

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA, GENÉTICA E BIOLOGIA CELULAR
ESPECIALIZAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FELIPE REIS FERNANDES

Produção de biofármacos por micro-organismos

MARINGÁ
2017

FELIPE REIS FERNANDES

Produção de biofármacos por micro-organismos

Short Review apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia – EAD - turma 6, do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr^a Ana Luiza de Brito Portela Castro

MARINGÁ- PR
2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

FELIPE REIS FERNANDES

Produção de biofármacos por micro-organismos

Short Review apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Biotecnologia e aprovado pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Luiza de Brito Portela Castro - orientadora Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. João Alencar Pamphile
Universidade Estadual de Maringá

Prof. MSc Layon Zafra Lemos
Universidade Estadual de Maringá

Aprovado em: 21 de Agosto de 2017.
Defesa realizada por Webconferência

DEDICATÓRIA(S)

Dedico este trabalho a meus pais, colegas de curso professores e mentoras que tanto contribuíram para sua realização.

AGRADECIMENTO(S)

Nesta página muito especial deste trabalho, gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realizá-lo.

Em especial a minha família pelo suporte ao longo de todo o processo e aos professores (as), com destaque a Professora Ana Luiza pela sua orientação, e as mentoras do curso de especialização por seu esforço em nos garantir uma boa formação.

Strength does not come from winning. Your struggles develop your strengths. When you go through hardships and decide not to surrender, that is strength.

(ARNOLD SCHWARZENEGGER)

Produção de biofármacos por micro-organismos

Resumo

Os biofármacos são moléculas produzidas a partir de organismos vivos, manipulados geneticamente ou não. Os micro-organismos são atualmente a primeira escolha quando se pretende produzir essas moléculas a nível industrial. Essas substâncias têm grande potencial de aplicação terapêutica e o modo de obtenção das mesmas se inicia com a definição de qual substância se pretende produzir passando então a definição da rota metabólica que será utilizada para sua produção, modificação de um micro-organismo, produção e extração do biofármaco. Devido ao crescente mercado para essa linha terapêutica é previsto um grande crescimento para esse campo nos próximos anos. Devido a isso o objetivo deste trabalho é fazer uma revisão geral de como se encontra atualmente a produção desses fármacos a nível técnico e, além disso, quais as perspectivas futuras para a área.

Palavras-chave: Organismos vivos. Indústria. Fármacos.

Introdução

A humanidade vem usando técnicas de fermentação a cerca de 7000 anos com um início empírico e com o principal propósito de produção de bebidas alcoólicas (MCGOVERN et al., 2004). A tecnologia microbiológica, entretanto floresceu a partir do momento em que os produtos de origem microbiana passaram para a escala industrial, sendo dois marcos, a produção de glicerol para fabricação de nitroglicerina durante a primeira grande guerra mundial e a produção de penicilina durante a segunda (WANG et al., 2001).

Em 1970, devido ao uso de DNA recombinante, foi possível a obtenção de insulina por meio de *Escherichia coli* (WALSH, 2012). Ainda na década de 70 por meio do uso da molécula de RNA ribossômico 16S, um novo domínio procariótico foi revelado, as arqueobactérias, o que abriu as portas de uma nova grande fonte de recursos biotecnológicos (WOESE and FOX, 1977; WOESE et al., 1990).

Em 1976, outra contribuição foi realizada por meio do isolamento da DNA polimerase termoestável a partir da bactéria *Thermus aquaticus*, e a partir da qual a bem conhecida técnica de amplificação de DNA da reação em cadeia da polimerase (PCR) se tornou possível. O uso dessa técnica bem como a aplicação de plasmídeos expandiu a possibilidade de manipulação de micro-organismos (CHIEN et al., 1976; SAIKI et al., 1988).

O conceito de fábricas celulares foi estabelecido na década de 80 com o fator chave da tecnologia de DNA recombinante e aprovação da insulina recombinante (JOHNSON 1983) sendo a primeira geração de fabricas celulares (*Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*), rapidamente substituídas por cepas projetadas (por seleção ou manipulação genética) para obtenção de melhores resultados (LEE et al., 2012).

Deste modo à tecnologia microbiológica tem evoluído desde a descoberta de novas espécies, seleção e melhoramento de cepas e espécies de micro-organismos e introdução de genes não nativos para aquisição de produtos ou criação novas funções.

Sendo assim esse trabalho tem enfoque na revisão dos tipos de micro-organismos usados e como esses são modificados com fins na produção de medicamentos bem como os tipos e classes de medicamentos pelos produzidos pelos mesmos a nível industrial. Além disso, se almeja apresentar detalhes do

processo de produção e purificação somado a perspectivas futuras para esse campo.

Desenvolvimento

Biofármacos e a indústria farmacêutica.

O desenvolvimento de drogas é extremamente complexo e longo. São necessários aproximadamente 15 anos de pesquisa intensa até que uma droga saia da idéia até a comercialização e a um custo de aproximadamente 2 bilhões de dólares (JOZALA et al., 2016).

Dentre as moléculas farmacologicamente ativas, aquelas de baixo peso molecular geralmente são chamadas de drogas ou fármacos enquanto que moléculas de alto peso molecular são conhecidas como biofármacos, que são polímeros formados a partir de nucleotídeos ou de aminoácidos e originam as enzimas, proteínas estruturais, anticorpos, moduladores de resposta imune, modificadores genéticos entre outros (JOZALA et al., 2016). Biofármacos com base em ácidos nucleicos são uma grande promessa no campo terapêutico ainda que o número de produtos com licença para aplicação em humanos ainda seja bem reduzido. Aproximadamente 50% das drogas em desenvolvimento nos próximos 4-9 anos serão biofármacos (LEADER et al. 2008 e MITRAGORI et al 2014).

Biofármacos, atualmente, em sua grande maioria são compostos por proteínas recombinantes e podem ser obtidos de plantas, células animais e até insetos, mas a produção por meio de micro-organismos continua sendo foco, onde esses genomas são bem caracterizados, possuem plasmídeos e vetores, viabilidade em diferentes espécies e cepas e bom custo benefício comparado com as outras metodologias. (JOZALA et al., 2016).

Dentre as vantagens do uso de sistemas microbianos para metabolismo de drogas podemos citar (VENISETTY e CIDDI 2003, LEE et al. 2009):

- 1- Baixo custo e facilidade de manter culturas dos micro-organismos utilizados;
- 2- Processos com um grande número de cepas são processos simples e repetitivos;
- 3- A concentração de moléculas produzidas é geralmente maior do que aquela obtida por modelos células ou de tecido. (0.2 a 0.5 g/l);

- 4- Novos produtos com diferentes atividades, ou as atividades podem ser isolados a partir de espécies e cepas análogas;
- 5- Possibilidade de prever quais são as reações metabólicas mais favorecidas;
- 6- Métodos podem ser escalados para preparação de testes farmacológicos e toxicológicos;
- 7- condições medianas de incubação são utilizadas, com uso de substratos baratos e rápido crescimento da massa celular;
- 8- Quando há a necessidade de régio (posição de radicais dentro da molécula) ou estereo (conformação espacial da molécula) especificidade esses modelos são mais práticos do que química sintética, uma vez que sistemas biológicos produzem seus compostos de modo seletivo a uma determinada conformação molecular.
- 9- Processos fermentativos são mais facilmente controláveis.

Biologia sintética aplicada a micro-organismos para descoberta e produção de biofármacos.

Micro-organismos sintéticos, na produção de biofármacos, são aqueles manipulados geneticamente para a obtenção de drogas. As dificuldades em se obter produtos de fontes naturais levam a atenção ao uso de biologia sintética. Uma vez que, graças à biologia sintética o controle de sistemas biológicos pode ser feito por fatores simples como a luz e substâncias (BREITLIG and TAKANO, 2015). A manipulação genética de micro-organismos serve não somente para a produção de biofármacos, mas também como suporte em diferentes etapas do processo de produção.

Uma célula sintética é composta basicamente de: indutor (ligante a um receptor de membrana) ou luz, que ativa o novo circuito criado naquela célula, sendo que a indução desse circuito ativa uma sequência de genes que por sua vez ativa uma determinada via metabólica (SUN et al. 2015; HARVEY et al, 2012).

O sistema de complexos de genes permite a ativação de vias metabólicas inteiras para a produção de substâncias. Como exemplo temos a Eritromicina, que tem uma rota biosintética composta por 28 proteínas agregadas em um único agregado de genes. Esses agregados podem ser pesquisados com o auxílio de ferramentas da bioinformática e então utilizados na manipulação genética.

(NEWMAN and CRAGG, 2012, MEDEMA et. al. 2011; DOROGHAZI et al. 2014) Com a manipulação específica de partes desses agregados é possível a obtenção de novas substâncias com propriedades previsíveis e interessantes, isso permite a criação de produtos derivados a partir de produtos naturais. (Mitchell W. 2011).

O uso de ferramentas bioinformáticas é de grande utilidade para eleição da melhor combinação de rotas biossintéticas (TROSSET and CARBONELL, 2015). Simulações *in silico* tem permitido explorar novas vias metabólicas e possíveis modificações para produção de fármacos de modo a aumentar a eficiência e qualidade da produção por micro-organismos. Predição de transcriptomas, proteomas, metabolomas e fluxomas são práticas comuns para entender como será o comportamento celular e de produção dadas variações genéticas e ambientais (de meio de cultura). (LEE et al, 2012)

Em relação às escalas de produção em biosíntese temos: escala industrial (maior do que 50 g/l) – atingida na produção de alguns aminoácidos e isoprenoides, escala média (de 5 a 50 g/l) – atingida na produção de artemisinina e vários antibióticos. Aumentar o número de fármacos que são produzidos em escala industrial é um desafio que fomentaria ainda mais o uso da biosíntese. (SUN & ALPER, 2014).

As maiores classes de produtos naturais bioproduzidos são: isoprenoides, poliquetideos, polifenóis, que são aplicados nas mais distintas áreas terapêuticas, de antibióticos a anticancerígenos. Independentemente do tipo, o conhecimento das vias de produção a ativação e expressão de genes são possíveis o aumento do fluxo de produção e controle da toxicidade do substrato. Como exemplo temos que a Identificação das enzimas limitadoras da expressão de genes, através de plasmídeos contendo séries de promotores, permitiu a produção de amorphadinina que é um precursor da artemisinina (antimalárico) a 25 g/l em *E. coli* e 40 g/l em levedura (IMMETHUN et al., 2013).

A biosíntese é um processo complexo que não depende somente da escolha apropriada de vias metabólicas, mas também fatores como a presença de cofatores enzimáticos, balanço redox, fluxo de nutrientes, substâncias regulatórias (PFLEGER et al. 2006).

O simples conhecimento das vias de metabolização microbianas não é suficiente para estabelecer se o uso de micro-organismos para produção de

fármacos é economicamente viável e deve determinar se a produção pode ser elevada a escala industrial. Isso significa a atenção a variáveis desde a espécie de micro-organismo até o método de produção a ser utilizado (BIANCHINI et al., 2015).

Produção a montante de biofármacos: seleção e crescimento da linhagem celular e formação de compostos.

São os processos necessários para a produção de biofármacos, dentro da indústria, que podem ser definidos como: seleção de uma linhagem celular, meio de cultura, parâmetros de crescimento, otimização de processos pra obtenção de condições ótimas de crescimento e produção do biofármaco. O principal objetivo nesta fase é o da transformação dos substratos na substancia de interesse. (GRONEMEYER et al, 2014)

Vários fatores são importantes de serem considerados para que a obtenção do biofármaco ocorra de modo adequado, dentre eles cabe destacar: tipo de processo (contínuo, por lote, semicontínuo), temperatura pH, oxigênio, esterilização, tipo de equipamento utilizado (bioreatores, misturadores, filtros etc), pureza enantiomérica, de modo a evitar a necessidade de purificação de compostos quirais, métodos de extração e purificação do produto e manutenção ambiental para evitar contaminações. (SCHMIDELL et al 2001 e BIANCHINI et al., 2015).

Processos a jusante: isolamento e purificação de biofármacos.

Uma vez que a transformação do substrato em no produto, o meio de cultivo contém vários outros metabólitos, restos celulares, outras substâncias indesejadas e o biofármaco em questão que deve ser isolado. A separação das moléculas de interesse das impurezas celulares, impurezas do processo. Cada etapa de purificação elimina uma ou mais classes de impureza. Esses processos podem ser divididos em 3 categorias gerais:

- 1- Recuperação inicial (extração e isolamento) - separação entre célula e sobrenadante - centrifugação, flotação, sedimentação e filtração. Importância do tipo de solubilidade da molécula bem como do fato de se é produzida em meio extra ou intracelular;
- 2- Purificação (remoção da maior parte dos contaminantes);

3- Remoção de contaminantes específicos e formas indesejadas da molécula alvo. (AZEVEDO et al, 2009, FIELDS et al. 2016).

Dentro da indústria farmacêutica, altos índices de pureza são exigidos. Os métodos de cromatografia ainda são os mais utilizados para recuperação final de substâncias, porém os mesmos enfrentam problemas quanto a custos e escalonamento. (ROSA et al, 2010).

A cromatografia é uma técnica de purificação altamente efetiva com grande aplicação industrial (SARASWAT et al., 2013). A especificidade estrutural das proteínas é utilizada como fator para sua separação por métodos cromatográficos. (SARASWAT et al., 2013)

As escolhas tradicionais de métodos cromatográficos incluem resinas baseadas em partículas, operação por lote, e colunas empacotadas. Com o rápido crescimento do setor, entretanto, existe uma demanda de inovação. Os novos processos que tem atraído a indústria são:

- As técnicas de leito móvel simulado, para a separação de enantiômeros (WARIKOO et al, 2012).

- Cama de absorção expandida, para captura do produto diretamente da suspensão celular formada por um gradiente de partículas de diferentes tamanhos e densidades. (JUNGBAUER A., 2013).

- Colunas de bloco monolítico único: método robusto que permite passagem de grandes quantidades de material e tolera a entrada de ar além de não necessitar de empacotamento. Entretanto, consome uma grande quantidade de tampão que pode ser reduzida ao se combinar com técnicas de leito móvel simulado (RAJAMANIKAM et al. 2015).

Técnicas alternativas de separação.

Além das técnicas cromatográficas, a indústria conta com outras opções que podem ser usadas em circunstâncias especiais ou em conjunto com a cromatografia. Precipitação por afinidade, filtração de alta performance de fluxo tangencial, sistemas aquosos duplos, alto gradiente de pesca magnética, eletroforese preparativa e foco isoelétrico, são os recursos mais comumente utilizados (FIELDS et al. 2016).

Considerações Finais

O desenvolvimento de tecnologias que permitam a produção de substâncias por micro-organismos é um trabalho multidisciplinar envolvendo times de profissionais de alta capacidade de áreas como microbiologia, química, bioinformática, engenharia bioquímica, agricultura e até mesmo a economia. Para isso, terá que ocorrer a parceria entre institutos e empresas que são necessárias devido a grande necessidade de informação requerida para modificações em micro-organismos que almejam produção em escala industrial de modo economicamente viável.

Um terço dos biofármacos são produzidos a partir de micro-organismos. A escolha se embasa no baixo custo de produção, fácil manipulação e propagação, e diversidade de métodos moleculares disponíveis. Esses biofármacos são majoritariamente produzidos no Japão, Estados Unidos e Europa, sendo a maior parte dedicada ao gerenciamento de doenças inflamatórias (como a artrite reumatoide) e câncer.

Patentes de vários produtos de biofármacos estão expirando ou vão expirar nos próximos anos permitindo a produção e comercialização de biossimilares e genéricos. Esse fator somado ao crescente custo no cuidado a saúde e ao envelhecimento da população mundial aumenta as oportunidades comerciais para biossimilares e biosuperiores.

Apesar da efetividade para controle ou cura, em geral, o tratamento com biofármacos ainda é considerado caro podendo chegar a valores de um milhão de dólares por paciente. Sendo assim, biofármacos produzidos são uma das grandes promessas dentro do campo terapêutico e a constante pesquisa e inovação na área tende a aumentar seu uso, bem como ampliar o número de enfermidades em que se aplicam.

Referências Bibliográficas

- AZEVEDO, A.M.; ROSA, P.A.J.; FERREIRA, I.F.; AIRES-BARROS, M.R.; Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. **Trends Biotechnol.** v. 27(4), p. 240–247, 2009
- BIANCHINI, L. F.; ARRUDA, M. F. C.; VIEIRA, S. R.; CAMPELO P. M. S.; GRÉGIO, A. M. T.; ROSA, E. A. R. Microbial biotransformation to Obtain New Antifungals. **Frontiers in Microbiology**, vol 6,p 1-12, 2015.
- BREITLING, R.; TAKANO, E.; Synthetic biology advances for pharmaceutical production. **Curr Opin Biotechnol.**;v 35, p 46–51. 2015.
- CHIEN, A.; EDGAR, D. B.; TRELA, J. M.; Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. **J. Bacteriol.** v 127,p 1550–1557. 1976
- DOROGHAZI, J. R.; ALBRIGHT, J. C.; GOERING, A. W.; A roadmap for natural product discovery based on large-scale genomics and metabolomics. **Nat Chem Biol.** v 10(11), p 963–968, 2014.
- FIELDS, C.; LI, P.; O'MAHONY, J. J.; LEE, G. U.; Advances in affinity ligand-functionalized nanomaterials for biomagnetic separation. **Biotechnol Bioeng.**; v 113(1),p11–25, 2016
- GRONEMEYER, P.; DITZ, R.; STRUBE, J.; Trends in upstream and downstream process development for antibody manufacturing. **Bioengineering.** 2014; v 1(4), p 188–212, 2014.
- HARVEY, C. J. B.; PUGLISI, J. D.; PANDE, V. S.; CANE, D. E.; KHOSLA. C.; Precursor directed biosynthesis of an orthogonally functional erythromycin analogue: selectivity in the ribosome macrolide binding pocket. **J Am Chem Soc.**; v 134(29), p 12259–12265, 2012.
- IMMETHUN, C. M.; HOYNES-O'CONNOR, A. G.; BALASSY, A.; MOON, T. S. S.; Microbial production of isoprenoids enabled by synthetic biology. **Front Microbiol.**;v 4(75), p 1–8, 2013.
- JOHNSON, I. S.; Human insulin from recombinant DNA technology. **Science**, v 219, p 632–637, 1983.
- JOZALA, A. F.; GERALDES, D. C.; TUNDISI, L. L.; FEITOSA, V. A.; BREYER, C. A.; CARDOSO, S. L.; MAZZOLA, P. G.; NASCIMENTO, L. O., YAGUI, C. O. R.; MAGALHÃES, P. O.; OLIVEIRA, M. A.; JUNIOR, A. P.; Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **Brazilian Journal of Microbiology**,v 47 S, p 51-63, 2016.
- JUNGBAUER, A.; Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. **Trends Biotechnol.**, v 31(8), p 479–492, 2013
- LEADER, B.; BACA, Q. J.; GOLAN, D. E.; Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. **Nat Rev Drug Discov.**; v 7(1), p 21–39, 2008.
- LEE, S. Y.; MATTANOVICH, D.; VILLAVERDE, A.; Systems metabolic engineering, industrial biotechnology and microbial cell factories. **Microbial Cell Factories**, v 11, p 156, 2012.

- LEE, S. Y. Y.; KIM, H. U. U.; PARK, J. H. H.; PARK, J. M. M.; KIM, T. Y. Y.; Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production. **Drug Discov Today**. v 14(1–2), p 78–88, 2012.
- MCGOVERN, P. E.; ZHANG, J.; TANG, J.; ZHANG, Z.; HALL, G. R.; MOREAU, R. A. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v 101, p 17593–17598. 2004.
- MEDEMA, M. H.; BLIN, K.; CIMERMANCIC, P.; antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. **Nucleic Acids Res.**; v 39(6), p 339–346, 2011.
- MITCHELL, W.; Natural products from synthetic biology. **Curr Opin Chem Biol**. v 15(4), p 505–515, 2011.
- MITRAGOTRI, S.; BURKE, P. A.; LANGER, R.; Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. **Nat Rev Drug Discov.**, v 13(9), p 655–672, 2014.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod.**; v 75(3), p 311–335, 2012.
- PATERSON, R. R. M.; (2006). Ganoderma—A therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**, v 67, p 1985–2001, 2006.
- PFLEGER, B. F.; PITERA, D. J.; SMOLKE, C. D.; KEASLING, J. D.; Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes. **Nat Biotechnol**. v 24(8), p 1027–1032, 2006.
- RAJAMANICKAM, V.; HERWIG, C.; SPADIUT, O.; Monoliths in bioprocess technology. **Chromatography**. v 2(2), p 195–212, 2015.
- ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R.; Aqueous two-phase systems: a viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. **J Chromatogr A**. v 1217(16), p 2296–2305, 2010.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v 239, p 487–491, 1988.
- SARASWAT, M.; MUSANTE, L.; RAVIDÁ, A.; SHORTT, B.; BYRNE, B.; HOLTHOFER, H.; Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends. **Biomed Res Int**. v 2013, p 1–18, 2013.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; **Biotecnologia Industrial**. v.2.1a ed. Engenharia Bioquímica São Paulo, Brasil: Blucher; 2001.
- SEKHON, B. S.; Biopharmaceuticals: an overview. **Thai J Pharm Sci**. v 34, p 1–19, 2010.
- SUN, H.; LIU, Z.; ZHAO, H.; ANG, E. L.; Recent advances in combinatorial biosynthesis for drug discovery. **Drug Des Devel Ther**. v 9, p 823–833, 2015.
- SUN, J.; ALPER, H. S.; Metabolic engineering of strains: from industrial scale to lab-scale chemical production. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v 42(3), p 423–436, 2014.

TROSSET, J. Y.; CARBONELL, P.; Synthetic biology for pharmaceutical drug discovery. **Drug Design, Development and Therapy** v 9, p 6285-6302, France, 2015.

VENISETTY, R. K.; CIDDI, V. Application of microbial biotransformation or the new drug discovery using natural drugs as substrates. **Curr. Pharm. Biotechnol.** v 4, p 153–167, 2003.

WALSH, G. New biopharmaceuticals. **Biopharm. Int.** v 25, p 34–38, 2012.

WANG, Z.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnol. Adv.** v 19, p 201–223, 2001.

WARIKOO, V.; GODAWAT, R.; BROWER, K.; et al. Integrated continuous production of recombinant therapeutic proteins. **Biotechnol Bioeng.** v 109(12), p 3018–3029, 2012.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.** v 87, p 4576–4579, 1990.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.** v 74, p 5088–5090, 1977.