



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QMC5515 – Estágio Supervisionado

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO DESENVOLVIDO EM ARK P&D EM
BIOLOGIA MOLECULAR S.A. (FLORIANÓPOLIS - SC)**

REGILSON LONDERO DEFANTE

**PROFA. DRA. TATIANE DE ANDRADE MARANHÃO (UFSC) / DRA. MARÍLIA
MARQUES KNYCHALA (ARK)**

Florianópolis

Junho/2026

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO DESENVOLVIDO EM ARK P&D EM
BIOLOGIA MOLECULAR S.A.**

Projeto de Estágio Supervisionado (QMC 5515)
apresentado ao Departamento de Química da
Universidade Federal de Santa Catarina
desenvolvido em ARK P&D em Biologia Molecular S.A., sob supervisão de Dra. Marília
Marques Knychala

Florianópolis

Junho/2026

Sumário

RESUMO.....	6
1. JUSTIFICATIVA.....	7
2. APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	7
3. REVISÃO DA LITERATURA REFERENTE AO TRABALHO DESENVOLVIDO.....	8
3.2 Sistemas de expressão heteróloga em leveduras metilotróficas.....	10
3.3 Fermentação de precisão.....	10
3.4 Análise de substratos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	12
3.5 SDS-PAGE para análise de proteínas.....	14
3.6 Segurança, boas práticas laboratoriais e gerenciamento de resíduos.....	17
4.OBJETIVOS.....	19
4.1 Objetivo Geral.....	19
4.2 Objetivos específicos.....	20
5.METODOLOGIA.....	20
5.1 Reagentes e equipamentos.....	20
5.2 Preparo de meios e soluções.....	21
5.3 Preparo de células competentes e transformação bacteriana.....	23
5.4 Extração de DNA plasmidial (Miniprep).....	25
5.5 Fermentação em biorreator de bancada.....	26
5.6 Análise quantitativa de substratos por HPLC.....	27
5.7 Análise de expressão proteica por SDS-PAGE.....	30
5.8 Segurança laboratorial e gerenciamento de resíduos.....	31

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ESTÁGIO.....	33
6.1 Transformação e seleção de clones.....	33
6.2 Curva de calibração: absorbância versus massa seca.....	34
6.3 Perfil de consumo de substratos e crescimento celular.....	39
6.4 Análise de expressão proteica por SDS-PAGE.....	48
6.5 Experiências profissionais adquiridas.....	52
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	52
8. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO À FORMAÇÃO PROFISSIONAL.....	53
9. REFERÊNCIAS.....	54
10. ANEXOS.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados de correlação entre absorbância (OD600nm) e massa seca (g/L) para os reatores A e B ao longo do cultivo.....	35
Tabela 2: Concentrações de glicerol e metanol (média $\pm$ desvio padrão, n=2) ao longo do cultivo nos reatores A e B.....	40

LISTA DE FIGURAS

Equação 1.....	46
Equação 2.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biorreator em batelada alimentada.....	12
Figura 2: Esquema eletroforese em gel de SDS-PAGE.....	16
Figura 3: Esquema da integração do plasmídeo linearizado no genoma da levedura por recombinação homóloga.....	24
Figura 4: Cromatograma do tempo de retenção de glicerol e metanol. Os picos correspondem aos tempos de retenção de 15,5 min (glicerol) e 22,1 min (metanol)..	28
Figura 5: Curva de calibração área x concentração: A) de glicerol ($R^2 = 0,9902$)., B) metanol ($R^2 = 0,9525$).....	29
Figura 6: Curva de correlação concentração celular vs ABS: Reator A ($R^2 = 0,51$) e Reator B ($R^2 = 0,72$).....	36
Figura 7: Gráfico de consumo de glicerol e metanol vs tempo (Reator A).....	42
Figura 8: Mecanismo de repressão catabólica exercido pelo glicerol sobre o promotor induzível por metanol. Comparação entre condições repressora (glicerol presente) e indutora (metanol, na ausência de glicerol).....	45
Figura 9: SDS-PAGE das amostras reator A (coloração Coomassie Blue).....	48
Figura 10: SDS-PAGE das amostras do reator B (coloração Coomassie Blue).....	50

RESUMO

Este relatório descreve as atividades desenvolvidas durante o estágio supervisionado no setor de Pesquisa e Desenvolvimento da ARK P&D em Biologia Molecular S.A, com sede localizada em São Paulo. O objetivo principal foi a expressão de uma proteína extracelular recombinante, utilizando uma linhagem de levedura geneticamente modificada em processo de fermentação de precisão. Foram realizadas etapas de preparo de meios e soluções, manutenção de microrganismos, transformação genética de bactérias competentes e leveduras, extração plasmidial (miniprep), cultivo em biorreator de bancada e análises de consumo de substratos (glicerol e metanol) por HPLC e expressão proteica por SDS-PAGE. Os resultados mostraram crescimento celular adequado com massa seca máxima de 6,5 g/L, porém o consumo de glicerol foi incompleto, com concentrações residuais de aproximadamente 16 g/L ao final do cultivo, indicando que a fase de indução com metanol foi iniciada antes do esgotamento do substrato. A proteína recombinante foi detectada por SDS-PAGE como uma banda adicional de aproximadamente 66 kDa em amostras induzidas, embora em baixa intensidade. O estágio contribuiu significativamente para a formação profissional, consolidando conhecimentos em biologia molecular, fermentação e análises bioquímicas.

Palavras-chave: Fermentação de precisão; expressão de proteínas; HPLC; SDS-PAGE.

1. JUSTIFICATIVA

A realização do estágio supervisionado na ARK P&D em Biologia Molecular S.A.. foi motivada pela necessidade de aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos no curso de Química Tecnológica da UFSC em um ambiente de inovação biotecnológica. A empresa atua no desenvolvimento de plataformas de expressão de proteínas recombinantes de alto valor agregado, utilizando leveduras geneticamente modificadas para esse fim.

Durante o estágio, participei de todas as etapas do processo produtivo, desde a preparação de meios de cultivo e soluções, manutenção de linhagens e transformação genética até a fermentação em biorreator e as análises do produto por cromatografia líquida e eletroforese. A escolha do tema justifica-se pela crescente demanda por proteínas recombinantes (enzimas, hormônios e anticorpos) obtidas por fermentação de precisão, tecnologia que substitui métodos de extração tradicionais e reduz o impacto ambiental. Além disso, o estágio permitiu integrar conhecimentos de química analítica, bioquímica e engenharia de bioprocessos, áreas essenciais para o profissional que atua no setor de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D).

As atividades foram realizadas sob a supervisão da Dra. Marília Marques Knychala, com acompanhamento acadêmico da Profa. Dra. Tatiane de Andrade Maranhão, totalizando 540 horas de estágio.

2. APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio foi realizado na ARK P&D em Biologia Molecular S.A., com sede localizada na Rua Prof. Artur Ramos, nº 183, Jardim Paulistano, São Paulo – SP, CEP 01454-905 (CNPJ 39.428.022/0001-92). As pesquisas foram desenvolvidas em parceria com a UFSC, nos laboratórios LBMBL (Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras), localizado no Departamento de Bioquímica, no Centro de Ciências Biológicas, e LiEB (Laboratório de Engenharia Biológica), localizado no

Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, no Centro Tecnológico, ambos situados no bairro Córrego Grande, em Florianópolis – SC.

A empresa é dedicada à pesquisa, ao desenvolvimento e à produção de insumos biotecnológicos, com ênfase em proteínas recombinantes destinadas às indústrias farmacêutica, alimentícia e de diagnóstico.

Os laboratórios nos quais atuei são equipados com cabines de fluxo laminar Classe II, biorreator de bancada Bioflo 115 (New Brunswick) (LiEB), agitadores orbitais com controle de temperatura, centrífugas refrigeradas (Eppendorf 5804R) (LBMBL), espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) (LBMBL), sistema de HPLC (Shimadzu LC-2050C com detector RID-20A e coluna HPX-87H), cuba de eletroforese vertical (Bio-Rad), termociclador, freezer a -80°C e autoclave.

Toda a equipe recebeu treinamento em boas práticas laboratoriais, descarte de resíduos e procedimentos para o trabalho com organismos geneticamente modificados, classificados no Nível de Biossegurança 2 (NB-2).

3. REVISÃO DA LITERATURA REFERENTE AO TRABALHO DESENVOLVIDO

Este relatório descreve atividades desenvolvidas em parceria com a ARK P&D em Biologia Molecular S.A., em conformidade com um acordo de confidencialidade firmado entre as partes. Por esse motivo, a identificação exata da linhagem de levedura, do vetor de expressão, do plasmídeo e da proteína recombinante alvo foi intencionalmente omitida ou generalizada ao longo do texto. Essas omissões não constituem falhas na apresentação do trabalho, mas sim requisitos contratuais de sigilo industrial, sendo as informações técnico-científicas preservadas em seu conteúdo essencial.

3.1 Fundamentos de engenharia genética para expressão heteróloga

A engenharia genética é o conjunto de técnicas que permite a manipulação direta do material genético de um organismo, com o objetivo de modificar suas

características ou introduzir novas funcionalidades. No centro desse processo está o DNA (ácido desoxirribonucleico), molécula que contém as instruções para a síntese de proteínas e para o funcionamento celular. O DNA é organizado em unidades funcionais chamadas genes, que codificam proteínas específicas.

Para transferir um gene de um organismo para outro, utiliza-se um vetor, geralmente um plasmídeo – uma molécula de DNA circular, pequena e extracromossômica, naturalmente encontrada em bactérias, que pode ser manipulada para carregar genes de interesse. Os plasmídeos são ferramentas versáteis porque se replicam independentemente do DNA cromossômico e podem ser facilmente introduzidos em células hospedeiras por processos como a transformação (captação de DNA livre do ambiente) ou eletroporação (uso de pulsos elétricos para permeabilizar a membrana celular).

A expressão heteróloga ocorre quando um gene de uma espécie é inserido em um organismo de outra espécie (o hospedeiro), que passa a produzir a proteína correspondente. Para que isso ocorra, o gene de interesse é colocado sob o controle de um promotor – uma sequência regulatória que ativa a transcrição do gene em resposta a um estímulo específico (como a presença de um indutor químico). O processo de transcrição gera uma molécula de RNA mensageiro (mRNA), que é traduzida pelos ribossomos para produzir a proteína alvo.

A recombinação homóloga é o mecanismo pelo qual o DNA exógeno (como um plasmídeo linearizado) se integra ao genoma do hospedeiro. Esse processo ocorre quando há regiões de DNA com sequências idênticas (homólogas) entre o vetor e o genoma; durante a recombinação, as sequências homólogas se alinham e ocorre a troca de material genético, resultando na inserção estável do gene de interesse no cromossomo da célula hospedeira. Essa integração garante que a característica seja herdada pelas gerações seguintes, ao contrário de plasmídeos episomais, que podem ser perdidos.

Esses conceitos são fundamentais para compreender as etapas de transformação genética descritas neste trabalho, bem como a construção da linhagem recombinante utilizada nas fermentações

3.2 Sistemas de expressão heteróloga em leveduras metilotróficas

Leveduras metilotróficas constituem uma plataforma consolidada para a produção heteróloga de proteínas recombinantes, sendo amplamente empregadas em processos biotecnológicos industriais. Esses microrganismos são capazes de utilizar metanol como única fonte de carbono e energia graças à presença de enzimas específicas da via metabólica do metanol, como a álcool oxidase e a di-hidroxiacetona sintase. O sistema de expressão baseia-se em um promotor fortemente induzível por metanol, que viabiliza elevados níveis de transcrição gênica e a secreção da proteína de interesse para o meio extracelular, simplificando significativamente as etapas posteriores de purificação^{1,2}.

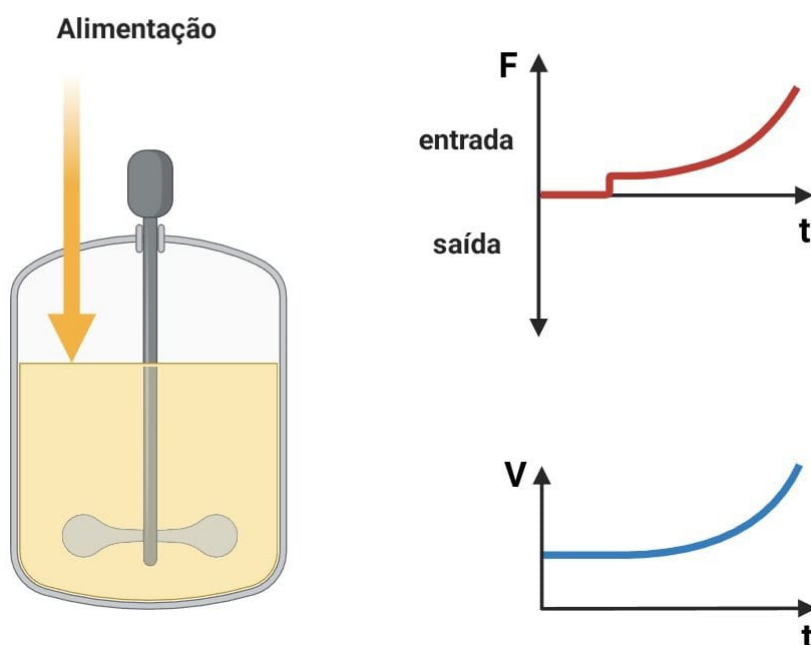
A linhagem utilizada no presente trabalho é uma cepa selvagem prototrófica, ou seja, não apresenta exigências nutricionais específicas, sendo transformada com vetores de expressão portadores de marcadores de seleção dominantes, dispensando a suplementação do meio com nutrientes complexos para a manutenção da construção genética. A elevada capacidade de secreção e a possibilidade de cultivo em altas densidades celulares tornam esse sistema particularmente atrativo para a produção de proteínas de alto valor agregado nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de diagnóstico³.

3.3 Fermentação de precisão

A fermentação de precisão emprega microrganismos recombinantes – organismos que recebem, por engenharia genética, genes heterólogos que lhes conferem a capacidade de produzir moléculas específicas (proteínas, lipídeos, ácidos orgânicos, entre outras) que não fazem parte de seu metabolismo nativo. Esses

microrganismos atuam como “*fabricas celulares*” e são cultivados em condições rigorosamente controladas para maximizar a síntese do produto de interesse. Diferentemente da fermentação tradicional, que visa a produção de biomassa ou metabólitos primários, a fermentação de precisão é direcionada à obtenção de compostos de alto valor agregado, geralmente de origem não nativa ao hospedeiro. O processo em biorreator envolve, tipicamente, duas fases principais: (i) uma fase de batelada, na qual uma fonte de carbono de crescimento (como glicose, glicerol ou outro substrato) é utilizada para a multiplicação celular e acúmulo de biomassa; e (ii) uma fase de batelada alimentada, na qual o indutor (no caso, metanol) é adicionada de forma controlada para ativar o promotor e desencadear a expressão de proteína alvo⁴. Parâmetros operacionais, como pH, temperatura, oxigênio dissolvido e agitação/aeração, são críticos para o sucesso do cultivo. O monitoramento em tempo real desses parâmetros, aliado à coleta de amostras para análises, permite ajuste finos durante o processo e garante a reprodutibilidade entre bateladas. Na Figura 1 encontra-se o esquema simplificado de um biorreator em batelada similar ao usado no estágio.

Figura 1: Biorreator em batelada alimentada



Fonte: Biorender: Bioreactor Operation Mode: Fed Batch, acesso em 29 jun 2026

3.4 Análise de substratos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) é uma das técnicas analíticas mais empregadas para a separação, identificação e quantificação de compostos em matrizes complexas, sendo amplamente utilizada em bioprocessos para o monitoramento de substratos e produtos metabólicos. Sua versatilidade decorre da variedade de detectores disponíveis, cada um com princípios de detecção específicos que atendem a diferentes classes de analitos.

Entre os detectores utilizados em HPLC, o detector de índice de refração (*Refractive Index Detector* – RID) destaca-se por sua capacidade de resposta universal. Diferentemente de detectores baseados em absorção UV-Vis, que exigem que o analito possua cromóforos, ou detectores de fluorescência, que requerem propriedades específicas de emissão de luz, o RID responde a qualquer composto que

apresente índice de refração diferente do da fase móvel. O princípio de funcionamento do RID baseia-se no fenômeno de refração da luz: quando um feixe de luz atravessa meios com índices de refrações distintos, sua trajetória é desviada – fenômeno descrito pela Lei de Snell. No detector, a luz emitida por uma lâmpada (tipicamente de tungstênio ou LED) passa por duas células ópticas: uma célula de referência, preenchida com fase móvel pura, e uma célula de amostra, por onde passa o efluente da coluna contendo os analitos. Enquanto apenas fase móvel flui, os dois caminhos ópticos são idênticos e o feixe de luz não sofre desvio. Quando um analito elui da coluna o índice de refração na célula de amostra se altera, provocando um desvio no feixe de luz que é detectado por um fotodiodo e convertido em um sinal elétrico proporcional à concentração do analito. Por essa razão, o RID é frequentemente denominado “*detector universal*”.

Apesar de sua universalidade, o RID apresenta limitações importantes que devem ser consideradas no planejamento analítico. Por ser um detector que mede uma propriedade física do solvente (o índice de refração), ele é extremamente sensível a variações de temperatura, pressão e composição da fase móvel. Pequenas flutuações térmicas ou gradientes de composição podem gerar ruído significativo na linha de base e comprometer a reprodutibilidade das análises. Por essa razão, o RID exige eluição isocrática (composição constante da fase móvel ao longo de toda a corrida) e controle rigoroso da temperatura ambiente e do forno da coluna. Além disso, sua sensibilidade é inferior à dos detectores como UV-vis, espectrometria de massas ou de espalhamento de luz evaporativo (ELSD), sendo mais adequado para analitos presentes em concentrações relativamente elevadas, como é o caso de substratos e metabólitos em caldos de fermentação.

No contexto de bioprocessos, o RID é amplamente empregado para a quantificação de carboidratos, álcoois e ácidos orgânicos, classes de compostos que não absorvem na região do UV-Vis e, portanto, não são detectáveis por métodos

espectrofotométricos convencionais. Diversos estudos reportam o uso de HPLC-RID para o monitoramento de fermentações, incluindo determinação simultânea de glicose e metanol em meios de cultura complexos⁵. A técnica tem sido aplicada com sucesso na análise de açúcares e álcoois em caldos fermentativos⁶, na quantificação de ácidos orgânicos e álcoois em vinhaça de cana-de-açúcar⁷, e no monitoramento de metabólitos em cultivos de células de mamíferos. Sua principal vantagem nesses contextos é a simplicidade do preparo de amostras – frequentemente limitado a centrifugação e filtração – e a possibilidade de quantificação direta sem derivatização o que reduz custos e tempo de análise.

Diante desse panorama, a escolha do HPLC-RID para o monitoramento do consumo de glicerol e metanol no presente trabalho é justificada pela natureza dos analitos (ambos sem cromóforos UV-Vis), pela robustez do método para matrizes de fermentação e pela adequação da técnica à faixa de concentrações esperadas (da ordem de g/l). A literatura reporta condições cromatográficas semelhantes às empregadas neste estudo, incluindo o uso de colunas de troca iônica e fase móvel acidificada, para a separação eficiente desses compostos em meios complexos^{8,9}. Zhu et al.¹⁰ utilizaram condições cromatográficas idênticas para separação e quantificação simultânea de glicerol e metanol em caldos de fermentação de leveduras metilotróficas. A técnica mostrou-se adequada para o acompanhamento do consumo de substratos ao longo do cultivo.

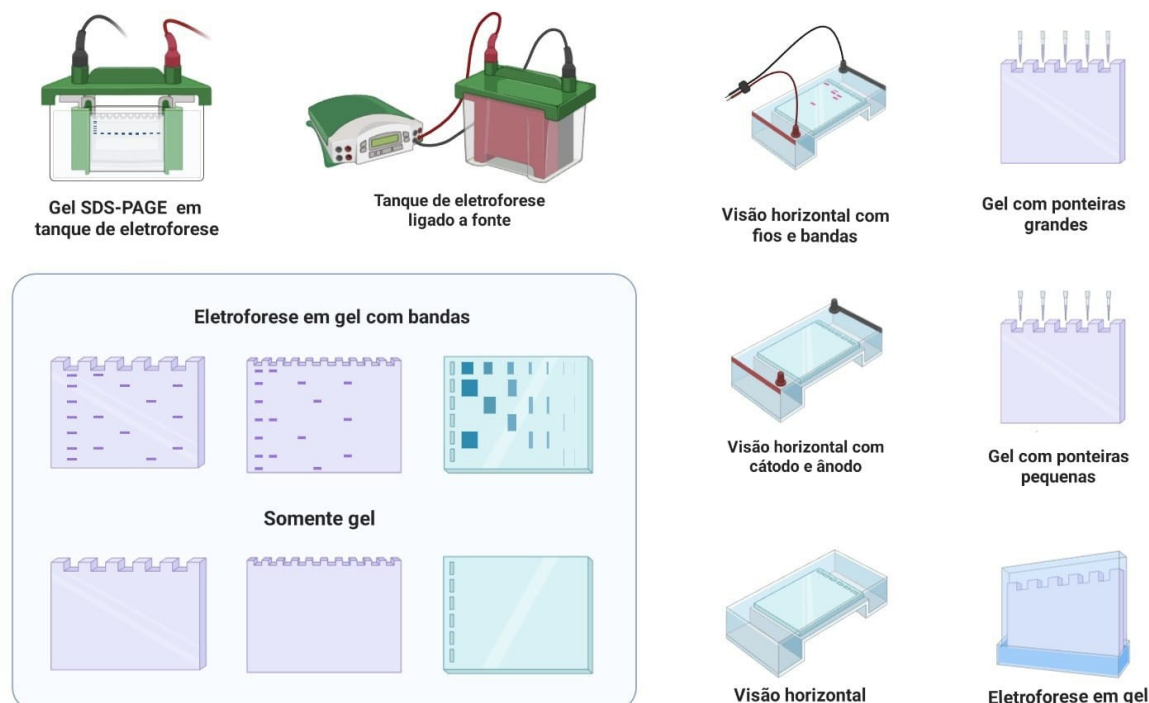
3.5 SDS-PAGE para análise de proteínas

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é uma técnica analítica fundamental para a separação, caracterização e estimativa da pureza de proteínas, sendo amplamente empregada em laboratórios de bioquímica e biologia molecular desde sua introdução por Laemmli em 1970¹¹. O princípio da técnica baseia-se na combinação de três elementos: um surfactante aniônico (SDS), um agente redutor e uma matriz de poliacrilamida, que

juntos conferem à separação uma relação direta entre a mobilidade eletroforética e a massa molecular da proteína. Na Figura 2 encontra-se a representação esquemática de um SDS-PAGE.

O dodecil sulfato de sódio (SDS) é um surfactante aniônico que se liga às proteínas de forma proporcional à sua massa, na razão aproximada de 1,4 g de SDS por grama de proteína. Essa ligação ocorre predominantemente por interações hidrofóbicas entre a cauda alquílica do SDS e as regiões apolares da cadeia polipeptídica, enquanto o grupo sulfato confere uma densidade de carga negativa elevada. Esse processo, combinado ao aquecimento e à presença de um agente redutor (como β -mercaptoetanol ou ditioneitol), promove a desnaturação completa da proteína, rompendo pontes de dissulfeto e destruindo a estrutura terciária. Como resultado, a carga elétrica intrínseca da proteína é mascarada, e todas as cadeias polipeptídicas passam a ter uma relação carga/massa aproximadamente constante, de modo que a mobilidade eletroforética depende essencialmente do tamanho da cadeia (volume hidrodinâmico), que é proporcional à sua massa molecular.

Figura 2: Esquema eletroforese em gel de SDS-PAGE



Fonte: Biorender: Gel electrophoresis, acesso em 29 jun 2026

A separação ocorre em um gel de poliacrilamida composto por duas camadas com funções distintas. O gel de empilhamento (*stacking gel*), com baixa concentração de acrilamida (poro maiores) e pH 6,8, atua como um concentrador de amostras. Nesse pH, a glicina do tampão de corrida encontra-se predominantemente na forma zwitteriônica (ponto isoelétrico ~6,0), apresentando baixa mobilidade, enquanto os íons cloreto são altamente móveis. Essa diferença de mobilidade cria um gradiente de campo elétrico que “empilha” as proteínas em uma zona extremamente estreita – um fenômeno conhecido como efeito isotacoforético. As proteínas concentradas migram então para o gel separador (*resolving gel* ou *main gel*), que possui pH 8,8 e maior concentração de acrilamida (poros menores). Nesse ambiente alcalino, a glicina torna-se totalmente ionizada e altamente móvel, ultrapassando as proteínas. A separação efetiva ocorre por peneiramento molecular: as cadeias polipeptídicas menores atravessam os poros da matriz com maior facilidade, enquanto as maiores encontram

maior resistência e migram mais lentamente. A relação entre a mobilidade relativa (R_f) das proteínas e o logaritmo de sua massa molecular é aproximadamente linear, o que permite a estimativa do peso molecular por comparação com padrões de massa conhecida.

Após a separação eletroforética, as proteínas precisam ser visualizadas. O *Coomassie Brilliant Blue R-250* é o corante mais utilizado para essa finalidade devido à sua simplicidade, baixo custo e sensibilidade adequada (detecção na faixa de 0,1 a 1 μg de proteína por banda). O mecanismo de ligação envolve interações eletrostáticas entre o grupo sulfônico do corante (carga negativa) e resíduos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), bem como interações hidrofóbicas entre o anel aromático do corante e regiões apolares da proteína. O complexo corante-proteína desloca seu máximo de absorção para 595 nm, permitindo a visualização de bandas azul-escuras em fundo claro após remoção de excesso de corante com solução de metanol/ácido acético.

No contexto de biotecnologia e da produção de proteínas recombinantes, a SDS-PAGE é empregada em múltiplas etapas do processo: desde a triagem de clones transformantes (avaliando a presença da proteína de interesse no sobrenadante), passando pelo monitoramento da cinética de expressão ao longo da indução, até a avaliação da pureza das frações obtidas nas etapas de purificação. A técnica permite detectar a presença de proteínas contaminantes, avaliar o grau de degradação ou agregação e estimar o título da proteína alvo, ainda que de forma semiquantitativa. Sua simplicidade e reprodutibilidade tornam-na uma ferramenta indispensável no desenvolvimento e monitoramento de processos de expressão heteróloga.

3.6 Segurança, boas práticas laboratoriais e gerenciamento de resíduos

A manipulação de reagentes químicos e agentes biológicos em laboratórios de biologia molecular exige a adoção rigorosa de medidas de segurança, boas práticas laboratoriais e procedimentos adequados de descarte, uma vez que os riscos

envolvidos são de naturezas distintas – químicos (toxicidade, inflamabilidade, corrosividade) e biológicos (infecção, liberação de organismos geneticamente modificados no ambiente).

Todos os procedimentos envolvendo microrganismos recombinantes foram conduzidos em cabines de fluxo laminar Classe II, cujo princípio de funcionamento é que o ar do ambiente é aspirado por um ventilador, passa por um filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Air*), que retém partículas e microrganismos com eficiência superior a 99,97% para partículas de 0,3 μm , e é soprado em um fluxo laminar – ou seja, um fluxo de ar paralelo, uniforme e sem turbulências – sobre a área de trabalho. Esse fluxo contínuo de ar filtrado cria uma barreira física que impede que partículas e microrganismos do ambiente entrem na zona de trabalho, mantendo a amostra estéril.

Para as cabines de classe II, o fluxo de ar é vertical (de cima para baixo) e uma parte do ar é recirculada após passar pelo filtro HEPA, enquanto outra parte é exaurida também por um filtro HEPA. Isso protege três elementos: a amostra (não é contaminada por microrganismos do ar), o operador (o ar que sai da cabine é filtrado, retraindo agentes biológicos) e o ambiente (não há liberação de microrganismos para o laboratório)

A utilização da cabine de fluxo laminar Classe II é obrigatória para trabalhos com organismos classificados no Nível de Biossegurança 2 (NB-2), categoria aplicável a microrganismos que apresentam risco moderado – capazes de causar doenças em humanos, mas com tratamento disponível e risco limitado de disseminação. Em termos práticos, o NB-2 exige, além da cabine de fluxo laminar, acesso restrito ao laboratório, pias para lavagem de mãos, superfícies impermeáveis e de fácil descontaminação, uso de jaleco de manga longa, luvas de procedimento (nitrila), e descontaminação de todos os resíduos biológicos em autoclave antes do descarte. O uso de luvas de nitrila, em particular, é uma escolha adequada para a interface entre

os riscos químicos e biológicos, pois oferece resistência tanto a agentes biológicos quanto a solventes orgânicos e corrosivos.

Para a manipulação de reagentes químicos, os princípios aplicados são: capela química com exaustão para compostos voláteis e tóxicos (metanol, acrilamida, TEMED, ácidos concentrados), armazenamento adequado e fichas de dados de segurança (MSDS) disponíveis. Atenção especial foi dispensada à acrilamida (neurotóxica, com potencial de absorção cutânea), ao metanol (inflamável e tóxico), ao TEMED (irritante e sensibilizante) e aos ácidos concentrados (corrosivos).

O gerenciamento de resíduos seguiu rigorosamente o plano de gerenciamento do laboratório, com segregação em três fluxos principais: (i) resíduos biológicos – autoclavados antes do descarte; (ii) resíduos químicos orgânicos – segregados por compatibilidade e encaminhados para coleta via canal de tratamento da UFSC; e (iii) resíduos aquosos não tóxicos – neutralizados e descartados na rede de esgoto somente após autorização. A integração entre os protocolos de segurança química e biológica é essencial em laboratórios de biotecnologia, assegurando a integridade dos experimentos, a segurança da equipe e a responsabilidade socioambiental da instituição.

4.OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver competências práticas em biologia molecular, cultivo microbiano e análises bioquímicas por meio da expressão de uma proteína recombinante de interesse em sistema heterólogo de levedura, em biorreator de bancada, com monitoramento analítico por cromatografia líquida (HPLC) e eletroforese (SDS-PAGE).

4.2 Objetivos específicos

- Preparar meios de cultivo e soluções para as etapas de propagação celular, indução da expressão e análises bioquímicas.
- Realizar transformação genética em sistemas bacterianos e eucarióticos com vetores de expressão adequados para cada sistema, contendo o gene que codifica a proteína de interesse.
- Extrair DNA plasmidial (miniprep) e confirmar sua integridade por eletroforese em gel de agarose.
- Conduzir fermentações em biorreator de bancada, compreendendo as fases de batelada (crescimento celular) e de batelada alimentada (indução da expressão com metanol), em experimentos realizados em duplicata.
- Monitorar o consumo da fonte de carbono de crescimento e do indutor (metanol) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).
- Quantificar o crescimento celular por meio de absorbância (OD_{600nm}) e correlação com massa seca.
- Analisar a expressão da proteína recombinante por eletroforese (SDS-PAGE), com coloração por Coomassie Blue.
- Registrar os dados obtidos, organizá-los em planilhas e discutir os resultados à luz da literatura científica disponível.

5.METODOLOGIA

5.1 Reagentes e equipamentos

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, provenientes de fornecedores consagrados no mercado de insumos laboratoriais (Sigma-Aldrich,

Merck, Invitrogen, entre outros). Os equipamentos principais empregados ao longo do estágio incluem: Cabine de fluxo laminar CFLC 09 (Veco) e BIOPROTECTOR 09 (Veco), termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific), shaker orbital TE-424 (TECNAL) e shaker orbital INNOVA®44 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC), biorreator Bioflo 115 (Eppendorf), centrífuga de microtubos MCD-2000 (Hsiangtai), espectrofotômetro UV-5100 UV-VIS SPECTROPHOTOMETER (TECNAL), centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf), leitora de pH de bancada K39-1014B (KASVI) cuba eletroforética Mini-PROTEAN (Bio-Rad), fonte de alimentação PowerPac (Bio-Rad), freezer -80 °C.

5.2 Preparo de meios e soluções

Os meios de cultivo foram preparados de acordo com protocolos estabelecidos no laboratório, com composições ajustadas às necessidades metabólicas de cada fase do processo.

Para a manutenção e propagação do hospedeiro bacteriano, foi utilizado meio LB (Luria-Bertani) contendo extrato de levedura (5 g/L), peptona (10 g/L) e cloreto de sódio (10 g/L), suplementando com ampicilina (100 µg/mL) como agente seletivo para a manutenção do plasmídeo. O meio foi solidificado com ágar (20 g/L) para plaqueamento e preparado em meio líquido para cultivos em frascos agitados. Nos experimentos de transformação da levedura, foi utilizada zeocina (100 µg/mL) como marcador de seleção dominante para manutenção da construção genética integrada ao genoma.

Para o cultivo da levedura recombinante, foram empregados diferentes meios conforme a etapa do processo:

Meio para pré-inóculo e crescimento inicial: meio complexo contendo extrato de levedura (10 g/L), peptona (20 g/L) e fonte de carbono (glicose/dextrose a 20 g/L),

com adição de ampicilina (1 µg/mL) para manutenção da pressão seletiva. A escolha da ampicilina em baixa concentração visa prevenir contaminações bacterianas sem interferir no metabolismo da levedura.

Meio para inóculo em frascos agitados: meio tamponado com fosfato de potássio 0,1M pH 5,0, contendo extrato de levedura (10 g/L), peptona (20 g/L), fontes de nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio – 5,17 g/L), vitaminas (biotina – 0,2 mg/L) e glicerol (20g/L) como principal fonte de carbono, além de uma solução de micronutrientes essenciais (PTM4, 4 mL/L). A biotina é adicionada como cofator essencial para o metabolismo da levedura, uma vez que a linhagem utilizada é prototrófica, mas a biotina é necessária para o crescimento em meio mínimo.

Meio mineral basal para a fermentação em biorreator: meio composto por fontes de fósforo (ácido fosfórico 85% – 21,6 mL/L), potássio (K_2SO_4 – 27,24 g/L), magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 4,48 g/L), cálcio ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,36 g/L) e outros sais inorgânicos, suplementado com solução de micronutrientes PTM4 (4,35 mL/L) – contendo sais de metais de transição ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $ZnCl_2$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, entre outros), vitaminas (biotina) e agente acidificante (H_2SO_4) para solubilização – e agente antiespumante (Antifoam J650 – 0,3 mL/L). A fonte de carbono (glicerol) foi adicionada diretamente ao meio antes da esterilização na concentração inicial de 30 g/L.

Todas as soluções de vitaminas e micronutrientes foram preparadas em água ultrapura, filtradas em membranas de 0,22 µm para a esterilização e armazenadas sob refrigeração. Os meios complexos foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos, e os componentes termolábeis (vitaminas, soluções de micronutrientes e antibióticos) foram filtrados em membrana 0,22 µm e adicionados após o resfriamento do meio.

5.3 Preparo de células competentes e transformação bacteriana

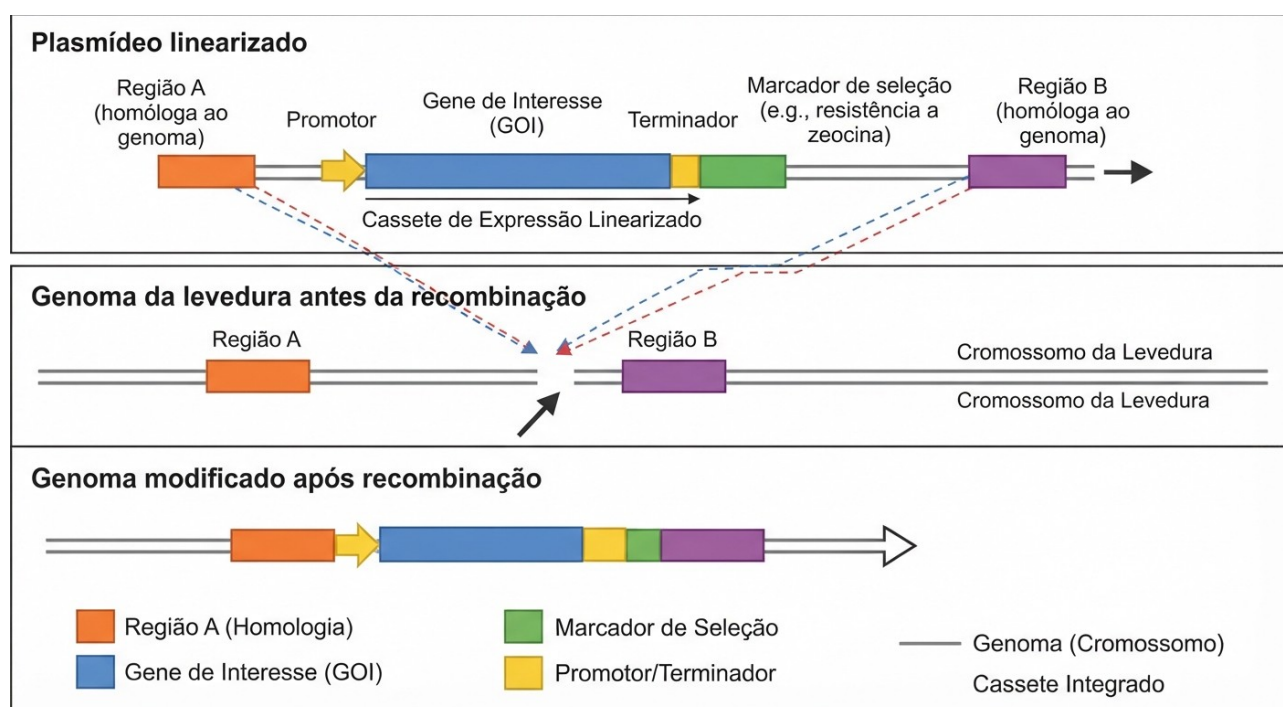
Para a manutenção e propagação do hospedeiro bacteriano (*Escherichia coli*, linhagem DH5 α – amplamente utilizada para clonagem e manutenção de plasmídeos), as células competentes foram preparadas pelo método de cloreto de cálcio, utilizando solução contendo CaCl₂ (60 mmol/L), glicerol (15%) e tampão Pipes (ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanossulfônico)) 10 mmol/L em pH 7,0. As células foram cultivadas em meio LB líquido a 37 °C sob agitação (200 rpm) até atingir densidade óptica OD₆₀₀ = 0,4–0,6 (fase exponencial de crescimento), condição na qual a parede celular está mais permeável à captação de DNA exógeno. Em seguida, as células foram resfriadas em gelo por 10 minutos, centrifugadas (1600 g, 10 min, 4 °C), ressuspensas na solução de competência gelada e aliquotadas (200 μ L por tubo) para armazenamento a –80 °C.

A transformação das células bacterianas competentes foi realizada por choque térmico: adição de 2 μ L de DNA plasmidial (contendo o gene de interesse e marcador de seleção zeocina), incubação em gelo por 5 minutos, choque térmico a 42 °C por 2 minutos, retorno ao gelo por 2 minutos, adição de 500 μ L de meio LB e incubação a 37 °C com agitação (160 rpm) por 1 hora para expressão do marcador de resistência. As células foram então plaqueadas em meio LB-ágar contendo zeocina (100 μ g/mL) e incubadas a 37 °C por 16 horas.

Para o hospedeiro eucariótico (levedura), as células competentes foram preparadas utilizando um protocolo químico comercial à base de polietilenoglicol (PEG), sorbitol e dimetilsulfóxido (DMSO). A transformação foi conduzida com o mesmo plasmídeo, previamente linearizado com enzima de restrição (PmeI) para favorecer a integração no genoma do hospedeiro por recombinação homóloga. O processo de integração é ilustrado esquematicamente na Figura 3. O plasmídeo linearizado, contendo o gene de interesse flanqueado por regiões homólogas ao genoma da levedura, é incorporado ao cromossomo por recombinação entre

sequências idênticas. A seleção dos transformantes é feita pelo marcador de resistência à zeocina, que confere capacidade de crescimento em meio contendo o antibiótico.

Figura 3: Esquema da integração do plasmídeo linearizado no genoma da levedura por recombinação homóloga.



Fonte: Gerado por inteligência artificial Gemini (NanoBanana 2), Autor, 2026

O plasmídeo linearizado contém o gene de interesse (GOI) e o marcador de seleção (zeocina), flanqueados por regiões homólogas ao genoma (A e B). Após a transformação, ocorre recombinação entre as regiões homólogas, resultando na integração estável do cassete de expressão no cromossomo da levedura.

Procedimento de transformação: 3 µg do DNA linearizado foram adicionados a 50 µL de células competentes, seguido de incubação com 1 mL de solução de PEG por 1 hora a 30 °C (com agitação a cada 15 minutos). O choque térmico foi realizado a 42 °C por 10 minutos, seguido de adição de 1 mL de meio de recuperação (meio complexo

com glicose) e incubação a 30 °C por 1 hora para expressão do marcador de seleção. As células transformadas foram então plaqueadas em meio sólido contendo zeocina (100 µg/mL) e incubadas a 30 °C por 3 a 4 dias, até o aparecimento de colônias isoladas.

Após o plaqueamento e incubação, as colônias transformadas foram submetidas à extração de DNA plasmidial (conforme descrito na Seção 5.4) e analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, com o objetivo de verificar a presença e a integridade do plasmídeo recombinante. As colônias que apresentaram o perfil esperado no gel (banda compatível com o plasmídeo íntegro) foram selecionadas para as etapas subsequentes. A escolha final do clone a ser utilizado nos experimentos em biorreator foi realizada pela supervisora do projeto, com base em sua experiência prévia com a linhagem e o vetor utilizados, bem como em critérios técnicos da equipe de P&D. Como estagiário, meu papel nessa etapa consistiu na execução dos procedimentos de transformação, plaqueamento, extração de DNA e preparo dos géis de agarose, enquanto a decisão final sobre qual clone escalar para a fermentação foi de responsabilidade da supervisão.

5.4 Extração de DNA plasmidial (Miniprep)

A extração de DNA plasmidial a partir de colônias bacterianas transformadas foi realizada pelo método de lise alcalina. As colônias foram inoculadas em meio líquido contendo o agente seletivo e cultivadas *overnight* a 37 °C sob agitação. Uma alíquota da cultura foi centrifugada, e o sedimento celular foi ressuspenso em solução contendo glicose, Tris-HCl (pH 8,0) e EDTA (Solução I). Em seguida, adicionou-se solução alcalina de lise contendo hidróxido de sódio (NaOH) e dodecil sulfato de sódio (SDS) (Solução II), com agitação suave e incubação em gelo. A neutralização e precipitação do DNA genômico e proteínas foi realizada com solução de acetato de potássio (pH 4,8) (Solução III), seguida de centrifugação. O sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi transferido para novo tubo, e o DNA foi precipitado com etanol

absoluto na presença de cloreto de sódio, mantido a baixa temperatura por algumas horas ou *overnight*, e recuperado por centrifugação. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco à temperatura ambiente e ressuspenso em água ultrapura. A integridade e a concentração do DNA obtido foram avaliadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose 1%, com visualização sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio.

5.5 Fermentação em biorreator de bancada

O processo fermentativo foi conduzido em biorreator de bancada com volume de trabalho de aproximadamente 0,4 L, em experimentos realizados em duplicata para garantir a reprodutibilidade. O processo foi dividido em duas fases principais: batelada (crescimento celular) e batelada alimentada (indução da expressão).

Pré-inóculo: A linhagem recombinante da levedura foi plaqueada em meio complexo sólido e incubada a 30 °C por 48 horas. Uma colônia isolada foi transferida para frasco Erlenmeyer contendo meio complexo líquido com fonte de carbono e antibiótico, e incubada em agitador orbital a 30 °C e 200 rpm por aproximadamente 24 horas.

Inóculo: O pré-inóculo foi utilizado para inocular frascos contendo meio tamponado com glicerol e solução de micronutrientes, na proporção de 10% (v/v). Os frascos foram incubados a 30 °C e 200 rpm por 24 horas, até atingir densidade celular adequada para a inoculação do biorreator.

Cultivo em modo batelada: O biorreator foi esterilizado em autoclave com fração do meio mineral basal contendo a fonte de carbono (glicerol) em concentração inicial determinada. Após resfriamento, o inóculo foi centrifugado, ressuspenso em solução salina peptonada estéril e transferido assepticamente para o reator. As condições operacionais foram ajustadas para: temperatura 30 °C, pH mantido entre

5,0 e 5,5 por adição automática de base (NH_4OH), agitação variável em modo cascata, variando entre 150-700 rpm, aeração com ar comprimido filtrado com vazão entre 0,1 e 2,0 vvm, para manter o oxigênio dissolvido acima de 30% de saturação, conforme recomendado por Yang et al.¹² para cultivos em escala de bancada. A fase batelada foi conduzida até 16 horas do início do processo.

Fase de batelada alimentada (indução com metanol): Após 16 horas de do início do cultivo, a temperatura do reator foi reduzida para a faixa de 24-28 °C, visando otimizar o dobramento e a estabilidade da proteína recombinante.

Iniciou-se então a alimentação contínua com indutor (metanol), acrescido da solução de micronutrientes para suportar a atividade metabólica. A vazão de alimentação foi ajustada de forma escalonada, com incrementos progressivos ao longo do tempo. O objetivo foi manter a concentração de indutor em uma faixa que garantisse a ativação máxima do promotor sem causar toxicidade ou inibição do crescimento. A fase de indução foi mantida por mais 8 horas, com coletas de amostras para análises *offline* de biomassa, substratos e expressão proteica.

5.6 Análise quantitativa de substratos por HPLC

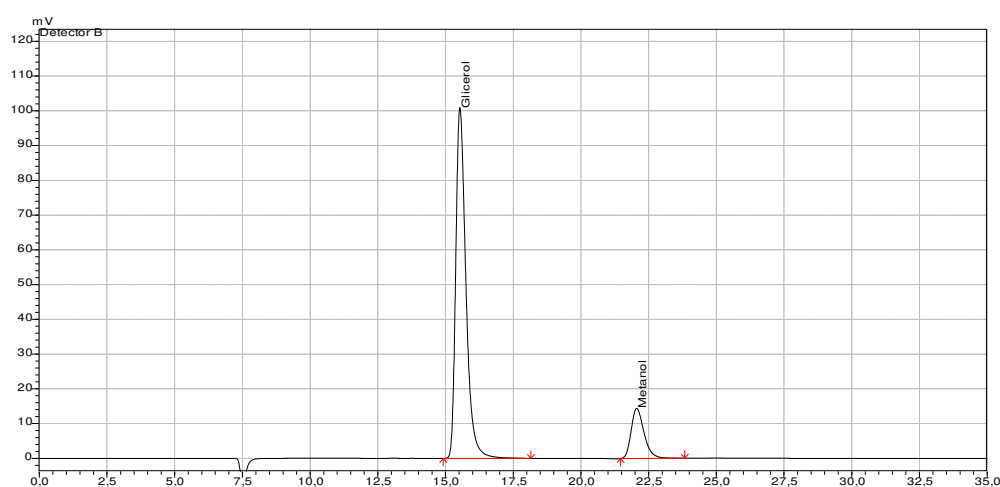
A quantificação da fonte de carbono de crescimento (glicerol) e do indutor (metanol) no sobrenadante das culturas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a detector de índice de refração (RID). As amostras foram centrifugadas (13.000 rpm, 10 min) para remoção de células e material particulado, e o sobrenadante foi filtrado em membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno) com porosidade de 0,22 μm antes da injeção, conforme recomendado pelo fabricante da coluna para evitar contaminação e preservar a integridade da fase estacionária.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna de troca iônica (fase estacionária de resina sulfonada – Aminex HPX-87H), com fase móvel composta por

água ultrapura acidificada com ácido sulfúrico em baixa concentração (5 mmol/L). As condições cromatográficas foram: coluna termostatzada a 50 °C, temperatura do detector ajustada para 40 °C, volume de injeção de 15 µL e tempo total de corrida de 35 minutos. O fluxo da fase móvel foi mantido constante em 0,5 mL/min.

Os tempos de retenção característicos para glicerol e metanol foram de

Figura 4: Cromatograma do tempo de retenção de glicerol e metanol. Os picos correspondem aos tempos de retenção de 15,5 min (glicerol) e 22,1 min (metanol) aproximadamente 15,5 e 22,1 minutos, respectivamente, conforme mostrado na Figura 4.



Fonte: Autor, 2026.

A quantificação foi realizada por curva de calibração com padrões externos de glicerol e metanol em concentrações conhecidas, com faixa linear de trabalho de 0,1 a 12 g/L para ambos os analitos, abrangendo a faixa esperada nas amostras. Os tempos de retenção característicos para cada analito foram determinados e utilizados para identificação dos picos nos cromatogramas.

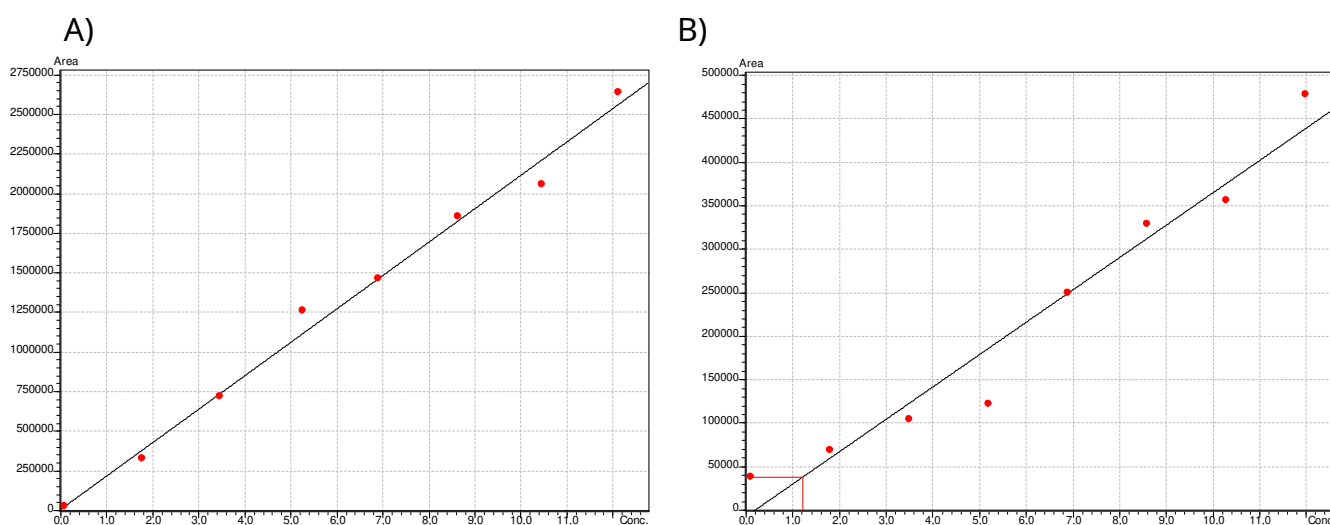
As curvas de calibração para glicerol e metanol (Figuras 5) foram construídas com os 8 pontos de concentração em duplicata e apresentaram as seguintes equações:

Glicerol: $Y = 210820x + 8287,09$ ($R^2 = 0,9902$) (Equação 1)

Metanol: $Y = 37212,1x - 7033,52$ ($R^2 = 0,9525$) (Equação 2)

onde Y é a área do pico ($\mu\text{RIU}\cdot\text{s}$) e x a concentração do analito (g/L).

Figura 5: Curva de calibração área x concentração: A) de glicerol ($R^2 = 0,9902$).), B) metanol ($R^2 = 0,9525$)



Fonte: Autor, 2026.

O coeficiente de correlação obtido para o metanol ($R^2 = 0,95$) indica uma linearidade moderada. Uma análise mais criteriosa dos pontos da curva de calibração sugere a presença de erro sistemático em alguns pontos, possivelmente relacionados à volatilidade do metanol durante o preparo das soluções padrão ou a variações na injeção. A eliminação desses pontos discrepantes (outliers), com base em critérios estatísticos (como resíduos padronizados ou teste de Grubbs), poderia elevar o R^2 para

valores mais próximos de 0,99, tornando a curva mais adequada para quantificação precisa.

As soluções para as curvas de calibração de glicerol e metanol foram preparadas no laboratório e encaminhadas para análise em HPLC por um técnico responsável, que forneceu as curvas já processadas (equações e coeficientes de correlação), sem disponibilizar os cromatogramas individuais ou os dados brutos de área para cada ponto da curva. Dessa forma, não foi possível realizar uma análise estatística detalhada dos resíduos, identificar formalmente outliers ou calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) durante o período do estágio. Para uma futura validação, recomenda-se que esses parâmetros sejam determinados conforme as diretrizes da IUPAC¹³, utilizando as fórmulas $LD = 3,3 \times (Sy/x / a)$ e $LQ = 10 \times (Sy/x / a)$, onde Sy/x é o erro padrão da regressão linear e a é a inclinação da curva de calibração.

Os valores de metanol obtidos neste trabalho devem, portanto, ser interpretados como estimativas semiquantitativas, uma vez que a curva de calibração apresenta linearidade moderada e não foi formalmente validada. Para trabalhos futuros, recomenda-se que o acesso aos dados brutos seja assegurado, permitindo a validação completa do método e a quantificação mais precisa do metanol em amostras de fermentação.

5.7 Análise de expressão proteica por SDS-PAGE

A expressão da proteína recombinante no sobrenadante do cultivo foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo o método de Laemmli.

Para o preparo dos géis, foram utilizadas soluções de acrilamida/bisacrilamida (30%, relação 29:1), tampão Tris-Hcl (3 M, pH 8,8, para o gel separador; e 0,5 M, pH 6,8, para o gel de empilhamento), dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%, persulfato de amônio (APS) a 15% e TEMED como catalisador da polimerização. O gel separador foi preparado com concentração de acrilamida de 12,5 % (adequada para a faixa de massas moleculares esperada para a proteína alvo), e o gel de empilhamento com 3 % de acrilamida.

As amostras do sobrenadante (20 uL) foram misturadas ao tampão de amostra concentrado (5x), contendo Tris-Hcl 0,5 M pH 6,8, SDS 10 %, glicerol 50 %, β -mercaptoetanol (agente redutor) e azul de bromofenol (corante de tracking). As misturas foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos para desnaturação completa das proteínas. As amostras (volumes equivalentes) e o marcador de massa molecular foram aplicados nos poços do gel, e a eletroforese foi conduzida a 120 V em tampão de corrida Tris-glicina-SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3).

Após a corrida, os géis foram incubados em solução corante de Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25% em metanol 50 % e ácido acético 10 %), para fixação e coloração das bandas proteicas. A descoloração foi realizada por sucessivas lavagens em solução de metanol (30 %) e ácido acético (7 %), até a visualização nítida das bandas. A presença da proteína recombinante foi avaliada pela comparação entre as amostras induzidas e a mobilidade relativa em relação ao marcador de massa molecular.

5.8 Segurança laboratorial e gerenciamento de resíduos

Todos os procedimentos envolvendo manipulação de microrganismos recombinantes foram realizados em cabine de fluxo laminar Classe II, garantindo a proteção do operador, da amostra e do ambiente, em conformidade com as normas de biossegurança.

Reagentes químicos com graus significativos de toxicidade foram manuseados exclusivamente em capela química com exaustão, com uso obrigatório de equipamentos de proteção individual (EPI), incluindo jaleco de manga longa, luvas nitrílicas, óculos de proteção e, quando necessário, máscara com filtro adequado. Atenção especial foi dispensada à acrilamida (neurotóxica, com potencial de absorção cutânea), ao metanol (inflamável e tóxico), ao TEMED (irritante e sensibilizante) e aos ácidos concentrados (corrosivos). Todos os reagentes foram armazenados em locais apropriados, com fichas de dados de segurança (MSDS) disponíveis e acessíveis a toda a equipe.

O gerenciamento de resíduos seguiu rigorosamente o plano de gerenciamento de resíduos do laboratório, em atendimento à legislação ambiental (Resoluções CONAMA e normas ANVISA). Resíduos biológicos (meios de cultura contaminados, placas de Petri, pontas de pipeta, microtubos, luvas, etc.) foram segregados em sacos próprios para resíduos infectantes e submetidos a tratamento em autoclave (121 °C, por 30 minutos) antes do descarte como resíduo sólido comum. Resíduos químicos orgânicos (solventes, metanol, soluções contendo corantes, tampões com compostos tóxicos) foram acondicionados em frascos específicos, devidamente identificados, segregados por compatibilidade química e encaminhados para coleta via canal de tratamento de resíduos da UFSC. Resíduos líquidos aquosos contendo sais e nutrientes, sem caráter tóxico, foram neutralizados e descartados na rede de esgoto somente após autorização e monitoramento periódico. Todas as práticas adotadas visaram assegurar a integridade dos experimentos, a segurança da equipe e a responsabilidade socioambiental da instituição.

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ESTÁGIO

6.1 Transformação e seleção de clones

A transformação do hospedeiro eucariótico com vetor de expressão linearizado contendo o gene de interesse gerou um número de colônias compatível com o esperado para o sistema utilizado (da ordem de dezenas de colônias em placas seletivas). O controle negativo, realizado na ausência de DNA, não apresentou crescimento, confirmando a eficácia do sistema de seleção.

A seleção da colônia a ser utilizada nos experimentos em biorreator foi conduzida pela supervisora do projeto, com base em critérios técnicos estabelecidos pela equipe de P&D. O processo envolveu a extração de DNA plasmidial das colônias transformantes e a análise por eletroforese em gel de agarose, que permitiu verificar a presença e a integridade do plasmídeo recombinante nas colônias. As colônias que apresentaram o perfil esperado no gel (banda correspondente ao plasmídeo íntegro) foram selecionadas para as etapas subsequentes, sendo que a escolha final do clone a ser utilizado na fermentação em biorreator foi realizada pela supervisora, considerando também critérios de experiência prévia da equipe com a linhagem e o vetor utilizados.

Como estagiário, meu papel nessa etapa consistiu em executar os procedimentos de transformação, plaqueamento e extração de DNA, bem como preparar os géis de agarose para a análise. A decisão final sobre qual clone escalar para os experimentos em biorreator foi de responsabilidade da supervisão, com base em sua expertise e no conhecimento acumulado sobre o comportamento da linhagem em processos fermentativos.

6.2 Curva de calibração: absorvância versus massa seca

Para quantificar o crescimento celular ao longo das fermentações, tentou-se estabelecer uma correlação entre a absorvância a 600 nm (OD_{600}) e a massa seca (g/L). Essa correlação é fundamental, pois permite converter medições rápidas de densidade óptica em valores de biomassa, que são a base para o cálculo de parâmetros cinéticos (velocidade específica de crescimento, rendimento biomassa/substrato e produtividade).

O comprimento de onda de 600 nm é tradicionalmente empregado para monitoramento de crescimento microbiano por espectrofotometria por duas razões principais. Primeiramente, nessa região do espectro visível, as células microbianas não absorvem significativamente a luz, mas sim a espalham (fenômeno de turbidimetria). A absorvância medida a 600 nm é, na verdade, uma medida indireta da turbidez da suspensão celular, que é proporcional à concentração de células e à sua morfologia. Em segundo lugar, esse comprimento de onda evita interferências de componentes do meio de cultura que poderiam absorver em regiões do UV ou em outros comprimentos do visível (como pigmentos ou corantes), garantindo que o sinal registrado seja predominantemente devido à presença das células. A faixa linear da Lei de Lambert-Beer para suspensões celulares é geralmente válida para OD_{600} entre 0,1 e 0,8; por isso, as amostras foram diluídas 10× sempre que necessário para garantir leituras dentro desse intervalo, conforme descrito a seguir.

A correlação foi estabelecida a partir de diluições seriadas da cultura coletada em diferentes pontos do processo (fase exponencial e estacionária). Para garantir que as leituras de absorvância estivessem dentro da faixa linear da Lei de Lambert-Beer ($OD_{600} < 0,8$), todas as amostras foram previamente diluídas 10 vezes em água ultrapura antes da leitura espectrofotométrica. Os valores obtidos foram então multiplicados pelo fator de diluição (10×) para expressar a absorvância

correspondente à cultura original, permitindo a correlação direta com a massa seca determinada por filtração e pesagem.

Tabela 1: Dados de correlação entre absorbância (OD600nm) e massa seca (g/L) para os reatores A e B ao longo do cultivo

Tempo (h)	Massa seca (g)	ABS (600nm)	Massa seca (g)	ABS (600nm)
	Reator A		Reator B	
0	1,0 ± 1,0	4,9	1,1 ± 1,3	4,1
4	4,2 ± 0,7	6,3	6,3 ± 0,7	6,6
8	4,1 ± 0,8	7,0	5,1 ± 1,3	4,9
12	6,4 ± 0,3	6,4	4,6 ± 0,9	4,6
16	5,1 ± 0,3	6,0	3,5 ± 1,8	4,3
20	2,7 ± 1,1	5,5	2,8 ± 0,1	4,0
24	3,0 ± 1,3	5,0	2,9 ± 0,1	3,7
28	3,4 ± 0,6	4,23	1,9 ± 0,5	3,6

Os dados brutos utilizados para a regressão são apresentados na Tabela 1, com as respectivas médias e desvios padrão para cada tempo e reator. Os dados

obtidos para os dois reatores (experimentos em duplicata) foram ajustados por regressão linear, resultando nas seguintes equações:

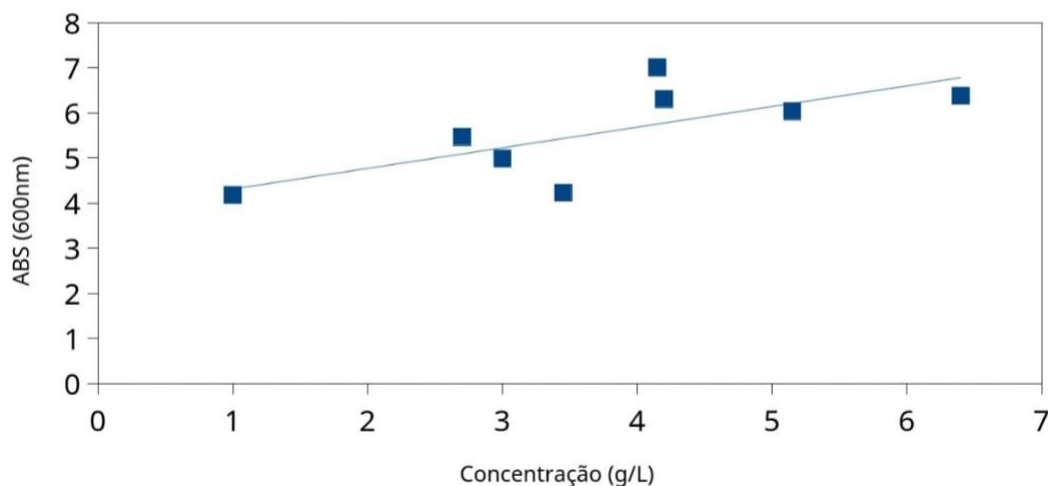
•**Reator A:** $y = 0,45x + 3,87$ ($R^2 = 0,51$)

•**Reator B:** $y = 0,47x + 2,80$ ($R^2 = 0,72$)

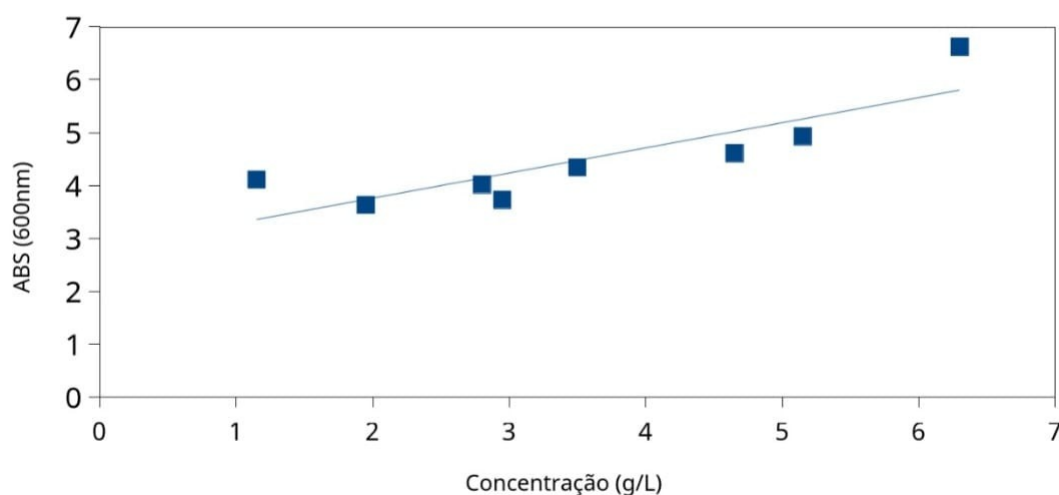
onde x representa a massa seca (g/L) – variável independente, controlada pelo experimentador – e y a absorbância medida a 600 nm – variável dependente, obtida experimentalmente. Essa convenção segue a prática usual em curvas de calibração, na qual a concentração (massa seca) é plotada no eixo das abscissas e a resposta instrumental (absorbância) no eixo das ordenadas.

Figura 6: Curva de correlação concentração celular vs ABS: Reator A ($R^2 = 0,51$) e Reator B ($R^2 = 0,72$)

Concentração celular vs ABS Reator A



Concentração celular vs ABS Reator B



Fonte: Autor, 2026.

Os coeficientes de determinação ($R^2 = 0,51$ e $0,72$) indicam que a correlação linear não foi satisfatória na faixa testada. Dois fatores principais contribuíram para essa baixa correlação:

1. **O fator de diluição (10×):** embora necessário para manter as leituras dentro da faixa linear do espectrofotômetro, a diluição multiplica qualquer erro experimental associado à pipetagem, à homogeneização da amostra ou à

leitura do equipamento. Pequenas variações na diluição resultam em erros amplificados por um fator de 10, reduzindo a precisão da correlação.

2. **Variação no tamanho celular e morfologia:** durante o cultivo, as células podem alterar sua morfologia (tamanho, forma, presença de agregados), o que afeta a relação entre a densidade óptica e a massa seca – uma limitação inerente ao método espectrofotométrico para estimativa de biomassa.
3. **Presença de debris e material particulado:** a cultura pode conter células mortas, fragmentos celulares ou outros debris que contribuem para a absorbância, mas não para a massa seca medida por filtração, introduzindo ruído na correlação..

Diante desses resultados, optou-se por utilizar a absorbância a 600 nm como um **indicador relativo de crescimento**, sem convertê-la diretamente em massa seca para a maioria das análises. As estimativas de biomassa apresentadas na Seção 6.3 são, portanto, **aproximações qualitativas** e devem ser interpretadas com cautela.

Apesar da baixa correlação, cabe destacar que as curvas de calibração do HPLC (apresentadas na Seção 5.6) são curvas analíticas rigorosas e foram validadas com $R^2 > 0,99$ para glicerol e 0,95 para metanol. A regressão OD/massa seca, por sua vez, tem caráter estimativo e está sujeita à variabilidade biológica inerente ao processo, o que justifica a diferença nos critérios de aceitação.

Para estudos futuros, recomenda-se a determinação da massa seca por métodos diretos (filtração e pesagem) em uma faixa linear restrita de OD (preferencialmente entre 0,1 e 0,8), evitando diluições elevadas, ou o uso de técnicas alternativas como a correlação com densidade celular por citometria de fluxo ou contagem em câmara de Neubauer. Uma curva de calibração mais robusta, com

número maior de pontos e réplicas, poderia melhorar a confiabilidade das estimativas de biomassa.

6.3 Perfil de consumo de substratos e crescimento celular

Os resultados das fermentações realizadas nos reatores A e B, conforme os dados cromatográficos obtidos (Tabela 2), mostraram que a fonte de carbono de crescimento (glicerol) não foi completamente consumida durante o período monitorado

Tabela 2: Concentrações de glicerol e metanol (média $\pm$ desvio padrão, n=2) ao longo do cultivo nos reatores A e B.

Amostra	Tempo (horas)	Glicerol (g/L)	Metanol (g/L)
A 0	0	21,5 $\pm$ 4,7*	2,7 $\pm$ 0,1*
A 1	4	30,9 $\pm$ 0,9*	2,7 $\pm$ 0,1*
A 2	8	38,9 $\pm$ 0,5*	3,1 $\pm$ 0,1*
A 3	12	29,1 $\pm$ 2,5*	3,5 $\pm$ 0,1*
A 4	16	25,3 $\pm$ 1,9*	4,1 $\pm$ 0,1*
A 5	20	22,9 $\pm$ 2,6*	5,1 $\pm$ 0,2*
A 6	24	18,8 $\pm$ 0,8*	5,7 $\pm$ 0,1*
A 7	28	15,4 $\pm$ 0,1*	5,3 $\pm$ 0,1*
B 0	0	27,2 $\pm$ 0,1*	2,8 $\pm$ 0,1*
B 1	4	29,6 $\pm$ 0,5*	2,9 $\pm$ 0,1*
B 2	8	32,8 $\pm$ 1,8*	2,8 $\pm$ 0,1*
B 3	12	31,7 $\pm$ 0,2*	3,3 $\pm$ 0,1*
B 4	16	27,1 $\pm$ 2,4*	3,9 $\pm$ 0,1*
B 5	20	24,6 $\pm$ 1,2*	4,1 $\pm$ 0,1*
B 6	24	20,7 $\pm$ 0,8*	4,8 $\pm$ 0,2*
B 7	28	16,7 $\pm$ 0,4*	5,7 $\pm$ 0,1*

**As amostras foram injetadas em duplicata e os desvios padrão referem-se à repetibilidade das injeções*

As concentrações iniciais de glicerol foram de $21,53 \pm 4,75$ g/L (reator A) e $27,23 \pm 0,05$ g/L (reator B), valores inferiores aos 30 g/L previstos no preparo do meio. Essa diferença pode ser atribuída a variações na homogeneização do meio antes da coleta da amostra inicial, bem como à possível presença de água residual no sistema de amostragem, que teria diluído a amostra coletada no tempo zero.

Um aspecto particularmente relevante é o aumento da concentração de glicerol observado nos três primeiros pontos de coleta (tempos 0, 4 e 8 horas), que contrasta com o esperado para um cultivo em batelada (consumo progressivo do substrato). Durante a defesa do trabalho, foram levantadas duas hipóteses para explicar esse comportamento atípico:

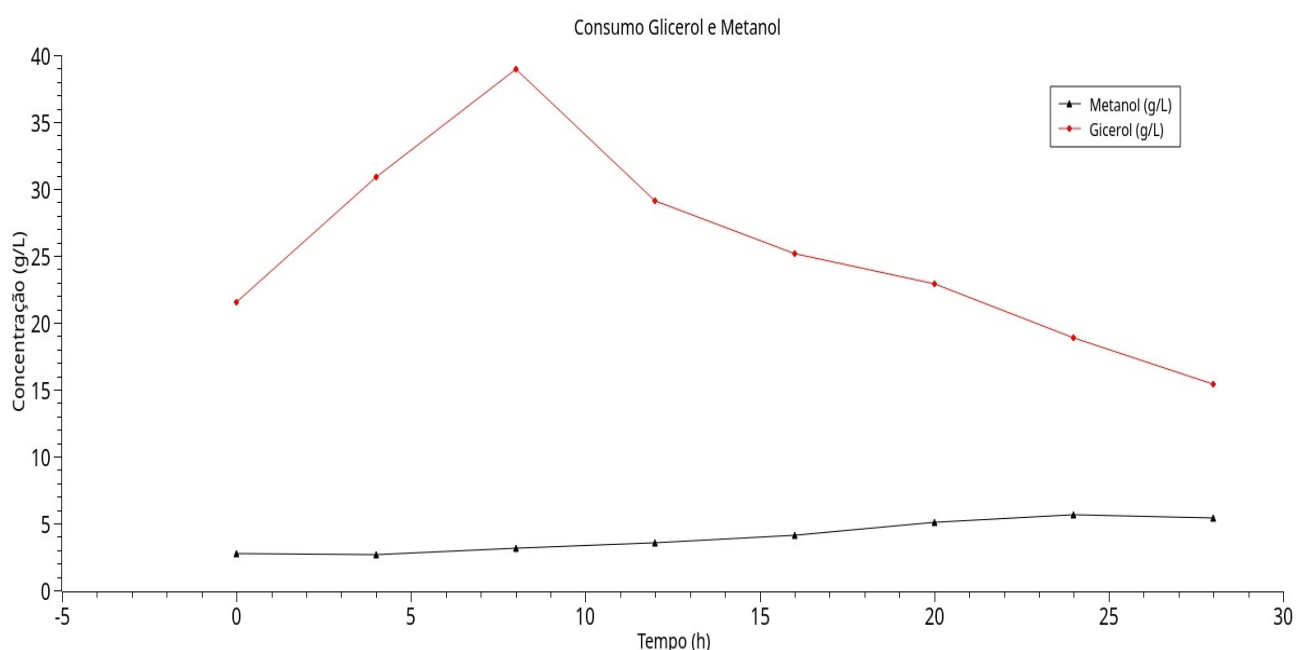
1. Resíduo de água no tubo de coleta: O sistema de amostragem do biorreator é composto por uma sonda e uma tubulação conectada a um frasco coletor. Antes da coleta propriamente dita, essa tubulação é purgada com ar comprimido para remover o conteúdo anterior. No entanto, se houver acúmulo de condensado ou resíduo de água esterilizada no interior da tubulação, a primeira amostra coletada pode ser diluída, resultando em concentrações artificialmente baixas. Nos pontos seguintes, a tubulação já estaria "lavada" pelo próprio meio de cultivo, explicando o aumento subsequente da concentração de glicerol.
2. Homogeneização insuficiente do reator: Nos estágios iniciais do cultivo, a agitação pode não ter sido suficiente para garantir uma mistura completa do meio, especialmente em um biorreator de bancada com volume reduzido (0,4 L). Com o tempo, a agitação continuada e o próprio movimento do líquido promovem a homogeneização, resultando em amostras mais representativas da composição real do meio.

Após o pico observado em 8 horas, as concentrações de glicerol diminuíram de forma consistente, indicando que o sistema se estabilizou e o consumo do substrato

passou a ser o fenômeno dominante, embora o processo ainda não tenha atingido a exaustão completa dentro do período de 28 horas. Essa interpretação é consistente com os altos desvios padrão observados nos primeiros tempos (especialmente no reator A, tempo 0), que diminuem à medida que o cultivo avança, sugerindo que as primeiras amostras estavam sujeitas a maior variabilidade experimental.

A possibilidade de resíduos no sistema de amostragem ou de homogeneização inadequada destaca a importância de um protocolo rigoroso de coleta, com purga adequada da linha e homogeneização do reator antes de cada amostragem, especialmente nos primeiros pontos do cultivo.

Figura 7: Gráfico de consumo de glicerol e metanol vs tempo (Reator A).



Fonte: Autor, 2026.

Em ambos os reatores, observou-se um aumento na concentração de glicerol nas primeiras 8 horas de cultivo (atingindo $38,94 \pm 0,47$ g/L no reator A e $32,82 \pm 1,81$ g/L no reator B). Esse aumento foi atribuído a um erro de amostragem (coleta em sistema não completamente homogeneizado antes da estabilização do reator), não

representando um acúmulo metabólico real. Após esse pico, as concentrações de glicerol diminuíram lentamente, mas ao final do experimento (28 horas) ainda restavam $15,44 \pm 0,05$ g/L (reator A) e $16,69 \pm 0,40$ g/L (reator B) de glicerol residual. Portanto, dentro do período de 30 horas de cultivo, a fase batelada não atingiu a exaustão da fonte de carbono.

A alimentação com metanol foi iniciada após 16 horas, conforme planejado, mas a presença de glicerol residual indica que a transição para a fase indutiva foi prematura. Isso é particularmente relevante porque o glicerol exerce repressão catabólica sobre o promotor induzível por metanol, comprometendo a eficiência da expressão da proteína, atingindo $5,36 \pm 0,01$ g/L (reator A) e $5,68 \pm 0,13$ g/L (reator B) ao final, confirmando que a alimentação com metanol foi realizada, mas em um contexto metabólico desfavorável. A alimentação com metanol foi iniciada após 16 horas, conforme planejado, mas a presença de glicerol residual indica que a transição para a fase indutiva foi prematura. Isso é particularmente relevante porque o glicerol exerce repressão catabólica sobre o promotor induzível por metanol, comprometendo a eficiência da expressão da proteína.

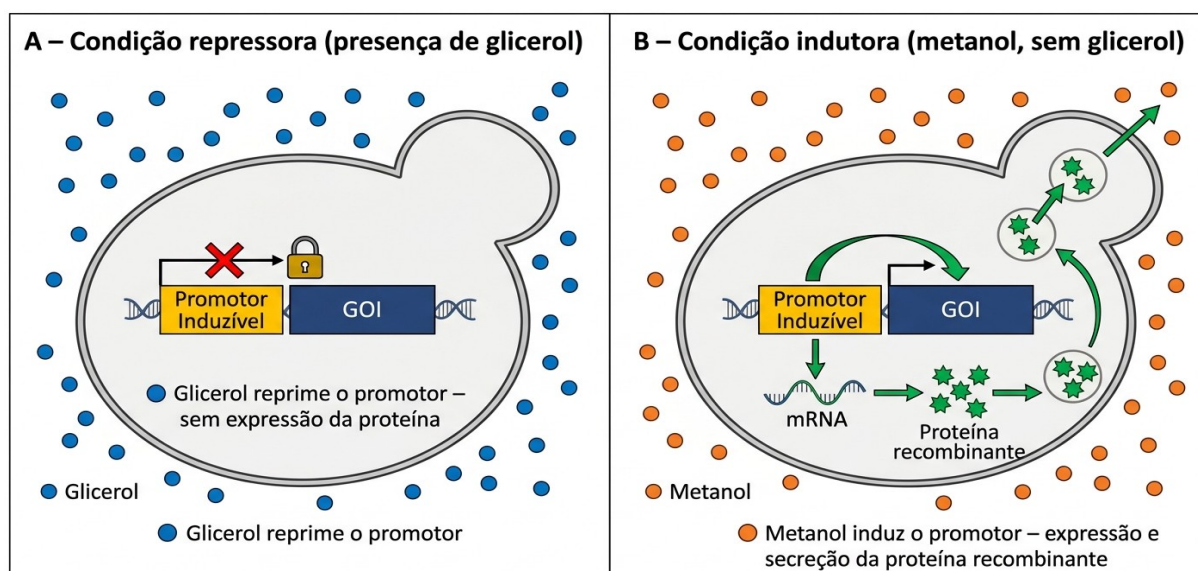
O mecanismo de repressão catabólica, ilustrado esquematicamente na Figura 8, é um fenômeno amplamente descrito na literatura para sistemas de expressão heteróloga em leveduras, no qual a presença de fontes de carbono de fácil assimilação (como glicerol, glicose ou etanol) reprime a ativação de promotores induzíveis por metanol¹⁵. Essa regulação ocorre em nível transcricional: a presença de glicerol mantém inativo o fator de transcrição que ativa o promotor responsivo ao metanol, direcionando a maquinaria celular prioritariamente ao metabolismo do glicerol, mais eficiente energeticamente.

No presente trabalho, essa interpretação foi utilizada como base para explicar os resultados obtidos, mas não foi testada experimentalmente – ou seja, não foi

realizada uma condição de controle com indução por metanol na ausência completa de glicerol residual para confirmar a repressão catabólica nas condições específicas deste cultivo. Trata-se, portanto, de uma inferência fundamentada na literatura científica, que é consistente com o comportamento observado (baixa intensidade da banda proteica na SDS-PAGE e ausência de correlação entre a adição de metanol e o aumento da expressão da proteína recombinante).

Como consequência, a adição de metanol antes do esgotamento completo do glicerol resulta em um estado metabólico misto, no qual o metanol é consumido em baixa taxa, enquanto o promotor permanece parcialmente reprimido. Isso explica a baixa intensidade da banda proteica observada na SDS-PAGE (Seção 6.4) e a necessidade de garantir o esgotamento do glicerol antes da indução em futuros experimentos, nos quais a hipótese poderia ser validada por meio de um experimento controle apropriado.

Figura 8: Mecanismo de repressão catabólica exercido pelo glicerol sobre o promotor induzível por metanol. Comparação entre condições repressora (glicerol presente) e indutora (metanol, na ausência de glicerol).



Fonte: Gerado por inteligência artificial Gemini (NanoBanana 2), Autor, 2026.

As concentrações de metanol ao final do cultivo – $5,36 \pm 0,01$ g/L no reator A e $5,68 \pm 0,13$ g/L no reator B – confirmam que a alimentação com metanol foi realizada. No entanto, o contexto metabólico desfavorável (presença de glicerol residual) resultou em um baixo nível de expressão da proteína recombinante, conforme evidenciado pela baixa intensidade da banda observada na SDS-PAGE (Seção 6.4).

A interpretação de que a repressão catabólica exercida pelo glicerol residual foi a causa da baixa expressão, embora consistente com a literatura¹⁸, permanece como uma hipótese inferencial, uma vez que não foi testada experimentalmente nas condições deste trabalho. Para confirmar essa hipótese em estudos futuros, sugerem-se duas abordagens complementares:

1. Experimento controle com consumo total de glicerol: Realizar um cultivo em condições idênticas, mas com a indução por metanol iniciada após a confirmação analítica do esgotamento completo do glicerol (por HPLC). A comparação entre a expressão da proteína nessa condição (indução "limpa") e a obtida no presente trabalho (indução com glicerol residual) permitiria isolar o efeito da repressão catabólica sobre a eficiência da expressão.
2. RT-qPCR para análise da expressão gênica em nível transcricional: A quantificação do mRNA do gene de interesse por RT-qPCR (transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real) permitiria avaliar diretamente se a presença de glicerol residual está reprimindo a transcrição do gene alvo. Essa técnica forneceria uma evidência molecular direta da repressão catabólica, complementando as análises em nível proteico (SDS-PAGE).

Essas abordagens, empregadas em conjunto, poderiam validar ou refutar a hipótese de repressão catabólica nas condições específicas do processo e orientar ajustes operacionais para maximizar a produção da proteína recombinante.

Embora o consumo de substrato tenha sido incompleto, é possível realizar uma estimativa preliminar dos rendimentos para avaliar a eficiência do processo. Com base na biomassa final estimada ($\approx 5\text{--}6$ g/L) e no consumo de glicerol observado (aproximadamente 5–10 g/L, considerando a variação entre os reatores e os artefatos de amostragem), o rendimento biomassa/substrato ($Y_{x/s}$) pode ser estimado pela equação 1:

Equação 1

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}$$

Onde:

- X_f = biomassa final estimada (média $\approx 5,5$ g/L, a partir da Tabela 1)
- $X_0 \approx 1,0$ g/L (biomassa inicial, tempo 0)
- $S_0 \approx 25$ g/L (glicerol inicial médio, a partir da Tabela 2)
- $S_f \approx 16$ g/L (glicerol residual final médio)

Substituindo os valores:

$$Y_{x/s} \approx \frac{5,5-1,0}{25-16} = \frac{4,5}{9} \approx 0,50 \text{ g/g}$$

Esse valor é significativamente inferior ao rendimento teórico reportado na literatura para linhagens similares em cultivos otimizados ($Y_{x/s} \approx 0,47$ g/g)¹⁴, confirmando que o processo operou em condições subótimas, com baixa eficiência de conversão de carbono em biomassa.

Da mesma forma, a produtividade volumétrica de biomassa, calculada como a taxa de acúmulo de massa celular por unidade de volume e tempo, foi estimada pela equação 2:

Equação 2

$$P_x = \frac{X_f - X_0}{\Delta t}$$

Onde $\Delta t = 28$ horas (tempo total de cultivo até a última amostra).

$$P_x \approx \frac{5,5-1,0}{28} \approx 0,16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

Para efeito de comparação, cultivos bem-sucedidos de leveduras metilotróficas em condições otimizadas alcançam produtividades volumétricas da ordem de 1,0

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, conforme reportado por Looser et al. (2015)¹⁴ e Yang et al. (2020)¹² para processos em batelada alimentada com controle adequado de oxigênio e alimentação de metanol. O valor obtido neste trabalho ($\approx 0,16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) é, portanto, cerca de seis vezes inferior ao esperado, reforçando a conclusão de que as condições operacionais empregadas – em particular a aeração, a agitação e a homogeneização do meio – foram insuficientes para sustentar um crescimento celular adequado e o subsequente consumo completo do glicerol.

Cabe ressaltar que as incertezas associadas a essas estimativas são consideráveis, uma vez que:

- A curva de calibração OD/massa seca apresentou baixos coeficientes de determinação ($R^2 = 0,51$ e $0,72$, conforme Seção 6.2), comprometendo a precisão da estimativa de biomassa.
- Os próprios dados de massa seca (Tabela 1) exibem desvios padrão de até $\pm 1,8 \text{ g/L}$ em alguns pontos, indicando alta variabilidade experimental.

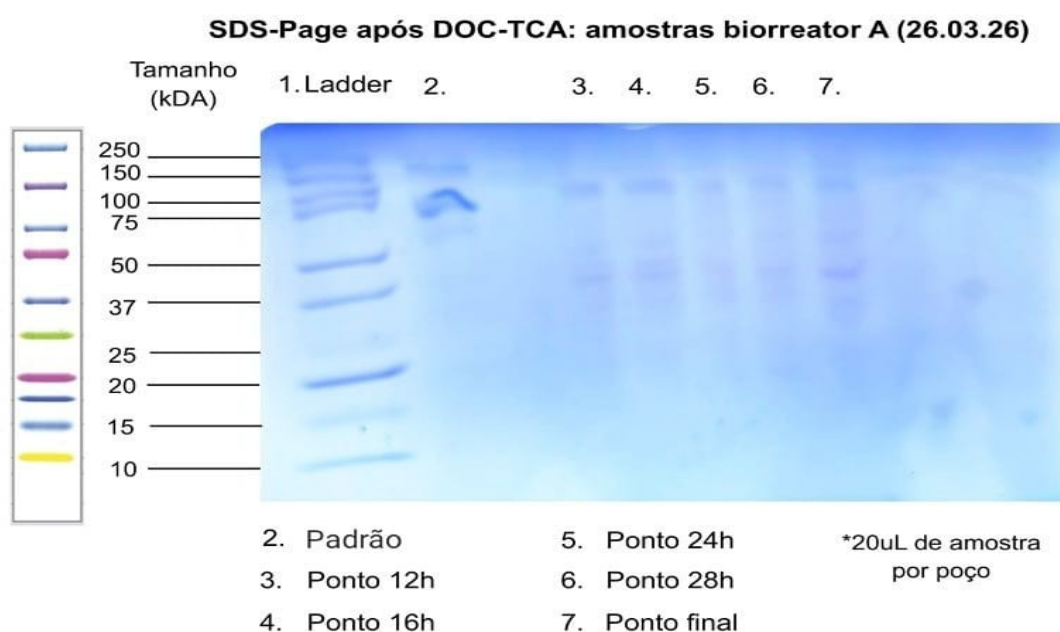
Dessa forma, os valores de $Y_{x/s}$ e produtividade devem ser interpretados como estimativas qualitativas, indicativas da baixa eficiência do processo, mas sem precisão quantitativa suficiente para serem tomados como absolutos. Eles servem, entretanto, como um diagnóstico claro da necessidade de ajustes operacionais (aeração, agitação, momento da indução) em futuros experimentos.

6.4 Análise de expressão proteica por SDS-PAGE

As amostras do sobrenadante coletadas nos tempos 12, 16, 20, 24 e 28 horas foram analisadas por SDS-PAGE. Os géis corados com Coomassie Blue revelaram uma banda proteica adicional de massa molecular compatível com a proteína

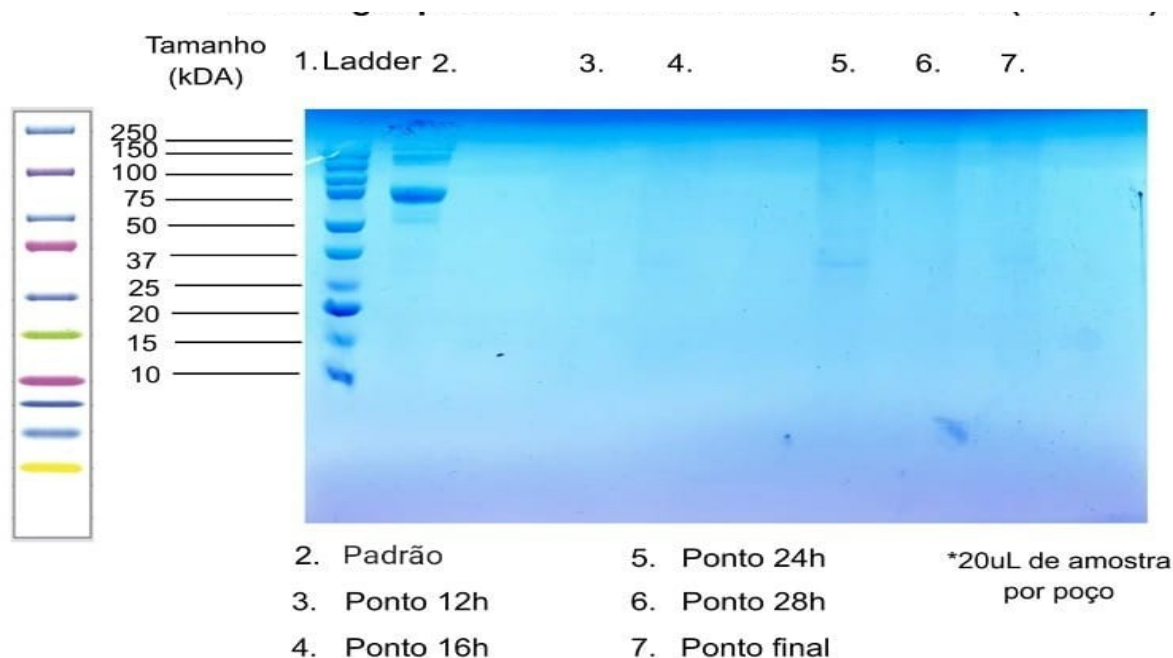
Figura 9: SDS-PAGE das amostras reator A (coloração Coomassie Blue).

recombinante esperada (aproximadamente 66 kDa) nas amostras induzidas com metanol nos tempos 20, 24 e 28 horas, com intensidade muito baixa e pouco nítida, sugerindo expressão basal. Nos tempos 12 e 16 horas, a banda não foi visualizada ou apresentou intensidade desprezível.



Fonte: Autor, 2026.

Figura 10: SDS-PAGE das amostras do reator B (coloração Coomassie Blue).



Fonte: Autor, 2026.

Contudo, a interpretação desse resultado deve ser feita com cautela. Como a fase indutiva foi iniciada antes do esgotamento do glicerol, a expressão da proteína pode ter sido parcial e influenciada pela repressão catabólica. A intensidade da banda observada é compatível com uma expressão em baixo nível, consistente com a presença de glicerol residual. Além disso, a análise por SDS-PAGE é essencialmente qualitativa: ela permite visualizar a presença de uma banda na região de massa molecular esperada, mas não confirma a identidade da proteína (outras proteínas do hospedeiro poderiam co-migrar na mesma faixa de massa molecular) nem permite uma quantificação precisa do título da proteína.

A confirmação da identidade da banda observada como sendo a proteína recombinante alvo exigiria a utilização de métodos ortogonais, como:

- Western blot: técnica que utiliza anticorpos específicos para a proteína alvo, permitindo a identificação inequívoca da banda de interesse e a estimativa de sua pureza relativa.
- RT-qPCR (transcrição reversa seguida de PCR em tempo real): método que quantifica o mRNA do gene de interesse, confirmando que a expressão ocorre em nível transcricional e que a proteína é efetivamente transcrita a partir do gene inserido.

Essas técnicas, baseadas em princípios físico-químicos distintos do SDS-PAGE (anticorpos com especificidade molecular no caso do Western blot; amplificação enzimática e detecção por fluorescência no caso do RT-qPCR), forneceria evidências complementares e robusteceriam a conclusão sobre a expressão bem-sucedida da proteína recombinante.

No entanto, esses testes não foram realizados durante o estágio devido a limitações de tempo e escopo do projeto. O estágio supervisionado tem carga horária definida (540 horas) e o cronograma estabelecido priorizou a execução das etapas de transformação, cultivo em biorreator e análises preliminares (HPLC e SDS-PAGE), que são as atividades centrais do plano de estágio. A realização de Western blot e RT-qPCR demandaria tempo adicional para aquisição de anticorpos específicos, otimização de condições experimentais e validação dos ensaios – atividades que extrapolam o escopo e a duração do estágio. Dessa forma, a análise por SDS-PAGE permanece como a única linha de evidência disponível, sendo qualitativa e preliminar.

Para uma avaliação mais robusta da expressão da proteína recombinante, recomenda-se que trabalhos futuros incorporem a confirmação por Western blot e a análise transcricional por RT-qPCR, permitindo validar a identidade da proteína e estimar com maior precisão o título de produção.

6.5 Experiências profissionais adquiridas

A realização do estágio proporcionou uma vivência prática abrangente em todas as etapas de um processo de desenvolvimento biotecnológico. Foi possível consolidar conhecimentos em planejamento experimental, execução de técnicas de biologia molecular (transformação, extração de DNA, eletroforese em agarose), operação em biorreator instrumentado (calibração de sensores, controle de parâmetros, coleta asséptica de amostras, alimentação controlada) e análises bioquímicas (HPLC e SDS-PAGE). Uma experiência particularmente enriquecedora foi o enfrentamento de situações imprevistas durante as fermentações, como a necessidade de ajustar a aeração e agitação para manter os níveis adequados de oxigênio dissolvido. A capacidade de identificar problemas, propor soluções e implementar correções em tempo real foi um aprendizado valioso que transcende os aspectos técnicos e contribui para a formação de um profissional mais autônomo e resiliente.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O estágio permitiu executar todas as etapas de um processo de expressão recombinante, embora o rendimento tenha sido comprometido por condições operacionais subótimas, com destaque para o início prematuro da indução antes do esgotamento do glicerol. Embora todas as etapas experimentais (preparo de meios, transformações, extração de DNA, condução das fermentações, análises cromatográficas e eletroforéticas) tenham sido executadas conforme o planejado, o processo fermentativo não atingiu a condição de esgotamento da fonte de carbono (glicerol), com concentração residual de aproximadamente 16 g/L ao final do cultivo, indicando que a fase de batelada alimentada com metanol foi iniciada prematuramente. Como consequência, a expressão da proteína recombinante, embora detectada por SDS-PAGE, ocorreu em condições subótimas, com baixa

intensidade de banda e sem garantia de indução efetiva. Os dados obtidos, entretanto, fornecem um diagnóstico importante para ajustes futuros, destacando a necessidade de monitoramento mais rigoroso do oxigênio dissolvido e da concentração de substratos para determinar com precisão o momento da transição entre fases.

Recomenda-se, para trabalhos futuros:

- Repetir a fermentação com acompanhamento cinético mais detalhado (coletas a cada 2-3 horas) para identificar com exatidão o ponto de exaustão do glicerol.
- Ajustar as condições de aeração e agitação para melhorar a transferência de oxigênio e evitar limitações metabólicas.
- Considerar a alimentação com metanol apenas após confirmação analítica do esgotamento do glicerol (por HPLC offline ou por sonda online).
- Realizar Western blot para confirmar a identidade da banda de 66 kDa.
- Incluir densitometria e quantificação de proteína (Bradford¹⁶ ou ELISA) para estimar título e pureza.

8. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO À FORMAÇÃO PROFISSIONAL

O estágio na ARK P&D em Biologia Molecular S.A. foi fundamental para consolidar a formação acadêmica e profissional como bacharel em Química Tecnológica. A integração entre diferentes áreas do conhecimento – Química Analítica (HPLC), Bioquímica (SDS-PAGE), Biologia Molecular (transformação genética, extração de DNA) e Engenharia de Bioprocessos (operação de biorreator, cinética microbiana) – reflete a natureza multidisciplinar do campo da biotecnologia e prepara o profissional para atuar em interfaces entre disciplinas tradicionalmente separadas.

Além das competências, o estágio proporcionou o desenvolvimento de habilidades comportamentais igualmente importantes para a carreira profissional: trabalho em equipe, comunicação eficaz de resultados em reuniões de alinhamento, capacidade de síntese e organização de dados em planilhas, cumprimento de prazos

e adaptação a rotinas dinâmicas. O contato frequente com materiais técnicos em língua inglesa (manuais de equipamentos, artigos científicos, protocolos) contribuiu significativamente para a fluência na leitura e interpretação de textos especializados no idioma. A responsabilidade pela segurança no manuseio de reagentes e pelo correto descarte de resíduos químicos e biológicos reforçou a consciência ambiental e ética profissional, valores essenciais para o exercício da química em qualquer contexto.

Esta experiência consolidou o interesse do estagiário pela área de P&D industrial e pela pesquisa aplicada, abrindo perspectivas tanto para atuação no mercado de trabalho quanto para a continuidade dos estudos em programas de pós-graduação em áreas correlatas.

9. REFERÊNCIAS

¹ CREGG, J. M. et al. *Pichia pastoris* as a host system for production of recombinant proteins. *Methods in Molecular Biology*, v. 389, p. 117–130, 2007.

² INVITROGEN. *Pichia EasyComp™ Kit – User Manual*. Carlsbad: Invitrogen, 2001.

³ THERMO FISHER SCIENTIFIC. *PichiaPink™ Expression System User Guide*. Carlsbad: Thermo Fisher Scientific, 2014.

⁴ LOOSER, V. et al. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 6, p. 1177–1193, 2015.

⁵ Simple high-performance liquid chromatography method for the analysis of glucose, glycerol, and methanol in a bioprocess. *Journal of Analytical Methods*, 2024.

⁶ SCION INSTRUMENTS. RI Detector HPLC. Disponível em: <https://scioninstruments.com/blog/ri-detector-hplc>. Acesso em: 30 jun. 2026.

⁷ Organic acids and alcohols quantification by HPLC/RID in sugarcane vinasse: analytical method validation and matrix effect assessment. *Journal of Chromatography A*, 2019.

⁸ KNAUER. Seeing is Believing – Detection Made Easy Part 4: Refractive Index Detector. KNAUER Blog, 2026.

- ⁹ SHIMADZU. Refractive Index Detection (RID) – Analysis Basics. Disponível em: https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/refractive_index_detection.html. Acesso em: 30 jun. 2026.
- ¹⁰ ZHU, W. et al. High level expression and purification of recombinant human serum albumin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, v. 147, p. 61–68, 2018.
- ¹¹ LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- ¹² YANG, Y. et al. A Guide to *Pichia pastoris* Fermentation in Single-Use Stirred-Tank Bioreactors. *Eppendorf Short Protocol*, n. 38, 2020.
- ¹³ IUPAC. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.
- ¹⁴ GMEINER, G. et al. Influence of methanol feeding rate on the expression of a recombinant protein in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2015.
- ¹⁵ EGLI, T.; BOSSHARD, C. Microbial growth on methanol: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, p. 101–115, 2015.
- ¹⁶ BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.
- ¹⁷ SHIMADZU. LC-2050C Liquid Chromatograph – User Manual. Kyoto: Shimadzu Corporation, 2020.
- ¹⁸ EPPENDORF. Bioflo 115 Fermentation System – Operating Manual. Hamburg: Eppendorf AG, 2019.
- ¹⁹ ARK P&D EM BIOLOGIA MOLECULAR S.A. Protocolo ARK-004: Cultivo e fermentação de linhagem recombinante em biorreator de bancada. Florianópolis, 2025. Protocolo interno do laboratório.
- ²⁰ HALL, G. M. et al. Cell density measurement in microbial cultures: a review of methods and correlations. *Journal of Biotechnology*, v. 112, p. 245–258, 2004.

10. ANEXOS



DECLARAÇÃO DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO

A AKR P&D em Biologia Molecular S.A. inscrito no CNPJ n. 39.428.022/0001-92, localizado na Rua Prof. Arthur Ramos, número 183, bairro Jardim Paulistano, na cidade de São Paulo/São Paulo, declara que o aluno Regilsom Londero Defante, CPF [REDACTED] número de matrícula da UFSC 24150193, realizou estágio OBRIGATÓRIO referente a disciplina Estágio Supervisionado (QMC 5515) na AKR P&D em Biologia Molecular S.A entre o período de setembro de 2025 a junho de 2026, totalizando 540 horas.

A Instituição de Ensino UFSC em que o aluno estuda possui vínculo com esta empresa e o aluno tem seu projeto de estágio de conclusão de curso supervisionado pela Dra. Marília Marques Knychala, CPF [REDACTED]

Atenciosamente,



Documento assinado digitalmente
MARILIA MARQUES KNYCHALA
Data: 25/06/2026 13:37:00-0300
CPF: ***.631.456-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Dra. Marília Marques Knychala

AKR P&D em Biologia Molecular S.A.