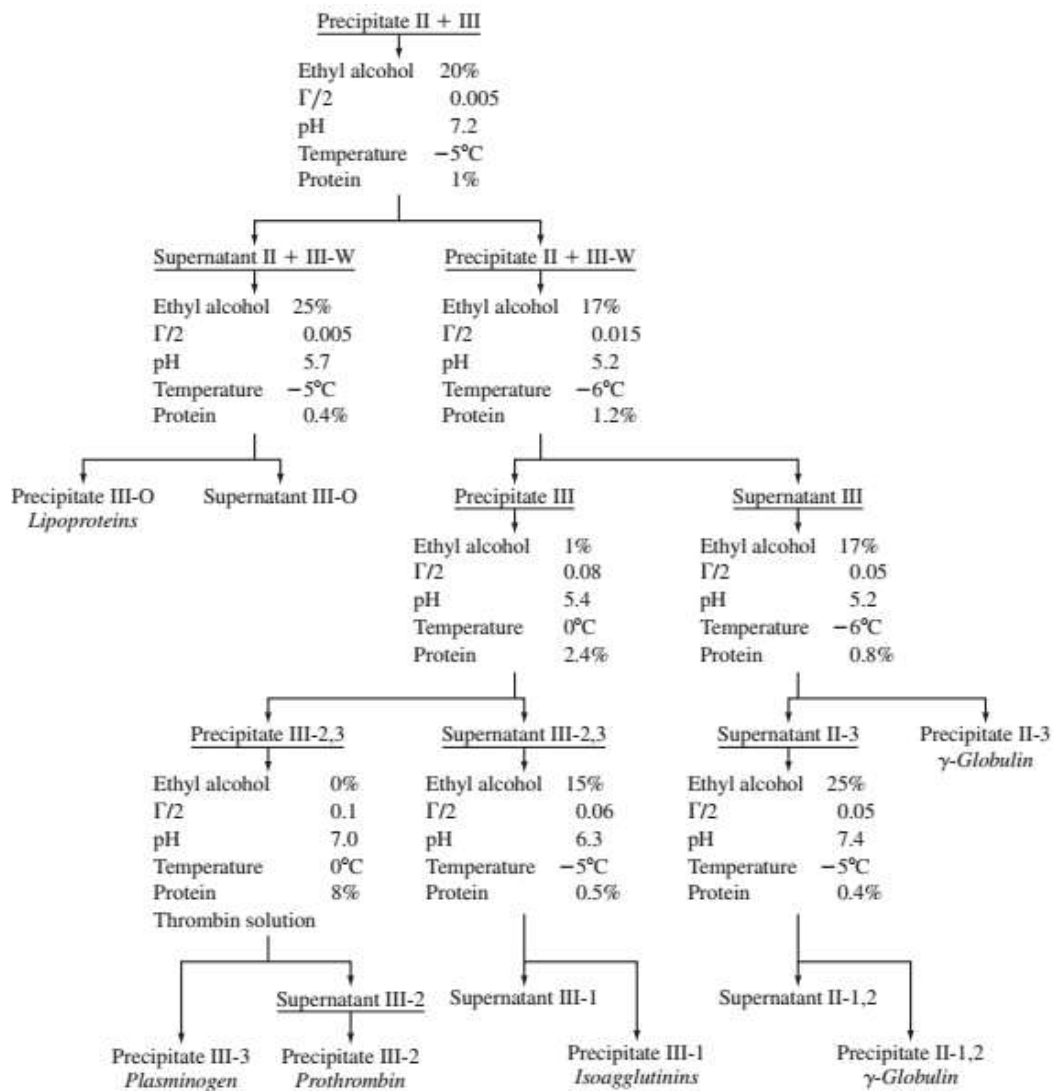


Figura A. Continuação

Fonte: Strong et al. (1948)

Tabelas A. Possíveis promotores indutíveis para expressão em *Pichia pastoris*

INDUT.	GENE CORRESPONDENTE	REGULAÇÃO
AOX1	Álcool oxidase 1	Induzida com MeOH
DAS	Dihidroxiacetona sintase	Induzida com MeOH
FLD1	Formaldeído desidrogenase 1	Induzida com MeOH ou metilamina
ICL1	Isocitrato liase	Reprimida por glicose, induzida pela ausência de glicose e adição de EtOH
PH089	Fosfato simporte	Induzida pela escassez de fosfato
THI11	Biossíntese de tiamina	Reprimida por tiamina
ADH1	Álcool desidrogenase	Reprimida por glicose e metanol, induzida por glicerol e etanol
ENO1	Enolase	Reprimida por glicose, metanol e etanol, induzida por glicerol
GUT1	Glicerol quinase	Reprimida por metanol, induzida por glicerol, glicose e etanol

Tabelas B. Possíveis promotores constitutivos para expressão em *Pichia pastoris*

CONST.	GENE CORRESPONDENTE	REGULAÇÃO
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato desidrog.	Expressão constitutiva em glicose. Menor expressão em glicerol e metanol
TEF1	Fator 1 de alongamento de trans.	Expressão constitutiva em glicose e glicerol
PGK1	3-Fosfoglicerato quinase	Expressão constitutiva em glicose. Menor expressão em glicerol e metanol
GCW14	Proteína ancorada GP1	Expressão constitutiva em glicose, glicerol e metanol
G1	Transportador de glicose	Reprimida por glicerol, induzida por limitação de glicose
G6	Aldeído desidrogenase putativa	Reprimida por glicerol, induzida por limitação de glicose

Fonte: Ahmad et al. (2014)

Tabela C. Vantagens da utilização de *P. pastoris* em sistemas de expressão frente à *S. cerevisiae*

Vantagens de *Pichia pastoris* sobre *Saccharomyces cerevisiae*

- a) Maior produtividade.
- b) Ausência de hiper-glicosilação.
- c) Crescimento em meio com metanol, que inibe crescimento de contaminantes.
- d) Sistema barato para estabelecimento e manutenção em escala industrial.
- e) Integração estável de várias cópias do DNA transformante.
- f) Modificações pós-traducionais mais eficientes, tais como: processamento de sequências sinal, formação de pontes dissulfeto, enovelamento, adição de lipídeos e glicosilação dos tipos O e N.
- g) Melhor secreção do produto recombinante.

Fonte: Cereghino e Cregg (2000) e Neto (2012)

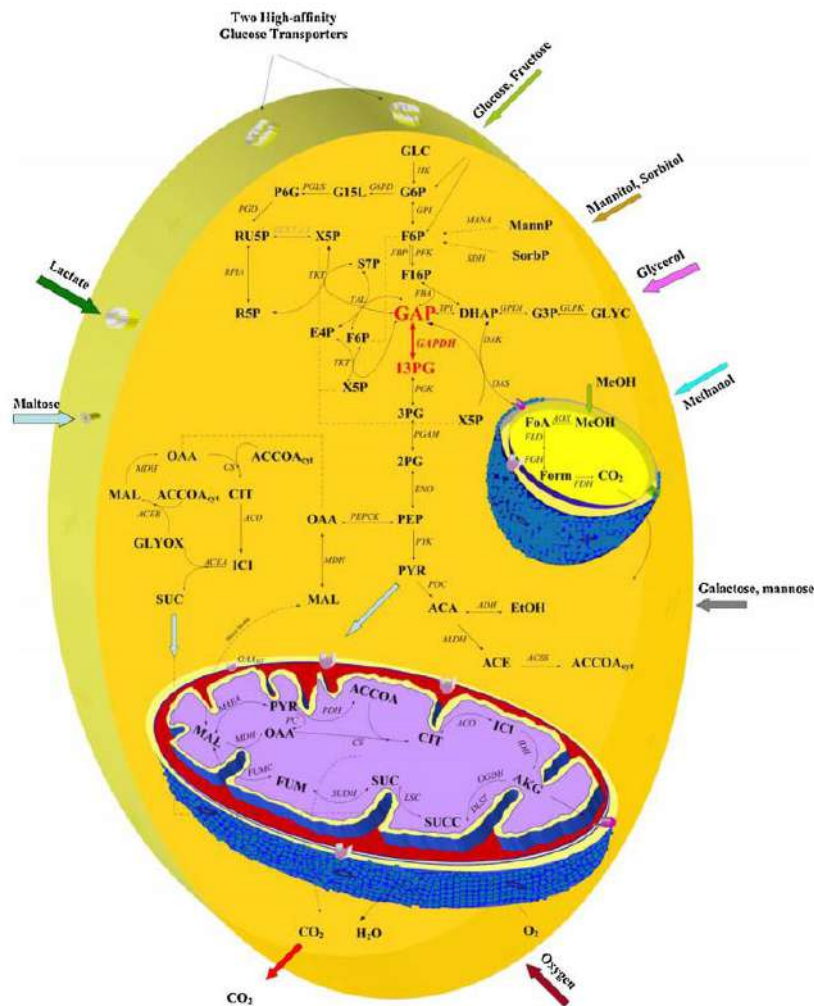


Figura B. Metabolismo global de fontes de carbono em *Pichia pastoris*

Fonte: Çalik et al. (2015)

As abreviações para os metabólitos são as seguintes: GLC: glicose, G6P: glicose-6-fosfato, F6P: frutose-6-fosfato, F16P: frutose-1,6-difosfato, GAP: gliceraldeído-3-fosfato, DHAP: diidroxiacetona fosfato, G3P: glicerol-3-fosfato, GLYC: glicerol, 13PG: 1,3-difosfoglicerato, 3PG: 3-fosfoglicerato, 2PG: 2-fosfoglicerato, PEP: fosfoenolpiruvato, PYR: piruvato, G15L: glucona-1,5-lactona-6-fosfato, P6G: 6-fosfogluconato, RU5P: ribulose-5-fosfato, R5P: ribose-5-fosfato, X5P: xilulose-5-fosfato, S7P: sedoheptulose-7-fosfato, E4P: eritrose-4-fosfato, ACA: acetaldeído, ACE: acetato, EtOH: etanol, ACCOA: acetil-CoA, MeOH: metanol, FormAl: formaldeído, Form: formato, CIT: citrato, ICI: isocitrato, AKG: cetoglutarato, SUCC: succinil-CoA, SUC: succinato, FUM: fumarato, MAL: malato, OAA: oxaloacetato, MannP: manitol fosfato, SorbP: sorbitol fosfato, GLYOX: glioxilato, cyt: citoplasmático, OAAMT: transportador de oxaloacetato.

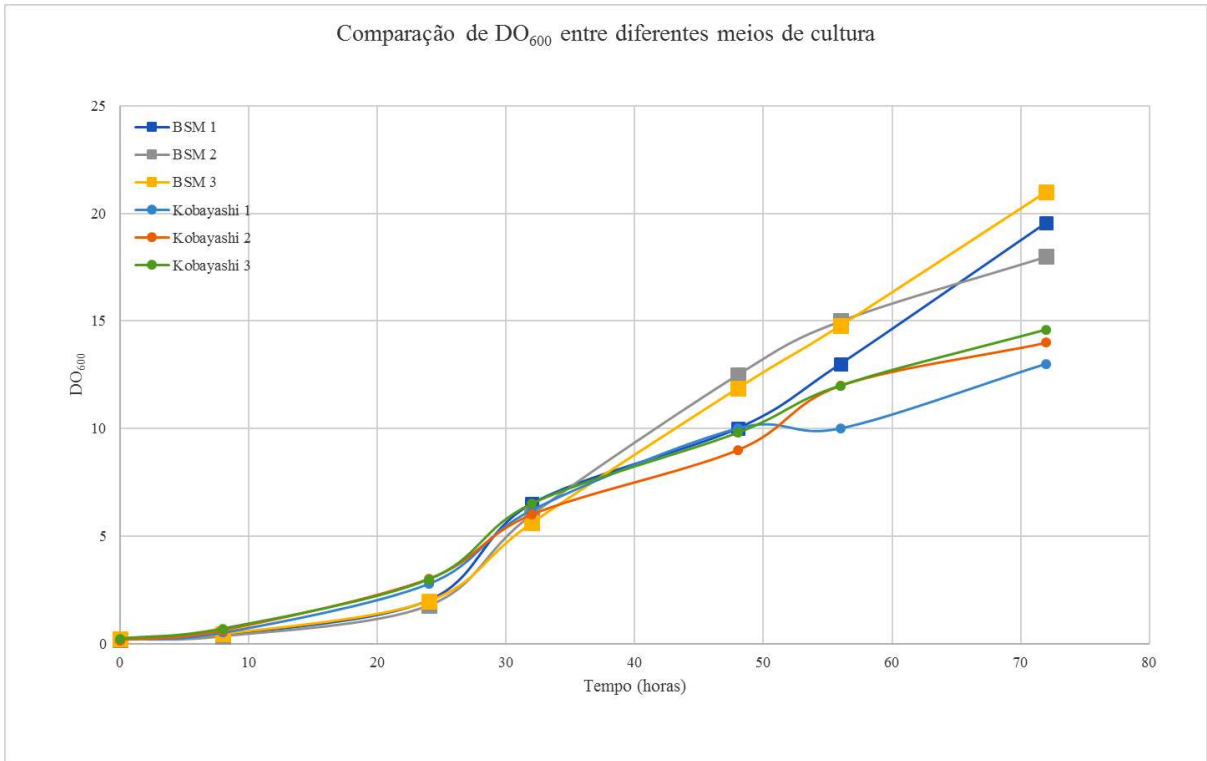


Figura C. Resultados de DO₆₀₀ para diferentes frascos agitados

Análise da curva de OD durante a dessorção por N₂

Taxa de consumo de O₂ (OUR, do inglês *Oxygen Uptake Rate*) = 49.265 mg/(L.h)

$$K_L a = 30,84 \text{ h}^{-1}$$

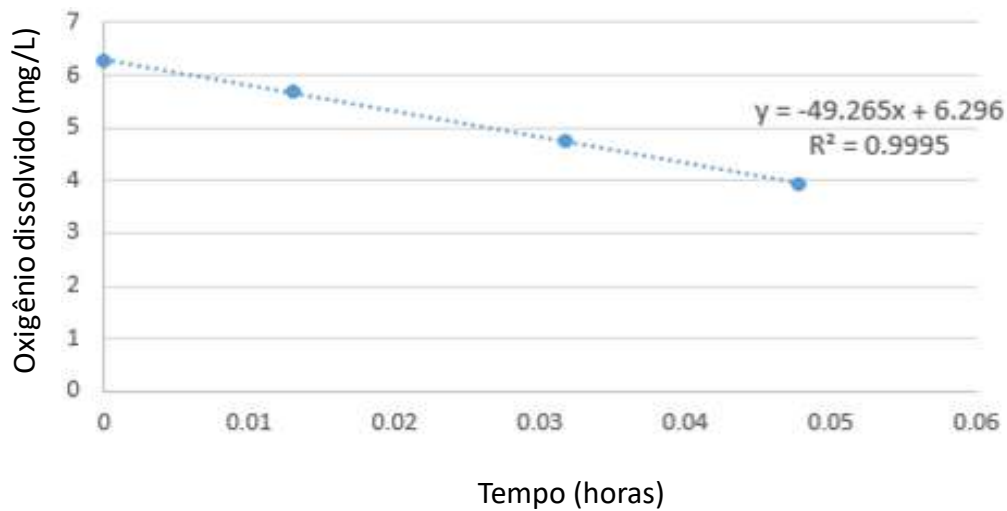


Figura D. Coeficiente global de transferência de O₂



August 6, 2017

**LETTER FOR PERMISSION TO USE RESEARCH WORK IN THE
UNDERGRADUATE FINAL PROJECT AT THE FEDERAL UNIVERSITY OF RIO DE
JANEIRO – UFRJ**

To Whom It May Concern,

This letter is to confirm that Samir Kalaoun Filho, undergraduate student in Chemical Engineering at the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), is allowed to include the material gathered in his research study at the Chemical Biological Engineering Laboratory at the Massachusetts Institute of Technology (MIT) in his undergraduate final project named “Produção de soroalbumina por rota fermentativa utilizando *Pichia pastoris*” at UFRJ.

Sincerely yours,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Hamel'.

Jean-François Hamel
