KARINA KLAFKE

Desenvolvimento do processo de produção em biorreator do
bioinseticida *Spodoptera frugiperda* MNPV em células de inseto Sf-

9

São Paulo, 2020

KARINA KLAFKE

Desenvolvimento de processo de produção em biorreator do
bioinseticida *Spodoptera frugiperda* MNPV em células de inseto Sf-
9

Versão revisada

Dissertação apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Aldo Tonso

Coorientadora: Dra. Marlinda Lobo de Souza

São Paulo, 2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Klafke, Karina

Desenvolvimento de processo de produção em biorreator do bioinseticida Spodoptera frugiperda MNPV em células de inseto Sf-9 / K. Klafke -- versão corr. -- São Paulo, 2020.
155 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Biorreator 2.Baculoviridae 3.Bioinseticida 4.Produção in vitro
5.Spodoptera frugiperda I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

Agradecimentos

Muito obrigada aos que cruzaram meu caminho e deixaram um pouco de si, aos que caminham junto de mim e aos que sempre estiveram lá.

Aldo, muito obrigada por compartilhar um pouco de ti e do que tu sabes, significou muito para mim. Obrigada pela amizade, pelo bom humor, pela preocupação e carinho de sempre.

Marlinda, obrigada pelo apoio, pela alegria e por sempre fazer as coisas parecerem melhores do que são.

Muito obrigado a todos os professores, pesquisadores, técnicos, alunos e colegas que, de alguma forma, fizeram parte da minha vida na USP e que, com certeza, ajudaram a realizar este trabalho. Mesmo nos tempos difíceis, ainda há algum sentimento de união e colaboração na pesquisa, sentimento que impulsionou meu trabalho e eu sou grata por isso.

Aos pesquisadores e técnicos do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan, em especial, ao Leme que sempre me ajudou e se preocupou comigo. Obrigada pelo carinho, Leme!

Obrigada ao Marcio e ao William da EMBRAPA que, pacientemente, me ajudaram e me guiaram por muitas análises.

Aos meus pais por serem meus professores, meus amigos e meu lar, pelo apoio incansável, por me mostrarem caminhos, por ouvirem os desabafos e concordarem com eles mesmo quando sem motivo, por acreditarem em mim sempre (e nos tamagotchi), pela motivação, piadas e amor. Ao meu irmão que me encoraja a perseguir o meu melhor. E a minha dinda Adriana, que mesmo longe, sempre dá um jeito de estar por perto. xx.

Aos meus amigos do Sul e de São Paulo, sem vocês eu já teria desistido faz tempo. Obrigada por me acolher sempre num abraço. À Carol e à Nati por tudo desde sempre, vocês são um norte para mim e uma inspiração. À Dani que é meu porto seguro e faz eu me sentir melhor em qualquer ocasião e sempre foi minha revisora, colega, orientadora, consultora e anjo. Ao Diogo e à Natasha que fizeram São Paulo mais bonita para mim. E aos integrantes da Cascatinha que, literalmente, me acolheram e fizeram eu me sentir parte de novo. Vocês sabem o quanto significam.

Ao Jim e à Bonita, que mesmo nos problemas me receberam, me cuidaram e me adotaram não só na pesquisa como em toda a experiência que foi ter tido eles na minha vida, desde aprender a dirigir até a confiança que colocaram em mim. Da mesma forma, à Kimra e ao Dwight que me trataram como família. Aos meus amigos que fizeram eu me sentir mais em casa, especialmente à Aletta.

Tenho muita sorte de ter vocês na minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Número de processo 2017/06371-1), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) agradeço o suporte financeiro.

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de termos e abreviações	iii
Lista de quadros, figuras, imagens e apêndices	v
Lista de gráficos	vi
Lista de Tabelas	viii
1. INTRODUÇÃO	17
2. Revisão Bibliográfica	18
2.1 Contexto Agro econômico	18
2.1.1. Importância da cultivar milho	18
2.1.2. <i>Spodoptera frugiperda</i>	18
2.1.3. Agrotóxicos	21
2.1.4. Manejo Integrado de Pragas (MIP)	22
2.2. Biopesticidas	23
2.3. Baculovírus	23
2.3.1. Classificação	24
2.3.2. Ciclo de vida	24
2.3.3. Genes/proteínas chave na biologia do baculovírus	27
2.4. Produção <i>in vivo</i> de baculovírus como biopesticidas	28
2.4.1. Produção <i>in vivo</i> - Biofábricas	28
2.5. Produção <i>in vitro</i> de baculovírus como biopesticidas	29
2.5.1. Metabolismo de células de inseto	32
2.5.1.1 Metabolismo de carboidratos	32
2.5.1.2. Metabolismo de aminoácidos	34
2.5.1.3. Metabolismo de lipídios	36
2.5.1.4. Metabolismo de subprodutos	36
2.5.2. Cultivo de células de inseto	37
2.5.2.1. Cisalhamento celular	38
2.5.3. Emprego de células de inseto para produção <i>in vitro</i>	39
2.5.4. Parâmetros de infecção viral	40
2.5.5. Desafios da produção <i>in vitro</i>	42
2.6. Cenário econômico	44
3. JUSTIFICATIVA	46
4. OBJETIVOS	47
4.1. Objetivos específicos	47
5. MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1. Linhagem celular, vírus e meio de cultura	48
5.2. Cultivo de células (suspensão e adesão)	49
5.3. Preparo do banco de células e descongelamento celular	49
5.4. Determinação da concentração de células viáveis (Xv)	50
5.5. Quantificação da concentração de glicose, lactato, glutamina e glutamato	50
5.6. Quantificação de amônio	50
5.7. Captura de imagem	50
5.8. Cultivo de células em biorreator	51

5.9.	Cálculo do kLa	52
5.10.	Adaptação celular	53
5.11.	Ensaio de suplementação de cisteína em meio Sf-900 III	53
5.12.	Ensaio de suplementação de ácido cisteico em meio Sf-900 III	54
5.13.	Ensaio de suplementação em meio ExCell 420	54
5.14.	Testes de infecção com baculovírus	55
5.15.	Titulação viral	56
5.16.	Liberação e contagem de poliedros	56
5.17.	Extração de DNA viral a partir de células infectadas	56
5.18.	Eletroforese em gel de agarose	56
5.19.	PCR (Reação em cadeia da polimerase)	57
5.20.	Purificação do produto de PCR para sequenciamento e análise das sequências	57
5.21.	PCR quantitativo em tempo real	58
5.22.	Análise cinética e estatística	58
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6.1.	<u>Etapa de crescimento celular em frasco <i>shaker</i></u>	61
	<u>Escola Politécnica da USP – Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GEnBio)</u>	
6.1.1.	Suplementação do meio Sf-900 III - Efeito da suplementação de cisteína na cinética celular (SuplBR1)	61
6.1.2.	Suplementação do meio Sf-900 III - Ensaio de suplementação de ácido cisteico (SuplBR2)	63
	<u>USDA – Forest Service Northern Research Station</u>	
6.1.3.	Otimização do meio ExCell 420 (SuplUS1)	65
6.1.4.	Comparações entre meios de cultivo Sf-900 III e ExCell 420 (USDA X GEnBio)	67
6.2.	<u>Etapa de crescimento celular em biorreator</u>	71
	<u>Escola Politécnica da USP – Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GEnBio)</u>	
6.2.1.	Ensaio padrão em biorreator e análises metabólicas	71
	<u>USDA – Forest Service Northern Research Station</u>	
6.2.2.	Ensaio padrão em biorreator	78
6.2.3.	Ensaio padrão com meio ExCell 420 otimizados	79
	<u>Escola Politécnica da USP – Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GEnBio)</u>	
6.2.4.	Ensaio em biorreator com suplementação	81
6.2.5.	Ensaio em biorreator com diminuição do cisalhamento celular - Ensaio em biorreator STR <i>bubble free</i>	84
	<u>USDA – Forest Service Northern Research Station</u>	
6.2.6.	Ensaio em biorreator com diminuição do cisalhamento celular - Ensaio padrão em biorreator Wave	89
6.2.7.	Ensaio padrão em biorreator Wave com meio ExCell 420 otimizado	90
6.3.	Comparações da etapa de crescimento celular	92
6.4.	<u>Etapa de infecção viral em biorreatores</u>	94
	<u>Escola Politécnica da USP – Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GEnBio)</u>	
6.4.1.	Ensaio de infecção em biorreator STR <i>bubble free</i> x aspersor (MOI 0,1)	94
6.4.2.	Ensaio de infecção em biorreator STR aspergido (MOI 1,0)	107
	<u>USDA – Forest Service Northern Research Station</u>	
6.4.3.	Ensaio de infecção em biorreator STR aspergido (MOI 1,0)	114
6.4.4.	Ensaio de infecção em biorreator STR aspergido - aumento de escala	118
6.4.5.	Ensaio de infecção em biorreator Wave (MOI 1,0)	121

6.5.	Comparações da etapa de infecção viral	127
6.6.	<u>Considerações finais</u>	130
7.	CONCLUSÕES	133
7.1.	<u>Escola Politécnica da USP – Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GEnBio)</u>	133
7.2.	<u>USDA – Forest Service Northern Research Station</u>	134
8.	PERSPECTIVAS	135
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
10.	APÊNDICE	148

Resumo

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de milho do mundo, portanto danos ao cultivo podem trazer um prejuízo econômico considerável. A *Spodoptera frugiperda* é a praga mais comum de milho nas Américas e os baculovírus são patógenos naturais desta, podendo atuar como bioinseticidas. Atualmente, são empregadas estratégias *in vivo* para produção em escala comercial através da multiplicação do vírus no próprio inseto hospedeiro em instalações de biofábricas, no entanto, a alternativa de produção *in vitro* em cultura de células de insetos em larga escala por meio de biorreatores pode trazer vantagens econômicas. Neste estudo buscou-se desenvolver o processo de produção *in vivo* de SfMNPV através do estudo de diferentes multiplicidades de infecção (MOI) e suplementações nutricionais, análises morfológica e molecular da infecção e testes do efeito da diminuição de cisalhamento no crescimento e produção de vírus. O projeto foi desenvolvido em uma parceria da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (GENBio-USP) com a EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) e com o United States Department of Agriculture (Laboratório NRS-FS/USDA). Os experimentos foram feitos com células Sf-9 em meio de cultivo Sf-900 III e ExCell 420 em frascos e em biorreatores STR aspergido, STR *bubble free* e Wave. De início, testou-se uma série de suplementações para o meio de cultivo ExCell 420 e definiu-se que a melhor condição dentre as avaliadas foi a combinação da adição de 2 g/L de glicose e 200 mg/L de ácido cisteico, que elevou a densidade celular em 37,5%, resultando em uma concentração celular máxima de $8,8 \times 10^6$ cel/mL em frasco *shaker*. Já para o meio de cultivo Sf-900 III, foi definida a adição de 1,0 g/L de glutamina nos ensaios em biorreator. Os cultivos em biorreator STR aspergido tiveram média de velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\max}$) de $0,60 \text{ dia}^{-1}$. Cultivos em STR *bubble free* apresentaram impacto significativo no valor da concentração celular máxima ($X_{\text{vmáx}}$), atingindo valores de 10×10^6 cel/mL, representando aumento de 42,8% comparada à abordagem STR aspergido, acompanhada de queda no $\mu_{\max}$ para $0,30 \text{ dia}^{-1}$. Da mesma forma, cultivos em reator Wave com meio ExCell 420 apresentaram, em média, aumento de 42,5% em $X_{\text{vmáx}}$ comparada com o equivalente em STR e $\mu_{\max}$ em torno de $0,45 \text{ dia}^{-1}$. Estes dados corroboram o efeito do cisalhamento como importante fonte de estresse celular. A análise metabólica dos ensaios com meio de cultivo Sf-900 III foram ao encontro de dados da literatura, confirmando a eficiência no metabolismo via ciclo TCA para células Sf-9, entretanto, devido a valores levemente aumentados de concentração de amônio, supõe-se que possa estar ocorrendo fenômeno reportado como efeito de densidade, em que há perda de eficiência metabólica devido a inibição por alta concentração celular. Ademais, observou-se também aumento de consumo de glicose pós-infecção. Por fim, a otimização da etapa de crescimento celular levou à melhora significativa na etapa de produção viral. Em ensaios de biorreator foi confirmado MOI de 1,0 como parâmetro otimizado sem alterações genéticas virais. Cultivo em biorreator STR aspergido com meio ExCell 420 obteve produção de 6×10^{10} pol/L, em comparação com seu equivalente em Wave de 43×10^{10} pol/L, que teve a melhor reprodutibilidade do estudo. Contudo, a abordagem de STR aspergido em meio de cultura Sf-900 III combinado ao MOI de 1,0 e suplementação com glutamina foi a que apresentou melhor desempenho de produção viral com produtividade específica acima de 300 pol/cel e volumétrica de 9×10^{11} pol/L.

Palavras-chave: biopesticida, biorreator, SfMNPV, baculovírus, Sf-9, produção *in vitro*, *Spodoptera frugiperda*.

Abstract

Brazil is one of the world biggest producers and exporters of corn crop, hence cultivation damage can bring a substantial prejudice. *Spodoptera frugiperda* is America's most common corn pest and baculoviruses are natural pathogens of this pest and can act as a biopesticide. Currently, *in vivo* strategies for commercial scale are employed by multiplying the virus in the host insect in biofactory facilities, however, *in vitro* large-scale production alternative can bring economic advantages. This study pursued to develop the process of *in vivo* production of SfMNPV through the study of different multiplicities of infection (MOI) and nutritional supplements, morphological and molecular analysis of the infection and tests of the effect of decreasing shear stress on the growth and production of virus. This project was developed through a partnership between the Polytechnic School of University of São Paulo (GenBio-USP) with EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology (Cenargen) and the United States Department of Agriculture (NRS-FS/USDA). The determinations were accomplished in Sf-9 insect cells in Sf-900 III and ExCell 420 culture media and performed in flasks and STR with aspersion, STR bubble free and Wave bioreactor models. At first, a series of supplementations were tested in the ExCell 420 culture medium and it was defined that the best condition among those evaluated was the combination of the addition of 2 g/L of glucose and 200 mg/L of cysteic acid, which increased cell density by 37.5%, resulting in a maximum cell concentration of 8.8×10^6 cell/mL in shaker flasks. As for the Sf-900 III culture medium, 1 g/L of glutamine was added. Batches in sparged STR bioreactor had an average maximum specific growth rate ($\mu_{\max}$) of 0.60 day^{-1} . Tests in STR bubble free showed a significant impact on the maximum cell concentration (X_{vmax}) value, reaching values of 10×10^6 cell/mL, representing a 42.8% increase compared to the sparged STR approach, which was accompanied by a drop in $\mu_{\max}$ to 0.30 day^{-1} . Likewise, cultures in the Wave reactor with ExCell 420 medium showed, on average, a 42.5% increase in X_{vmax} compared to the equivalent in STR and $\mu_{\max}$ around 0.45 day^{-1} . These data corroborate the effect of shear as an important source of cellular stress. The metabolic analysis of the batches with Sf-900 III culture medium met with data from the literature, confirming the metabolic efficiency via TCA cycle in Sf-9 cells, however, due to slightly increased values of ammonium concentration, it is assumed that a phenomenon reported as density effect, in which there is loss of metabolic efficiency due to inhibition by high cell concentration, may be occurring. In addition, an increase in glucose consumption was also observed in a post-infection manner. Finally, the optimization of the cell growth stage led to a significant improvement in the viral production stage. In bioreactor tests, a MOI of 1.0 was confirmed as an optimized parameter without viral genetic alterations. Batches in sparged STR bioreactor with ExCell 420 medium yielded 6×10^{10} pol/L, compared to its Wave equivalent of 43×10^{10} pol/L, which had the best reproducibility in the study. However, the sparged STR approach with Sf-900 III culture medium combined with the MOI of 1.0 and glutamine supplementation showed the best viral production performance with specific productivity above 300 pol/cell and volumetric productivity of 9×10^{11} pol/L.

Key words: biopesticide, bioreactor, SfMNPV, baculovirus, Sf-9, *in vitro* production, *Spodoptera frugiperda*.

Lista de termos e abreviações

AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatalis nucleopoliedrovirus múltiplos</i>
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
bt	<i>base pairs</i> /pares de bases
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BV	<i>Budded virus</i> /Vírus extracelulares
Cenargen	EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia
CCI	Concentração celular no momento da infecção
CO ₂	Dióxido de carbono
CSR	Controle em <i>shaker</i> do reator
Cya	Ácido cisteico
Cys	Cisteína
DIP	<i>Defective interfering particles</i> /Partículas interferentes defectivas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpi	dias pós infecção
EMBRAPA	Empresa Brasileira de pesquisa agropecuária
FP	mutante com poucos poliedros - <i>Few polyhedra</i>
Glc	Glicose
Gln	Glutamina
Glt	Glutamato
GOGAT	Glutamato sintase
GS	Glutamina sintase
GDH	Glutamato desidrogenase
GV	Granulovírus
IC-BEVS	<i>Insect cell - Baculovirus expression vector system</i> /Sistema de expressão de vetores célula de inseto - baculovírus
ICD	<i>Initial cell density</i> /Densidade celular inicial
kLa	Coeficiente volumétrico de transferência de massa
Lac	Lactato
Ln	Logaritmo neperiano
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MIP	Manejo Integrado de Pragas
MNPV	Múltiplo Nucleopoliedrovírus
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> /Multiplicidade de infecção
MP	mutante muitos poliedros - <i>Many polyhedra</i>
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NH ₄ ⁺	Amônio
NPV	nucleopoliedrovírus/ <i>nucleopolyhedrovirus</i>
OB	<i>Oclusion body</i> /Corpo de oclusão
OD	Oxigênio dissolvido
ODV	<i>Oclusion derived virus</i> /Vírus derivado de oclusão
OTR	<i>Oxygen Transmission Rate</i> /Taxa de transferência de oxigênio
OUR	<i>Oxygen Uptake Rate</i> /Taxa de consume de oxigênio
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> /Reação em cadeia da polimerase
pfu	<i>Plaque forming unit</i> /Unidade formadora de placa
R	Reator

R^2	Coeficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
S	Substrato
Sf-9	Clone 9 da linhagem de célula <i>Spodoptera frugiperda</i> SF21
SF21	Linhagem de célula <i>Spodoptera frugiperda</i> estabelecida a partir do ovário da lagarta
SFB	Soro Fetal Bovino
SFC	<i>Shaker Flask Control</i>
SFM	<i>Serum Free Media</i> / Meio de cultivo livre de soro fetal bovino
SfMNPV	<i>Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus</i>
SfMNPV I-19	<i>Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus</i> isolado 19
SfMNPV NicB	<i>Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus</i> isolado Nicarágua B
SNPV	<i>Single Nucleopolyhedrovirus</i> /Nucleopoliedrovírus único
STR	<i>Stirred Tank Reactor</i> /Reator de tanque agitado
SUB	<i>Single use bioreactor</i> /Biorreator de uso único
TCA	Ciclo do ácido cítrico
TCID ₅₀	<i>50% Tissue Culture Infective Dose</i> /Dose infectiva de cultura de tecido 50%
TOH	<i>Time of harvest</i> /Tempo de coleta do produto viral
TOI	<i>Time of infection</i> /Instante de infecção
USDA – NRS-FS <i>Forest Service</i>	<i>United States Department of Agriculture – Northern Research Station –</i>
USP – GEnBio	Universidade de São Paulo – Grupo de engenharia de bioprocessos
VLP	<i>Virus like particle</i> /Partícula como vírus
X	Célula
X _{nv}	Células não viáveis
X _v	Células viáveis
X _{v0}	Células viáveis iniciais
X _{vmax}	Concentração ou densidade celular máxima
Y _{P/Glc}	Fator de conversão glicose a produto
Y _{P/Gln}	Fator de conversão glutamina a produto
Y _{X/Glc}	Fator de conversão glicose à célula
Y _{X/Gln}	Fator de conversão glutamina à célula
μ _{Gln}	Taxa de consumo de glutamina
μ _{max}	Velocidade específica de crescimento máxima

Lista de Quadros, Figuras, Imagens e Apêndices

Quadro 1	Cultivares hospedeiras da praga <i>Spodoptera frugiperda</i> já reportadas	20
Figura 1	Esquema do ciclo de ataque da praga <i>Spodoptera frugiperda</i> na cultivar milho	19
Figura 2	Incidência da peste <i>Spodoptera frugiperda</i> em escala global	20
Figura 3	Formas fenotípicas dos baculovírus e ciclo de infecção da lagarta	26
Figura 4	Vias metabólicas simplificadas de linhagem de célula de inseto	34
Figura 5	Esquema do sistema GS/GDH/GOGAT e de metabolismo de subprodutos	35
Figura 6	Esquema de fluxo metabólico central de Sf-9 no crescimento celular e na infecção viral	41
Figura 7	Fórmula química da L-cisteína e do L-ácido cisteico	63
Imagem 1	Microscopia Eletrônica de Transmissão - células Sf-9 infectadas com o vírus SfMNPV em Biorreator 7 dpi	31
Imagem 2	Mortalidade de larvas de <i>S. frugiperda</i> após ingestão de poliedros produzidos em biorreator – bioensaio	31
Imagem 3	Comparação visual em microscópio da infecção viral em modo de cultivo de suspensão e adesão	43
Imagem 4	Microscopia da infecção do controle em shaker dos reatores R10 e R11, CSR11 em 7 dias, com aumento de 64X e de 320X	96
Imagem 5	Captura de imagem da progressão da infecção viral do reator R10, de 0h até 7dpi, a primeira coluna tem aumento de 64X e a segunda de 160X	97
Imagem 6	Captura de imagem da progressão da infecção viral do reator R11, de 0h até 7dpi, a primeira coluna tem aumento de 64X e a segunda de 160X	98
Imagem 7	Géis de PCR dos genes que codificam Poliedrina, FP25K, Proteína F, p10 e pp34	106
Imagem 8	Captura de Imagens da progressão da infecção viral do CSR 12 infectado com SfMNPV MOI 1,0 para os tempos 0, 3, 5, 7, 11 e 14 dpi (dias pós infecção)	112
Imagem 9	Captura de Imagem da progressão da infecção viral do R12 com SfMNPV MOI 1,0 para os tempos 0, 3, 5, 7, 11 e 14 dpi (dias pós infecção)	113
Imagem 10	Imagem representativa da progressão da infecção por SfMNPV-NicB em 3, 5 e 7 dpi para biorreator STR aspergido (US10) versus Wave (Wave07).	126
Apêndice 1	Monitoramento dos parâmetros de cultivo - R01	148
Apêndice 2	Monitoramento dos parâmetros de cultivo - R02	148
Apêndice 3	Monitoramento dos parâmetros de cultivo - R03	149
Apêndice 4	Monitoramento dos parâmetros de cultivo - R04	149
Apêndice 5	Monitoramento dos parâmetros de cultivo - R05	150
Apêndice 6	Monitoramento dos parâmetros de cultivo - R06	150
Apêndice 7	Monitoramento dos parâmetros de cultivo - R08	151
Apêndice 8	Monitoramento dos parâmetros de cultivo - R09	151
Apêndice 9	Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R10	152
Apêndice 10	Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R11	152
Apêndice 11	Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R12	153
Apêndice 12	Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R13	153
Apêndice 13	Tabela resumo de todos os experimentos conduzidos no USDA-NRS/FS e seus respectivos resultados	154
Apêndice 14	Tabela resumo de todos os experimentos conduzidos no GEnBio - USP e seus respectivos resultados	154

Apêndice 15	Tabela resumo dos valores iniciais, finais e máximos/mínimos – quando pertinentes - dos metabólitos analisados: glicose, lactato, glutamina e glutamato e amônio para os ensaios em biorreator realizados no GEnBio – USP	155
Apêndice 16	Tabela resumo dos fatores de conversão substrato à célula de glicose e glutamina para os ensaios conduzidos em biorreator no GEnBio – USP.	155

Lista de Gráficos

Gráfico 1	Curva de crescimento celular do experimento SuplBR 1	62
Gráfico 2	Variáveis cinéticas do experimento SuplBR 1, de velocidade específica de crescimento máximo e crescimento celular máximo	62
Gráfico 3	Comparativo da cinética de crescimento celular do experimento SuplBR2	64
Gráfico 4	Comparação da média de crescimento celular em escala de shaker da linhagem Sf-9 em meio de cultivo ExCell 420 e da linhagem Sf-9 em meio de cultura Sf-900 III	65
Gráfico 5	Comparação entre as condições de suplementação para velocidade específica de crescimento celular máximo $\mu_{\text{máx}}$ em dia^{-1} para o experimento SuplUS1	66
Gráfico 6	Comparação entre as condições de suplementação para concentração celular máxima ($X_{v\text{máx}}$) em cel/mL para o experimento SuplUS1	66
Gráfico 7	Gráfico da análise da variação do $\mu_{\text{máx}}$ conforme passagens da célula Sf-9 e com a indicação da proporção de meios de cultivo utilizada	68
Gráfico 8	Comparação do experimento USDA X GEnBio – célula Sf-9 USDA	68
Gráfico 9	Comparação do experimento USDA X GEnBio – célula Sf-9 GEnBio	69
Gráfico 10	Análise metabólica meio ExCell 420	70
Gráfico 11	Comparação do crescimento celular entre os Controles em shaker dos reatores R04, R05 e R06, ou seja, CSR04, 05 e 06	71
Gráfico 12	Comparativo do perfil de crescimento celular das células viáveis dos três Reatores presentes nesse conjunto de dados (R04, R05 e R06)	72
Gráfico 13	Análise do crescimento celular e do metabolismo – R04	75
Gráfico 14	Análise do crescimento celular e do metabolismo – R05	76
Gráfico 15	Análise do crescimento celular e do metabolismo – R06	77
Gráfico 16	Curva cinética dos ensaios em reator US01, US02 e US03 (US padrão) para células viáveis (X_v) e não viáveis (X_{nv}), além de respectiva viabilidade.	78
Gráfico 17	Comparativo cinético dos reatores US04, US05 e US padrão	80
Gráfico 18	Comparativo cinético dos controles em frasco SFC04, SFC05 e SFC padrão	81
Gráfico 19	Análise do crescimento celular e do metabolismo – R08	83
Gráfico 20	Análise do crescimento celular e do metabolismo – R09	83
Gráfico 21	Comparativo do perfil de crescimento celular das células viáveis (X_v) e viabilidade de R08 e R09	84
Gráfico 22	Análise do crescimento celular - CSR13	85
Gráfico 23	Análise do crescimento celular e do metabolismo – R13	86
Gráfico 24	Análise do crescimento celular – Wave01	89
Gráfico 25	Análise do crescimento celular – Wave02	90
Gráfico 26	Análise do crescimento celular – Wave03	91
Gráfico 27	Comparação cinética dos três modos de transferência de oxigênio: STR x <i>bubble free</i> x Wave	93
Gráfico 28	Comparação do crescimento celular – CSR10 e CSR11	95
Gráfico 29	Análise do crescimento celular e da infecção viral – CSR11	95
Gráfico 30	Análise do crescimento celular, metabolismo e infecção viral – R10	101

Gráfico 31	Análise do crescimento celular, metabolismo e infecção viral – R11	102
Gráfico 32	Comparativo do crescimento celular e infecção viral para os reatores R10 e R11	103
Gráfico 33	Comparativo do crescimento celular (CSR12 x CSR13) e infecção viral (CSR12)	108
Gráfico 34	Análise do crescimento celular, metabolismo e infecção viral – R12	111
Gráfico 35	Análise do crescimento celular e infecção viral – US06	116
Gráfico 36	Análise do crescimento celular e infecção viral – Média de US07 e US10	117
Gráfico 37	Análise do crescimento celular – US08, US09 e Média US07+US10	119
Gráfico 38	Análise da infecção viral – US08	120
Gráfico 39	Análise da infecção viral – US09	120
Gráfico 40	Análise do crescimento celular e infecção viral – Wave04	122
Gráfico 41	Análise do crescimento celular – Wave05, Wave06, Wave07 e Wave08	124
Gráfico 42	Análise da infecção viral – Wave05, Wave 06, Wave07 e Wave08	125

Lista de Tabelas

Tabela 1	Comparativo de dados da literatura de parâmetros de cinética celular e viral e taxas metabólicas para a célula Sf-9	33
Tabela 2	Comparação de condições de cultivo e parâmetros cinéticos na literatura (Drugmand et al., 2012) com trabalhos anteriores do grupo	38
Tabela 3	Quantificação por HPLC/método enzimático de alguns dos nutrientes que compõe os meios de cultivo Sf-900 II (Life Tech.) e ExCell 420 (Sigma-Aldrich) e a respectiva proporção de Sf-900 II para ExCell 420	49
Tabela 4	Passos por passagem da adaptação da linhagem celular Sf-9 do meio Sf-900 III (Life Technologies) para ExCell 420 (Sigma-Aldrich) e ExCell 420 para Sf-900 III	53
Tabela 5	Resumo das condições do experimento de suplementação de cisteína em shaker (SuplBR1)	54
Tabela 6	Relação das condições de otimização do meio de cultura ExCell 420, seus conteúdos com concentração e veículo utilizado (SuplUS1)	55
Tabela 7	Relação dos genes estudados por método de PCR e seus respectivos primers forward e reverse	57
Tabela 8	Relação dos experimentos realizados com a respectiva sigla, operação, sistema e observações pertinentes. O modo de operação padrão foi feito com os parâmetros descritos previamente	60
Tabela 9	Comparação dos parâmetros cinéticos do experimento SuplBR2	64
Tabela 10	Comparação dos parâmetros cinéticos para o experimento USDA X GEnBio	69
Tabela 11	Relação dos metabólitos para meio ExCell 420	70
Tabela 12	Relação dos parâmetros cinéticos de CSR04, CSR05 e CSR06	71
Tabela 13	Relação dos parâmetros cinéticos para R04, R05 e R06	72
Tabela 14	Relação dos parâmetros cinéticos para US01, US02 e US03 e seus controles em frasco SFC01, SFC02 e SFC03	79
Tabela 15	Relação dos parâmetros cinéticos para US04, US05, US06, SFCpadrão, SFC04 e SFC05	80
Tabela 16	Relação dos parâmetros cinéticos para CSR08, R08 e R09	82
Tabela 17	Relação dos parâmetros cinéticos para R13 e CSR13	87
Tabela 18	Relação dos parâmetros cinéticos para Wave01, Wave02, Wave03, SFC03, SFC04 e SFC05	90
Tabela 19	Relação dos parâmetros cinéticos para CSR10, CSR11, R10 e R11	94
Tabela 20	Comparativo dos fatores de conversão metabólicos para R10 e R11	104
Tabela 21	Relação dos parâmetros cinéticos para CSR13, CSR12 e R12	107
Tabela 22	Análise quantitativa por RT-qPCR do DNA viral para o R12 e CSR12	114
Tabela 23	Relação dos parâmetros cinéticos para US08, US09 e a média de US07 e US10, SFC08 e SFC08inf (controles em frasco infectado e não infectado de US08 e US09) e SFC07 e SFC07inf (controles em frasco infectado e não infectado de US07+US10)	115
Tabela 24	Relação dos parâmetros cinéticos para US08, US09 e a média de US07 e US10, SFC08 e SFC08inf (controles em frasco infectado e não infectado de US08 e US09) e SFC07 e SFC07inf (controles em frasco infectado e não infectado de US07+US10)	118
Tabela 25	Relação dos parâmetros cinéticos para Wave04 e seus controles infectado e não infectado em frasco (SFC06 e SFC06inf), Wave05, Wave06, Wave07, Wave08, a média dos 4 reatores e seus controles infectado e não infectado em frasco (SFC07 e SFC07inf)	123
Tabela 26	Relação dos parâmetros cinéticos para CSR10, R10, CSR12 e R12	127
Tabela 27	Relação dos parâmetros cinéticos com foco na comparação da análise viral para R10, R11, R12 (em 7 e 14 dpi) e CSR12	127

Tabela 28	Relação dos parâmetros cinéticos para controle e infecção das diferentes estratégias de transferência de oxigênio	128
Tabela 29	Comparação de parâmetros cinéticos de crescimento celular e infecção viral deste estudo com estudos da literatura	131
Tabela 30	Comparação dos fatores de conversão substrato à célula para glicose e glutamina de diferentes trabalhos gerados pelo grupo de pesquisa GEnBio para diferentes linhagens celulares	131
Tabela 31	Comparação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (kLa) para as escalas de shaker, STR aspergido, STR bubble free e biorreator Wave para cultivos de 1,0 litro	131

1. Introdução

O milho é uma das commodities agrícolas mais importantes do Brasil, que é o segundo maior exportador do mundo (USDA, 2018). Contudo, a praga *Spodoptera frugiperda* tem potencial de dano nesta cultivar que chega a valores de 400 milhões de dólares (Valicente, 2016). Este inseto tem potencial reprodutivo alto e fácil dispersão por conta de sua fase adulta como mariposa, é uma espécie polífaga e tem sido reportada atualmente em, pelo menos, 30 países (CABI, 2018). Ademais, tem sido descrita a resistência da praga a tratamento de sementes com pesticida e outras estratégias comumente aplicadas (Omoto *et al.*, 2013 e 2016; Bernardi *et al.*, 2015).

O contexto agro econômico deste impasse envolve problemas de grande amplitude, entre eles, o uso sem critério técnico e de forma prolongada de agroquímicos, que traz consequências severas como contaminação ambiental, intoxicação animal, desequilíbrio ecológico e seleção de pestes resistentes. Também a crescente demanda alimentar tem produzido uma carga exacerbada na capacidade agrícola e gera o grande desafio de alcançar este fim de maneira ecológica. A pesquisa científica agro técnica é essencial na busca do equilíbrio que concilia a utilização de terras de forma produtiva com sustentabilidade (Omoto *et al.*, 2013).

Sendo assim, nesse cenário, a utilização de biopesticidas suporta esses requisitos e pode ser associada também ao manejo integrado de pragas, que, quando usado de maneira correta, mantém alto rendimento ao passo que incorpora qualidade no produto de forma consciente (Pignati *et al.*, 2017). Os baculovírus podem ser definidos como inimigos naturais desta praga de interesse, e tem como vantagens a eficiência com baixo impacto ambiental e rápida decomposição, são também biodegradáveis e não apresentam efeito prejudicial a organismos não alvo, dessa forma, são altamente específicos (Moscardi, 2011).

A produção comercial atual de bioinseticidas virais é baseada em abordagens *in vivo*, que apresentam aplicação já comprovada (Programa de Controle Biológica da Lagarta da Soja – EMBRAPA) e expôs diversos benefícios, como evitar o despejo de 17 milhões de litros de defensivos químicos e vantagem econômica, em comparação com a abordagem química, de, pelo menos, 30 % (EMBRAPA, 2004). Entretanto, a replicação do baculovírus no inseto hospedeiro traz uma série de dificuldades, especialmente na manipulação da lagarta em biofábricas, que envolve canibalismo, problemas de coleta e contaminação microbiológica pela lise da cutícula do inseto, ainda, o processo envolve grande infraestrutura e pessoal especializado, dificultando a escalabilidade (Reid *et al.*, 2014).

Assim, o desenvolvimento da técnica em modo *in vitro* seria interessante para aumento de escala, maior controle e qualidade de processo em pequenos espaços. Para tal, é necessário o cultivo em suspensão de células de inseto para multiplicação viral em biorreator (Szewczyk *et al.*, 2011). Neste estudo foi utilizada a célula Sf-9 e o baculovírus SfMNPV em reatores de bancada e tem como objetivo estudar: a demanda nutricional celular para melhoria da densidade celular por meio de suplementação no meio de cultivo, o efeito do estresse de cisalhamento celular na etapa de crescimento celular e na etapa de infecção viral, o efeito do MOI (multiplicidade de infecção) na progressão de infecção do vírus e o aumento de escala do processo.

Com isso em mente, foram realizadas análises cinéticas, metabólicas e de infecção viral para produção do biopesticida em parceria do Laboratório de Células Animais (LCA - GEnBio) da Universidade de São Paulo (USP) com a EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia e com o laboratório Northern Research Station do Forest Service, United States Department of Agriculture (NRS-FS-USDA).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Contexto Agro econômico

2.1.1. Importância da cultura do milho

O milho foi a primeira cultura a ser domesticada pelo homem e demonstra uma importância econômica extremamente relevante em virtude de sua disseminação em escala global. Representa boa parcela do valor nutricional na dieta humana, além de ser muito utilizada como ração animal.

Possui incontáveis variedades e é um dos cultivos mais tecnológicos e mecanizados, permitindo o desenvolvimento de uma alta produtividade. Em menos de 20 anos, impulsionada pelo avanço científico, a produção triplicou sendo que, no Brasil, é uma das mais altas entre os grãos, entre 5000 e 6000 kg/ha (Conab, 2020).

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho, atrás apenas dos Estados Unidos e da China, sendo o segundo maior exportador mundial (USDA, 2018). Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, o Brasil foi o único país com aumento na exportação mundial em 2018, evidenciando sua relevância econômica (USDA, 2018). Para as três safras de 2019/20 estima-se 18,5 milhões de hectares de área de plantio e uma produção recorde de 101 milhões de toneladas, seguindo uma tendência nacional de crescimento de produção de grãos (Conab, 2020).

2.1.2. *Spodoptera frugiperda*

Uma das principais pragas de milho das Américas é a lagarta do cartucho ou lagarta militar, *Spodoptera frugiperda*, descrita em 1797 por J. E. Smith. No Brasil somente, foi demonstrado que esta é capaz de causar um impacto de até 60% de redução na produtividade, ocasionando um dano financeiro anual de até 400 milhões de dólares (Valicente, 2016).

Possui metamorfose completa, passando por quatro fases distintas – ovo, larva, pupa e adulto. A praga realiza postura nas folhas, sendo que a quantidade de ovos pode variar de 200 até 1000 ovos e o período de incubação é de apenas 3 dias. O período larval varia de 15 a 25 dias com até 7 ínstar, dependendo da temperatura, e, após cerca de 10 dias de pupa, ocorre a emergência das mariposas adultas com período de vida em torno de 12 dias (Omoto *et al.*, 2013).

Uma das características que torna este inseto tão prejudicial é a habilidade de atacar a planta tanto na fase vegetativa quanto na fase reprodutiva. Por conta de causar danos ao cultivo principalmente na fase larval, pode acometer diferentes partes da cultivar, podendo causar o completo desfolhamento ou até seu desprendimento do solo ao atacar a base como lagarta. O dano causado é expressivo e pode ser acentuado em períodos de seca (Cruz *et al.*, 2000). Um esquema do ciclo de ataque da praga com legenda explicativa está na Figura 1.

O uso de estratégias canônicas como a aplicação manual de pesticidas químicos e o tratamento da semente têm se mostrado ineficiente, tendo em vista a localização das lagartas, protegidas no cartucho da planta. Ademais tem se notado crescente desenvolvimento de resistência a inseticidas e estratégias Bt, apesar de cerca de 220 produtos contra a praga estarem disponíveis no mercado (Omoto *et al.*, 2013 e 2016).

Os cultivos sucessivos possibilitaram a sobrevivência de populações, dado seu elevado potencial reprodutivo, e, graças a sua capacidade de dispersão, o fluxo contínuo de mariposas entre culturas hospedeiras ocasionou grandes infestações da praga, independentemente da fase

de desenvolvimento das plantas e época de cultivo. Todos esses fatores tornam essa praga um problema expressivo na agricultura (FAO, 2018).

Outro contratempo no manejo da praga é sua habilidade polífaga, isso significa que tem capacidade de atacar várias culturas agrícolas, mais de 100 espécies de hospedeiros já foram identificadas em várias regiões do mundo (Omoto *et al.*, 2013) (Quadro 1). Esta característica é um agravante muito expressivo devido à permanência da praga na rotação de culturas, permitindo sua sobrevivência, fenômeno chamado de ponte verde e que leva ao aumento da frequência de pulverização (Omoto *et al.*, 2013). Além disso, *Spodoptera frugiperda* é capaz de acometer culturas de alto valor econômico como soja, trigo, sorgo e algodão. Apesar de não ser a principal peste destas cultivares, ainda assim pode resultar em danos consideráveis, tornando ainda mais preocupante sua ação descontrolada e sua disseminação (Burlet *et al.*, 2017).

Foi relatada a presença deste inseto em uma área contínua do sul do Brasil até o México. Já foram reportados casos nos Estados Unidos e Europa e recentemente em regiões novas, como África em condições mais brandas (desde 2016) e na Índia (desde 2018) (Figura 2); sendo que, atualmente, afeta ativamente mais de 30 países (EPPO, 2014 e 2018; IPPC, 2016 e 2018; IITA, 2016; Abrahams *et al.*, 2017; FAO, 2017 e 2018, CABI, 2018).

Figura 1: Esquema do ciclo de ataque da praga Spodoptera frugiperda na cultivar milho
O ciclo se inicia pela postura dos ovos perto do caule da planta; como larvas, a praga se alimenta das folhas e tem atividade noturna; na fase de lagartas é quando causa o maior dano, atacando todas as regiões da planta, inclusive o milho em si e a base da planta; para proteção, elas se movem para as áreas do verticilo ou cartucho; na fase final, cerca de até 15 dias após a postura, o lagarta adulta cai no solo e se enterra para iniciar a fase de pupa; em torno do 25º dia do ciclo a mariposa adulta emerge e durante os 4 a 5 primeiros dias de vida, a fêmea coloca os ovos para reiniciar o ciclo. Fonte: Adaptado de CABI, 2018 e FAO, 2018.

Quadro 1: cultivares hospedeiras da praga *Spodoptera frugiperda* já reportadas. Fonte: Defesa vegetal, 2017.

Cultivares hospedeiras reportados da praga *Spodoptera frugiperda*: Alface, Alfafa, Amendoim, Arroz, Aspargo, Aveia, Batata, Batata-doce, Berinjela, Beterraba, Couve, Couve-flor, Couve-galega, Cana de açúcar, Cebola, Cenoura, Cevada, Chicória, Ervilha, Espinafre, Feijão, Feijão da Flórida, Laranjeira, Limão siciliano, Melancia, Milho, Milho-doce, Pessegueiro, Pepino, Pimentão, Soja, Tangerina, Tomate, Trigo, Trigo sarraceno, Uva, Feijão de corda, Centeio, Grão-de-bico, Gengibre, Tiririca, Crisântemo, Pimenta, Algodão, Painço, Milheto, Sorgo, Sorgo de alepo, Tabaco, Setaria, Capitata, Craveiro, Macieira, Trevo-branco, Seringueira, Nogueira-pecã, Agrostis, Erva-de-febra, Nabo, Alho, Alho-poró, Gladiolo, Trevo-vermelho, Ançarinha branca, Milhã-verde, Beladona, Hibisco, Quinoa, Dália, Amaranço, Caruru, Corda-de-viola, Gerânio, Beldroega, Bananeira, Capim Rhodes, Algodoeiro asiático, Capim-arroz, Alcea, Violeta, Corriola, Buva, Carrapicho, Capim-andropogon, Carriço-liso, Capim-elefante, Cróton, Chicória, Morango chiloensis, Capim quicuio, Timóteo, Sicômoro, Erva-negra, Agrião, Mirtilo, Teosinto, Jasmin manga, Acelga.

Figura 2: Incidência da peste *Spodoptera frugiperda* em escala global. Fonte: CABI, 2018.

2.1.3. Agrotóxicos

Os agrotóxicos têm seu uso tanto em atividades agrícolas, através do setor de produção, abrangendo atividade como limpeza do terreno e preparação do solo, como também em etapa de acompanhamento da lavoura e das pastagens. O uso não agrícola é feito em florestas nativas ou outros ecossistemas, como lagos e açudes, por exemplo. Produtos agropecuários são responsáveis por metade das exportações e por 21% do Produto Interno Bruto brasileiro (Ministério da Agricultura, 2017), paradoxalmente nota-se um aumento do uso de produtos químicos no setor fundiário, provocando uma barreira às exportações e até redução no consumo interno. A produção sob boas práticas é uma demanda mundial, uma vez que embargos ecológicos e de resíduos químicos ainda são empecilhos à expansão das exportações (MAPA, 2009).

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo desde 2008 (FAO, 2018), decorrente do desenvolvimento do agronegócio no setor econômico. O crescimento acelerado é uma das causas do uso sem critério técnico de inseticidas químicos, desencadeando em inúmeras questões ambientais, sociais e de saúde humana. Cerca de 550 mil toneladas de produtos foram comercializadas em 2018, média que tem se mantido nos últimos cinco anos, sendo o glifosato o defensivo mais comumente utilizado (Ibama, 2017). A cultura do milho é a segunda que mais recebe protetores químicos no contexto produtivo (Ministério da Agricultura, 2017).

Os principais grupos químicos para utilização no controle da lagarta do cartucho são os organofosforados, carbamatos e piretroides sintéticos (Waquil *et al.*, 2011). Vem sendo reportado aumento representativo no uso de spinosinas, inibidores de síntese de quitina, avermectinas, pyrroles, diacilhidrazina, oxadiazina e semocarbazona como alternativas à substituição dos primeiros (MAPA, 2009). Como resultado do uso descomedido de agrotóxicos, tem sido documentado o incremento escalonado na frequência de resistência no decorrer das safras, atingindo valores de sobrevivência de pestes rurais acima de 40%, principalmente em regiões de cultivo intenso (Omoto *et al.*, 2013).

Com a introdução, em torno de 2007, de tecnologias Bt, abordagem alternativa ao agrotóxico, foi observada uma redução significativa na pulverização de inseticidas, reestabelecendo a suscetibilidade da lagarta. Por outro lado, o uso inadequado e sem planejamento de manejo acarretou o desenvolvimento de tolerância a proteínas Bt. O aparecimento de mutações e fenótipos que conferem vantagem de sobrevivência à toxina Bt demorou apenas 4 anos, comprometendo outras técnicas similares devido à resistência cruzada e levando ao consequente retorno do uso de estratégias químicas (Birch *et al.*, 2011; Omoto *et al.*, 2013 e 2016; Bernardi *et al.*, 2015 e Ministério da Agricultura, 2017).

Por fim, o uso de pesticidas químicos traz não somente preocupação ambiental, especialmente na contaminação de fluxos de água e mortandade de abelhas, mas também problemas envolvidos na saúde humana, como a intoxicação dos trabalhadores da indústria e agricultores que lidam diretamente com o produto, culminando em consequências imediatas e de longo prazo. Entre alguns sintomas de envenenamento agudo por inseticidas químicos estão: fraqueza, vômito, espasmos musculares, convulsões, irritações conjuntivas e na pele. Por outro lado, a intoxicação crônica pode causar efeitos neuro tóxicos, alterações cromossômicas, lesões hepáticas e renais, problemas respiratórios, arritmias cardíacas e hipersensibilidade nas mucosas e na pele (Omoto *et al.*, 2013). Dados do Ministério da Saúde apontam que em 2017 foram reportados mais de 4 mil casos de intoxicação, sendo que se estipula que os casos agudos sejam subnotificados. Ademais, toda a população está sujeita a exposição por meio do consumo de alimentos e água contaminados ou do contato em áreas de pulverização (Pignati *et al.*, 2017).

2.1.4. Manejo Integrado de Pragas (MIP)

O manejo integrado de pragas considera a utilização de diversas táticas de proteção de plantas e a incorporação de medidas adequadas para manter o número populacional da praga abaixo do dano de nível econômico, sendo ambiental e ecologicamente viável. É um sistema que associa o ambiente e a dinâmica populacional da praga com objetivo de aproximar-se do ponto de equilíbrio, mantendo controle maior sob a lavoura (Pignati *et al.*, 2017).

O MIP traz vantagens sob diversos pontos de vista, mas o fator mais atraente para o produtor é que mantém compensação ecológica, trazendo benefício econômico, já que o gasto com defensivos diminui. Dessa forma, é um planejamento estratégico e aplicado, que comprovadamente reduz a aplicação de agroquímicos em cerca de 50%, ajudando a manejar corretamente diversas pragas (Burlet *et al.*, 2017).

A idealização de um modelo de MIP é complexa e requer a consideração de diversos fatores. É preciso ter conhecimento do agro ecossistema, da praga e sua ação e correto monitoramento e amostragem do campo. Os principais pilares do manejo integrado são:

- Controle das culturas: envolve, principalmente, a rotação de cultivares;
- Controle biológico: que leva a preservação de predadores naturais e estes contribuem grandemente com o manuseio da praga;
- Controle comportamental: uso de armadilhas com estratégias diversas, como por meio de feromônios e atraentes;
- Controle genético: pela liberação de machos estéreis;
- Controle varietal: através da inserção de variantes Bt resistentes aos insetos de forma adequada;
- Controle químico: envolve a utilização de pesticidas de forma correta e consciente, com rotação de produtos com diferentes mecanismos de ação para evitar a seleção de insetos resistentes a defensivos específicos e uso de inseticidas seletivos e não de espectro abrangente.

O interesse nesta prática tem crescido devido à preocupação com o desenvolvimento de populações tolerantes a produtos químicos ou tecnologia Bt, tática que foi usada em extensão, gerando pressão seletiva e, devido a isso, pouco eficaz na supressão da lagarta. Dessa forma, a aplicação de combinações químicas mais agressivas tem aumentado nos últimos anos, ao passo que o produtor é obrigado a deixar os artifícios mais modernos e recorrer as ferramentas químicas para não comprometer produtividade e manter um controle imediato e residual (Pignati *et al.*, 2017).

No caso da praga *Spodoptera frugiperda*, o cenário foi agravado pelo cultivo sucessivo de plantas hospedeiras da praga, permitindo sua sobrevivência a longo prazo na plantação devido sua característica polífaga. Esse sistema de cultivo levou à maior frequência de aplicações sem o uso de táticas MIP, ocasionando o desenvolvimento da resistência. Ademais, o uso incorreto de procedimentos Bt, mau uso de combinações (especialmente com fungicidas), planejamento sazonal inadequado e o tratamento ineficaz da semente também são de problemas da cultura ao buscar alternativas a defensivos químicos. Assim, é comum a seleção de pragas com resistências múltiplas ou o enfraquecimento da lagarta de forma não planejada, fenômeno que facilita a ascensão de outras pestes de cultivo (EMBRAPA, 2004; Omoto *et al.*, 2013 e Bernardi *et al.*, 2015).

A necessidade de alternativas efetivas no manuseio do campo vem crescendo e a introdução destas na habituação do agricultor pode ser realizada de maneira gradual pela implementação do MIP. Assim, o bom uso da associação de diferentes técnicas ainda tem como proveito a ação sinérgica de abordagens de controle da praga (Xu *et al.*, 2011). Por fim, devido à alta mobilidade da mariposa, o ideal seria a implementação da tática MIP em âmbito regional, podendo ser

alcançada pela ação conjunta de universidades, empresas, institutos de pesquisa, agricultores e órgãos governamentais (MAPA, 2009; Pignati *et al.*, 2017).

2.2. Biopesticidas

Nesse contexto, biopesticidas emergem como uma opção promissora e podem ser definidos como defensivos agrícolas cujo principal princípio ativo tem base biológica. De uma forma geral, são formulações derivadas de organismos vivos ou seus produtos, usados como regulador natural de uma espécie que prejudica a lavoura ou que sofreu aumento populacional descontrolado, de maneira densidade-dependente, buscando equilíbrio (Parra *et al.*, 2002; Thakore, 2006).

De acordo com sua origem, eles podem ser classificados como: microbianos (bactérias, vírus, fungos, protozoários e nematoides – patógenos naturais), protetores incorporados à planta (plantas geneticamente modificadas) e pesticidas bioquímicos (substâncias naturais como feromônios, ácidos graxos, entre outros...) (Bishop, 1994; Glare *et al.*, 2012; Leng *et al.*, 2011).

Como exemplos práticos de biopesticida é possível listar o uso de óleos minerais, vírus bacteriofagos, bactérias entomopatogênicas (*Bacillus thuringiensis*, *Xenorhabdus*, *Pseudomonas*), fungos entomopatogênicos, especialmente no uso de esporos (*Metarhizium*, *Aspergillus*).

Segundo a Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBio) entre 2005 e junho de 2019 houve o registro de 230 produtos biológicos para controle de pragas para as mais abrangentes aplicações. Sendo 40 destes produtos à base bacteriana (*Bacillus* e *Pasteuria*), 88 à base de fungos (*Bauveria*, *Metarhizium*, *Trichoderma*, *Pochonia*, *Paecilomyces*, *Isaria*), 20 à base viral (todos *Baculovirus*), 43 utilizam de estratégias que envolvem insetos (*Ceratitis*, *Cotesia*, *Cryptolaemus*, *Trichogramma*, *Tissolcus*), 10 ácaros (*Neoseiulus*, *Orius*, *Phytoseiulus*, *Stratiolaelaps*) e 1 à base de nematoide (*Deladenus*), por fim há 20 produtos à base de feromônios utilizados principalmente em armadilhas e 8 de extratos vegetais (alga *Ecklonia*, *Tephrosia*, *Sophora*, molécula Azadiractina, chá *Mameluca* e *Reynoutria*) (ABCBio, 2019 e Bettiol, 2011).

O recente aumento do interesse pelos biopesticidas é baseado nas vantagens que seu uso traz, entre elas é possível destacar:

- ação significativamente menos prejudicial à saúde humana e ao meio ambiente;
- são bastante específicos, afetando apenas a praga em questão ou, em alguns casos, uma pequena variedade de organismos alvos, sendo inofensivos para outras populações, como insetos polinizadores ou animais;
- apresentam decomposição relativamente rápida, evitando problemas de contaminação de solos, águas e dos produtos agrícolas;
- podem ser aplicados em técnica MIP, em conjunto com outros biopesticidas ou combinados com quantidades menores de defensivos químicos, tendo sua eficiência bastante aumentada (Mazid, Kalita e Rajkhowa, 2011 e Xu *et al.*, 2011).

2.3. Baculovírus

Baculovírus é um grande grupo de vírus entomopatogênicos que possuem DNA dupla fita, compreendendo o maior grupo de vírus de inseto. Apresentam grande potencial como pesticidas biológicos de insetos-pragas agrícolas e florestais, sendo que mais de 600 vírus foram isolados de lepidópteros, demonstrando sua abrangência natural. Por consequência, desde a

década de 60, estudos nesse âmbito vêm sendo desenvolvidos e o Brasil vem se destacando na área (Moscardi, 1999; Moscardi *et al.*, 2011).

Os baculovírus são conhecidos por infectar apenas membros da Classe *Insecta* (filo *Arthropoda*) e não se replicam em vertebrados, plantas e outros micro-organismos, não apresentando, portanto, riscos contra humanos, animais de criação ou organismos não-alvo. Mesmo assim, são capazes de se introduzir em células animais em determinadas circunstâncias, sem causar o processo infectivo em si, tornando-os uma ferramenta valiosa na biotecnologia como vetores de expressão (sistemas BEVS) (Castro *et al.*, 1999; Szewczyk *et al.*, 2009, 2011, Kost *et al.*, 2005).

2.3.1. Classificação

A família *Baculoviridae* é compreendida em dois gêneros que se distinguem pela morfologia do corpo de oclusão: os nucleopoliedrovírus (NPV), cujas estruturas poliédricas são formadas pela proteína poliedrina e são divididos filogeneticamente em outros dois grupos (NPV tipo I e II), com base em sua proteína de fusão; e os granulovírus (GV) que apresentam corpos de oclusão menores, com estrutura ovalada, formados pela proteína granulina (Murphy *et al.*, 1995; Pearson *et al.*, 2000).

Sua fita dupla de DNA pode variar entre 80 e 200kb e é envolta por um capsídeo proteico em forma de bastonete, constituindo a unidade infectiva do vírus: o nucleocapsídeo. Os vírions consistem em um (SNPV – *Single Nucleopolyhedrovirus*) ou mais (MNPV – *Multiple Nucleopolyhedrovirus*) nucleocapsídeos envoltos por um envelope membranoso proteico.

Análises filogenéticas trouxeram a proposta de uma taxonomia com maior especificidade dividida em 4 grupos monofiléticos que podem ser discriminadas pela ordem de insetos hospedeiros e em sua morfologia (Jehle *et al.*, 2006; King *et al.*, 2011). São eles:

- Alphabaculovírus: nucleopoliedrovírus específico da ordem *Lepidoptera*;
- Betabaculovírus: granulovírus específico da ordem *Lepidoptera*;
- Gammabaculovírus: nucleopoliedrovírus específico da ordem *Hymenoptera*;
- Deltabaculovírus: nucleopoliedrovírus específico da ordem *Diptera*.

2.3.2. Ciclo de vida

Durante seu ciclo de vida pós-infecção, há a possibilidade de os vírions assumirem duas formas fenotipicamente diferentes, mas geneticamente idênticas:

Budded Virus (BV) é uma forma polarizada gerada por brotamento da membrana citoplasmática do hospedeiro para o meio extracelular, é envelopada individualmente, ou seja, apenas um nucleocapsídeo por vírion, e é capaz de realizar a transmissão do vírus para outras células e tecidos do inseto (Monsma *et al.*, 1996; Szewczyk *et al.*, 2011) (Figura 3A).

A segunda forma, *Occlusion-derived virus* (ODV), possui membrana sintetizada no núcleo da célula infectada, podendo ser encontrado mais de um nucleocapsídeo por vírion. É constituído principalmente pela proteína poliedrina, que constitui a matriz que o envolve (Braunagel *et al.*, 2003). São oclusos em cristais proteicos denominados corpos de oclusão (OB) ou poliedro, responsáveis pela manutenção do vírus durante as adversidades ambientais, apresentando alta resistência, e pela sua disseminação de um inseto para o outro (Castro *et al.*, 1999; Szewczyk *et al.*, 2011) (Figura 3A). Um complexo estável de proteínas componente integral da membrana do ODV, tem papel fundamental na infecção

oral *in vivo*. As proteínas deste complexo são denominadas *Per os infectivity factor* (PIF) e promovem o contato inicial do vírus com as células epiteliais do intestino médio (Peng *et al.*, 2012).

Os ODVs estão envolvidos na transmissão de vírus entre larvas de insetos e a BV é a forma de infecção responsável pela transmissão de célula a célula no inseto e nas células de cultura de tecidos. Embora as formas ODV e BV contenham nucleocapsídeos dentro de envelopes de diferentes origens, é o nucleocapsídeo que eventualmente é liberado no citoplasma (Moscardi *et al.*, 2011; Szewczyk *et al.*, 2011).

Essas duas formas utilizam diferentes mecanismos de penetração. Enquanto os ODVs penetram nas células por fusão, os BVs entram por endocitose adsorptiva (Blissard, 1996). Pelo fato dos BVs não estarem protegidos em uma forma oclusa, eles não são infecciosos a larva por ingestão oral. Entretanto, os BVs são altamente infecciosos em cultura de células e em tecidos quando injetados diretamente na hemocele da larva, estrutura por onde flui a hemolinfa, líquido que preenche os vasos de artrópodes (Volkman e Summers, 1997, Keddie e Volkman, 1985). A principal proteína dos BVs é a proteína de fusão, a qual é necessária para o brotamento do vírus da célula e é responsável pela entrada do vírus na célula vizinha (Monsma *et al.*, 1996).

A infecção na lagarta se inicia quando ela ingere os corpos de oclusão (poliedros ou grânulos) do baculovírus presentes na superfície das folhas (infecção primária). Ao chegar ao intestino médio do inseto, a matriz de poliedrina do vírus é dissolvida devido ao pH altamente alcalino (aproximadamente 11) e a ação de enzimas locais. Assim, os vírions são liberados no lúmen digestivo, concedendo acesso às células epiteliais do intestino médio, onde ocorrem adsorção e penetração do vírus via fusão de membrana. Uma vez no interior da célula, os nucleocapsídeos são transportados para o núcleo, onde são desnudados e a fita de DNA liberada. Através do uso da maquinaria celular hospedeira, ocorre a replicação do material genético e a expressão de diversos genes virais de maneira estritamente controlada.

A transcrição ocorre em quatro fases (Moscardi *et al.*, 2011; Szewczyk *et al.*, 2011): genes imediatos (*immediate early*), utilizando fatores de transcrição do hospedeiro; genes iniciais ou precoces (*delayed early*), os quais requerem a ativação dos produtos dos genes imediatos; genes tardios (*late*), replicação do DNA viral e eventos da pós-replicação como a síntese de proteínas virais essenciais, incluindo a GP64 que tem um papel essencial na formação dos BVs; e genes muito tardios (*very late*), fase em que ocorre a síntese de proteínas da matriz (poliedrina). Nesta fase final é dada preferência para genes essenciais à formação da partícula viral para remontagem das unidades, seguida de liberação.

Após formação dos *Budded Virus* por brotamento pela membrana celular, os BVs são expostos ao meio extracelular, provocando a infecção sistêmica ou secundária (Szewczyk *et al.*, 2006, 2009, 2011) (Figura 3B).

Paralelamente, ocorre a formação por agrupamento de corpos de oclusão, forma resistente do vírus (ODV), além do acúmulo de estruturas fibrilares que facilitam a desintegração do hospedeiro. Após a morte da lagarta, resultado de uma variedade de modificações comportamentais e fisiológicas geradas pela infecção, ocorre o rompimento do seu tegumento, liberando poliedros que garantem a continuidade da infecção de maneira externa para outras lagartas (transmissão horizontal). Ademais, em decorrência de chuvas e da queda de lagartas, grande parte dos poliedros se acumulam na camada superficial do solo, onde o vírus permanece de um ano para outro, servindo de inóculo para produzir infecções naturais na safra seguinte (Castro *et al.*, 1999; Szewczyk *et al.*, 2009, 2011).

Figura 3: Formas fenotípicas dos baculovírus (A) (adaptado de Au S., Wu W. e Panté N., 2013) e ciclo de infecção da lagarta (B) (adaptado de Graves, 2015)

É importante ressaltar que a forma BV é comumente usada para passagem viral em cultura celular já que esta apresenta o vírion acessível à célula, não necessitando de nenhum tratamento para que ocorra a liberação viral. Ao contrário da forma ODV ou sua forma oclusa, o poliedro, ambas requerem tratamento em meio altamente alcalino para liberação dos nucleocapsídeos. Sendo assim, o poliedro é a forma ideal para a utilização como produto final de biopesticida, pois este é a forma mais resistente e só apresenta liberação dos virions uma vez que em contato com o intestino médio da lagarta (Reid *et al.*, 2014).

Cerca de 12 horas após o momento da adição do inóculo viral *in vitro* (0h) já há produção de partículas BVs. A produção de poliedros, normalmente, é visível por microscópio óptico em torno do terceiro dia pós infecção (dpi), apesar de sua produção iniciar em cerca de 18 horas após o momento zero. Por fim, cerca de 24h depois do início da infecção já se considera infecção secundária pela secreção de BVs (Reid *et al.*, 2014)

2.3.3. Genes/proteínas chave na biologia de baculovírus

Entender e estudar os genes do SfMNPV pode trazer informações relevantes já que estes controlam processos fundamentais como a constituição e estruturação do vírus; a formação, adsorção e liberação da partícula viral e do corpo de oclusão; a progressão da própria infecção e o controle da patogenicidade do agente. Dessa forma, a análise gênica pode ajudar no monitoramento da estabilidade viral e, por consequência, do processo. A identificação e caracterização molecular e a geração de mutantes durante a passagem serial do vírus em cultura de células, especialmente por deleção e/ou inserção, podem ser monitorados por técnicas como *Polimerase Chain Reaction* (PCR) e sequenciamento gênico. Com base nisso, neste trabalho alguns genes-chave foram estudados; as proteínas codificadas por estes são descritas a seguir:

pp34: fosfoproteína associado ao cálix viral, ou seja, envelope ou capsídeo poliedral, sendo assim, tem função estrutural e transcrição tardia e muito tardia. Sua presença já foi relatada no corpo de oclusão, na membrana do vírion e no citoplasma e núcleo da célula do hospedeiro, associada com estruturas fibrilares da célula infectada, sendo uma das proteínas necessárias para a montagem e liberação da partícula viral (Manning JS & Whitt MA, 1988; Vlak *et al.*, 1990).

p10: proteína do capsídeo viral com transcrição muito tardia. O acúmulo de estruturas fibrilares é basicamente composto de proteínas p10, estas têm um importante papel na lise celular, interferindo na liberação do poliedro por células infectadas e na oclusão via associação com citoesqueleto, por consequência atuam na desintegração celular do hospedeiro junto com as proteínas quitinase e catepsina (Van Oers & Vlak, 1997).

Poliedrina (polh): componente proteico principal dos corpos de oclusão do vírus, sendo assim, fundamental para a estrutura do poliedro. Por consequência, tem envolvimento na estabilização da matriz proteica e na proteção do vírus ao ambiente externo por longos períodos até serem ingeridos pelas larvas de insetos; apresenta transcrição muito tardia (Zanotto *et al.*, 1992).

Proteína F (protf): proteína transmembrana helicoidal componente integral da membrana em baculovírus NPVs do grupo II e em granulovírus (Pearson *et al.*, 2000). Tem como função a penetração do vírus por fusão de membrana dependente de pH na célula hospedeira e, por consequência, tem papel crucial na infectividade célula-célula. Ademais, essa proteína possibilita o processo de transdução em células animais (Hefferon *et al.*, 1999; Kingsley *et al.*, 1999; Ijkel *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2005).

Obs: NPVs de grupo I possuem a proteína GP64, que tem a mesma função de brotamento que a proteína F, causando fusão mediada por pH do envelope viral com o endossomo celular. Considerada uma introdução evolutiva mais recente e com potencial de fusão maior do que a proteína F, pode estar associada a maior eficácia de penetração e, por consequência, infecção (Deng *et al.*, 2012).

fp25k: Proteína FP (*Few Polyhedra*) 25k de transcrição tardia e integrada ao envelope proteico, tendo assim função estrutural, está diretamente envolvida com tráfico de proteínas no envelope do ODV. A passagem serial do vírus em cultivos celulares está intimamente relacionada a geração de mutantes, denominados *FP mutants*, devido a alterações no gene *fp25K* e pode resultar em baixa produção de poliedros (Braunagel *et al.*, 1999; Krell, 1996).

sf32: gene único a SfMNPV, sendo muito útil para identificação, caracterização e quantificação específica deste baculovírus. Proteína não essencial de transcrição precoce que pode estar envolvida com a organização do nucleocapsídeo durante a montagem e oclusão de ODV (Beperet *et al.*, 2013).

2.4. Produção *in vivo* de baculovírus como biopesticida

Para a comercialização de baculovírus, tem-se recorrido a técnicas da produção *in vivo*, em que se parte da lagarta infectada, seja pela coleta do inseto doente ou morto após aplicação do vírus na lavoura, seja criando o inseto alvo em laboratório ou biofábricas e expondo-o ao vírus. Uma vez obtidas as lagartas contaminadas, elas são então maceradas e utilizadas para aplicação na lavoura diretamente (macerado) ou após formulação, podendo ser um formulado em pó ou molhável (Shapiro *et al.*, 1986; Castro *et al.*, 1999; Szewczyk *et al.*, 2009 e 2011). O sucesso da aplicação destes pesticidas virais é comprovado na literatura (Leng *et al.*, 2011) e possui longo histórico no Brasil, comprovando sua eficiência no controle da lagarta da soja, inclusive quando comparado com o pesticida químico (Castro *et al.*, 1999; Szewczyk *et al.*, 2009, 2011).

O Brasil é um dos maiores exemplos de sucesso do desenvolvimento e aplicação de biopesticida (baculovírus *Anticarsia*), através do Programa de Controle Biológico da Lagarta da Soja pela Embrapa a partir do início da década de oitenta (Moscardi, 1999). Cerca de 2,0 milhões de hectares foram tratados com o vírus *Anticarsia gemmatilis* MNPV (AgMNPV) na safra de 2003/04 (pico) e assim atingiu o status de maior programa de controle biológico com vírus no mundo (EMBRAPA, 2004). Apesar dos grandes avanços do programa de mais de 20 anos, essa área representou cerca de 7% do território de soja, plantada no Brasil. No entanto, com a introdução do plantio direto na cultura da soja o uso incorreto de inseticidas químicos, fungicidas e herbicidas desencadeou um desequilíbrio na população de insetos/organismos existentes nessa cultura. Dessa forma, pragas consideradas secundárias como *Chrysodeixis includens* (lagarta falsa-medideira), *Spodoptera* spp, *Bemisia argentifolii* (mosca-branca) e também ácaros se tornaram pragas mais importantes a serem controladas. Embora o programa tenha sido bem-sucedido, a conjunção dos fatores mencionados acima reduziu a aplicação do vírus para cerca de 300.000 ha/ano (Moscardi *et al.*, 2011)

Não obstante, com o uso desse programa, evitou-se lançar ao meio ambiente 17,0 milhões de litros de inseticidas químicos nas últimas décadas, com uma vantagem econômica de 30% sobre o equivalente químico, sendo que a venda do produto *in vivo* foi reportada por US\$ 0,42/ha (EMBRAPA, 2004; Moscardi *et al.*, 2011; Reid *et al.*, 2014). Dentre as vantagens obtidas pela aplicação do bioinseticida pode-se citar: segurança para o agricultor e organismos não-alvos, preservação da biodiversidade, uma vez que somente insetos são infectados pelos baculovírus, e redução de resíduos tóxicos nos produtos agrícolas finais (Moscardi, 1999; Moscardi *et al.*, 2011).

2.4.1. Produção *in vivo* - Biofábricas

As biofábricas são instalações físicas para produção de bioinseticida *in vivo*, são onde se mantém a produção de lagartas para a multiplicação do baculovírus. Estas envolvem diversas etapas, iniciando pela coleta de organismos chave que serão a origem da população, sendo assim, o acasalamento de adultos é crucial e dependendo da biologia do inseto, necessita de um ambiente específico, sendo essas comumente chamadas de câmaras de acasalamento. Após isso, ocorre a postura dos ovos, que normalmente é feita em folhas de papel apropriadas para a coleta, e após a eclosão dos ovos em condições específicas, é necessária a alimentação das larvas por meio de uma dieta artificial definida. As lagartas passam pelo desenvolvimento de seus ínstares e parte delas são acompanhadas até a fase de pupa e adulta para seguir a reprodução do inseto, enquanto outras são infectadas com baculovírus, na sua fase larval, de forma oral através da ingestão da dieta com vírus. A progressão da infecção é acompanhada até a liquefação das lagartas, estas são coletadas e maceradas para preparação da formulação e aplicação na lavoura (Shapiro *et al.*, 1986 e Omoto *et al.*, 2013).

De maneira geral, a biofábrica é completamente dependente da biologia e do ciclo de vida do inseto e, neste caso, o principal empecilho para a lagarta *Spodoptera frugiperda* é o fato desta ser canibal e, portanto, ser necessário crescê-las separadamente, ocupando um espaço maior e

dificultando a manutenção. Sua fase adulta é uma mariposa com potencial de motilidade, sendo assim, também é um fator a ser considerado e aplicado ao projeto da biofábrica e as câmaras de acasalamento (Cruz *et al.*, 2018).

Ademais, existem dificuldades significativas para escalonamento da produção *in vivo*, exigindo biofábricas maiores e mais custosas, além de outros problemas que envolvem a criação do inseto, lise intensa da cutícula do inseto após infecção, que leva a perda de poliedros na dieta, contaminação com outros microrganismos, grandes dificuldades de coleta, etc. Estas restrições à produção em massa *in vivo* têm gerado a busca por outras tecnologias (Reid *et al.*, 2014).

Para ilustrar problemas de grandeza e escalonamento: já se sabe que para cerca de um hectare de cultivo são necessários $7,5 \times 10^{11}$ OB, ou seja, em torno de 10^{11} a 10^{12} OB (Buerger *et al.*, 2007). Também é descrito que na fabricação *in vivo*, cada lagarta, originada de um isolado natural, é capaz de gerar, no máximo e sem perdas de produção, 10^{10} OB (Reid *et al.*, 2014). Sendo assim, segundo Reid e colaboradores (2014), dependendo das condições e da produtividade, é possível que para o tratamento de um hectare, até 1.000 lagartas infectadas possam ser requeridas, sendo a mínima quantidade reportada de 10. Estes valores aplicados à safra 2019/20 de milho de 18,5 milhões hectares permitem a compreensão das dificuldades que uma biofábrica pode encontrar, enquanto um biorreator de bancada de baixa escala (1,0 litro) é capaz de gerar mais que o suficiente para a aplicação do biopesticida para um hectare, considerando que a virulência do vírus produzido em cultura de células não sofra alterações, sendo similar ao do isolado produzido no inseto (*in vivo*).

Por fim, poucos estudos são disponibilizados sobre projeção e construção de biofábricas, sendo assim, seu custo não é bem estabelecido e é bastante variável por conta da biologia de cada praga. Um estudo chegou à conclusão de que um investimento inicial de cerca de 430 mil reais seria necessário para o estabelecimento de uma biofábrica de um parasitoide simples como *Trichogramma pretiosum* (Cruz *et al.*, 2018).

2.5. Produção *in vitro* de baculovírus como biopesticida

A tecnologia de cultivo de células de inseto para biopesticidas tem sido desenvolvida em pequenas escalas, especialmente em *shaker* ou em frasco *spinner* em cultura de batelada com densidade celular baixa e produtividade de poliedro modesta (Reid, 2014). A produção *in vitro* de inseticida viral, utilizando cultura de células de inseto em biorreatores, poderia elevar a competitividade comercial, trazendo diversos benefícios como a possibilidade de se produzir grandes quantidades em um espaço menor (pois não seriam necessários grandes galpões para produção das lagartas), o controle do processo seria mais acessível, esterilidade e qualidade do produto seriam mais elevadas e apresentariam um processo *downstream* relativamente simples e barato (Riet *et al.*, 1991; Moscardi e Souza, 2002; Szewczyk *et al.*, 2011).

Há relatos na literatura de diversos trabalhos de crescimento de células de inseto (em específico, a linhagem celular Sf-9, melhor descrita a seguir) *in vitro* e em biorreator, no entanto, a grande maioria não é para multiplicação de isolado selvagem do vírus e sim para técnicas que utilizam sistema de expressão de vetores célula de inseto - baculovírus (IC-BEVS), principalmente para produção de vírus recombinantes. De qualquer forma, estes estudos podem ajudar no entendimento do processo e abrir novos caminhos de estudo. Como exemplos, há a descrição para diversos fins, como a produção de AgMNPV por reator de tanque agitado (STR) e reator de coluna de bolhas (*airlift*) (Rodas *et al.* 2005; Micheloud *et al.* 2011), a produção de proteínas recombinantes e *Virus-like Particles* (VLP) são relativamente comuns (Chan *et al.*, 2002; Meghrou *et al.* 2005).

Células de inseto no geral já foram aplicadas em escalas de até 600 litros em STR (Cox, 2004) e em movimento de gangorra (Wave) por uso SUB (*Single Use Bioreactor*) de até 20 litros (Cecchini *et al.*, 2011); e com uso de diversos modos de operação, como batelada, batelada alimentada e perfusão (Kloppinger *et al.*, 1990; Nguyen *et al.*, 1993; Deutschmann e Jager, 1994; Bédard *et al.*, 1997; Elias *et al.*, 2000; Jardin *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010) desde a década de 80.

Recentemente foi feita a análise da susceptibilidade de seis linhagens celulares ao vírus SfMNPV isolado I-19 (Sihler *et al.*, 2018) em cultura estática. As duas linhagens de *Spodoptera frugiperda* (SF21 e Sf-9) foram susceptíveis aos vírus, embora nesse estudo a linhagem SF21 celular tenha se mostrado mais produtiva do que a Sf-9. As linhagens *Bombyx mori* (BM-5), *Lymantria dispar* (IPLB-LD-625 Y) *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) e *Anticarsia gemmatilis* (UFL-AG-286) não foram produtivas. Em estudo anterior com o vírus SfMNPV (isolado I-19), foi feita a comparação da cinética do crescimento celular e produção do baculovírus em células Sf-9 e SF21 em suspensão (30 ml), em escala de frascos *shaker* (Almeida *et al.*, 2010). A célula Sf-9 apresentou melhor resultado de produção do vírus (5×10^8 OBs/ml) quando comparada a célula SF21 ($2,5 \times 10^8$ OBs/ml), sendo, portanto, indicada como uma melhor candidata para a produção em alta escala.

Por fim, outro ponto que apresenta uma vantagem interessante e é importante de ser ressaltado é que o processo tem uma etapa *downstream* relativamente simples, já que o produto não precisa ter pureza elevada, apenas necessita ser destituído de restos celulares. O método mais utilizado para purificação de poliedros é a ultracentrifugação. Assim, devido a purificação simples e com poucas etapas não há perda viral relevante, característica típica de processos *downstream*, especialmente em cultivos que dependem de alta produção de vírus.

Estudos do grupo de pesquisa GEnBio – USP iniciaram a avaliação de parâmetros de produção de biopesticida SfMNPV em biorreator (Pereira, 2017). A qualidade do produto final (poliedros) foi confirmada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (imagem 1). O efeito do vírus SfMNPV no corpo do inseto foi comprovado pelo desenvolvimento da sintomatologia típica da doença (Imagem 2).

Imagem 1: Microscopia Eletrônica de Transmissão - células Sf-9 infectadas com o vírus SfMNPV em Biorreator 7 dpi (Pereira, 2017)

Imagem 2: Mortalidade de larvas de *S. frugiperda* após ingestão de poliedros produzidos em biorreator – bioensaio (Imagens concedidas pela pesquisadora Marlinda Lobo de Souza – EMBRAPA Cenargen).

2.5.1. Metabolismo de células de inseto

O conhecimento sobre o metabolismo das células de inseto é de grande importância na

elaboração de meios de cultivos e novas estratégias de alimentação, pois possibilita o aumento da produtividade de proteínas recombinantes e produtos baseados em baculovírus a partir do ajuste otimizado da fonte de energia, além da dependência direta com a densidade celular pré infecção (Ikonomou *et al.*, 2003; Drugmand *et al.*, 2012). No entanto, o entendimento e o estudo das vias metabólicas das células de inseto ainda são limitados (Chou, 2014). A seguir serão descritos os processos metabólicos para cada grupo de macronutrientes, utilizados como fonte de energia pela célula de inseto e na Tabela 1 tem um compilado de parâmetros cinéticos ($X_{v_{máx}}$ e $\mu_{máx}$) e metabólicos (Taxas específicas de consumo e produção de glicose, lactato, glutamina, glutamato e amônio) da célula Sf-9 em meio Sf-900 nas etapas de crescimento celular e infecção viral de diferentes fontes da literatura.

2.5.1.1. Metabolismo de carboidratos

Apesar de capazes de consumir uma variedade de carboidratos como fonte de carbono, a glicose ainda é a fonte de energia preferencial das células de inseto e sua taxa específica de consumo é alta, sendo maior do que a de células de mamífero, por exemplo (Tabela 1). Porém, em situações alternativas, na ausência da fonte principal, algumas células de inseto conseguem consumir frutose e maltose; há também registro de dispêndio de sacarose por Sf-9 pós-infecção. Essas são opções válidas a serem investigadas como alternativas à otimização do crescimento celular já que podem apresentar uma importante diferença no custo final do produto (Ikonomou *et al.*, 2003; Drugmand *et al.*, 2012) (Figura 4).

O metabolismo de carboidratos das células de inseto é parecido com o de células de outros eucariotos, apresentando ciclo TCA totalmente funcional, assim como o ciclo da pentose fosfato (Benslimane *et al.*, 2005). O metabolismo via ciclo TCA (ácido cítrico) é bastante eficiente com incorporação de 80% do piruvato, sendo este utilizado para crescimento celular pela conversão à acetil-CoA (Benslimane *et al.*, 2005) (Figura 4).

Uma parte significativa também é desviada para formação de alanina e de lipídios. Especificamente em células Sf-9 foi demonstrado que o fluxo via glicólise e ciclo TCA são regulados negativamente com o aumento da concentração celular, assim a queda na energia metabólica tem forte relação com a densidade celular e o efeito desta na infecção. Para esse fenômeno se dá o nome de efeito de densidade ou efeito da alta concentração celular (Jardin *et al.*, 2007; Bernal *et al.*, 2009).

Aminoácidos podem ser utilizados como forma de manter a viabilidade celular na falta de glicose, no entanto a depleção do carboidrato desencadeia vias de apoptose em Sf-9. Em situação de excesso de glicose, o acúmulo de alanina e lactato ocorre. Intermediários do ciclo TCA parecem ser utilizados durante a fase lag, não tendo conversão útil para crescimento exponencial (Drugmand *et al.*, 2007).

Tabela 1: Comparativo de dados da literatura de parâmetros de cinética celular e viral e taxas metabólicas para a célula Sf-9
Trabalhos Benslimane et al., 2005, Bernal et al., 2009, Carinhas et al., 2010, Drugmand et al., 2012 e Monteiro et al., 2016. A avaliação foi feita na etapa de crescimento celular com parâmetros de $\mu_{m\acute{a}x}$ e $Xv_{m\acute{a}x}$ e na etapa de infecção viral com as informações de vírus e MOI (multiplicidade de infecção). Em comum às duas etapas há os valores das taxas de consumo e produção de glicose, lactato, glutamato, glutamina e amônio. *considera fase exponencial inicial, média e tardia e fase estacionária inicial e tardia. **diferentes CCI. ***trabalho de revisão que leva em conta 8 trabalhos diferentes entre 1993 e 2007.

Taxas específicas de consumo e produção (nmol/10 ⁶ cel.h)	Etapa	Crescimento celular		Crescimento celular	Infecção viral		Crescimento celular	Infecção viral		Crescimento celular	Infecção viral	
		Vírus			Ac-hisGFP (3 dpi)**			vp39EGFP (3 dpi)				
	Fase	Fase exponencial		Cultivo médio total*	MOI 0,6	MOI 30		MOI 0,1		Fase exponencial		MOI 0,2
	Referência	Benslimane et al., 2005		Bernal et al., 2009				Carinhas et al., 2010		Drugmand et al., 2012***		MOI 5
	Méio de cultura	Sf-900 II		Sf-900 II				Sf-900 II		SFM não limitante		Sf-900 II
	Xv max											
	(x10 ⁶ cel/mL)	8,30 ± 0,66	7,7		-	-		-		11		-
	μ (dia ⁻¹)	0,60 ± 0,05	0,61		-	-		-		0,65 ± 0,02		-
	Glicose	86,4 ± 8,0	60,9 ± 19,8	52,1 ± 12,9	42,4 ± 24,4		45,3		51-93	58,6 ± 3,9	54,8 ± 5,1	97 ± 29
	Lactato	12,3 ± 1,8	10,0 ± 5,1	10,5 ± 10,4	2,9 ± 2,6		3,7		4-12	2,1 ± 0,5	0,6 ± 0,3	3,2 ± 0,9
	Glutamato	4,0 ± 0,4	10,1 ± 6,9	9,1 ± 4,9	2,2 ± 3,4		4,5		-	7,7 ± 0,7	7,1 ± 1,3	53 ± 15
	Glutamina	39,6 ± 4,3	18,7 ± 13,9	7,8 ± 2,4	3,5 ± 2,0		7,8		23-40	18,7 ± 1,7	18,6 ± 2,5	29 ± 6,5
	Anômia	2,2 ± 0,4	1,9 ± 1,0	3,5 ± 2,8	1,9 ± 1,8		1,4		2-18	5,1 ± 0,2	9,0 ± 1,4	44,8 ± 9,5

Figura 4: Vias metabólicas simplificadas de linhagem de célula de inseto

Glicólise, fermentação alcoólica e láctica, consumo de carboidratos, consumo de aminoácidos, consumo de ácidos graxos, produção de alanina, produção de amônio, síntese de lipídios, síntese de proteínas, síntese de ácidos nucleicos. G6P: glicose-6-fosfato; G3P: 3-fosfoglicerato, gly3P: glicerol-3-fosfato; rib5P: ribose-5-fosfato. Figura baseada em Drugmand et al., 2012.

2.5.1.2. Metabolismo de aminoácidos

O emprego de aminoácidos pode ser tanto para a biossíntese como para finalidade de geração de energia e tem sido assumido que as células de inseto não são capazes de produzir a maioria dos aminoácidos, sendo que a falta de apenas um pode comprometer o crescimento celular. Os principais aminoácidos possíveis de utilização como fonte de energia são: glutamina, glutamato, aspartato, serina, arginina, asparagina e metionina (Drugmand *et al.*, 2012) (Figura 4). Após infecção viral, foi demonstrado que uma mudança importante ocorre no metabolismo de aminoácidos, ocorrendo deslocamento para metabolização de valina e leucina, além de glutamina e glutamato, previamente relevantes (Monteiro *et al.*, 2016).

Dentre os aminoácidos citados, a glutamina é considerada o mais importante no cultivo de células de linhagem Sf, pois em situações de limitação de glicose (< 1,3 g/L ou 7 mM), estas são capazes de converter glutamina em glutamato, o qual é convertido a α-cetoglutarato, alimentando o ciclo do ácido cítrico e produzindo energia por meio da reação chamada glutaminólise (Figura 5) (Young, 2013). No entanto, o fato de o crescimento ser afetado pela falta de glutamina sugere que esta síntese não é completamente eficiente (Drugmand *et al.*, 2012).

Em contrapartida, estudos mostraram que algumas linhagens de células de insetos são capazes de crescer em meios sem glutamina, glutamato ou aspartato, desde que íons amônio estejam presentes no meio (Ikonomou *et al.*, 2003; Ohman *et al.*, 1996; Chou, 2014). A capacidade de se desenvolver na ausência deste aminoácido essencial (glutamina) seria explicada pela presença de duas vias metabólicas: a da glutamina sintetase (GS), na qual a glutamina necessária para o crescimento celular seria produzida a partir de glutamato e íons

amônio; e a via metabólica que envolve glutamato sintase (GOGAT), em que há a transferência do nitrogênio do grupamento amida da glutamina para uma molécula de α -cetoglutarato, formando duas moléculas de glutamato, deslocando o metabolismo celular para replicação (Chou, 2014). Ambas vias estão presentes nas células Sf-9 e são de extrema importância para metabolização e desintoxicação de subprodutos tóxicos (Drews *et al.*, 2000) (Figura 5).

Células Sf-9 tem uma taxa de consumo de asparagina e ácido aspártico baixa quando comparada com outras células de inseto, entretanto, asparagina é consumida quando em condição de limitação de glutamina. Os outros aminoácidos parecem ser consumidos em menor escala e de forma dependente da linhagem celular. De acordo com Ferrance e colaboradores (1993) e Radford e colaboradores (1997), isoleucina, lisina, histidina, leucina e treonina são cruciais para Sf-9 e a presença de metionina e tirosina são necessárias para retardar a morte celular em cultivo (Mendonça *et al.*, 1999). Alguns aminoácidos como arginina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, glutamato, glicina e serina são extremamente importantes para sustentar uma alta taxa de crescimento em Sf-9 e manter a produção de proteínas durante a infecção (Drugmand *et al.*, 2012).

É também conhecido, no caso das células Sf-9, a preferência pelo consumo de aminoácidos ao invés de sua síntese, mesmo para o caso dos não essenciais (Ferrance *et al.*, 1993), assim o consumo de aminoácidos é maior do que o necessário para síntese proteica. Em consequência, a incorporação do esqueleto de carbono dos aminoácidos em vias energéticas parece exercer papel fundamental para desenvolvimento celular. Por exemplo, asparagina e ácido aspártico podem ser incorporados na via para geração de oxaloacetato e glutamina e glutamato para formação de α -cetoglutarato, enquanto a parte amino-terminal pode ser transferida ao piruvato para formação de alanina, como já mencionado anteriormente (Drugmand *et al.*, 2012) (Figura 4).

Figura 5: Esquema do sistema GS/GDH/GOGAT e de metabolismo de subprodutos.

(A) Simplificação da via de uso de Glicose para geração de energia pelo ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA) e da via de uso de Glutamina para energia (glutaminólise). O amônio gerado como subproduto é desintoxicado pela acoplagem da conversão de piruvato a alanina.

(B) Detalhe da reação bidirecional enzimática do sistema GS/GDH/GOGAT (glutamina sintase (GS), glutamato desidrogenase (GDH) e glutamato sintase (GOGAT)).

Figuras baseadas em Drugmand *et al.*, 2012.

2.5.1.3. Metabolismo de lipídios

Células de inseto tem metabolismo de lipídios bastante incompleto, tendo capacidade limitada de sintetização, dessaturação e alongamento de ácidos graxos. Além disso, são incapazes de sintetizar esteróis, o principal deles sendo colesterol, substrato essencial para produção de hormônios e formação de membranas lipídicas. No entanto, células de insetos são capazes de utilizar lipídios como forma de energia e sua depleção pode causar degeneração celular e produção deficiente de baculovírus. Dessa forma, a suplementação ou inclusão no meio é essencial para cultivo de células de inseto no geral (Schlaeger, 1996; Drugmand *et al.*, 2012).

2.5.1.4. Metabolismo de subprodutos

O acúmulo de lactato em relação ao consumo de glicose não é tão alto em células de inseto quanto em células de mamífero (Ikonomou *et al.*, 2003). Células Sf-9 em específico tem reportado acúmulo de lactato em níveis baixos (Neermann e Wagner, 1996; Bhatia *et al.*, 1997; Ikonomou *et al.*, 2001). Isso acontece, pois elas não produzem lactato quando a transferência de oxigênio é suficiente, mesmo com excesso de glicose (Bernal *et al.*, 2009) (Tabela 1). Ainda assim, a forma que a toxicidade do lactato afeta as células de inseto parece ser similar à via em células de mamíferos: acidificação do meio e aumento da osmolaridade (Cruz *et al.*, 2000). Em células Sf-9 o efeito tóxico é observado acima de 0,9 g/L (ou 10 mM), sendo crítico apenas em valores acima de 3,6 g/L (ou 40 mM), aumentando as vias apoptóticas sem ainda desencadear necrose (Drugmand *et al.*, 2007). Por outro lado, Benslimane e colaboradores (2005) relatam que o valor máximo de lactato deveria ser menor, em torno de 0,2 g/L (ou 2 mM).

Alanina e amônio são produzidos devido ao catabolismo de aminoácidos. A produção de amônio é dependente das concentrações iniciais de glutamina e asparagina (Rhiel *et al.*, 1997). Sua via de toxicidade ainda não é clara, mas pode ser similar aos efeitos em células de mamífero, em que ocorre acidificação da mitocôndria e citoplasma e modificação do gradiente de potássio. A taxa de produção específica de amônio é mais alta em células de inseto quando comparada a células de mamífero, assim células de insetos devem ser menos sensíveis aos efeitos tóxicos causados e o crescimento não é afetado até concentrações de cerca de 0,18 g/L (ou 10 mM) de amônio (Bernal *et al.*, 2009) (Tabela 1). Ademais, células Sf-9 são capazes de incorporar amônio a α -cetoglutarato para a formação de glutamato (Palomares *et al.*, 2006) (Figura 5).

Alanina é um subproduto metabólico que é acumulado em condição de excesso de glicose e é consumida em caso de depleção, este aminoácido não é tóxico até concentrações de 8,9 g/L (ou 100 mM), sendo assim, a preocupação com este subproduto não é tão grande quanto com os outros (Ohman *et al.*, 1995). Sua taxa metabólica de produção em células Sf-9 em meio SFM não limitante está reportada como 39 a 45 nmol/10⁶cel.h em fase exponencial de crescimento e 27 a 28 nmol/10⁶cel.h em infecção viral (Drugmand *et al.*, 2012). A produção de alanina é também uma forma alternativa de desintoxicação de subprodutos nitrogenados (como o amônio), quando há glicose excedente (Drugmand *et al.*, 2012) (Figura 4 e 5).

2.5.2. Cultivo de células de inseto

Para se obter o maior rendimento possível de qualquer produto com o sistema célula de inseto-baculovírus, é necessária a otimização das condições de todas as etapas de produção: durante a etapa de crescimento celular, para se alcançar uma alta densidade e definir as condições fisiológicas antes da adição do vírus; e durante a infecção, com parâmetros de proporção célula/vírus. Cada fator de cultivo pode ter grande influência no rendimento de produção (Deutschmann e Jäger, 1994).

A temperatura é um dos fatores de bastante importância no cultivo, afetando tanto o crescimento celular quanto o rendimento do produto. A temperatura ideal para o crescimento das células de inseto é entre 22 e 29°C. O pH do meio é outra condição bastante importante, variando de acordo com a célula empregada no processo, porém, costuma ficar por volta de 6,2 sem a necessidade de sistema de tampão CO₂/bicarbonato (Tabela 2). Em valores de pH abaixo de 6,0 e acima de 6,8, a velocidade específica de crescimento e a máxima concentração celular tendem a diminuir e a fase lag tende a aumentar (Drugmand *et al.*, 2012).

A sensibilidade das células de inseto a osmolalidades é menor quando comparada à de células de mamíferos, sendo cultivadas na faixa de 260 a 320 mOsm/Kg (Drugmand *et al.*, 2012).

Sabe-se que a concentração de oxigênio dissolvido no meio (OD) é importante no desenvolvimento das células e no rendimento dos produtos desejados. Células de inseto tem uma taxa de consumo de oxigênio alta. Vários estudos foram feitos, com diferentes modelos de biorreatores, entretanto não foi determinado um valor de OD ideal para células de inseto. Sendo assim, é padrão seguir o consenso de faixa ótima de crescimento entre 30% e 70% da saturação com ar apesar de exceções na literatura (Drugmand *et al.*, 2012) (Tabela 2).

Alguns estudos demonstram ainda que o controle fino do OD permite alcançar resultados de alta densidade em menor tempo (Deutschmann e Jäger, 1994; Rodas *et al.*, 2005; Drugmand *et al.*, 2012). Mas de maneira geral, é relatado na literatura que a concentração de oxigênio no líquido crítica é ao redor de 5% (Palomares *et al.*, 1999). A taxa de consumo de oxigênio para célula Sf-9 é de 280 a 650 nmol/10⁶cel.h para células em fase de replicação celular e 200 a 760 nmol/10⁶cel.h para etapa de infecção viral (Drugmand *et al.*, 2012).

Apesar das discrepâncias, sabe-se que durante a fase de infecção, células de inseto são mais sensíveis a mudanças no oxigênio dissolvido e também possuem uma taxa de consumo de oxigênio mais alta (Monteiro *et al.*, 2016). Este fato somado ao estresse hidrodinâmico que as células estão passíveis de sofrer pelas condições de cultivo dentro do biorreator, especialmente por borbulhamento, e a fragilidade que a dupla membrana de lipídios oferece a forma BV dos baculovírus (Rohrmann *et al.*, 2013), podem fazer com que o ambiente pós-infecção seja muito agressivo para a progressão correta da infecção viral.

Dados não publicados do grupo sugerem que uma aeração mais baixa pode beneficiar a produção de poliedros: quando diminuída a vazão gasosa de aeração em 4x, o processo de infecção aparentou, visualmente, mais efetivo com acúmulo de corpos de oclusão no interior celular mais proeminentes. Sendo assim, há indícios de que a aeração por borbulhamento possui um efeito nocivo sobre o baculovírus na forma BV e, por consequência, sua progressão na infecção viral (Pereira, 2017).

Por fim, é notável também a divergência no perfil de crescimento entre as células de *Spodoptera frugiperda* SF21 e Sf-9 (Tabela 2). Dados anteriores do grupo não publicados, mostram claramente que a linhagem Sf-9, devido a consequências de passagem e por ser um clone da linhagem SF21, possui desempenho mais homogêneo, sendo assim, uma melhor opção para processo produtivo (Del Padre, 2016).

Tabela 2: Comparação de condições de cultivo e parâmetros cinéticos na literatura (Drugmand *et al.*, 2012) com trabalhos anteriores do grupo (Del Padre, 2016, Pereira, 2017 e Oliveira, 2019). rS2: linhagem de *Drosophila melanogaster* recombinante.

Fisiologia/Condições do cultivo	Drugmand <i>et al.</i> , 2012	Del Padre, 2016	Pereira, 2017	Oliveira, 2019
Linhagem celular	Sf-9	SF21	Sf-9	rS2
Diâmetro da célula (μm)	13	$16,1 \pm 1,1$	-	8-10
Densidade celular máxima ($\times 10^6$ cel/mL)	4-10	4-6	8-10	6,0
Meio de cultivo	Meio sem soro não limitante	Sf-900 II	Sf-900 III	TC100 AG
Velocidade específica de crescimento máxima μ (dia^{-1})	0,6	$0,65 \pm 0,10$	$0,58 \pm 0,03$	0,82
Temperatura ótima de crescimento ($^{\circ}\text{C}$)	27	28	27	28
Faixa pH	6,2-6,4	6,2-6,4	6,2-6,4	5,9
OD (% de saturação com ar)	30-70%	50%	30%	30%
$Y_{X/\text{Glc}}$ ($\times 10^9$ cel/g)	-	1,0	$3,1 \pm 0,4$	3,75
$Y_{X/\text{Gln}}$ ($\times 10^9$ cel/g)	-	3,0	-	4,8

2.5.2.1. Cisalhamento celular

O estresse de cisalhamento tem íntima relação com a agitação, aeração, pressão parcial de entrada do gás e borbulhamento, todos em função da transferência de oxigênio, fator essencial para o crescimento celular. As células de inseto são muito mais frágeis ao cisalhamento que microrganismos, e menos suscetíveis ao comparar com células de mamíferos, impondo limitações à taxa máxima de transferência de oxigênio (Tramper *et al.*, 1986). A restrição por transferência de oxigênio já é relatada em diversos processos de expressão proteica dependente da infecção (Cruz *et al.*, 1998; Palomares *et al.*, 1996; Maranga *et al.*, 2002). Sendo assim, o efeito combinado da frequência de agitação, tipo (Rushton, hélice, etc.), dimensão e número de impelidores, vazão gasosa, tipo (aspersor, micro aspersor, anel perfurado, etc.) e dimensão da aeração, retenção de bolhas e formação de vértices tem consequências grave na multiplicação celular e infecção viral, especialmente em baixas escalas (Michaels *et al.*, 1996).

O regime de fluxo inicial que se dá pelo vórtice macroscópico se origina da sobreposição tridimensional de redemoinhos gerados pelo impelidor de agitação, estes, colapsam em outros menores, transferindo e conservando a energia cinética. Assim, partículas com tamanho aproximado ao destes redemoinhos experimentam a maior tensão de cisalhamento. Já a dissipação de energia causada pela aeração pode ser ainda mais severa que a causada pela agitação, devido à geração de bolhas pelo aspersor, que, ao subirem pela coluna de líquido e quebrarem na superfície, geram um dano celular acentuado. Dessa forma, a extensão da morte celular é proporcional à vazão de aeração, ao volume específico das bolhas e inversamente proporcional ao diâmetro do reator e da bolha. Pequenas bolhas causam picos locais na velocidade do filme do líquido (Maranga *et al.*, 2002 e 2004).

Para contornar esta barreira em reatores STR aspergidos, uma das estratégias mais habituais é o uso de meios de cultivo com protetores, sendo o mais comum o Kolliphor™ P-188, que inibe a adesão celular às bolhas de ar. Ainda que derivados do Pluronic sejam reportados na literatura como efetivos contra o dano celular causado pelo estouro da bolha e na diminuição de espuma

gerada pela homogeneização provocado pela hélice, há a possibilidade do uso destes prejudicar a entrada do vírus na célula, devido ao mecanismo destes polímeros de formar uma capa protetora ao redor da célula (Murhammer e Goochee, 1990).

Apesar de já se conhecer o dano causado pelas forças de cisalhamento, ainda não se tem grande sucesso na projeção e escalonamento que evite esse estresse por completo sem comprometer parâmetros de cultivo celular. No entanto, modos de operação e estratégias alternativas ao borbulhamento ajudam neste quesito: microaeração, aeração descontínua, reatores de fibra oca, aeração livre de bolhas (*bubble free*) e biorreatores de gangorra (como Wave) são algumas das opções (Reid *et al.*, 2014). Ademais, diferentes abordagens podem trazer consequências diferentes devido à particularidade de cada método, por exemplo, aeração *bubble free* diminui morte celular causada por efeito de bolha enquanto que biorreatores do tipo gangorra diminuem a tensão de cisalhamento gerada pelo impelidor.

Cruz e colaboradores (1998) demonstraram que, para o clone Sf-9, tensões de cisalhamento consideráveis não afetavam a viabilidade celular, mas sim a velocidade de crescimento celular, a infecção pelo baculovírus e expressão do produto. Porém, pouco se sabe sobre a consequência específica na estabilidade do BV em células infectadas (Harrap *et al.*, 1977; Summers e Volkman, 1976; Maranga *et al.*, 2004). As células no processo de produção de partículas virais parecem ser mais suscetíveis a forças de cisalhamento, pois estas, em consequência da infecção, aumentam de diâmetro (Zeiser *et al.*, 2000) e diminuem a resistência da membrana celular devido ao conteúdo proteico alterado. Assim, a destruição lítica pode ocorrer aceleradamente e, não necessariamente, devido a infecção viral e sim, ao estresse de cisalhamento (Cruz *et al.*, 1998).

2.5.3. Emprego de células de inseto para produção *in vitro*

O uso de células de inseto em sistemas *in vitro* é possível desde a metade do século passado. Esta técnica foi desenvolvida, inicialmente, para o estudo da fisiologia dos insetos e foi relatada pela primeira vez em 1915. Entretanto, apenas 50 anos depois foi estabelecida a primeira linhagem contínua de células de inseto (Agathos, 2010). Atualmente existem centenas de linhagens celulares de insetos isoladas de mais de cem espécies diferentes, abrangendo mais de seis ordens diferentes, sendo a ordem *Lepidoptera* (borboletas e mariposas) a origem de grande parte dessas linhagens (Arif e Pavlik, 2013; Drugmand *et al.*, 2012).

Quando se tornou possível a manipulação genética de baculovírus, foi desenvolvido o sistema de expressão célula de inseto-baculovírus como vetor (IC-BEVS), que consiste em cultivar as células de inseto e então infectá-las com o vírus. O genoma do vírus tem inserido um gene de interesse, possibilitando a produção de proteínas recombinantes complexas, já que viabiliza modificações pós-traducionais. Este sistema tem sido utilizado para a expressão de várias proteínas de alto valor agregado em pequena escala, como hormônios, fatores de crescimento e vacinas (Granados *et al.*, 2008; Mena *et al.*, 2011 e Drugmand *et al.*, 2012).

A primeira vacina para uso humano aprovada que faz uso deste sistema de expressão é a Cervarix®, que previne a infecção por papilomavírus humano (HPV), este responsável pelo desenvolvimento de lesões pré-cancerosas na região cervical e é comercializada desde 2007 pela empresa GSK. Além disso, a primeira vacina terapêutica para câncer, Provenge® também usa desta técnica e foi lançada nos EUA em 2015 (Drugmand *et al.*, 2012; Reid, 2014).

As linhagens de célula de inseto mais empregadas em aplicações acadêmicas e industriais são as seguintes: TN368, High-Five (BTI-Tn-5B1-4), SF21 e Sf-9. A linhagem Tn368 foi desenvolvida por Fred Hink em 1970, isolada de tecido de ovário da lagarta da couve (*Trichoplusia ni*) (Granados *et al.*, 2008; Hink, 1970). A linhagem High-Five (BTI-Tn-5B1-4) foi desenvolvida a partir da linhagem parental (Tn5B1) isolada em 1986 a partir de ovos de

Trichoplusia ni e ficou conhecida com esse nome por possuir capacidade de expressar maiores concentrações de proteína recombinante do que a sua linhagem de origem (Arif e Pavlik, 2013; Granados *et al.*, 2008).

A linhagem SF21 foi isolada por Vaughn e colaboradores (1977) a partir de tecido do ovário de pupas de *S. frugiperda*, e em 1983 foi descrita a clonagem de uma nova linhagem a partir de SF21, sendo então denominada Sf-9 (Summers & Smith, 1983; Vaughn *et al.*, 1977). Dentre as duas linhagens, SF21 é mais frágil do que a Sf-9 e menos tolerante ao pH, choque osmótico e cisalhamento, além de possuir uma velocidade específica de crescimento menor. Porém, ambas são consideradas células robustas, fáceis de se cultivar tanto aderidas (sem necessidade do uso de tripsina para soltá-las) como em suspensão e adaptadas para meios de cultivo sem soro. Além disso, a linhagem SF21 tipicamente demonstra melhor amplificação viral (Drugmand *et al.*, 2012; Granados *et al.*, 2008). Apesar da similaridade destas linhagens, Sf-9 apresenta maior robustez, sendo, em geral, melhor opção para processos biológicos pela consistência e homogeneidade de cultivo.

O uso de células de inseto é bastante versátil e as combinações célula-vírus podem ser aplicadas de diversas maneiras. Por exemplo, a mesma espécie de baculovírus pode ser empregada como pesticida no controle de insetos ou ser modificada geneticamente para carregar genes heterólogos. Ainda, dado que uma linhagem celular é suscetível a mais de um baculovírus, há a possibilidade de produzir mais de um biopesticida na mesma linhagem celular (co-infecção).

Após estabilização de um processo para uma combinação linhagem celular-baculovírus é possível a adaptação para outro par célula-vírus. Desta forma, a otimização do cultivo de células de inseto para produção do vírus leva ao desenvolvimento de uma metodologia com potencial multifuncional, em que diferentes produtos podem ser concebidos com poucas modificações de procedimento, gerando uma planta versátil que acompanha necessidades de mercado (Reid *et al.*, 2014).

2.5.4. Parâmetros de infecção viral

A estratégia da produção do baculovírus em biorreatores na etapa de infecção viral é determinada, basicamente, pela seleção da multiplicidade de infecção (MOI), pela concentração celular no momento da infecção (CCI) e pelo instante de infecção (TOI). MOI é definido como o número de unidades infecciosas por células que serão adicionadas no momento da infecção; enquanto TOI trata-se do momento em que se inicia a infecção das células do inseto. Tanto a fração da população celular infectada quanto a cinética da infecção estão relacionadas à MOI e ao TOI (Micheloud *et al.*, 2009). Por fim, o tempo de coleta (TOH) depende basicamente da curva de produtividade viral ou proteica (Radford *et al.*, 1997).

Em um bioprocessamento com células de insetos infectadas com o baculovírus, a escolha da CCI e do TOI vai determinar a composição do meio de cultura no instante da infecção, assim como o estado fisiológico da massa celular. Esses fatores interagem entre si e podem ser manipulados para a otimização do processo; a combinação deve ser estabelecida para cada sistema por causa da dependência da característica da linhagem celular e a capacidade nutricional do meio de cultura empregado. Encontra-se descrito na literatura que o valor de TOI ideal para infecção viral se dá conforme o tipo celular, pois depende da fase exponencial de crescimento; idealmente a infecção se dá no início ou no meio da fase exponencial (log) (Pedrini *et al.*, 2006 e Micheloud *et al.*, 2009).

É importante levar em consideração a mudança no metabolismo celular durante a infecção viral. Células Sf-9 são conhecidas por terem um metabolismo via ciclo TCA bastante eficiente e o

efeito mais comum é uma parada ou diminuição nas taxas metabólicas celulares, uma vez que a divisão celular é interrompida (Tabela 1). Todavia, isso depende fortemente da disponibilidade de nutrientes, do vírus e, principalmente, das condições de cultivo. Assim, MOI, TOI e CCI podem ter grande influência neste processo. Em contrapartida, também é relatado, em alguns casos, incremento metabólico devido a estratégia viral de manipulação da maquinaria do hospedeiro, assim, os fluxos metabólicos essenciais para a síntese de baculovírus podem ser beneficiados, dependendo da situação, como está exemplificado na Figura 6 e exemplificado na literatura na Tabela 1 (Monteiro *et al.*, 2016).

Outro requisito na produção de baculovírus em cultura de células é a necessidade de linhagens celulares altamente produtivas. Para uma linhagem ser considerada uma boa opção para a produção de baculovírus, ela deve apresentar um tempo de duplicação próximo de 24 horas e ter a capacidade de produzir vírus ativos em um rendimento específico em torno de 300 OB/célula (Reid *et al.*, 2014). Por fim, tempo de cultivo pós infecção, ou seja, o tempo de permanência do produto no meio, é importante devido a proteases provenientes de células que sofreram morte e lise celular e também deve ser levado em consideração para otimização do processo e definição de TOH.

Figura 6: Esquema de fluxo metabólico central de Sf-9 no crescimento celular e na infecção viral. Distribuição do fluxograma metabólico central da célula Sf-9 em meio de cultivo Sf-900 II no comparativo de células em fase de crescimento celular exponencial e durante a infecção viral no período de 2 dpi pelo vírus AcMNPV recombinante e MOI 0,2. Fluxos foram calculados pelo software FluxAnalyzer e normalizados pela taxa específica de consumo de glicose. Os números são o fluxo metabólico molar normalizado e o desvio padrão entre parênteses; a espessura das flechas demonstra esquematicamente o fluxo de cada reação metabólica. Fonte: adaptado de Monteiro *et al.*, 2016.

2.5.5. Desafios da produção *in vitro*

É bastante clara a abertura no mercado para este tipo de produto em diversas perspectivas: econômica, ambiental e tecnológica. No entanto, a produção do baculovírus *in vitro* ainda constitui uma forte demanda sob a perspectiva comercial. Apesar do alto potencial, um grande empecilho no desenvolvimento em escala comercial é o surgimento de mutações genéticas com a realização das passagens seriadas do vírus em cultura que, entre outros efeitos, levam à diminuição da virulência e da eficiência do pesticida, assim como um menor rendimento em sua produção (Krell, 1996; Jarman-Smith *et al.*, 2002; Pedrini *et al.*, 2004; Rezende *et al.*, 2009).

A instabilidade genética dos vírus ou atenuação viral, de uma maneira geral, já foi extensamente estudada e tem um efeito exacerbado em linhagens celulares estabelecidas quando comparadas com eventos *in vivo*, inclusive com células Sf-9 (Jarman-Smith *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2013). Já foi determinado que a maior causa da diminuição da produção dos poliedros é a mudança do fenótipo parental *Many Polyhedra* (MP) para o fenótipo mutado *Few Polyhedra* (FP), causado pela perda de uma proteína de 25 kDa após efeito de passagem, a FP25K (Fraser *et al.*, 1983; Krell, 1996). Diversas abordagens inovadoras podem ser aplicadas para ultrapassar esta barreira a fim de criar variantes mais estáveis ou otimizar a produção de forma geral (Jakubowska *et al.*, 2009; Giri *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017). O estudo do genoma do baculovírus tem cooperado para este propósito também (Castro *et al.*, 2006; Wolff *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2015).

Outro problema relevante são as *Defective Interfering Particles* (DIPs), alterações genômicas espontâneas que geram mutantes de deleção, ou seja, ocorre perda de uma porção crítica do material genômico viral por replicação defectiva ou recombinação não-homóloga (Krell, 1996; Reid, Chan & Oers, 2013; Rodas *et al.*, 2005). Esta interferência é um obstáculo científico, pois a rápida replicação que tais partículas virais apresentam, gera uma preferência no processo de replicação viral. Para evitar tal fenômeno, as células de inseto devem ser infectadas com baixa multiplicidade de infecção para minimizar a probabilidade de esta partícula penetrar a célula como um vírion (Wickham *et al.*, 1991).

Apesar de sua especificidade ser uma das grandes vantagens do bioinseticida, ela também pode ser abordada como uma desvantagem: por um lado, ela assegura a preservação de organismos que não devem ser afetados pelo inseticida como vertebrados e plantas, sustentando o equilíbrio ecológico. Porém, ela também restringe o espectro de aplicação do produto a um número restrito de pragas, por vezes uma única espécie (Bishop, 1994). Assim, caso o padrão de pragas da região mude, o bioinseticida pode passar a ser ineficaz ou desnecessário (Szewczyk *et al.*, 2011; Moscardi *et al.*, 2011). Existem algumas estratégias que vêm sendo estudadas para contornar essas deficiências dos inseticidas a base de baculovírus. Uma delas é aplicar o biopesticida juntamente com o pesticida químico. Isso levaria a uma diminuição significativa na quantidade do agente químico usado (20 a 25% da dose recomendada) e seria um ótimo exemplo de Manejo Integrado de Pragas (MIP), método que já provou economia de 26% em comparação ao manejo tradicional (ABCBio, 2016). Em adição, diversas estratégias de barateamento de custos vêm sendo avaliadas (Huynh *et al.*, 2012).

Outra estratégia é o uso de aditivos na formulação final de biopesticidas, que pode beneficiar o produto de diferentes formas, dependendo do uso do bioformulado. Alguns exemplos são: os biopolímeros, que podem aumentar a vida útil do produto ao promover deposição e fixação foliar; ativos bioquímicos, que aceleram e facilitam a morte do hospedeiro; decantadores, quelantes e nanoencapsulação, que ajudam a fixar e entregar o poliedro na superfície foliar e aumentar a persistência pós-aplicação (Villamizar *et al.*, 2010); óleos vegetais emulsionáveis, que podem baratear a formulação; componentes molhantes, que aumentam o grau de adsorção, adesão e estabilidade; entre muitos outros. No Brasil se utilizam substâncias diversas e inertes para

formulação como caulim, apatita, enxofre, talco, argila calcinada, amianto, zeólita, ... (Souza *et al.*, 1995). Uma das grandes vantagens de se utilizar o poliedro como ativo final é sua resistência geral, apresentando alta persistência também à radiação UV, sendo significativamente susceptível apenas a pH alcalino.

Por fim, a dificuldade de análise e identificação da progressão de infecção viral também é um desafio do processo. As consequências da infecção viral, conhecidas como efeito citopático, além do acúmulo de poliedros ou corpos de oclusão no interior da célula de inseto, são bastante proeminentes quando em monocamada, ou seja, quando as células estão aderidas e estáticas. No entanto, quando as células estão em suspensão no líquido a visualização se torna difícil pois se encontram totalmente dispersas no meio de cultura, em estrutura tridimensional, dificultando a visualização dos poliedros que estão no interior do núcleo celular. Por outro lado, é importante salientar que a progressão do processo de infecção ocorre tanto em aderência, como em suspensão, evidenciado inclusive pela posterior lise celular e contagem de poliedros; a diferença é que nas células em monocamada, a visualização morfológica é mais fácil e, assim, o resultado é mais evidente (Imagem 3). Essa limitação só reforça a necessidade de métodos alternativos e mais acurados para análise e quantificação viral.

Imagem 3: Comparação visual em microscópio da infecção viral em modo de cultivo de suspensão e adesão.

Célula Sf-9 inoculada com vírus SfMNPV MOI 1,0, dia 7 da infecção. Aumento da imagem em 160 e 640 vezes respectivamente em microscópio com coloração de azul de tripano para análise de viabilidade celular.

2.6. Cenário econômico

Só no mercado brasileiro, há a comercialização de cerca de 230 soluções de biopesticidas, sendo 148 deles microbiológicos e 20 deles baseados em baculovírus (ABCBio, 2020). Atualmente existem aproximadamente 50 formulações de pesticidas baseados em baculovírus registradas no mundo, sendo que algumas delas são basicamente o mesmo produto, mas com diferentes nomes de mercados e em diferentes países (Szewczyk *et al.*, 2011). Isso mostra que ainda é uma área sem diversificação e que não apresenta grande concorrência.

O primeiro inseticida viral a ser lançado foi o ElcarTM em 1975 para o controle de *Heliothis virescens* nos Estados Unidos. Posteriormente vários outros bioinseticidas virais foram registrados ao redor do mundo, como por exemplo: Gypchek, Disparivirus e Virin-ENSH (*L. dispar*), TM BioControl-1 e Virtrus (*S. pseudotsugata* NPV), Spod-X (*Spodoptera exigua*), Spodopterin (*Spodoptera littoralis*), Gemstar LC e Biotrol (*Helicoverpa zea e virescens*), Gusano (*Autographa californica*), Baculoviron e Nitral (*Anticarsia gemmatilis*), entre outros. Vale ressaltar que todos têm modo de produção *in vivo* (Reid *et al.*, 2013; Leng *et al.*, 2011). Ademais, no Brasil, há 35 patentes vinculadas à tecnologia de baculovírus, sendo 20 delas aplicadas ao controle biológico de pragas e apenas 3 delas com data de depósito após o ano 2000 (INPI, 2020).

No início da década, defensivos biológicos representavam menos de 0,5% do faturamento do setor (Powell & Faull, 1989). Em 2015 já representavam 2%, com valores de mercado de 9,6 bilhões de reais. E a expectativa é que o crescimento atinja valores de 10 a 15% de todo mercado de protetores agrícolas entre 2020 e 2030 (Szewczyk *et al.*, 2009; Bailey *et al.*, 2011; ABCBio, 2016).

Estima-se que o desenvolvimento de um biopesticida custa, em média, de 3 a 5 milhões de dólares nos EUA e levam aproximadamente 3 anos para ser comercializado (Glare *et al.*, 2012); em comparação com a área de sintéticos químicos que necessita 250 milhões de dólares e 10 anos para finalizar o produto. Apesar de uma planta produtiva biológica ter um custo elevado quando comparado à planta de produção sintética, o faturamento anual cobriria rapidamente o investimento inicial até pela facilidade em produção em larga escala, ainda, os ganhos ecológicos são imensuráveis neste contexto.

Até 2020 prevê-se que seis empresas comercializarão o biopesticida *Spodoptera frugiperda* produzido *in vivo* no Brasil, sendo cinco delas brasileiras e com base em isolados EMBRAPA (ABCBio, 2016). No Brasil, o primeiro produto comercial a base de SfMNPV foi desenvolvido por meio de uma parceria EMBRAPA-Vitae Rural Biotecnologia (Uberada, MG). Neste produto (CartuchoVIT) é utilizado o isolado natural SfMNPV 6NR (Valicente *et al.*, 2008), que, devido a uma mutação do gene da quitinase, não apresenta o rompimento do tegumento do inseto, facilitando assim a coleta das lagartas (Valicente e Tuelher, 2010).

Os bioinseticidas vêm ganhando notoriedade e assim, o espaço no mercado tende a crescer. Um divisor de águas no Brasil foi o surto na safra de 2014/15 da lagarta *Helicoverpa armigera*, em que se enfrentou a dificuldade do uso das estratégias tradicionais devido à resistência da praga. Naquela ocasião a praga *H. armigera* foi introduzida no Brasil e se tornou um problema grave, principalmente devido às perdas no cultivo do algodão. Este cenário colocou os biopesticidas em perspectiva ao apresentar sucesso no reequilíbrio orgânico do meio produtivo, ao introduzir inseticidas microbiológicos no MIP (ABCBio, 2016). Como já mencionado também, os biopesticidas a base de baculovírus fizeram parte do maior programa de controle biológico com uso de vírus (baculovírus anticarsia), desenvolvido pela EMBRAPA.

O consumo e venda de alimentos orgânicos têm ganhado força no Brasil nos últimos anos, acompanhando uma tendência mundial. Dessa forma, há um nicho de mercado novo que vem se adaptando para alcançar a demanda e, em consequência, o número de produtores de cultivares

orgânicos registrado vem aumentando significativamente, concentrado na agricultura familiar. Como consequência, um produto à base biológica pode alcançar um mercado que não tem competição com produtos químicos já que seria destinado apenas a proteção orgânica. O Brasil é o maior mercado na América latina e estipula-se que 15% da população do Brasil consome esse tipo de produto (Organis, 2017).

Nesse contexto, o controle biológico tem uma vantagem clara em relação a produtos químicos, pois biopesticidas podem ser aplicados em cultivos orgânicos para conferir proteção a pragas. Ainda, há também uma vantagem burocrática já que a lei nº 7802 de 11 de julho de 1989 e os decretos regulamentados pela INC nº 1 de 24 de maio de 2011 e INC nº 2 de 02 de junho de 2014 determinam uma proposta diferenciada para registro de produtos para a agricultura orgânica, facilitando e simplificando o processo (Kabaluk *et al.*, 2010 e ABCBio, 2016).

3. Justificativa

Com a pressão sobre a agricultura para aumentar a produção com menor quantidade de terras, torna-se evidente a necessidade contínua de um manejo de pragas eficiente, uma vez que estas são responsáveis por 27% a 42% de perdas na produção das maiores lavouras mundiais e estima-se que esses valores alcancem 48% a 83% sem o devido controle (Omoto *et al.*, 2013).

Para diminuir o impacto das pragas sobre as lavouras são usados os defensivos agrícolas, agrotóxicos ou pesticidas (inseticidas, fungicidas, herbicidas, entre outros). Todavia, o uso prolongado destes compostos sintéticos acompanhado do uso indiscriminado, resultou em grande prejuízo ambiental. Esta situação gera, também, consequências sérias como o desenvolvimento de resistências das pragas, contaminação de rios, solos e lençóis freáticos, desequilíbrio ecológico a partir de seu efeito em espécies de insetos não alvo; além de potenciais riscos à saúde humana (Bishop, 1994; Glare *et al.*, 2012).

O custo financeiro do dano causado por esse procedimento é estimado em aproximadamente US\$ 8,2 bilhões por ano (Pimentel, 2005) nos Estados Unidos. Assim, cada vez mais aponta-se a necessidade de uma alternativa que seja menos agressiva para o meio ambiente e acompanhada de menos consequências danosas. Este contexto representa uma grande oportunidade para o desenvolvimento e o aprimoramento de bioinseticidas, que emergem como uma opção eficiente e biodegradável (Mazid *et al.*, 2011). Os baculovírus têm as vantagens de baixo impacto ambiental e alta especificidade de alvo, além de não serem prejudiciais à saúde humana ou ao meio ambiente e serem passíveis de aplicação no cultivo orgânico (Sanderson *et al.*, 1999).

A produção *in vivo* atual ocorre através da infecção da lagarta, processo que necessita do uso de biofábricas com insetos, tem baixa escalabilidade e competitividade. Como não há relatos de doenças causadas por baculovírus em vertebrados, a produção *in vitro* pode trazer a possibilidade de produção em larga escala em pequenos espaços e com maior controle de produção, alcançando um produto de alta qualidade que pode ser adaptado a outros biopesticidas a partir do conhecimento gerado (Moscardi e Souza, 2002; Szewczyk *et al.*, 2011).

Considerando o alcance global e importância crescente da praga *Spodoptera frugiperda*, o desenvolvimento de um produto à base de baculovírus em cultura de células não só teria um grande valor monetário como também um espaço no mercado agrícola. No entanto, para que a produção *in vitro* de baculovírus seja possível em escala comercial, o processo precisa ser melhor compreendido e otimizado em sistema de reator.

4. Objetivos

Estudo e otimização do processo de produção do baculovírus *Spodoptera frugiperda* múltiplo nucleopoliedrovírus em células de inseto Sf-9 em sistema de biorreatores, desenvolvendo o cultivo celular em alta densidade com parâmetros nutricionais e operacionais mais adequados para posterior infecção, visando à produção do biopesticida.

4.1. Objetivos específicos:

- Otimizar a etapa de crescimento celular, pela realização de análise metabólica para assim compreender as necessidades nutricionais da célula;
- Avaliar se o meio de cultivo comercial otimizado atende à demanda metabólica, não ocorrendo limitação de crescimento celular por substrato ou geração de subproduto tóxico;
- Estudar suplementação do meio nutricional de cultivo com nutrientes chave (substrato limitante) e os efeitos nos parâmetros cinéticos;
- Estudar substratos específicos para otimização nutricional:
 - Do meio de cultivo Sf-900 III: cisteína e glutamina;
 - Do meio de cultivo ExCell 420: glicose, glutamina, ácido cisteico, tirosina, serina, aspartato e colesterol;
- Testar condições mais brandas de transferência de oxigênio para diminuir estresse de cisalhamento e analisar o efeito no crescimento celular e na infecção viral por meio das abordagens *bubble free* e biorreator Wave;
- Testar métodos de análise viral não tradicionalmente utilizados na literatura que permitam maior monitoramento e análise da progressão do fenômeno da infecção viral;
- Realizar análise genética viral em reator para checagem de mutações pontuais por excesso de passagens, que levariam a perda de virulência;
- Testar melhores parâmetros de infecção, em especial o balanço entre baixo MOI, para prevenção de mutantes, e alto MOI, para maior produtividade;
- Comparar crescimento celular e produção de poliedro em diferentes sistemas de biorreator (STR aspergido, STR bubble free e Wave) por metodologias adequadas para realizar análise morfológica celular (microscopia óptica), contagem e viabilidade celular (câmara de Neubauer) e respectiva análise cinética, análise de metabólitos (quantificação de glicose, lactato, glutamina, glutamato e amônio) e análise da progressão viral pela análise morfológica celular/viral (microscopia óptica), liberação e contagem de poliedros (câmara de Neubauer), análise molecular (PCR, eletroforese, sequenciamento e RT-qPCR) e análise do diâmetro celular (Scepter).

5. Materiais e métodos

Este projeto foi realizado em dois laboratórios diferentes e as metodologias, resultados, discussões e conclusões serão divididos de acordo, sendo referidos como GEnBio – Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP e USDA – Forest Service Northern Research Station.

5.1. Linhagem celular, vírus e meio de cultura

Foi utilizada a linhagem Sf-9 adaptada para meio Sf-900 III (Life Technologies), produto comprado já esterilizado. A linhagem Sf-9 também foi adaptada para meio de cultivo ExCell 420 (Sigma-Aldrich), único disponível nos estudos realizados no USDA e filtrado antes do uso. A célula Sf-9 tem código de referência: 12659-017 na ATCC e foi mantida no Banco Mestre em passagem sete. As células são mantidas congeladas em nitrogênio líquido. Foram utilizados o vírus *Spodoptera frugiperda multiple Nucleopolyhedrovirus* - SfMNPV isolado 19 (I-19), cedido pela Dr. Fernando Hercos Valicente da EMBRAPA Milho e Sorgo, e também o isolado Nicarágua B, fornecido pelo USDA. Há diferentes lotes de inóculo do vírus SfMNPV I-19, tendo sido usado neste trabalho o lote 2018, o lote 1 de 2019 e o lote 2 de 2019. Todos os isolados virais utilizados neste trabalho foram mantidos até passagem cinco para evitar efeito de passagem.

A quantificação de alguns dos componentes dos meios de cultivo ExCell 420 e Sf-900 II está disposta na Tabela 3. Vale ressaltar também que ambos são meios de cultivo livres de soro e de componentes de origem animal, apesar de o meio ExCell 420 ter indicação de uso de SFB e, a princípio, ambos têm a composição não revelada pelo fornecedor e quimicamente complexa devido ao uso de hidrolisados; ademais os valores de compra são similares. Os dados do meio Sf-900 II foram retirados da dissertação de mestrado de Vieira (2010) e do meio ExCell 420 de dados não publicados do USDA. Foram utilizados na comparação os dados do meio de cultivo Sf-900 II (produto da mesma linha do utilizado neste estudo, o Sf-900 III), apesar de versões diferentes do mesmo meio, esses dados são relevantes já que a informação da composição não está disponível e Sf-900 III é uma versão otimizada do utilizado na comparação. A proporção entre os meios evidencia que o Sf-900 II é um meio de cultivo de célula de inseto mais rico em nutrientes que o ExCell 420.

Tabela 3: Quantificação por HPLC/método enzimático de alguns dos nutrientes que compõe os meios de cultivo Sf-900 II (Life Tech.) e ExCell 420 (Sigma-Aldrich) e a respectiva proporção de Sf-900 II para ExCell 420. A listagem reflete apenas alguns componentes que foram possíveis quantificar, não significa que o meio de cultivo não tenha outros componentes além dos indicados

Meio de Cultura	ExCell 420	Sf-900 II	Proporção Sf-900 II/ExCell 420
unidade	mg/L		
L-ácido aspártico	713,0	1161,0	1,63
L-alanina	175,1	360,0	2,06
L-arginina	376,7	2217,0	5,88
L-asparagina	828,6	1060,0	1,28
L-cisteína	-	131,0	-
L-cistina	74,0	-	-
L-fenilalanina	587,1	947,0	1,61
L-glicina	241,5	720,0	2,98
L-glutamato	1045,2	2053,0	1,96
L-glutamina	1093,8	1936,0	1,77
L-histidina	223,5	410,0	1,83
L-isoleucina	517,0	760,0	1,47
L-leucina	537,7	420,0	0,78
L-lisina	423,1	876,0	2,07
L-metionina	1029,4	1162,0	1,13
L-prolina	307,5	767,0	2,49
L-serina	266,9	661,0	2,48
L-tirosina	144,5	301,0	2,08
L-treonina	174,0	350,0	2,01
L-triptofano	65,7	-	-
L-valina	371,6	808,0	2,17
Amônia	75,1		-
Colesterol	3,4		-
Riboflavina	0,3		-
Vitamina B-12	0,1		-
unidade	g/L		-
Glicose	5,6	9,5	1,68

5.2. Cultivo de células (suspensão e adesão)

A manutenção das células foi realizada em *shaker* orbital com agitação de 130 rpm e temperatura controlada a 28°C em frascos Schott de 500,0 mL ou Erlenmeyer de 250,0 mL, como padrão. Nessas mesmas condições foram realizados estudos de crescimento das células para obtenção de parâmetros cinéticos. A partir dos cultivos em frascos *shaker*, as células foram transferidas para biorreator. Alternativamente, as células também foram mantidas em frascos T-25 para cultivo em adesão em estufa com temperatura controlada a 28°C.

5.3. Preparo do banco de células e descongelamento celular

Após crescimento celular em *shaker*, a cultura foi centrifugada a aproximadamente 320 g por 5 minutos para sedimentação das células. O pellet foi ressuspenso de modo que a concentração celular fosse de 2×10^7 cel/mL em meio de criopreservação, constituído por:

- 40% meio condicionado;
- 40% meio fresco;
- 10% DMSO (Dimetilsulfóxido);
- 10% SFB (Soro Fetal Bovino).

A constituição do meio de criopreservação é idealizada para manter a integridade celular e, assim, manter a viabilidade para a recolocação da célula em cultura. Sendo assim, DMSO é

utilizado de forma abrangente como um crioprotetor, na proporção certa, e atua protegendo a membrana celular de cristais de gelo, limitando a desidratação celular. Já o SFB é utilizado pelo fato de ser rico em nutrientes complexos, facilitando a recuperação celular e a manutenção da viabilidade no processo de descongelamento; devido sua baixa porcentagem na constituição do meio de criopreservação, o SFB logo é diluído no meio de cultivo após recolocação em cultura.

Alíquotas de 1,0 a 2,0 mL foram transferidas para criotubos e estes colocados em container de congelamento Mr. Frosty™ (Thermo Fischer), que permite o congelamento em uma taxa de 1°C/min em freezer a -80°C por 24 horas. Após esse procedimento, foi feito o armazenamento em nitrogênio líquido.

O descongelamento foi feito de maneira rápida em banho maria de aproximadamente 37°C, o conteúdo foi transferido para um frasco Schott com 20,0 mL de meio fresco (Sf-900 III ou ExCell 420 dependendo do experimento). O frasco foi incubado a 28°C e 130 rpm e repicado para manutenção a cada 3 dias, durante fase exponencial celular.

5.4. Determinação da concentração de células viáveis (Xv)

Para determinação da concentração de células viáveis foi utilizado um hemacitômetro (câmara de Neubauer), sendo as células contadas utilizando-se de microscópio óptico (Olympus CK 2). A diferenciação entre as células viáveis (Xv) e não viáveis (Xnv) foi feita através do método de exclusão pela coloração com Azul de Tripiano em concentração de 0,4% (Sigma-Aldrich).

5.5. Quantificação da concentração de glicose, lactato, glutamina e glutamato

As amostras foram provenientes de cultivo em *shaker* e em biorreator e foram centrifugadas por 3 minutos a aproximadamente 3000 rpm em centrífuga Spin VI (Incibrás) e o sobrenadante congelado a -20 °C para posterior processamento em analisador bioquímico YSI 2700 Select (Yellow Springs), que, através de medidas enzimáticas, fornece a concentração de glicose, glutamina, glutamato e lactato. O sensor do aparelho se baseia em enzimas imobilizadas em membranas, onde, efetivamente, ocorre a reação de degradação do substrato com a consequente produção de peróxido de hidrogênio, oxidado no ânodo, gerando uma corrente proporcional à concentração do substrato degradado.

5.6. Quantificação de amônio

As amostras foram preparadas como já descrito, provenientes de cultivo em *shaker* e biorreator, centrifugadas e armazenadas em -20°C. A determinação de amônio foi feita por ensaio colorimétrico com kit da marca Genese (BioAssay Systems, California, USA) que mede a conversão de NADH em NAD⁺ na presença de NH₃, cetoglutarato e glutamato desidrogenase com base em uma curva padrão. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas no comprimento 340 nm utilizando software SoftMax Pro 6.4 (Molecular Devices).

5.7. Captura de imagem

As imagens no laboratório GEnBio – Escola Politécnica de Engenharia Química da USP foram feitas através da inserção de uma webcam na ocular do microscópio e capturadas pelo software MiPro (Optika, Itália). No laboratório Northern Research Station Forest Service – USDA

as imagens foram feitas por Microscópio Axiophot Carl Zeiss Inc por meio sistema integrado de câmera, software e tratamento de imagem ProgResC3.

5.8. Cultivo de células em Biorreator

No laboratório GEnBio – Escola Politécnica de Engenharia Química da USP foram utilizados os biorreatores BioFlo 110 (New Brunswick Scientific) e BioStat® B (Sartorius) em volume útil de 1,0 litro. Estes dispõem de completo sistema de aquisição de dados e controle das variáveis de processo - oxigênio dissolvido (DO), pH, temperatura e frequência de agitação - através de um programa desenvolvido localmente, em linguagem LabVIEW (National Instruments) e implementado em microcomputador. O controle de oxigênio dissolvido é feito pelo próprio biorreator BioFlo 110 através da abertura sequencial de válvulas solenoides para mistura dos gases nitrogênio, oxigênio e ar; e de dois gases (normalmente ar e oxigênio) no biorreator BioStat B, através da limitação de valores do parâmetro GasMix, variável que dita a porcentagem de tempo que o controlador deixa a válvula de gás oxigênio aberta. O controle da temperatura é feito por manta térmica e camisa de água, respectivamente. As sondas de pH são calibradas anteriormente a esterilização dos sistemas, com os pontos 4,0 e 7,0. As sondas de oxigênio dissolvido são estabilizadas por pelo menos 12 horas e calibradas com água saturada de ar para 100% e água saturada com nitrogênio para 0%, zero eletrônico também foi realizado através da desconexão do sistema para fins de comparação.

No laboratório Forest Service – USDA também foi utilizado o biorreator BioFlo 110 (New Brunswick Scientific) em volume útil de 1,0, 5,0 e 10,0 litros equipado de camisa de água, temperatura controlada por plataforma aquecida e controle de oxigênio dissolvido através da mistura de ar e oxigênio, promovido pelo reator. O reator BioFlo 110 não era equipado de um programa de monitoramento de dados. O reator Wave 20/50 EHT (GE Healthcare Life Sciences) foi utilizado com bags de 2,0 e 5,0 litros e volume útil de 1,0 litro para ambos. A homogeneização do reator é realizada pela oscilação das bags, cuja velocidade e ângulo podem ser ajustadas. A temperatura é controlada por placas posicionadas no topo da plataforma. O oxigênio dissolvido é regulado por um controlador O2MIX20 que controla fluxo, pressão e valor de DO; a calibração da sonda é feita pela saturação de água com ar para 100% e por Padrão de oxigenação nula (Corning Inc. Life Sciences, USA) para 0%. O controlador DOOPT20 é ligado a sonda de oxigênio dissolvido óptica e conectado a bag por uma manga estéril. Apesar de ser equipado de um programa que monitora os dados pelo software System 20/50EH v 3.04, não é possível o armazenamento destes.

A esterilização foi feita por autoclavagem na temperatura de 121°C e pressão de 1 atm. por cerca de 30 minutos nos reatores BioFlo 110 e BioStat B. Os bags do reator Wave são adquiridos estéreis.

Foi adotado como condição padrão de crescimento celular os parâmetros: temperatura de 28°C, agitação de 80 rpm para biorreator *Stirred Tank Reactor* (STR – BioFlo 110 e BioStat B), volume útil de 1L, 30% de oxigênio dissolvido, pH apenas monitorado, aeração com fluxo de 200 mL/min ou 0,2 vvm por meio de aspersor para sistema STR, 100 mL/min ou 0,1 vvm para sistema Wave, concentração celular inicial (X_{v0}) de cerca de 5×10^5 cel/mL e mangueira de silicone SI-Schaluch (Kleinschmidt GmbH, Alemanha) com 3 mm de diâmetro externo e 0,35 mm de espessura com pressão de 0,5 bar foi utilizada para sistema *bubble free*; para sistema Wave foi tomado como padrão velocidades entre 10-18 rpm com ângulo de 7,5-9°. Estes parâmetros serão referidos como condição padrão nos experimentos.

5.9. Cálculo do k_La

O k_La , ou coeficiente volumétrico de transferência de massa, descreve a eficiência em que o oxigênio é entregue ao processo no biorreator para uma série de condições operacionais. A variação de oxigênio dissolvido no meio ao longo do tempo depende, principalmente, da taxa de transferência de oxigênio (OTR).

Deste modo, o processo para realizar o cálculo do k_La foi feito por método dinâmico e desconsiderando o consumo de oxigênio pelas células (OUR – *oxygen uptake rate*), já que foi feito nas condições de operação, mas em água. Este método foi feito para os sistemas STR aspergido e STR *bubble free*, assim depende intimamente dos fatores agitação e aeração. Para as estratégias Wave e escala em frascos *shaker*, o valor de k_La já é reportado e foi retirado de informações de um manual da GE Healthcare.

O processo foi feito com a saturação com ar comprimido da água presente dentro do reator sob as condições padrões, ao atingir a leitura máxima, ar foi substituído por nitrogênio e o sinal da sonda foi monitorado continuamente até um valor que a leitura do eletrodo fique próximo a nula, segundo calibração prévia. O método então foi repetido ao contrário: na leitura nula do eletrodo foi adicionado fluxo de gás ar e o monitoramento foi realizado até valor máximo de saturação do oxigênio na água.

Para o caso de uma perturbação do sistema que aumenta concentração de DO de um valor inicial de zero, o cálculo fica de acordo com a Equação 1, sendo que:

$$\ln(1 - pO_2) = -k_La \times t \quad (1)$$

Para a situação de perturbação que diminui a concentração de DO, calcula-se pela Equação 2:

$$\ln(pO_2) = k_La \times t \quad (2)$$

Sendo que pO_2 é a porcentagem de oxigênio dissolvido que é lido pela sonda dentro do biorreator e se dá pela equação 3:

$$pO_2 = \frac{C_{O_2}}{C_{O_2}^*} \quad (3)$$

Onde C_{O_2} é a concentração de oxigênio dissolvido e $C_{O_2}^*$ é a concentração de oxigênio no momento que o líquido atinge a saturação de moléculas de oxigênio dissolvidas com ar.

Gráficos $\ln(pO_2) = f(t)$ para análise do decaimento de DO e $\ln(1-pO_2) = f(t)$ para saturação do oxigênio do líquido foram plotados. A região linear $y=ax+b$ do gráfico foi estudada e regressão linear foi feita com $R^2 \approx 0,99$ para cálculo do k_La . Uma média foi feita entre as duas abordagens de decaimento e saturação para valor final.

5.10. Adaptação celular

Já que foram utilizados dois meios de cultivo diferentes neste estudo, foi necessária a realização de uma adaptação das células utilizadas no GEnBio com o meio Sf-900 III (Life Tech.) para o meio ExCell 420 e das células utilizadas no USDA do meio ExCell 420 para o Sf-900 III. A adaptação foi realizada gradualmente em frasco T-25 conforme Tabela 4 com volume total de 5 mL, cada passagem expressa um repique de 3 dias utilizando incubadora a 28°C e após completo este processo, o conteúdo de três frascos T-25 foi transferido para um volume de 20 mL em frasco Schott e incubado em *shaker* com agitação de 130 rpm e temperatura de 28°C até completa adaptação celular. A adaptação em suspensão se deu após 5 passagens com centrifugações para remoção de células mortas e reposição de nutrientes com meio de cultura fresco. Com experiências prévias do nosso grupo de pesquisa, determinou-se que a adaptação celular poderia se iniciar com a proporção de 50/50 para meios de cultivo sem desvios relevantes, sendo assim, a passagem 1 é iniciada com esta concordância. Foi realizada a quantidade de passagens necessárias para julgar $\mu_{\text{máx}}$ estável e passível de continuidade.

Tabela 4 : Passos por passagem da adaptação da linhagem celular Sf-9 do meio Sf-900 III (Life Technologies) para ExCell 420 (Sigma-Aldrich) e ExCell 420 para Sf-900 III

Sf-9	Meio Sf-900 III	Meio ExCell 420
Passagem 1-8	50%	50%
Passagem 9-12	25%	75%
Passagem 13-16	10%	90%
Passagem 17-24	5%	95%
Passagem 25-30	0%	100%

Após adaptação celular completa foi realizado ensaio cinético para comparação com as células da passagem zero. O experimento foi feito em *shaker* com frasco Schott de 500,0 mL e volume útil de 20,0 mL, nas condições de 28°C e 130 rpm e inóculo inicial de $0,5 \times 10^6$ cel/mL. O ensaio foi acompanhado de 7 a 11 dias com contagens diárias na câmara de Neubauer. Foram determinados a concentração de células viáveis e não viáveis e os respectivos parâmetros cinéticos calculados a partir destas variáveis. Os experimentos foram realizados em triplicata e com um ensaio controle.

5.11. Ensaios de suplementação de cisteína em meio Sf-900 III

O experimento foi feito em *shaker* com frasco Schott de 500,0 mL e volume útil de 20,0 mL, nas condições de 28°C e 130 rpm e inóculo inicial de $0,5 \times 10^6$ cel/mL. A suplementação de cisteína (Merck) foi feita adicionando ao meio de cultivo uma solução aquosa e estéril, realizada no início do cultivo (dia 0) ou no terceiro dia (dia 3) para avaliar diferenças na oferta de nutrientes. A suplementação foi feita de maneira que a concentração final fosse 50% e 100% maior do que a inicial (131,0 mg/L), ou seja, concentrações finais de 196,5 e 262,0 mg/L, respectivamente. Os experimentos foram acompanhados por até 9 dias com contagens diárias em câmara de Neubauer e realizados em triplicata.

O experimento SuplBR foi feito conforme a Tabela 5.

Tabela 5: Resumo das condições do experimento de suplementação de cisteína em shaker (SuplBR1)

ENSAIO DE SUPLEMENTAÇÃO SuplBR1		
Condições	Controle	Sem suplementação
	50%	Suplementação para aumento em 65,5 mg/L no início do cultivo
	100% (0)	Suplementação para aumento em 131,0 mg/L no início do cultivo
	100% (3)	Suplementação para aumento em 131,0 mg/L no dia 3 de cultivo

5.12. Ensaio de suplementação de ácido cisteico em meio Sf-900 III

O experimento SuplBR2 foi feito em *shaker* com frasco Schott de 500,0 mL e volume útil de 20,0 mL, nas condições de 28°C e 130 rpm e inóculo inicial de $0,5 \times 10^6$ cel/mL. A suplementação de ácido cisteico (Sigma-Aldrich) foi feita adicionando ao meio de cultivo uma solução aquosa e estéril, realizada no início do cultivo. A suplementação foi feita na concentração de 200 mg/L e o ensaio acompanhado por 7 dias com contagens diárias na câmara de Neubauer. Foram determinados diariamente a concentração de células viáveis e não viáveis e os respectivos parâmetros cinéticos calculados a partir destas variáveis. Os experimentos foram realizados em triplicata e com um ensaio controle sem adição de suplementação.

5.13. Ensaio de Suplementação em meio ExCell 420

As suplementações avaliadas foram determinadas com base na Tabela 3, considerando os nutrientes que apresentavam alta discrepância entre os meios de cultivo, ademais, levou-se em conta dados da literatura para escolha de aditivos e suas respectivas concentrações. As condições analisadas estão dispostas na Tabela 6 com a informação da concentração utilizada e o veículo de uso. As combinações mantiveram as concentrações aplicadas individualmente e estão listadas na Tabela 6. Todas as adições foram realizadas no dia zero, com exceção da condição “Meio ExCell 420”, em que o cultivo foi centrifugado ao atingir concentração celular de 3×10^6 cel/mL e o meio ExCell 420 consumido foi substituído pelo meio ExCell 420 fresco. O ensaio controle é a única condição sem adição de suplementos, e este foi utilizado como uma referência de crescimento padrão.

As condições implementadas foram: frascos Erlenmeyer de 250,0 mL com volume útil de 50,0 mL, agitados no *shaker* a 130 rpm e temperatura de 28°C, a amostragem foi realizada todos os dias até, no máximo, 11 dias, dependendo da cinética celular para ter certeza de coletar dados suficientes para a apuração dos parâmetros de densidade celular máxima e velocidade específica de crescimento máxima. Cada suplementação foi executada, pelo menos, três vezes em ocasiões diferentes e o erro padrão de triplicata foi calculado.

Tabela 6: Relação das condições de otimização do meio de cultura ExCell 420, seus conteúdos com concentração e veículo utilizado (SuplUS1)

Condição	Suplementação	Concentração (g/L)	Veículo
Controle	-	-	-
ExCell 420	Meio ExCell 420	1X	-
aa	Tirosina	0,20	2N HCl
	Serina	0,50	Água destilada filtrada
	Aspartato	0,50	1N NaOH
Col	Colesterol	0,02	Etanol 99,5%
Cya	Ácido cisteico	0,20	Água destilada filtrada
Gln	Glutamina	3,00	Água destilada filtrada
Glc	Glicose	2,00	Água destilada filtrada
Cya + Gln	Ácido cisteico	0,20	Água destilada filtrada
	Glutamina	3,00	Água destilada filtrada
Cya + Glc	Ácido cisteico	0,20	Água destilada filtrada
	Glicose	2,00	Água destilada filtrada
Cya + Gln + Glc	Ácido cisteico	0,20	Água destilada filtrada
	Glutamina	3,00	Água destilada filtrada
	Glicose	2,00	Água destilada filtrada
Cya + Gln + Glc + Col	Ácido cisteico	0,20	Água destilada filtrada
	Glutamina	3,00	Água destilada filtrada
	Glicose	2,00	Água destilada filtrada
	Colesterol	0,02	Etanol 99,5%

5.14. Testes de infecção com baculovírus

Após seu crescimento, as células foram infectadas e o processo de infecção foi acompanhado por amostragem para determinação de concentração de células viáveis, não viáveis, células infectadas e produção de poliedros virais. A determinação da concentração de células infectadas/porcentagem de células infectadas foi feita através de visualização em microscópio óptico, uma vez que as células infectadas apresentam corpos de oclusão visíveis.

Os testes realizados em frasco T-25 foram todos realizados com concentração de 2×10^6 células totais e adicionado 100 μ L de vírus e acompanhados até, pelo menos, 10 dpi. Os testes realizados em suspensão foram feitos em frasco Schott de 500,0 mL com volume útil de 20,0 mL ou frasco Schott de 100,0 mL com volume útil de 20,0 mL e, tipicamente, infectados com concentração de cerca de $3,0 \times 10^6$ cel/mL no momento da adição do vírus.

Ademais, para a análise viral do Reator 12, foi utilizado o aparelho Scepter (Merck Millipore). Este instrumento realiza análise automatizada de populações celulares através de um sensor de corrente elétrica localizado na ponteira (60 μ m), e, assim gera informações como o diâmetro médio celular, indicativo de progressão de infecção devido hipertrofia celular.

5.15. Titulação viral

Como descrito por O'Reilly (1992), após passagem viral para multiplicação do vírus em cultura estática com a finalidade de gerar um inóculo viral com volume apropriado, foi feita a titulação destes inóculos, para que seja possível realizar o cálculo quantitativo do número de partículas virais por célula existente no reator (*Multiplicity of Infection* - MOI). A titulação se baseia na observação dos efeitos da infecção do vírus na linhagem celular alvo. Foi feita uma diluição seriada da suspensão viral e aplicados 10,0 µL a concentração celular de 1×10^4 células, em um poço de uma placa de 96 poços, cada poço contendo 100 µL de meio. De 5 a 7 dias após a infecção foi analisado a formação de corpos de oclusão no interior da célula, bem como outras alterações morfológicas causada pelo processo de infecção. A este resultado foi aplicado o método de Reed e Muench (1938) para cálculo do TCID₅₀ (*50% Tissue Culture Infective Dose*), dessa forma se obteve uma concentração de *Plaque Forming Unit/mL* (pfu/mL). Essa informação foi utilizada para cálculo do MOI.

5.16. Liberação e contagem de poliedros

O processo iniciou-se com a liberação dos poliedros de dentro da célula, pela adição de SDS 1% na amostra celular, esta mistura foi mantida a 28°C por pelo menos 1 hora para a dissolução da membrana celular (GEnBio -USP). No laboratório Forest Service – USDA foi feita a lise celular e a consequente liberação de poliedros por sonicação com ciclos de 20 segundos a 20 W (Microson™ *ultrason cell disruptor XL*) seguido de lavagem em PBS 1X (tampão fosfato salina). A contagem da concentração de poliedros por mL foi feita através do uso de câmara de Neubauer em microscópio óptico (Axiophot Carl Zeiss Inc).

5.17. Extração de DNA viral a partir de células infectadas

As células foram sedimentadas e tratadas com SDS (concentração final 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente para liberação dos poliedros. Posteriormente os poliedros foram dissolvidos em uma solução alcalina (Na₂CO₃ 0,1 M). Foi utilizado o kit comercial *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen) de acordo com as recomendações da fabricante, a partir de 100,0 µL da solução. A concentração de DNA foi checada através de espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e comparada com marcador de massa *low DNA mass ladder* (Invitrogen) em gel de agarose 0,8%.

5.18. Eletroforese em gel de agarose

O gel foi preparado em uma concentração de 0,8% de agarose em tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA, pH 8,0) de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Após solidificação, o gel foi submerso na cuba contendo TAE 1X e as amostras contendo os fragmentos de DNA, após suspensão em tampão contendo azul de bromofenol e glicerol, foram introduzidas nos poços. Foram também utilizados os marcadores moleculares λ /*HindIII* e λ /*PstI* para referência de massa molar. Após corrida eletroforética, com voltagem constante de 80 V, o gel foi imerso em solução de TAE 1X contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo. Finalmente, para análise das bandas, o gel foi visualizado em sistema transiluminador-UV e fotografado em fotodocumentador (LAB Trade).

5.19. PCR (Reação em cadeia da polimerase)

Para cada par de *primers* (Tabela 7) utilizou-se: 10,0 µl de tampão da enzima 5x, 0,2 µM de cada primer, 0,4 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 1,25 U de *GoTaq flexi DNA Polimerase* (Promega), 1,0 µl de DNA molde e quantidade suficiente de água ultrapura para completar 50,0 µl. As condições das reações de PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de (desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 50-64°C por 60 segundos, polimerização a 72°C por 90 segundos) e polimerização final a 72°C por 10 minutos. O produto da RT-PCR (5,0 µl) foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Essa análise foi realizada para amostras coletadas dos reatores R10 e R11.

Tabela 7: Relação dos genes estudados por método de PCR e seus respectivos primers forward e reverse

Gene	Primer forward	Primer reverse
polh	polhFw_Sf_2013 (5' AATGTATACTCGTTACAGCTATAACCCA 3')	polhRv_Sf_2013 (5' GTGGTATGGTTTATTAGTACGCGGG 3')
protf	fproteinFw2_Sf_2013 (5'GCCGAACGTAAGTTGTTGTT 3')	fproteinRv2_Sf_2013 (5' CATAACAGATCCATTAACATTTACA 3')
fp25k	25kfpFw_Sf_2013 (5' CATAAACTAACATGACGACTGCCACTG 3')	25kfpRv_Sf_2013 (5' CGTTTATCGCGTTGCGCACTCATC 3')
pp34	pp34Fw_Sf_2013 (5' GTTACAATATAATGTCGTTGATTAC 3')	pp34Rv_Sf_2013 (5' CTTGGATAATCCTTTGATTG 3')
p10	p10Fw_Sf_2013 (5' CGCATTTCGATTAGACGGACC 3')	p10Rv_Sf_2013 (5'GGCCACGATACAGAATTACGC 3')

5.20. Purificação do produto de PCR para sequenciamento e análise das sequências

Os fragmentos obtidos através de PCR foram purificados com o *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen); ou na presença de uma ou mais bandas, foi efetuada a remoção das bandas do gel e estas purificadas com o *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram posteriormente quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e comparadas com marcador de massa *low DNA mass ladder* (Invitrogen) em gel de agarose 0,8%. As amostras que apresentaram concentrações suficientes foram sequenciadas diretamente a partir do produto de PCR.

Os fragmentos de PCR escolhidos foram as amostras de reatores R10 e R11 no tempo 7 dpi para cada gene e amostras controle para comparação, como o vírus SfMNPV que provém do método *in vivo* ou que provém do método *in vitro*, porém na passagem zero, um ou dois. Estas foram sequenciadas por método de Sanger na empresa Macrogen (Seoul, Korea), os infográficos foram analisados individualmente. As sequências obtidas foram analisadas utilizando-se BLASTn (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para comparação com demais sequências disponíveis no Genbank e verificadas para qualidade da sequência através do eletroferograma gerado pelo sequenciamento. O alinhamento das amostras de material genético e da sequência proteica secundária foram realizadas com a versão X do programa Mega (Tamura *et al.*, 2013). Também foi comparado com o genoma de SfMNPV I-19 que está anotado e inserido no banco de dados do Genbank (Wolff *et al.*, 2008).

5.21. PCR quantitativo em tempo real de amostras virais

O par de *primers* sf32fw (5' GCGTTTATCGGCATCCACT 3') / sf32rev (5'ACAACACCAGCAACAAAGC 3') para a região do gene único *sf32* de SfMNPV foi utilizado em um ensaio de qPCR, com o emprego do *Platinum Sybr Green qPCR Supermix-UDG* (Invitrogen). Foram utilizados em cada reação 12,5 µl do mix, 0,2 µM de cada primer, 1,0 µl de DNA molde e água ultrapura suficiente para completar 25,0 µl de reação. Os ensaios foram feitos em um equipamento Rotor gene 5plex HRM platform (Qiagen). As amostras foram submetidas às seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos; 40 ciclos de (95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos) em finalmente, 60°C por 5 minutos. Foram utilizados estoques virais do isolado SfMNPV NR-6 com concentração conhecida para realizar curva padrão de cinco pontos e água foi utilizada como controle negativo. A análise da curva de *melting* foi realizada para assegurar que um produto de amplificação homogêneo foi produzido. Essas análises foram aplicadas para pontos finais dos reatores R10 e R11 e para progressão acompanhada de R12.

5.22. Análise cinética e estatística

Com os dados obtidos da análise das amostras nos experimentos, foi possível a elaboração de gráficos para o cálculo dos principais parâmetros cinéticos do processo, que permitiram comparar os processos. Foram feitas análises das seguintes cinéticas:

- de crescimento celular (concentração celular x tempo);
- do consumo de substrato (concentração de glicose e glutamina x tempo);
- da formação de produtos inibitórios (concentração de lactato e amônio x tempo);
- da formação de produtos e seus efeitos (concentração de poliedros, porcentagem de células infectadas e diâmetro celular x tempo).

Foram calculados, os parâmetros: duração da fase exponencial pela curva de $\ln X_v = f(t)$, $\mu_{\max}$ (velocidade específica de crescimento máxima) pela inclinação da curva de $\ln X_v = f(t)$, $X_{v\max}$ (concentração celular máxima), $Y_{X/Glc}$ (fator de conversão glicose à célula), $Y_{X/Gln}$ (fator de conversão glutamina à célula), $Y_{P/Glc}$ (fator de conversão glicose a produto) e $Y_{P/Gln}$ (fator de conversão glutamina a produto).

Os fatores de conversão de substrato à célula e substrato a produto foram calculados tanto para fase exponencial de crescimento celular ("exp" nas equações) (Equação 4 e 5), quanto para etapa de infecção viral ("inf" nas equações) (Equações 6 e 7) e foram utilizados na fase exponencial para calcular as taxas específicas de consumo de substrato μ_s (Equação 8).

$$Y_{X/S}^{Exp} = \frac{x_{vexp} - x_{v0exp}}{S_{0exp} - S_{exp}} \quad (4)$$

$$Y_{P/S}^{Exp} = \frac{P_{exp} - P_{0exp}}{S_{0exp} - S_{exp}} \quad (5)$$

$$Y_{X/S}^{Inf} = \frac{x_{vinf} - x_{v0inf}}{S_{0inf} - S_{inf}} \quad (6)$$

$$Y_{P/S}^{Inf} = \frac{P_{inf} - P_{0inf}}{S_{0inf} - S_{inf}} \quad (7)$$

$$Y_{X/S} = \frac{\mu_X}{\mu_S} \quad (8)$$

Desta maneira, X_v e X_{v_0} são as concentrações celulares no momento final e inicial da fase exponencial ($X_{v_{exp}}$ e $X_{v_0_{exp}}$) e da fase de infecção viral ($X_{v_{inf}}$ e $X_{v_0_{inf}}$). Da mesma forma, essa lógica se aplica para concentração de substrato (S e S_0 – “exp” e “inf”) e de produto (P e P_0 – “exp” e “inf”). Tais variáveis foram associadas às condições de ensaio para determinação dos critérios ótimos do processo.

A análise estatística foi feita através de análise de variância ANOVA one-way, seguida de teste Tukey com $p < 0,05$ quando detectadas diferenças entre as médias. Os testes foram realizados no software PAST 3.26 (University of Oslo, 2019).

Os experimentos serão denominados como R (Reator) e seu respectivo número quando referente a um ensaio em reator e a CSR (Controle em *shaker* do Reator) e seu respectivo número para ensaios conduzidos no GEnBio – Escola Politécnica de Engenharia Química da USP.

Já os experimentos realizados no USDA-Northern Research Station Forest Service serão nomeados US e seu respectivo número quando reator e SFC (*Shaker Flask Control*) e seu respectivo número quando Controle em *Shaker*. A relação dos experimentos referidos neste trabalho está resumida na Tabela 8.

Tabela 8: Relação dos experimentos realizados com a respectiva sigla, operação, sistema e observações pertinentes. O modo de operação padrão foi feito com os parâmetros descritos previamente

Nome	Obs	Condição	Infecção	Sistema	Objetivo
SuplBR1		Sf-900 III + Cys	x	Schott shaker	Análise crescimento celular
SuplBR2		Sf-900 III + Cys	x	Schott shaker	Análise crescimento celular
USDA x GenBio		ExCell x Sf-900 III	x	Schott shaker	Análise crescimento celular após adaptação, metabólico e equivalência
R01		Sf-900 III padrão	x	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular
R02		Sf-900 III padrão	x	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular
R03		Sf-900 III padrão	x	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular
R04		Sf-900 III padrão	x	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular e metabólico
R05		Sf-900 III padrão	x	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular e metabólico
R06		Sf-900 III padrão	x	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular e metabólico
R08		Sf-900 III + Gln	x	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular e metabólico
R09		Sf-900 III + Gln	x	STR aspergido BioStat B	Análise crescimento celular e metabólico
R10		Sf-900 III + Gln	MOI 0,1	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular e metabólico
R11		Sf-900 III + Gln	MOI 0,1	STR bubble free BioStat B	Análise crescimento celular, metabólico e infecção viral em baixo cisalhamento
R12		Sf-900 III + Gln	MOI 1,0	STR aspergido BioStat B	Análise crescimento celular, metabólico e infecção viral
R13		Sf-900 III + Gln	x	STR bubble free BioStat B	Análise crescimento celular e metabólico em baixo cisalhamento
CSR01		Sf-900 III padrão	x	Schott shaker	Controle em shaker
CSR02		Sf-900 III padrão	x	Schott shaker	Controle em shaker
CSR03		Sf-900 III padrão	x	Schott shaker	Controle em shaker
CSR04		Sf-900 III padrão	x	Schott shaker	Controle em shaker
CSR05		Sf-900 III padrão	x	Schott shaker	Controle em shaker
CSR06		Sf-900 III padrão	x	Schott shaker	Controle em shaker
CSR08	Controle de R08 e R09	Sf-900 III + Gln	x	Schott shaker	Controle em shaker
CSR10	Controle cresc. de R10 e R11	Sf-900 III + Gln	x	Schott shaker	Controle em shaker
CSR11	Controle viral de R10 e R11	Sf-900 III + Gln	MOI 0,1	Schott shaker	Controle em shaker do crescimento celular e da infecção
CSR12	Controle cresc. de R12 e R13	Sf-900 III + Gln	x	Schott shaker	Controle em shaker
CSR13	Controle viral de R12 e R13	Sf-900 III + Gln	MOI 1,0	Schott shaker	Controle em shaker do crescimento celular e da infecção
SuplUS01		ExCell 420 + Gln, Glc, Cya, Col, aa, ExCell 420	x	Erlenmeyer shaker	Análise crescimento celular para otimização do meio ExCell 420
US01		ExCell 420 padrão	x	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular
US02		ExCell 420 padrão	x	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular
US03		ExCell 420 padrão	x	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular
US04		ExCell 420 + Gln	x	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular
US05		ExCell 420 + Cya	x	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular
US06		ExCell 420 + Gln, Glc, Cya	MOI 1,0	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular e infecção viral
US07		ExCell 420 + Glc e Cya	MOI 1,0	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular e infecção viral
US08		ExCell 420 + Glc em 5 litros	MOI 1,0	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular e infecção viral
US09		ExCell 420 + Glc em 10 litros	MOI 1,0	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular e infecção viral
US10		ExCell 420 + Glc e Cya	MOI 1,0	STR aspergido BioFlo 110	Análise crescimento celular e infecção viral
Wave01		ExCell 420 padrão	x	Wave	Análise crescimento celular em baixo cisalhamento
Wave02		ExCell 420 + Gln	x	Wave	Análise crescimento celular em baixo cisalhamento
Wave03		ExCell 420 + Cya	x	Wave	Análise crescimento celular em baixo cisalhamento
Wave04		ExCell 420 + Gln, Glc, Cya	MOI 1,0	Wave	Análise crescimento celular e infecção viral em baixo cisalhamento
Wave05		ExCell 420 + Glc e Cya	MOI 1,0	Wave	Análise crescimento celular e infecção viral em baixo cisalhamento
Wave06		ExCell 420 + Glc e Cya	MOI 1,0	Wave	Análise crescimento celular e infecção viral em baixo cisalhamento
Wave07		ExCell 420 + Glc e Cya	MOI 1,0	Wave	Análise crescimento celular e infecção viral em baixo cisalhamento
Wave08		ExCell 420 + Glc e Cya	MOI 1,0	Wave	Análise crescimento celular e infecção viral em baixo cisalhamento
SFC01		ExCell 420 padrão	x	Erlenmeyer shaker	Controle em shaker
SFC02		ExCell 420 padrão	x	Erlenmeyer shaker	Controle em shaker
SFC03	Controle de US03 e W01	ExCell 420 padrão	x	Erlenmeyer shaker	Controle em shaker
SFC04	Controle de US04 e W02	ExCell 420 + Gln	x	Erlenmeyer shaker	Controle em shaker
SFC05	Controle de US05 e W03	ExCell 420 + Cya	x	Erlenmeyer shaker	Controle em shaker
SFC06	Controle cresc. de US06 e W04	ExCell 420 + Gln, Glc, Cya	x	Erlenmeyer shaker	Controle em shaker
SFC06 inf.	Controle viral de US06 e W04	ExCell 420 + Gln, Glc, Cya	MOI 1,0	Erlenmeyer shaker	Controle em shaker do crescimento celular e da infecção
SFC07	Controle cresc. de US07, US10, W05, W06, W07 e W08	ExCell 420 + Glc e Cya	x	Erlenmeyer shaker	Controle em shaker
SFC07 inf.	Controle viral de US07, US10, W05, W06, W07 e W08	ExCell 420 + Glc e Cya	MOI 1,0	Erlenmeyer shaker	Controle em shaker do crescimento celular e da infecção
SFC08	Controle cresc. de US08 e US09	ExCell 420 + Glc	x	Erlenmeyer shaker	Controle em shaker
SFC08 inf.	Controle viral de US08 e US09	ExCell 420 + Glc	MOI 1,0	Erlenmeyer shaker	Controle em shaker do crescimento celular e da infecção

6. Resultados e Discussão

Os Resultados do presente trabalho serão divididos basicamente em dois grupos, um com o objetivo de promover a etapa de crescimento das células antes da infecção viral e outro da etapa de infecção pelo vírus e produção de poliedros propriamente ditos. Esses grupos serão ainda separados em relação à escala de cultivo: frascos *shaker* e reatores.

6.1. Etapa de crescimento celular em frasco *shaker*

Escola Politécnica da USP – Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GEnBio)

6.1.1. **Suplementação do meio Sf-900 III - Efeito da suplementação de cisteína na cinética celular (SuplBR1)**

Com intuito de maximizar o crescimento celular através da busca de nutrientes limitantes foi realizado um experimento nomeado SuplBR1, com o intuito de testar a suplementação do aminoácido cisteína, este foi escolhido devido a dados anteriores do grupo que indicavam que a cisteína poderia ser um substrato limitante do cultivo (Pereira, 2017) e outros indícios já embasados na literatura (Doverskog *et al.*, 1998). Ademais segundo Vieira (2010), a concentração deste aminoácido presente no meio Sf-900 II quantificado por HPLC é de 0,131 g/L (ou 1,1 mM). Estes fatos, somados a conhecida baixa solubilidade, fez da cisteína um bom candidato para teste de suplementação. Se confirmada, seria uma boa estratégia para operar o reator em modo de batelada alimentada e, desta forma, otimizar o crescimento celular para atingir maiores concentrações celulares e, por consequência, maior formação de poliedros.

Os ensaios de SuplBR1 foram realizados conforme descritos anteriormente, segue o esquema da Tabela 5 e após acompanhamento de 8 dias, as análises cinéticas foram calculadas e plotadas segundo os Gráficos 1 e 2.

Gráfico 1: Curva de crescimento celular do experimento SuplBR 1 com meio de cultivo Sf-900 III Condições Controle (A), Suplementação com 50% do aminoácido cisteína (B), bem como suplementação de 100% nos dias 0 (C) e 3 (D). Concentração celular de células viáveis, não viáveis e a respectiva viabilidade estão mostradas no gráfico. A barra de erros demonstra erro padrão da triplicata.

Gráfico 2: Variáveis cinéticas do experimento SuplBR 1, com meio de cultivo Sf-900 III, parâmetros de velocidade específica de crescimento máximo (A) e crescimento celular máximo (B) A barra de erro demonstra o erro padrão da triplicata.

Ao observar a comparação das curvas de crescimento celular (Gráfico 1) é notável a semelhança no perfil, principalmente da fase exponencial de crescimento celular. Esta similaridade é confirmada na análise cinética (Gráfico 3), o $\mu_{\text{máx}}$ das quatro condições é estatisticamente igual, assim como o $X_{v\text{máx}}$.

6.1.2. Suplementação do meio Sf-900 III - Ensaio de suplementação de ácido cisteico (SuplBR2)

Devido à dificuldade em manipular a cisteína em relação à solubilidade, decidiu-se testar um análogo da cisteína como suplementação no meio de cultivo Sf-900 III e a este experimento se deu o nome de SuplBR2. O ácido cisteico, também chamado de beta sulfoalanina, é gerado pela oxidação da cisteína, oxidando o grupo tiol na terminal carboxila da cisteína a um grupo ácido sulfônico e é derivado da L-alanina (Figura 7). O ácido cisteico é completamente metabolizado via 3-sulfolactato, que realiza a conversão a piruvato e sulfito/bissulfito.

Figura 7: Fórmula química da L-cisteína e do L-ácido cisteico

Na cinética de crescimento fica evidente a semelhança das curvas das duas condições, especialmente na fase inicial (3 primeiros dias). Após o terceiro dia ocorre um desvio na fase exponencial de crescimento da suplementação com ácido cisteico e, consequentemente, uma densidade celular máxima estatisticamente menor (Gráfico 3 e Tabela 9). Sendo assim, o mecanismo pelo qual o ácido cisteico é utilizado pelas células parece ser diferente do da cisteína, já que não se observou um desvio claro na fase de crescimento para este último. Apesar do claro deslocamento da curva cinética, $\mu_{\text{máx}}$ não diferiu entre as condições.

A suplementação com 200,0 mg/L de ácido cisteico não parece ser uma boa alternativa para a otimização do crescimento celular, além de apresentar $X_{v_{\text{máx}}}$ menor, a viabilidade celular final também é mais baixa (Tabela 9). Sendo assim, não é o substrato limitante para o crescimento da célula Sf-9 em meio Sf-900 III.

Gráfico 3: Comparativo da cinética de crescimento celular do experimento SuplBR2 com meio de cultivo Sf-900 III

Variáveis de concentração de células viáveis em azul e viabilidade celular em verde do Controle (Sf-900 III) e da condição com suplementação de 200 mg/L de Ácido cisteico. As barras de erro são o erro padrão das triplicatas.

Tabela 9: Comparação dos parâmetros cinéticos do experimento SuplBR2

Densidade celular máxima ($X_{v_{máx}}$), velocidade específica de crescimento máximo ($\mu_{máx}$) e viabilidade celular no momento de $X_{v_{máx}}$ com desvio padrão da triplicata quando pertinente para a condição Controle (Sf-900 III) e a suplementada com 200 mg/L de Ácido cisteico.

	$X_{v_{máx}}$ (x10 ⁶ cel/mL)	$\mu_{máx}$ (dia ⁻¹)	Viabilidade no $X_{v_{máx}}$ (%)
Controle (Sf-900 III)	7,2 ± 0,6	0,52 ± 0,03	86,7
Ácido cisteico	4,9 ± 0,2	0,47 ± 0,02	93,2

USDA – Forest Service Northern Research Station

6.1.3. Otimização do meio ExCell 420 (SuplUS1)

Ao se iniciar os experimentos no laboratório do USDA, o meio de cultivo disponível para uso era o ExCell 420, assim foi realizado um ensaio preliminar para conferir se o perfil cinético era similar ao já estabelecido em meio Sf-900 III. Ao realizar a comparação entre estes diferentes meios, notou-se que o parâmetro de densidade celular máxima ($X_{v_{máx}}$) estava com valores bastante abaixo do observado anteriormente em meio Sf-900 III. Dessa forma, constatou-se que havia espaço para otimização nutricional que precisa ser alcançada para realizar experimentos comparáveis aos realizados na USP (Gráfico 4).

Gráfico 4: Comparação da média de crescimento celular em escala de shaker da linhagem Sf-9 em meio de cultivo ExCell 420 (USDA- Forest Service Northern Research Station) e da linhagem Sf-9 em meio de cultura Sf-900 III (Escola Politécnica da USP - Grupo de Engenharia de Bioprocessos) Barra de erros mostra triplicata.

Com base nisso, uma comparação de componentes foi feita entre os dois meios de cultura mencionados, Sf-900 II e ExCell 420, ambos popularmente utilizados para cultivo de células de inseto. A análise foi feita com busca de dados da literatura (Vieira, 2010) e dados não publicados do USDA, ambas quantificadas por método de HPLC (Tabela 3). Na terceira coluna é evidenciada a diferença de concentração dos reagentes, ressaltando que o meio Sf-900 II é mais rico em nutrientes que o ExCell 420. Foi estudando quais substratos diferem mais entre os meios de cultivo que os grupos de suplementação foram escolhidos para o ensaio SuplUS1 (Tabela 3).

Desta maneira, com base nestes dados, levantou-se a possibilidade de estar acontecendo uma limitação de crescimento celular da linhagem Sf-9 adaptada ao meio ExCell 420 por falta de substratos chave. Esta restrição poderia causar um prejuízo na produtividade viral, pois esta é proporcional e dependente da concentração de células viáveis. Para contornar este obstáculo, estipulou-se que o meio de cultivo ExCell 420 seria melhor estudado para elaborar uma otimização nutricional através de suplementação de substratos. Os experimentos de suplementação do ExCell 420 foram nomeados como SuplUS1 e realizados conforme a Tabela 6, com adições pontuais ou em grupos de nutrientes nas concentrações descritas. Os resultados desta análise estão nos Gráficos 5 e 6.

Gráfico 5: Comparação entre as condições de suplementação para velocidade específica de crescimento celular máximo $\mu_{\max}$ em dia⁻¹ para o experimento SuplUS1 com meio de cultivo ExCell 420

A barra de erros é da quadriplicata e o asterisco, diferença estatística significativa em relação ao controle.

Gráfico 6: Comparação entre as condições de suplementação para concentração celular máxima ($Xv_{\max}$) em cel/mL para o experimento SuplUS1 com meio de cultivo ExCell 420

A barra de erros demonstra quadriplicata e o asterisco, diferença estatística significativa em relação ao controle.

Como pode ser notado no Gráfico 6, a maioria das condições de suplementação causou aumento na densidade celular máxima quando comparado ao controle, porém a combinação de ácido cisteico com glicose foi o que apresentou a melhora mais significativa, sem aparente consequência no $\mu_{\max}$ (Gráfico 5 e 6). Todavia, o maior $X_{v\max}$ foi obtido na condição de suplementação com o próprio meio de cultura ExCell 420, a suplementação desta condição foi feita da seguinte maneira: ao alcançar uma concentração celular específica (em torno de 3×10^6 cel/mL), o cultivo foi centrifugado, o meio condicionado foi descartado e meio ExCell 420 fresco foi adicionado. Assim, fica mais claro se os substratos testados são de fato limitantes e se estão sendo adicionados numa concentração ótima; o fato de a suplementação com meio complexo e fresco ter resultado em maior $X_{v\max}$ sugere que o substrato limitante não foi encontrado (Gráfico 5).

As condições de suplementação de aminoácidos e colesterol resultaram em um $\mu_{\max}$ e $X_{v\max}$ com valores estatisticamente inferiores, ainda menores que o controle, logo, não são boas abordagens para otimização do crescimento celular através da suplementação do meio ExCell 420 (Gráfico 5 e 6).

6.1.4. Comparações entre os meios de cultivo Sf-900 III e ExCell 420 (USDA X GEnBio)

Como alguns experimentos foram desenvolvidos em laboratórios diferentes e com meios de cultura diferentes, foram realizadas análises complementares com a finalidade de comparação e melhor compreensão das diferenças práticas, este grupo de experimentos foi denominado USDA X GEnBio.

Apesar de a linhagem celular utilizada nos diferentes grupos ser a mesma, Sf-9, mudanças no metabolismo celular e nos mecanismos de transcrição e tradução poderiam causar dúvidas na influência destes processos nos resultados e nas comparações destes. Deste modo, para minimizar este problema, a célula Sf-9 do USDA, que estava adaptada ao meio de cultura ExCell 420, passou por um processo de adaptação celular para ser cultivada em meio de cultivo Sf-900 III e, da mesma forma, foi feito o inverso: a célula Sf-9 do GEnBio USP, ajustada ao meio de cultivo Sf-900 III, foi adaptada para passar a ser cultivada em meio ExCell 420.

Após a adaptação celular finalizada, constatada pelo perfil da curva de crescimento celular ou através da estabilização do $\mu_{\max}$, foi feita a análise cinética juntamente com o respectivo controle, ou seja, a célula no meio de cultivo que estava adaptada originalmente. As adaptações foram realizadas conforme descrito anteriormente e as análises cinéticas ocorreram em escala de frascos *shaker*.

Analisando os gráficos separadamente, nota-se que a adaptação foi bem sucedida seja pela estabilização do $\mu_{\max}$ analisada para a célula Sf-9 GEnBio (Gráfico 7), seja pela ausência da fase lag que se percebe na curva de crescimento celular (Gráfico 8 e 9). Pela Tabela 10, que reúne os parâmetros cinéticos importantes, é clara a semelhança que as células Sf-9 USDA e GEnBio apresentam para o mesmo meio de cultivo e para os três parâmetros estudados. O meio ExCell 420, apesar de apresentar clara desvantagem para a multiplicação celular, aparenta manter viabilidade celular de maneira mais eficiente que o meio Sf-900 III (Tabela 10). O fator velocidade específica de crescimento máximo $\mu_{\max}$ teve resultados estatisticamente iguais nos quatro grupos (Tabela 10).

Desta forma, fica evidente que a diferença no perfil de crescimento celular entre os meios de cultivo Sf-900 III e ExCell 420 se deve, realmente, a diferenças nutricionais que estes meios apresentam (Tabela 3) e não a defasagens de caráter fenotípico, demonstrando robustez desta linhagem celular. Ainda, o meio Sf-900 III demonstra clara vantagem para crescimento da linhagem celular Sf-9 e se mostra mais adequado neste contexto. Apesar disso, o meio ExCell 420

parece manter viabilidade celular por mais tempo que o meio Sf-900 III, esta vantagem pode ser oportuna dependendo da finalidade desejada. Além disso, vale ressaltar que meios de cultivo pobres nutricionalmente são mais fáceis de formular pensando em um futuro barateamento do meio de cultivo. Por fim, o uso do meio de cultivo ExCell 420 é indicado com o emprego de soro fetal bovino (SFB), que deve otimizar a cinética de crescimento.

Gráfico 7: Gráfico da análise da variação do $\mu_{\text{máx}}$ conforme passagens da célula Sf-9 no processo de adaptação celular do meio de cultivo Sf-900 III para o ExCell 420, com a indicação da proporção de meios de cultivo utilizada

Gráfico 8: Comparação do experimento USDA (ExCell 420) X GEnBio (Sf-900 III) – célula Sf-9 USDA Curva cinética de crescimento celular em escala de shaker da célula Sf-9 USDA para o meio em que estava inicialmente adaptada, ExCell 420 e para o meio de cultivo que foi posteriormente adaptada, Sf-900 III. A barra de erro mostra triplicata. Curva ExCell 420 foi deslocada no eixo x para fins de comparação.

Gráfico 9: Comparação do experimento USDA (ExCell 420) X GEnBio (Sf-900 III) – célula GEnBio. Curva cinética de crescimento celular em escala de shaker da célula Sf-9 GEnBio para o meio em que estava inicialmente adaptada, Sf-900 III e para o meio de cultivo que foi posteriormente adaptada, ExCell 420. A barra de erro mostra triplicata. Curva ExCell 420 foi deslocada no eixo x para fins de comparação.

Tabela 10: Comparação dos parâmetros cinéticos para o experimento USDA X GEnBio. Velocidade específica de crescimento máxima, densidade celular máxima e viabilidade celular no momento que a concentração celular atinge seu máximo para as células Sf-9 USDA e Sf-9 GEnBio, ambas adaptadas para os dois meios de cultivo estudado: Sf-900 III e ExCell 420.

Origem célula	Meio de cultura	$X_{v_{\max}}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	$\mu_{\max}$ (dia ⁻¹)	Viabilidade no $X_{v_{\max}}$ (%)
Sf-9 USDA	ExCell 420	5,87	0,56	73
	Sf-900 III	9,33	0,53	21
Sf-9 GenBio	Sf-900 III	9,37	0,53	40
	ExCell 420	5,40	0,55	76

Por fim, mesmo com os dados anteriores do grupo USDA-Forest Service sobre a concentração e os componentes contidos no meio ExCell 420, decidiu-se fazer uma análise metabólica tanto do meio fresco quanto do consumo ao longo do cultivo. O Gráfico 10 apresenta a concentração de nutrientes de células Sf-9 adaptadas ao meio ExCell 420.

Pode-se perceber que ao redor do 5º dia há uma queda brusca na concentração de glutamina, coincidindo com o momento que atinge a concentração celular máxima ($5,4 \times 10^6$ cel/mL) e com o início do dispêndio de glutamato. Da mesma forma, após este ponto, o consumo de glicose é acelerado e, por conta disso, a quantidade de lactato começa a escalar como consequência da limitação dos substratos; atingindo valor final de 0,75 g/L (ou 8,3 mM), apesar de a concentração não ser reportada como tóxica para o crescimento celular, ela sofre um aumento brusco no fim do cultivo.

Assim como para o subproduto lactato, amônio não se torna prejudicial para o cultivo celular, apesar de atingir um valor relativamente alto, de 0,13 g/L (ou 7,6 mM) (Tabela 11). A análise realizada por HPLC concorda com valores de glutamina e glutamato quantificados pelo método enzimático, porém para glicose o número difere em 3,3 g/L, ainda assim, são concentrações inferiores quando comparado ao meio Sf-900 III, destacando a clara desvantagem de composição (Tabela 3). O fator de conversão de glicose em célula é mais alta do que a de conversão de glutamina, sendo o substrato principal para a linhagem Sf-9 cultivada neste meio (Tabela 11).

Gráfico 10: Análise metabólica de cultivo em meio ExCell 420

Análise do consumo de glicose, lactato, glutamina e glutamato, assim como o valor inicial e final de amônio em relação ao perfil de crescimento celular em cultivo de células Sf-9 adaptadas ao meio ExCell 420.

Tabela 11: Relação dos metabólitos para meio ExCell 420

Glicose, glutamina, glutamato, lactato e amônio quantificado em meio fresco ($t=0$) e em seu ponto máximo ou mínimo ao longo do cultivo de 11 dias em g/L, os fatores de conversão de célula em substrato estão também dispostos.

	Gln_0 (g/L)	Gln_{min} (g/L)	Glt_0 (g/L)	Glt_{min} (g/L)	Glc_0 (g/L)	Glc_{min} (g/L)	Lac_0 (g/L)	$Lac_{máx}$ (g/L)	$NH_3^+ final$ (g/L)	$Y_{X/Glc}$ ($\times 10^9$ cel/g)	$Y_{X/Gln}$ ($\times 10^9$ cel/g)
ExCell 420	1	0,095	1,06	0,639	8,9	0,13	0,04	0,75	0,13	1,2	6,3

6.2. Etapa de crescimento celular em biorreator

Escola Politécnica da USP – Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GEnBio)

6.2.1. Ensaio padrão em biorreator e análises metabólicas

Após as análises em escala em frasco *shaker*, em que se estabeleceu o padrão cinético do crescimento celular da linhagem Sf-9, partiu-se para dados referência em biorreator. Foi inicialmente utilizado o BioFlo 110 com as condições padrão já relatadas na metodologia. Como forma de controle, concomitantemente ao reator é feito um cultivo em *shaker* partindo do mesmo inóculo que o reator, com volume útil de 20,0 mL em condições referência.

Foram realizados três cultivos em biorreator com o padrão referência já mencionado; R04, R05 e R06 são uma triplicata. No Gráfico 11 estão plotados os controles realizados em *shaker* provenientes dos mesmos inóculos que os três reatores e podemos observar que na fase mais significativa de crescimento celular, a fase exponencial, o perfil cinético é similar e, em consequência, o $\mu_{\text{máx}}$ também, isto é evidenciado também na Tabela 12 com a relação dos parâmetros cinéticos desses cultivos.

Gráfico 11: Comparação do crescimento celular entre os Controles em frascos *shaker* dos reatores R04, R05 e R06, ou seja, CSR04, 05 e 06 em meio de cultivo Sf-900 III

Tabela 12: Relação dos parâmetros cinéticos de CSR04, CSR05 e CSR06

Velocidade específica de crescimento máximo e densidade celular máxima ($X_{v\text{máx}}$, $\mu_{\text{máx}}$) dos Controles em *shaker* dos Reatores 04, 05 e 06.

	$X_{v\text{máx}}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)
CSR04	9,1	0,62
CSR05	10,0	0,56
CSR06	9,9	0,58

Gráfico 12: Comparativo do perfil de crescimento celular das células viáveis dos três Reatores presentes nesse conjunto de dados (R04, R05 e R06) em meio de cultivo Sf-900 III. As curvas foram deslocadas de forma a desconsiderar a fase lag de cada ensaio para fins de comparação.

Tabela 13: Relação dos parâmetros cinéticos para R04, R05 e R06

Velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$), densidade celular máxima ($X_{\text{v máx}}$), duração da fase lag, taxa de consumo de glutamina (μ_{Gln}), menor valor de glutamina e fatores de conversão glicose e glutamina à célula ($Y_{\text{X/Glc}}$ e $Y_{\text{X/Gln}}$) dos R04, 05 e 06.

	$X_{\text{v máx}}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1})	Duração fase lag (dias)	μ_{Gln} (dia^{-1})	Menor valor de Glutamina (g/L)	$Y_{\text{X/Glc}}$ exponencial ($\times 10^9$ cel/g)	$Y_{\text{X/Gln}}$ exponencial ($\times 10^9$ cel/g)
R04	6,0	0,51	2,86	0,10	0,087	1,3	4,9
R05	6,5	0,62	3,61	0,06	0,149	4,2	10,0
R06	7,6	0,59	0,95	0,08	0,073	4,4	7,1

A triplicata de ensaios teve perfil cinético padrão e o ensaio teve os parâmetros, no geral, bem controlados (Apêndices 4, 5 e 6). No Gráfico 12 foram plotados os três perfis cinéticos de crescimento celular das replicatas de reatores R04, R05 e R06 com um deslocamento do eixo x para fins de compensação das diferentes fases lag. Dessa forma, pode-se notar que, mesmo com as disparidades entre os três reatores (Tabela 13), há um perfil de crescimento celular análogo, especialmente na fase exponencial de crescimento.

A diferença nos valores de $X_{\text{v máx}}$ provavelmente se deve às discrepâncias na eficiência de conversão metabólica e duração de fase lag. A fase lag relativamente longa apresentada pelos reatores, principalmente R04 e R05 (Tabela 13), se deve, provavelmente, à concentração inicial celular baixa de $3,7$ e $3,0 \times 10^5$ cel/mL e pode ter tido grande impacto no perfil cinético geral.

R06 teve maior $X_{v_{\max}}$ e menor duração da fase lag, sendo que os fatores de conversão dos dois principais substratos apresentaram valores médios quando comparados aos outros dois cultivos. R05 teve a maior duração da fase lag, talvez por consequência, este também apresentou menor viabilidade final; $\mu_{\max}$ foi o maior entre os três e o consumo de glutamina à célula parece ter sido o menos eficiente. R04 apresentou valores medianos entre os outros dois reatores e valores de consumo de substratos bastante eficientes.

Ademais, os três ensaios apresentaram outros trechos lineares na curva de $\ln X_v$ com inclinações menores, de 3 a 6 dias, logo após a fase logarítmica máxima com uma velocidade específica de crescimento entre 0,2 e 0,3 dias⁻¹ (dados não mostrados); evidência que pode ser consequência do desvio ou interrupção da fase de crescimento celular exponencial máxima, e evidência de limitação de crescimento por nutriente.

As quantificações metabólicas foram feitas através do equipamento YSI 2700 e, assim, é possível fazer o cálculo de conversão de glicose à célula, por meio deste, temos a informação para o R04 de que 1,0 g de glicose é consumida por cerca de 2×10^9 células. Ao observar o Gráfico 13, podemos constatar que ao final da fase exponencial, ainda havia cerca de 8,2 g de glicose presente no meio (ou 45,5 mM), sendo esta não limitante ao crescimento.

O R05 teve fator de conversão de glicose à célula de $4,2 \times 10^9$ células consumindo 1,0 g do substrato, similar com o valor do R06 de $4,4 \times 10^9$ cel/g, sendo ambos então maiores que R04, devido a isso a concentração de glicose no final da fase exponencial foi mais alta para ambos os reatores, sendo de 9,2 g/L e 8,6 g/L, respectivamente para R05 e R06. Novamente, glicose não aparenta ser substrato limitante para condição padrão de cultivo (Gráfico 13 e 14 e Tabela 13).

Ao observar o perfil de consumo de glutamina à célula para R04 é constatado um valor de $4,9 \times 10^9$ célula por 1,0 g do substrato, este valor é menor quando comparado aos valores dos outros dois reatores. Ademais, considerando que a concentração inicial deste nutriente é de cerca de 1,2 g/L (ou 8,2 mM), que seu consumo coincide com a interrupção da fase exponencial e que o valor mínimo atingido é bastante próximo de zero (0,087g/L) pode haver um esgotamento do substrato no meio. Esses dados demonstram indícios de que a glutamina pode ser um limitante do crescimento celular da célula Sf-9 em meio Sf-900 III, mesmo este sendo um meio teoricamente otimizado (Gráfico 13 e Tabela 13).

O fator de conversão de glutamina à célula também seguiu a tendência observada para $Y_{X/Glc}$, sendo maiores nos reatores R05 e R06, com valores de 10,0 e $7,1 \times 10^9$ células para 1,0 g do substrato, respectivamente. Ainda assim, como R06 atingiu $X_{v_{\max}}$ maior, também apresentou a menor concentração de glutamina dos três reatores deste grupo, de 0,073 g/L e R05 teve valor de 0,149 g/L. Tais dados suportam a teoria de esgotamento de glutamina e limitação de crescimento por conta deste nutriente, também devido ao fato de os menores valores do aminoácido no meio coincidirem com o fim da fase exponencial de crescimento e da taxa de consumo de glutamina (Gráfico 14 e 15 e Tabela 13). Ademais, a concentração celular máxima atingida deste conjunto de ensaios é significativamente menor que o padrão previamente observado em cultivo em frasco Schott e nos Reatores iniciais (Tabela 12 e 13).

O consumo de glutamina é usualmente convertido para o crescimento celular, de forma que, para a linhagem Sf-9, é um substrato chave. A metabolização acontece através da entrada no ciclo TCA como α -cetoglutarato, apesar de cumprir a premissa, esse fenômeno torna o uso de glicose menos eficiente (Bernal *et al.*, 2009). Em limitação de glicose, ocorre glutaminólise com geração, principalmente, de amônio. Enquanto que, em excesso de glicose, a metabolização é feita através da enzima GOGAT e tem como subproduto o lactato (Drews *et al.*, 2000; Young, 2013).

A necessidade de consumo de glutamina e glutamato é evidente ao observar as curvas de consumo (Gráficos 13, 14 e 15) e ocorre de forma concomitante ao consumo da glicose, de maneira claramente eficiente, já que acompanha a fase exponencial de crescimento. No entanto, depois do ponto máximo de densidade celular e o possível esgotamento de glutamina, observa-se formação desses substratos.

Isto muito provavelmente se deve ao fato de que a metabolização de glutamina e glutamato a α -cetoglutarato está intimamente relacionada com a formação do subproduto amônio por terem nitrogênio como parte de sua estrutura básica. Esse sistema é controlado pelo conjunto de enzimas GS/GDH/GOGAT (Figura 5B). No entanto, a produção exacerbada de amônio pode ser tóxica para o desenvolvimento celular, dessa forma, para que ocorra a drenagem deste, ocorre o acoplamento da conversão de piruvato a alanina, subproduto que permite a desintoxicação (Ohman *et al.*, 1996). Caso essa excreção não seja efetiva, o acúmulo de amônio conduz mudança direcional do sistema enzimático GS/GDH/GOGAT já que são reações bidirecionais, para que, assim, ocorra o consumo de amônio tóxico com consequente formação de glutamina e glutamato (Figura 5A e 5B) (Ikonomou *et al.*, 2003).

O metabolismo de glutamina e glutamato está intimamente relacionado devido a maquinaria de enzimas que os conecta de maneira proporcional, assim sua conversão é depende um do outro (Figuras 4 e 5). Por conta disso, há a tendência de as curvas de consumo/produção destes dois aminoácidos acompanharem o perfil um do outro, como podemos observar neste conjunto de dados.

Todavia, em discordância com o relatado, mesmo com a produção de glutamina e glutamato, se observa um acúmulo de amônio: os maiores valores alcançados para os reatores R04 e 06 foram, respectivamente, 1,28 g/L e 1,29 g/L, cerca de 75,4 mM. Assim, pode-se discutir que apesar da tentativa de desintoxicação de nitrogênio por um mecanismo de reciclagem alimentado por GOGAT (Doverskog *et al.*, 2000) e evidenciada pela formação de glutamina e glutamato, não foi suficiente para impedir a alta produção de amônio, que levou a acúmulo de valores tóxicos.

Sendo assim, aparentemente, há uma limitação nutricional do crescimento celular junto da geração de um ambiente nocivo por excesso de amônio devido a metabolização complexa de glutamina, já que tanto o acúmulo de amônio, quanto a formação dos aminoácidos ocorre apenas na etapa final de cultivo, causando assim, a morte celular. Ainda, segundo Drews e colaboradores (2000), a formação exacerbada de amônio também é indício de limitação por glicose.

Em compensação, a produção de lactato parece ser insignificante. A concentração máxima atingida de lactato para R04 foi cerca de 0,14 g/L (ou 1,55 mM), no final da fase exponencial este valor é de 0,09 g/L, sendo assim não é subproduto nocivo já que este apresenta toxicidade a partir de cerca de 0,9 g/L (Drugmand *et al.*, 2007). Os valores máximos de lactato para R05 e R06 foram de 0,16 g/L e 0,1 g/L, respectivamente, ou seja, também não são concentrações tóxicas para a divisão da célula.

Isso indica que não há falta de transferência de oxigênio às células, causa comum do acúmulo de lactato para Sf-9 (Bernal *et al.*, 2009), também que a concentração de glicose não está em excesso (Ikonomou *et al.*, 2003). E, somado a isso, que o metabolismo de glutamina como fonte de energia pela glutaminólise (Figura 5C) não está trazendo carga metabólica a ponto do requerimento do consumo de NADH/NADPH, que gera lactato e CO₂ (Young, 2013). Em concordância, os gráficos de monitoramento de cultivo nos Apêndices 4, 5 e 6 não acusam liberação exacerbada ou picos de CO₂. Assim, glicose segue sendo fonte preferencial para metabolismo central de carbono, porém a glutamina tem papel indispensável ao metabolismo já que seu aparente esgotamento contribui fortemente para a parada da multiplicação celular.

Com este conjunto de dados, há diversas evidências de limitação do crescimento celular pelo aminoácido glutamina, que, até então, não haviam sido notadas. Isso pode ser devido a discrepâncias no lote de fabricação do meio Sf-900 III já que a quantificação inicial enzimática de glutamina do Reator 01 foi cerca de 2,4 g/L, enquanto o conjunto de reatores apresentados aqui (04, 05 e 06) tem uma média de concentração de glutamina inicial de 1,2 g/L $\pm$ 0,1 g/L, valores significativamente menores. A degradação deste aminoácido é comum apenas para temperaturas acima de 27°C e como o meio de cultura é armazenado a 4°C não é provável que a concentração inicial destes lotes tivesse oscilado por degradação.

Gráfico 13: Análise do crescimento celular e do metabolismo – R04

Curva do crescimento celular do R04, com células viáveis, não viáveis e respectiva viabilidade, X_{v0} de $3,7 \times 10^5$ cel/mL. Gráfico da análise metabólica do cultivo R04 em meio Sf-900 III realizado por quantificação em YSI 2700 dos substratos Glicose e Glutamina e dos subprodutos Lactato, Glutamato e quantificação por kit colorimétrico de Amônio em g/L relacionado ao crescimento celular.

Gráfico 14: Análise do crescimento celular e do metabolismo – R05

Curva do crescimento celular do R05, com células viáveis, não viáveis e respectiva viabilidade, X_{v0} de $3,0 \times 10^5$ cel/mL. Gráfico da análise metabólica do cultivo R05 em meio Sf-900 III realizado por quantificação em YSI 2700 dos substratos Glicose e Glutamina e dos subprodutos Lactato, Glutamato e quantificação por kit colorimétrico de Amônio em g/L relacionado ao crescimento celular.

Gráfico 15: Análise do crescimento celular e do metabolismo – R06

Gráfico do crescimento celular do R06, com células viáveis, não viáveis, viabilidade, X_{v0} de $4,8 \times 10^5$ cel/mL. Gráfico da análise metabólica do cultivo R06 em meio Sf-900 III realizado por quantificação em YSI 2700 dos substratos Glicose e Glutamina e dos subprodutos Lactato, Glutamato e quantificação por kit colorimétrico de Amônio em g/L relacionado ao crescimento celular.

USDA – Forest Service Northern Research Station

6.2.2. Ensaio padrão em biorreator

Todos os ensaios realizados em biorreator BioFlo 110 foram acompanhados por um controle em frasco *shaker* com volume útil de 50,0 mL, como descrito anteriormente, com inóculo celular de mesma origem que o reator e com a mesma composição do meio de cultivo (suplementado ou não); este controle em frasco *shaker* (SFC) foi analisado no mesmo período que o reator permaneceu ativo. O perfil e os parâmetros cinéticos foram calculados e plotados para cada análise. Os testes iniciais em reatores foram realizados em triplicata sem suplementação nutricional para estabelecer-se uma condição padrão não otimizada (US01, US02, US03) e as três curvas estão plotadas no Gráfico 16, os parâmetros cinéticos estão dispostos na Tabela 14.

Os três ensaios apresentaram fase lag, típica de experimentos em reator, apesar disso, esta teve curta duração. A densidade celular máxima foi atingida entre o quinto e o sexto dia, com valor médio de $4,67 \times 10^6 \pm 0,23 \times 10^6$ cel/mL e $\mu_{\max}$ de $0,48 \pm 0,02$ dia⁻¹. Ambos os parâmetros são inferiores aos resultados observados em frasco *shaker* para SFC01, SFC02 e SFC03, estes serão referenciados como “SFC padrão” daqui para frente ($6,4 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$ cel/mL e $\mu_{\max}$ de $0,60 \pm 0,01$ dia⁻¹), porém este fenômeno não é incomum quando em aumento de escala e, consequentemente, estresse celular.

Quanto a viabilidade celular nota-se valores bastante altos, de $87,67 \pm 8,02\%$ para reator e $73,06 \pm 5,03\%$ para ensaios em *shaker*. Valores inesperados quando comparados com conjuntos de dados anteriores relativos ao meio de cultura Sf-900 III, possível consequência da discrepância da multiplicação celular entre ambos os meios de cultura. Para este conjunto de dados, será designado o nome “US padrão” para referência e comparações adiante.

Gráfico 16: Curva cinética dos ensaios em reator US01, US02 e US03 (US padrão) para células viáveis (Xv) e não viáveis (Xnv), além de respectiva viabilidade. Ensaio realizado em meio de cultura ExCell 420.

Tabela 14: Relação dos parâmetros cinéticos para US01, US02 e US03 e seus controles em frasco SFC01, SFC02 e SFC03

Velocidade específica de crescimento máximo, densidade celular máxima ($\mu_{\max}$, $X_{v\max}$), viabilidade celular no momento de $X_{v\max}$ e duração da fase lag para ensaios em biorreator US01, US02 e US03 (USpadrão) e seus controles SFC01, SFC02 e SFC03 (SFCpadrão).

	Referência	$X_{v\max}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	$\mu_{\max}$ (dia ⁻¹)	Duração da fase lag (dias)	Viabilidade no $X_{v\max}$ (%)
US01	US padrão	4,80	0,47	1,00	98,70
US02		4,40	0,50	1,00	95,70
US03		4,80	0,47	0,50	93,20
SFC01	SFC padrão	5,90	0,60	0,00	90,00
SFC02		7,00	0,58	0,00	88,00
SFC03		6,30	0,61	0,00	91,60

6.2.3. Ensaios padrão com meio ExCell 420 otimizado

Na tentativa de otimização do meio ExCell 420, foram realizados novos ensaios em biorreator com adição de 2,0 g/L (ou 13,7 mM) glutamina (US04) e outro reator com adição de 200,0 mg/L (ou 1,2 mM) ácido cisteico (US05) nas condições padrão já descritas e com controles em frasco *shaker* (SFC04 e SFC05). Os resultados estão nos Gráficos 17 e 18 e Tabela 15.

No Gráfico 17 é possível verificar que a suplementação tanto do reator US04, quanto do US05 não promove aumento na densidade celular máxima (Tabela 15). Isso é confirmado também pela comparação com a curva do reator US padrão (Gráfico 17), que é a média do primeiro conjunto de dados, ou seja, os cultivos em reator com condição padrão sem suplementação alguma, que gerou concentração celular máxima mais alta que os reatores suplementados (Tabela 15). Apesar de a diferença no $X_{v\max}$ não ser estatisticamente significativa, o $\mu_{\max}$ apresenta diferença estatística, assim, a suplementação aumentou a velocidade específica de crescimento máxima. Por fim, a suplementação com ácido cisteico parece diminuir a viabilidade celular em biorreator (Gráfico 17 e Tabela 15).

Da mesma forma, em escala de frasco *shaker*, este resultado se repete, isto é, a suplementação de glutamina e ácido cisteico não causa aumento com significância estatística no parâmetro de concentração celular máxima, mesmo que apresente um acréscimo no $X_{v\max}$ modesto (Gráfico 18 e Tabela 15). No entanto, é evidente que os valores máximos atingidos em escala de frascos *shaker* são mais altos que em biorreator, com ou sem suplementação; cerca de $3,0 \times 10^6$ cel/mL maior (Tabela 15). Logo, o aumento de escala parece afetar consideravelmente a cinética celular, fenômeno comum e provavelmente devido ao estresse de cisalhamento gerado pela agitação e aeração. Além disso, também se nota uma diminuição considerável na viabilidade celular final nas condições com suplementação (Gráfico 18 e Tabela 15).

Tabela 15: Relação dos parâmetros cinéticos para US04, US05, US06, SFCpadrão, SFC04 e SFC05. Velocidade específica de crescimento máxima, densidade celular máxima ($\mu_{\text{máx}}$, $X_{v\text{máx}}$) e viabilidade celular no momento de $X_{v\text{máx}}$ para ensaios em biorreator US04, US05, US padrão e seus respectivos controles em frasco shaker SFC padrão, SFC04, SFC05 com a duração da fase log em dias. Parâmetros do padrão com desvio padrão da triplicata.

	Suplementação	$X_{v\text{máx}}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1})	Viabilidade no $X_{v\text{máx}}$ (%)
US padrão	X	$4,70 \pm 0,20$	$0,48 \pm 0,02$	$95,90 \pm 2,75$
US04	Gln	3,60	0,67	87,60
US05	Cya	4,30	0,64	84,30
SFC padrão	X	$6,40 \pm 0,50$	$0,60 \pm 0,01$	$89,90 \pm 1,80$
SFC04	Gln	7,00	0,45	91,70
SFC05	Cya	7,30	0,58	84,60

Gráfico 17: Comparativo cinético dos reatores US04, US05 e US padrão. Curva cinética dos cultivos em reatores US04 (com suplementação de 2 g/L de Glutamina), US05 (com suplementação de 200 mg/L de Ácido cisteico) e US padrão com meio de cultura ExCell 420 com células viáveis (Xv), não viáveis (Xnv) e respectiva viabilidade. Barra de erros em triplicata.

Gráfico 18: Comparativo cinético dos controles em frasco SFC04, SFC05 e SFC padrão
Curva cinética dos cultivos em frascos controles em shaker de US04 (SFC04 - com suplementação de 2,0 g/L de Glutamina), US05 (SFC05 - com suplementação de 200,0 mg/L de Ácido cisteico) e "SFCpadrão" (que não apresenta suplementação) com meio de cultivo ExCell 420 com células viáveis (Xv), não viáveis (Xnv) e respectiva viabilidade. A barra de erros mostra triplicata.

Escola Politécnica da USP – Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GEnBio)

6.2.4. Ensaios em biorreator com suplementação

Após constatar indícios de limitação de crescimento celular por esgotamento de glutamina, fenômeno já relatado e discutido na literatura (Drews *et al.*, 2000), decidiu-se realizar um cultivo em reator com suplementação do substrato. Ao analisar a quantificação por YSI 2700 dos reatores R04, 05 e 06, notou-se que anterior ao valor mínimo de glutamina, havia uma queda na concentração celular entre 4 e 5×10^6 cel/mL. Desta forma, e, considerando que concentrações iniciais muito altas de determinado substrato possam ser tóxicas, foi definido que a suplementação seria de 1,0 g/L (ou 6,8 mM) e ocorreria entre 3 e $4,5 \times 10^6$ cel/mL com intuito de prevenir o esgotamento sem acarretar o acúmulo do substrato em um momento inicial. O ensaio foi realizado de maneira simultânea no reator BioFlo 110 (R08) e no BioStat B (R09) para fins de comparação destes sistemas de biorreatores. A suplementação foi feita conforme concentração celular, e com dissolução de 1,0 g de glutamina (Merck) em 50 mL do meio Sf-900III estéril.

No momento da suplementação de glutamina, a concentração no meio de cultivo era de cerca 0,44 g/L e 0,35 g/L, valores relativamente baixos e similares aos dos reatores anteriores que apresentaram esgotamento do aminoácido. O fator de conversão $Y_{X/Gln}$ foi consideravelmente mais alto para R08 devido a maior concentração celular que este atingiu comparado com R09, sendo de $9,1$ e $5,3 \times 10^9$ cel/g para R08 e R09. Porém, o mesmo fator de conversão, após a adição do nutriente foi praticamente igual para ambos os reatores, tendo média de $2,45 \times 10^9$ cel/g e sendo notavelmente baixa, ou seja, a glutamina foi altamente consumida (Tabela 16).

Apesar de a suplementação de glutamina não ter causado efeito claro, especialmente no valor de densidade celular máxima, a taxa de consumo do substrato foi mais alta após a suplementação (Tabela 16), indicando necessidade nutricional. Os valores finais de glutamina foram 0,59 g/L e 0,37 g/L, respectivamente, sendo bastante próximo dos valores anteriores a adição do suplemento. Ademais, novamente, o decaimento da concentração de glutamina ocorreu concomitantemente com o pico de concentração celular máxima. Houve um consumo de 0,42 g/L e 0,63 g/L para R08 e R09 além do que o meio de cultivo sem suplementação oferece.

Mais uma vez, há uma série de evidências que apontam para limitação do crescimento por este aminoácido, o que explicaria $\mu_{\text{máx}}$ e $X_{\text{v máx}}$ ligeiramente mais baixos que os dados prévios, reiterando a importância da glutamina no metabolismo central de Sf-9. Talvez o momento de suplementação não tenha sido oportuno e poderia ser estudada a possibilidade de complementar o aminoácido no início da cinética, já que outros meios de cultivo amplamente utilizados para cultura de células de inseto, TC100 por exemplo, têm concentração inicial de glutamina em torno de 3,5 g/L sem demonstrar inibição do crescimento.

O valor final da concentração de glicose no meio foi de 3,2 g/L (ou 17,8 mM) e 4,5 g/L, respectivamente, sendo assim, não foi limitante ao cultivo. A adição de glutamina não alterou a produção de lactato, sendo que os valores se mantiveram abaixo do valor tóxico, sendo de 0,13 g/L (ou 1,4 mM) e 0,18 g/L, respectivamente. No R09 o acúmulo de amônio teve valor máximo de 0,98 g/L (ou 57,5 mM), o que, novamente explica a produção de glutamato que se nota em ambos os reatores (Gráficos 19 e 20). Este valor foi observado no fim da fase exponencial, sendo assim, pode ter interrompido a multiplicação celular e pode também explicar a baixa concentração celular máxima mesmo com suplementação, aparentemente, efetiva de glutamina.

Ambos os reatores tiveram uma curva de crescimento celular com uma tendência similar (Gráfico 21) e manutenção boa dos parâmetros de cultivo para ambos os sistemas em biorreator BioFlo 110 e BioStat B (Apêndices 7 e 8), apesar das discrepâncias, que ficam mais claras na Tabela 16. De maneira geral, a fase logarítmica dos reatores é bastante análoga, e mesmo com algumas dificuldades neste cultivo, em especial a longa fase lag, é possível afirmar que os dois sistemas – BioFlo 110 e BioStat B - desempenham de maneira equivalente. No entanto, esta confirmação é importante e deve ser validada futuramente.

Tabela 16: Relação dos parâmetros cinéticos para CSR08, R08 e R09

Concentração celular máxima, velocidade específica de crescimento máxima, viabilidade celular no momento de $X_{\text{v máx}}$, bem como fatores de conversão glicose à célula, glutamina à célula e taxa de consumo de glutamina (na fase exponencial de crescimento e após a suplementação com o aminoácido) do frasco shaker Controle e ambos os Reatores, 08 e 09.

	$X_{\text{v máx}}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)	Viabilidade no $X_{\text{v máx}}$ (%)	$Y_{\text{X/Glc}}$ exponencial ($\times 10^9$ cel/g)	$Y_{\text{X/Gln}}$ exponencial ($\times 10^9$ cel/g)	μ_{Gln} exponencial ($\times 10^6$ cel/nmol)	$Y_{\text{X/Gln}}$ após suplementação ($\times 10^9$ cel/g)	μ_{Gln} após suplementação ($\times 10^6$ cel/nmol)
CSR08	7,00	0,58	92,40	-	-	-	-	-
R08	6,80	0,45	91,80	2,60	9,10	14,1	2,40	53,5
R09	5,70	0,44	92,00	3,60	5,30	23,7	2,50	50,2

Gráfico 19: Análise metabólica – R08

Análise metabólica dos substratos glutamina e glicose e subprodutos lactato, glutamato quantificado no YSI 2700 em relação ao crescimento celular.

Gráfico 20: Análise metabólica – R09

Análise metabólica de glutamina, glutamato, glicose e lactato quantificados por YSI 2700 e amônio quantificado por kit colorimétrico em relação ao crescimento celular.

Gráfico 21: Comparativo do cultivo em meio Sf-900 III do perfil de crescimento celular das células viáveis (Xv) e viabilidade de R08 (BioFlo 110, aspersor) e R09 (BioStat B, aspersor). A linha vertical preta mostra o momento da suplementação com Glutamina.

Escola Politécnica da USP – Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GEnBio)

6.2.5. Ensaios em biorreator com diminuição de cisalhamento celular - Ensaios em biorreator STR *bubble free*

Foi realizado cultivo em biorreator STR equipado com base na estratégia de transferência de oxigênio *bubble free* (BioStat B - R13), em alternativa ao modo STR aspergido. O propósito foi compreender melhor o efeito do estresse de cisalhamento no crescimento celular da linhagem Sf-9, já que tem sido reportado que o rompimento da bolha proveniente da aspersão causa alta inviabilidade e morte celular.

A abordagem *bubble free* promove a transferência de oxigênio no meio de cultivo através da passagem da mistura de gases por uma membrana de silicone (SI – Schlauch) imersa, que possui uma parede fina de 0,35 mm de espessura, sendo assim bastante permeável, e com uma pressão controlada de 0,5 bar, propiciando a dissolução do oxigênio no meio sem a formação de bolhas. Além disso, o meio de cultivo Sf-900 III foi suplementado com 1,0 g/L (ou 6,8 mM) de glutamina no início do cultivo, totalizando um valor teórico inicial de cerca de 2,7 g/L.

O Gráfico 22 mostra a curva cinética do controle em *shaker* para o R13, nota-se que a viabilidade celular cai rapidamente após atingir a densidade celular máxima.

Gráfico 22: Análise do crescimento celular - CSR13

Controle em frascos shaker dos cultivos em meio Sf-900 III nos reatores R12 e R13, parâmetros de concentração de células viáveis e não viáveis e sua respectiva viabilidade.

Gráfico 23: Análise do crescimento celular e metabolismo – R13

Curva cinética do cultivo em Sf-900 III em R13 (BioStat B, membrana de silicone) com células viáveis e não viáveis e sua respectiva viabilidade, X_{v0} de $4,7 \times 10^5$ cel/mL com meio suplementado com 1,0 g/L de Glutamina. Análise metabólica de glicose, glutamina, lactato e glutamato quantificado em YSI 2700 em relação ao crescimento celular.

Tabela 17: Relação dos parâmetros cinéticos para R13 e CSR13

Densidade celular máxima, velocidade específica de crescimento máxima, viabilidade celular e fatores de conversão glicose à célula e glutamina à célula para o Controle em shaker e Reator 13 com estratégia *bubble free*.

	$X_{v\text{máx}}$ ($\times 10^6 \text{ cel/mL}$)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1})	μ_{linear} (dia^{-1})	Viabilidade no $X_{v\text{máx}}$ (%)	$Y_{X/\text{Glc}}$ exponencial ($\times 10^9 \text{ cel/g}$)	$Y_{X/\text{Gln}}$ exponencial ($\times 10^9 \text{ cel/g}$)
Controle Shaker R13	5,20	0,75	-	84,4	-	-
R13	10,00	0,78	0,30	89,3	4,10	7,90

No Gráfico 23 é bastante perceptível a alta densidade celular máxima atingida devido à diminuição do estresse de cisalhamento, resultado já esperado, mas ainda mais significativo do que previamente descrito. Além disso, a viabilidade celular cai consideravelmente apenas após o décimo dia de cultivo, quando o valor de células viáveis ainda é de cerca de 80%. Na Tabela 17 pode-se observar a discrepância notável do alto valor da concentração celular máxima atingido no R13 quando comparado ao controle em escala de frascos *shaker*, sendo quase o dobro. Este é um resultado bastante relevante, elucidando que a busca por estratégias que diminuem o estresse de cisalhamento no reator tem um efeito importante para a multiplicação celular, já que a viabilidade e a divisão celular foram mantidas em valores elevados, por um período expressivo.

É interessante pontuar que apesar de os valores de $\mu_{\text{máx}}$ do cultivo no reator R13 e seu controle serem bastante similares, o processo em *bubble free* teve fase específica de crescimento máximo curto com desvio de crescimento precoce (Tabela 17). Assim, houve uma segunda fase de crescimento com velocidade específica de crescimento celular não máxima, caracterizada, provavelmente, por um crescimento linear, não exponencial. Este é acompanhado da permanência da viabilidade e divisão celular, chegando a sua concentração máxima apenas no sétimo dia de cultivo, quando o padrão é culminar ao redor do quinto ou sexto dia. A característica desta fase da curva de crescimento é manter velocidade de divisão constante e velocidade específica de crescimento não constante, sendo que esta última decresce com o aumento da densidade celular. Pode ocorrer sem a prévia existência de uma fase logarítmica, apesar de não ser comum para células de inseto (Schmidell *et al.*, 2001).

Também é descrito que esse fenômeno acontece quando há limitação de transporte de nutrientes do meio de cultivo para o interior celular (Schmidell *et al.*, 2001), no entanto, neste caso, não há indícios de isso estar ocorrendo neste cultivo. Além disso, apesar da transferência de oxigênio não ser tão efetiva, já que o método é menos agressivo, o oxigênio dissolvido é controlado em valor constante (Apêndice 12), portanto não ocorre limitação do crescimento celular devido a isso. Por fim, a alta densidade celular alcançada, o valor constante de saída de CO_2 no monitoramento dos parâmetros (Apêndice 12) e a baixa concentração de lactato, que tende a acumular quando há deficiência de transferência do gás fomentam essas afirmações.

Ainda assim, é importante ressaltar que houve acúmulo celular notado ao final do cultivo no fundo da dorna devido à alta densidade celular alcançada. Isso provavelmente ocorreu devido à dificuldade de homogeneização ao atingir e manter valores acima de 10^7 células/mL, especialmente considerando sistema *bubble free*, já que a aspersão por bolhas tem um papel importante na agitação da coluna de líquido, em particular do fluxo que movimenta a solução do fundo da dorna para a superfície. Dessa forma, é possível que a superfície do vidro tenha atuado como superfície de adesão e, assim, propiciou a formação de uma estrutura similar a um biofilme e uma resposta celular coordenada para produção viral semelhante ao fenômeno de *quorum sensing*. No entanto, é essencial notar que as análises aqui relatadas não consideraram esse efeito, ou seja, o biofilme formado não foi analisado e os dados reportados são das células que permaneceram em suspensão.

A concentração máxima atingida no cultivo para o subproduto lactato foi de 0,54 g/L (ou 6,0 mM) no ponto final analisado. Este valor ainda está abaixo do nível nocivo à divisão celular, contudo ele é significativamente mais alto que os observados anteriormente. Isso se deve provavelmente, devido ao consumo exacerbado de substratos, necessário para alcançar a alta densidade celular. Ou ainda, considerando o acúmulo celular ("biofilme") e que a concentração de lactato tem íntima relação com a disponibilidade de oxigênio no meio, há a possibilidade de esta população celular ter passado por limitação de oxigênio, o que explicaria também a fase linear de crescimento. É provável que uma combinação de ambos os fenômenos tenha ocorrido, e isso, alinhado, com outros efeitos que a estratégia *bubble free* causa, poderia ter causado essa mudança da tendência de fase de crescimento.

Não foi possível realizar a quantificação de amônio para este experimento, no entanto, a produção de glutamato coincidindo com o pico de densidade celular sugere a ação do sistema de enzimas GS/GDH/GOGAT para limpeza do excesso de nitrogênio. No entanto, não se visualiza o mesmo padrão para a curva de consumo de glutamina, observado também nos dados anteriores. Isso pode ocorrer tanto pelo consumo diferenciado causado pela transferência em modo *bubble free*, quanto à suplementação do nutriente no dia zero (0).

Assim, o cultivo foi iniciado com 1,0 grama a mais de glutamina do que o meio de cultivo Sf-900 III oferece, tendo sido quantificado no momento inicial em 2,2 g/L (ou 15,0 mM). Sendo que o último ponto foi registrado como 0,16 g/L, valor relativamente baixo e próximo do esgotamento apesar da adição do aminoácido.

Por fim, a concentração final de glicose foi de 0,62 g/L (ou 3,4 mM), valores muito baixos ao considerar a importância metabólica deste substrato. No entanto, não há indícios de limitação no crescimento celular por glicose já que no pico da curva cinética a concentração de glicose ainda era alta, cerca de 7,0 g/L. Após $X_{v_{máx}}$, o consumo de glicose progrediu rapidamente e de maneira concomitante à taxa de morte celular. Portanto, a parada na multiplicação celular provavelmente teve forte relação com a dificuldade em suprir as necessidades metabólicas em alta densidade.

O coeficiente de conversão de glicose à célula foi de $4,1 \times 10^9$ cel/g, significativamente mais alto que os outros cultivos em reator, bem como a conversão de glutamina à célula que foi de $7,9 \times 10^9$ cel/g. Esses valores podem ser consequência da fase de crescimento celular linear observado, que pode requerer um consumo de substratos diferenciado em relação ao crescimento exponencial padrão observado até então.

Assim, é visível as consequências da diminuição das forças de cisalhamento, levando ao maior valor atingido de $X_{v_{máx}}$ no conjunto de dados deste trabalho. Os valores das concentrações finais dos dois principais substratos indicam falta de otimização do meio de cultura já que, devido a isso, não foi possível a manutenção celular em alta densidade. É possível que, para alcançar valores ainda mais altos de concentração celular, seja necessária uma revisão da composição do meio de cultivo. Ademais, estas características também são concordantes com efeito de densidade, em que, em altas densidades, ocorre perda de eficiência metabólica (Bernal *et al.*, 2010), neste caso, enfrenta-se uma limitação inerente a linhagem celular.

USDA – Forest Service Northern Research Station

6.2.6. Ensaios em biorreator com diminuição de cisalhamento celular - Ensaios padrão em biorreator Wave

Um experimento foi realizado como previamente descrito sem suplementação no meio ExCell 420 para estabelecer condição padrão no biorreator Wave (Wave01). O perfil de crescimento celular está no Gráfico 24. Os parâmetros deste teste inicial foram $X_{v\text{máx}}$ de $2,4 \times 10^6$ cel/mL e $\mu_{\text{máx}}$ de $0,44 \text{ dia}^{-1}$ (Tabela 18). Os valores baixos podem ser devido a problemas no controlador de oxigênio dissolvido relatados durante o cultivo.

Gráfico 24: Análise do crescimento celular – Wave01

Curva de crescimento celular para células viáveis, não viáveis e respectiva viabilidade celular em reator Wave para o ensaio Wave01 em meio de cultivo ExCell 420. O ensaio foi conduzido sem suplementação com X_{v0} de $5,8 \times 10^5 \text{ cel/mL}$.

6.2.7. Ensaios padrão em biorreator Wave com meio ExCell 420 otimizado

Foram realizados experimentos de suplementação para tentativas de otimização do crescimento celular com estratégia Wave em meio ExCell 420. A adição de 2,0 g/L (ou 13,7 mM) de glutamina (Wave02) e de 200 mg/L (ou 1,2 mM) de ácido cisteico (Wave03) foi feita e a curva cinética foi plotada nos Gráficos 25 e 26.

Tabela 18: Relação dos parâmetros cinéticos para Wave01, Wave02, Wave03, SFC03, SFC04 e SFC05

Concentração celular máxima ($X_{v\text{máx}}$), velocidade específica de crescimento máximo ($\mu_{\text{máx}}$), viabilidade celular final (%) e duração da fase log em dias dos biorreatores Wave 01, 02 e 03 e seus respectivos Controles em shaker SFC03, 04 e 05.

	$X_{v\text{máx}}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)	Viabilidade no $X_{v\text{máx}}$ (%)	Duração da fase lag (dias)
Wave01	2,40	0,44	92,50	9,00
Wave02	6,50	0,41	90,00	16,00
Wave03	7,00	0,46	87,30	11,00
SFC03 (Controle de W01)	6,30	0,61	76,80	4,00
SFC04 (Controle de W02)	7,00	0,45	54,70	6,00
SFC05 (Controle de W03)	7,30	0,58	62,30	7,00

Gráfico 25: Análise do crescimento celular – Wave02

Curva cinética de crescimento de células viáveis, não viáveis e respectiva viabilidade. O Wave02 foi conduzido com suplementação de 2 g/L de glutamina com x_0 de $5,2 \times 10^5$ cel/mL em meio de cultivo ExCell 420

Gráfico 26: Análise do crescimento celular – Wave03

Curva cinética de crescimento de células viáveis, não viáveis e respectiva viabilidade. O Wave03 foi conduzido com suplementação de 200 mg/L de ácido cisteico com x_0 de $4,0 \times 10^5$ cel/mL em meio de cultivo ExCell 420

Em comparação com o padrão sem suplementação (Wave01), a adição de glutamina e ácido cisteico tem como consequência o aumento significativo da densidade celular máxima e mais coerente com valores obtidos em escala de frascos *shaker* nos experimentos de SuplUS1 (Tabela 18 e Gráfico 24, 25 e 26). Ao contrário do grupo de dados gerados de forma similar a este, mas em reator STR aspergido (US04 e 05, Tabela 15), como mencionado anteriormente, o fato de a suplementação não favorecer $X_{v_{máx}}$ como acontece em baixa escala pode ser devido ao estresse de cisalhamento celular em biorreator STR aspergido. Este conjunto de dados corrobora essa suposição, pois ao minimizar o cisalhamento pelo uso do biorreator Wave, os valores de $X_{v_{máx}}$ foram mais coerentes com os valores obtidos em frascos *shaker*, como esperado, otimizando o crescimento celular da linhagem Sf-9 em meio ExCell 420.

A suplementação com glutamina já causa uma diferença significativa no crescimento celular quando comparado com o controle sem suplementações (Tabela 18), a adição de ácido cisteico parece ser uma alternativa ainda melhor já que os valores cinéticos foram ainda mais adequados para o processo. De maneira geral, aparentemente, a fase log em biorreator Wave dura mais tempo em comparação com biorreator STR aspergido e escala de frascos *shaker*: $12 \pm 3,6$ dias; $5,8 \pm 1,5$ dias; $5,3 \pm 0,9$ dias (Tabela 18), respectivamente, e pode ser por conta disso que $X_{v_{máx}}$ é maior. Por fim, $\mu_{máx}$ e viabilidade final não diferiram significativamente entre os grupos de biorreator Wave (Tabela 18).

6.3. Comparações da etapa de crescimento celular

É válido ressaltar a importância de se obter comparações entre estudos e otimizações da etapa de crescimento celular da produção de biopesticida viral utilizando a linhagem Sf-9 para melhor compreender o processo e como a célula é afetada pelas condições mecânicas, físicas e nutricionais do meio. Até este ponto o objetivo central foi a otimização da fase de crescimento celular para que, através da alta densidade celular, fosse possível incrementar a produção viral. Estão aqui resumidos alguns pontos chave e conclusões parciais dos experimentos realizados com esta finalidade através da suplementação nutricional e da diminuição do estresse de cisalhamento:

No Gráfico 27 é feita a comparação da cinética de crescimento de quatro reatores com três estratégias de transferência de oxigênio distintas. O modo STR aspergido, mesmo com otimização e suplementação do meio Sf-900 III atinge valores máximos de densidade celular de até 7×10^6 cel/mL, enquanto o modo STR *bubble free* teve valor de 10×10^6 cel/mL para meio Sf-900 III suplementado. Desta forma, esta combinação de STR *bubble free* com suplementação de glutamina é a que apresentou melhor desempenho para aperfeiçoamento da máxima concentração celular neste contexto.

Ademais, pelos experimentos e resultados já demonstrado, o meio ExCell 420 não é a melhor opção para aprimorar a densidade celular desta linhagem (Gráfico 8 e 9). Contudo, mesmo que não comparável aos outros ensaios neste conjunto de dados (por conta da diferença nutricional dos meios de cultura celular), vale destacar que o biorreator Wave também é uma boa opção para este propósito devido ao baixo cisalhamento celular, amplamente descrito, e o efeito na performance das células Sf-9 quando comparada com a versão clássica de STR aspergido, mesmo com meio ExCell 420, que possui uma desvantagem de composição (Gráfico 27).

Apesar da dificuldade na comparação dos sistemas USP e USDA devido a notável diferença nutricional no meio de cultivo, vale ressaltar que as abordagens de diminuição da tensão de cisalhamento têm embasamentos distintos. Enquanto a aeração *bubble free* diminui a morte celular através da ausência de bolhas e a turbulência causada por estas quando estouram, a estratégia do Wave diminui o estresse de cisalhamento devido à ausência de impelidores. Para o crescimento celular da linhagem Sf-9, aparentemente, ambas as estratégias são vantajosas, sendo que o cultivo STR *bubble free* atingiu densidade celular máxima ótima em contexto de meio nutricional rico.

Além da estratégia de transferência de oxigênio ser importante para redução do estresse celular, o consumo de oxigênio também é um fator central, pois este pode ter consequências enraizadas no metabolismo celular. Ainda, o acúmulo de subproduto do metabolismo como lactato e amônio também estão intimamente correlacionados com os fatores de consumo de oxigênio e também glutamina (Lua e Reid, 2003). Foi descrito em todos os grupos de dados, uma dificuldade em realizar o ajuste fino do metabolismo de glutamina, especialmente em relação a concentrações de produção de amônio. O meio Sf-900 III é rico na componente glutamina com valor inicial teórico de quase 1,7 g/L (ou 11,6 mM), especialmente com a suplementação realizada. Assim, teria o potencial de causar a produção exacerbada desses subprodutos tóxicos, não obstante, mostrou-se ser, no geral, benéfico.

Dessa forma, nota-se aqui, em especial, a eficiência da célula Sf-9 em canalizar glicose para oxidação no ciclo TCA, ao passo que é capaz de impedir a formação exacerbada de lactato (Drugmand *et al.*, 2012; Ikononou *et al.*, 2003). A desintoxicação de amônio, por outro lado, deveria ocorrer pelo mecanismo de reciclagem alimentado pela atividade de GS/GDH/GOGAT (Doverskog *et al.*, 2000). Todavia, este não parece tão eficaz dado o contexto e evidenciado pela formação de glutamato. Ainda assim, a síntese base de ATP parece ser relativamente alta em Sf-

9, por consequência da alta atividade do ciclo TCA e da alta eficiência metabólica geral desta linhagem. Dessa forma, há a possibilidade de estar ocorrendo efeito de densidade, em que o fluxo metabólico é inibido com o aumento da concentração celular (Bernal *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2016).

Assim sendo, a fase de estudo e otimização do crescimento da linhagem celular Sf-9 foi finalizada para dar seguimento a etapa de infecção viral.

Gráfico 27: Comparação cinética dos três modos de transferência de oxigênio: STR x bubble free x Wave

Curva de crescimento celular da linhagem Sf-9 com meio de cultivo Sf-900 III suplementado para sistema de STR aspergido e STR bubble free. Em cinza está o gráfico de cinética da célula Sf-9 com meio de cultivo ExCell 420 otimizado para biorreator Wave. A barra de erro corresponde a triplicata.

* cultivo no biorreator Wave não é diretamente comparável as outras duas curvas, por conta da diferença nutricional no meio de cultivo (US - ExCell 420 x BR - Sf-900 III).

6.4. Etapa de infecção viral em biorreatores

Escola Politécnica da USP – Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GEnBio)

Os inóculos virais utilizados neste trabalho foram titulados em $4,65 \times 10^6$ pfu/mL e $5,7 \times 10^7$ pfu/mL.

6.4.1. Ensaio de infecção em biorreator STR *bubble free* x aspersor (MOI 0,1)

Para analisar a hipótese mencionada anteriormente de que o cisalhamento poderia impactar negativamente tanto no crescimento celular quanto na infecção viral, foram feitos cultivos seguidos de infecção de forma simultânea nos reatores BioFlo 110 (R10) e BioStat B (R11), com estratégia de transferência de oxigênio por meio de aspersor e por mangueira de silicone (que gera menor cisalhamento pela ausência de bolhas), respectivamente.

Foi realizada suplementação em ambos os reatores de 1,0 g/L (ou 6,8 mM) de glutamina no início do cultivo, totalizando um valor teórico inicial de cerca de 2,7 g/L. O inóculo viral utilizado foi titulado com o resultado de $4,65 \times 10^6$ pfu/mL e a partir deste valor foi calculado um MOI de aproximadamente 0,1. É reportado na literatura sucesso na produção de baculovírus em multiplicidades de infecção relativamente baixas (Liebman *et al.*, 1999), ademais é um método eficiente para inibir o aparecimento de DIPs (Zhang *et al.*, 2005). A infecção foi iniciada com concentração celular entre $3-4 \times 10^6$ cel/mL, durante a fase exponencial de crescimento celular, padrão para infecção viral. A contagem de poliedros, assim como imagens da progressão da infecção viral foram feitas e as amostras foram coletadas para posterior análise metabólica e viral.

No Gráfico 28 e 29 consta os controles realizados em *shaker* proveniente do mesmo inóculo utilizado nos ensaios R10 e 11, ou seja, CSR10 e CSR11, CSR10 é o controle em *shaker* sem adição do inóculo viral, enquanto CSR11 é o controle com adição do inóculo viral SfMNPV de modo similar em MOI, TOI e CCI que os Reatores. Nota-se uma concentração celular máxima atingida e uma velocidade específica de crescimento similares em ambos os grupos de CSR (Gráfico 28 e Tabela 19). No entanto, essa semelhança não era esperada já que uma das consequências da infecção viral é retardar ou interromper o crescimento celular devido ao desvio no metabolismo celular para a montagem das partículas virais, mesmo com baixo MOI.

Ao comparar a produção de poliedros com os ensaios em biorreatores, podemos observar que apesar de a porcentagem de células infectadas serem semelhantes, é notável a diferença da concentração final de poliedros produzidos, na ordem de quase 60 vezes menos poliedros no CSR11, controle em *shaker* do cultivo celular dos reatores com adição do inóculo viral. Isso poderia explicar o baixo desvio metabólico para produção de poliedros e, consequentemente, a continuidade do crescimento celular; além de ressaltar, mais uma vez, a importância da produção *in vitro* em biorreatores que dispõe de um sistema de controle mais elaborado que a produção em frascos *shaker*.

Tabela 19: Relação dos parâmetros cinéticos para CSR10, CSR11, R10 e R11

Concentração celular máxima atingida, máxima velocidade específica de crescimento, contagem total de poliedros no momento final de cultivo, bem como porcentagem de células com corpos de oclusão no momento final do cultivo e viabilidade celular no momento do $X_{v_{máx}}$ para Controle em *shaker* (CSR10), Controle infectado em *shaker* (CSR11) e Reatores 10 e 11.

	$X_{v_{máx}}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	$\mu_{máx}$ (dias ⁻¹)	Contagem total poliedros ($\times 10^8$)	% células infectadas pelo vírus	Viabilidade celular no $X_{v_{máx}}$ (%)
CSR10	6,20	0,45	-	-	95,00
CSR11 (+ SfMNPV)	6,90	0,47	0,32	30,00	92,00
R10	6,20	0,59	650,00	30,00	87,40
R11	10,00	0,49	850,00	20,00	90,50

Gráfico 28: Comparação do crescimento celular – CSR10 e CSR11

Concentração de células viáveis e viabilidades dos Controles em frascos shaker dos cultivos em Sf-900 III dos reatores R10 e R11, CSR10 e CSR11 (com adição do vírus) e provenientes do mesmo inóculo que os Reatores. Linha vertical mostra o momento em que ocorreu a infecção com SfMNPV MOI 0,1 no Controle com infecção viral (CSR11)

Gráfico 29: Análise do crescimento celular e da infecção viral – CSR11

Gráfico do experimento CSR11, o controle em frascos shaker dos cultivos em Sf-900 III dos reatores R10 e R11 com adição do vírus, com a curva de crescimento celular, com células viáveis e não viáveis, respectiva viabilidade, porcentagem de células infectadas e concentração de poliedros, análise feita pela observação de corpos de oclusão no interior celular, do cultivo controle em shaker. A linha vertical mostra o momento em que foi realizada a infecção com SfMNPV MOI 0,1.

Na Imagem 4 é perceptível a formação de poliedros no interior celular do controle em *shaker*, isso é claro pelo acúmulo de grânulos negros aglomerados no núcleo celular (corpos de oclusão) em forma de colar de contas. Outras características morfológicas típicas do efeito citopático da infecção viral bem-sucedida são a hipertrofia nuclear, que faz com que a área citoplasmática fique muito reduzida e o volume celular aumente, a lise celular acentuada, que ocasiona os debris celulares e células com formatos não usuais. Além disso, é característico a formação do estroma virogênico, região dentro do núcleo que apresenta alta concentração de material genético viral e possível de ser visualizada apenas por microscopia eletrônica. Nas Imagens 4 e 5, essas particularidades também podem ser observadas em maior escala e com a progressão da infecção viral em biorreator.

Imagem 4: Microscopia da infecção do controle em shaker dos reatores R10 e R11, CSR11 em 7 dias, com aumento de 64X (A) e de 160X (B e C)

Imagem 5: Captura de imagem da progressão da infecção viral do reator R10, de 0h até 7dpi, a primeira coluna tem aumento de 64X e a segunda de 160X

Flechas amarelas apontam exemplos de acúmulo de poliedros no interior celular ou alterações morfológicas claras induzidas pelo vírus para melhor discernimento da infecção

Imagem 6: Captura de imagem da progressão da infecção viral do reator R11, de 0h até 7dpi, a primeira coluna tem aumento de 64X e a segunda de 160X

Flechas amarelas apontam exemplos de acúmulo de poliedros no interior celular ou alterações morfológicas claras induzidas pelo vírus para melhor discernimento da infecção

R10 apresentou perfil de crescimento pré-infecção similar aos reatores anteriores e, consequentemente, variáveis cinéticas bastante parecidas (Gráfico 30, 31 e 32 e Tabela 19). Foi notável o desvio de crescimento e viabilidade celular após o momento da infecção para R10, causado pela formação de ODVs, que foram visíveis a partir de pouco depois de 2 dpi (Gráfico 30). Isso fica claro ao analisar as fases de crescimento da curva de divisão celular e, especialmente, ao comparar com a curva de R11 (Gráfico 32). A fase logarítmica de crescimento do R10, que durou cerca de quatro dias, é interrompida pela adição do inóculo viral, nota-se então uma fase de crescimento linear não máxima, está também dura cerca de quatro dias e corresponde a fase que as células seguem replicando, porém ocorre um deslocamento no metabolismo celular para produção de partículas virais. Por fim, há uma fase linear com coeficiente angular negativo, sendo assim, representa o declínio celular causado pela morte das células.

Os parâmetros cinéticos dos reatores foram bastante análogos durante a fase exponencial de crescimento, no entanto o perfil cinético diferiu significativamente após a adição do inóculo viral (Gráfico 30, 31 e 32). O deslocamento metabólico para R11 é muito sutil e fica evidente apenas ao analisar as fases lineares de crescimento. A fase de crescimento logarítmico é mais extensa quando comparado com os outros processos, porém também verificada no reator R13, em modo *bubble free*. Está dura cerca de seis dias e com um valor de velocidade específica máxima um pouco mais baixa, porém, devido a duração, o valor de densidade celular no fim da fase exponencial é mais alto que a média, cerca de 6×10^6 cel/mL. Após cerca de dois dias após a adição do vírus na cultura, nota-se outra fase linear que dura cerca de quatro dias e é caracterizada pela produção de poliedros, seguida por uma fase tênue de declínio de cerca de um dia.

Dessa forma, em consequência das discrepâncias da curva cinética, especialmente após infecção viral, a concentração celular máxima de R11 é significativamente mais alta que R10, sendo estes valores de 10 e $6,2 \times 10^6$ cel/mL, para R11 e R10, respectivamente. Esse resultado é importante pois é mais um indício da importância da interferência do estresse de cisalhamento na multiplicação celular, destacando a relevância e robustez da estratégia *bubble free*, já que apresenta parâmetros similares ao reator R13. Em concordância com isso, a viabilidade celular também divergiu substancialmente, em específico, no perfil de decaimento celular. A morte celular por perda de viabilidade parece ser bem mais lenta no R11, em particular após a adição do vírus, isso se deve, provavelmente, à diminuição do estresse de cisalhamento. Os números para viabilidade celular de R10 e R11, respectivamente, no momento de 5 dpi são 70,9 e 90,1% (Gráficos 30, 31 e 32, Tabela 19).

Por outro lado, a diminuição das forças de cisalhamento no modo *bubble free* não favoreceu a etapa de infecção viral. Pois, apesar de a concentração celular dos dois ensaios terem diferido significativamente, a porcentagem de células infectadas e a concentração de poliedros por mL final não diferiu significativamente, sendo 6,5 e $8,5 \times 10^7$ pol/mL, para R10 e R11, respectivamente. Já que R11 teve uma concentração de células muito superior ao R10, isso significa que, para R11 houve uma produção muito baixa de ODVs por células (Gráfico 30, 31 e 32, Tabela 19, Imagem 5 e 6). No entanto, vale ainda ressaltar que a concentração celular só diferiu após a adição do inóculo viral, dessa forma, R11 teve uma proporção vírus/célula durante a progressão viral mais baixa que R10. Por fim, os parâmetros de cultivo do ensaio foram bem controlados durante o monitoramento (Apêndices 9 e 10).

As concentrações máximas de lactato para R10 e R11 foram de 0,11 g/L (ou 1,2 mM) e 0,16 g/L, ambas concentrações não tóxicas, não correndo acúmulo apesar do grande consumo de glicose. Por outro lado, os valores máximos para amônio foram de 1,14 g/L (ou 66,9 mM) e 1,21 g/L, respectivamente. Estas são concentrações de amônio são nocivas para a divisão celular, no entanto, não se observa uma produção consequente e proporcional de glutamato para

compensação do mecanismo enzimático de reciclagem de nitrogênio. Isso pode ter ocorrido porque o consumo de glutamato foi menor nestes reatores quando comparado com os outros conjuntos de dados, possivelmente por consequência de demandas metabólicas diferentes devido à infecção viral. Nota-se também uma relação dependente e proporcional do glutamato com a amônia na análise metabólica de R11: o pico de amônia corresponde a um dos pontos mais baixos da concentração de glutamato. E no último ponto analisado, pode-se perceber que a consequente produção de glutamato pelo complexo de enzimas GS/GDH/GOGAT leva a diminuição da concentração de amônia, ilustrando mais uma vez esse balanço, observado também em outros processos deste trabalho (Gráficos 30 e 31).

O valor da concentração no final do cultivo de R10 e R11 de glicose foi de, respectivamente, 2,3 g/L (ou 12,8 mM) e 1,5 g/L. No final da fase exponencial, estes números foram 7,7 g/L e 7,1 g/L. Ou seja, durante a infecção pelo baculovírus a demanda celular por glicose foi notavelmente maior. Isso fica mais claro ao analisar os fatores de conversão de glicose à célula: durante a fase exponencial de crescimento $Y_{X/Glc}$ teve média de $2,4 \pm 0,14 \times 10^9$ cel/g, valor um pouco menor que a média dos cultivos deste trabalho, provavelmente devido ao desvio precoce da fase log por conta da adição do vírus. Enquanto pós infecção, os valores foram, 0,7 e $2,7 \times 10^9$ cel/g, a conversão $Y_{X/Glc}$ para R11 foi maior por conta do alto $X_{v_{máx}}$. Não houve restrição da multiplicação celular por glicose, apesar de a concentração final ter sido baixa comparada com outros ensaios (Tabela 19 e 20).

A suplementação de glutamina foi feita em ambas as abordagens, iniciando processo com cerca de 2,63 g/L (ou 18,0 mM). No último ponto analisado dos cultivos, a concentração foi 0,52 g/L para ambos os reatores, não caracterizando esgotamento do substrato. O fator de conversão $Y_{X/Gln}$ teve média $4,55 \pm 0,13 \times 10^9$ cel/g para fase log de crescimento (Tabela 20), da mesma forma que para o substrato glicose, esse valor ficou um pouco abaixo da média dos outros reatores deste estudo provavelmente devido à infecção. Já no período após a adição do inóculo viral, os valores para o parâmetro $Y_{X/Gln}$ foram de 2,7 e $7,3 \times 10^9$ cel/g para R10 e R11 (Tabela 19). Novamente, o consumo por este nutriente teve tendência de aumento para R10 durante a infecção pelo vírus, ao passo que o valor para R11 não acompanha esta propensão.

Nota-se também que ambos os fatores de conversão substrato à célula durante a fase logarítmica de crescimento dos reatores R10 e R11, que possuem abordagem de aeração diferentes, têm valores muito próximos (Tabela 19). Ou seja, na fase log de crescimento, o perfil de consumo de substrato aparenta independer do estresse de cisalhamento e tem como preferência o gasto de glicose. Já na fase de infecção viral, os fatores de conversão e a divisão celular mudam significativamente entre os biorreatores, acontecimento que tem relação direta com o perfil de crescimento dos modos STR aspergido e *bubble free*. Contudo, as células Sf-9 seguem com uma preferência clara por glicose, que parece ser ainda mais importante nesta etapa de produção viral.

Já para o consumo de glutamina, os valores entre as duas abordagens são mais divergentes ainda, o que pode ser explicado pelo desvio metabólico mais evidente no R10 para a produção viral, notável logo após a adição do vírus, que resultou em uma produção específica mais alta; enquanto R11, por conta da elevada concentração celular, usou a conversão metabólica para a divisão celular e não produção de partículas virais (Tabela 20).

Gráfico 30: Análise do crescimento celular, metabolismo e infecção viral – R10

Gráfico da curva de crescimento das células viáveis, não viáveis, bem como a respectiva viabilidade do cultivo em Sf-900 III do R10 (BioFlo 110, aspersor), X_{v0} de $3,6 \times 10^5$ cel/mL. Gráfico da análise metabólica de glicose, lactato, glutamina e glutamato quantificado em YSI2700 e amônio quantificado por kit colorimétrico, comparada com a curva de crescimento celular. Gráfico da análise viral pós-infecção do Reator 10 com contagem de pol/mL e % de células que possuíam em seu interior poliedros. A linha vertical mostra o momento da infecção com SfMNPV MOI 0,1.

Gráfico 31: Análise do crescimento celular, metabolismo e infecção viral – R11

Gráfico da curva de crescimento das células viáveis, não viáveis, bem como a respectiva viabilidade do cultivo em Sf-900 III de R11 (BioStat B, mangueira de silicone), X_v de $4,2 \times 10^5$ cel/mL. Gráfico da análise metabólica com glicose, lactato, glutamina e glutamato quantificado por YSI2700 e amônio quantificado por kit colorimétrico, além da comparação com a curva de crescimento celular. Gráfico da análise viral pós-infecção do R11 com contagem de pol/mL e % de células que possuíam em seu interior poliedros. A linha vertical mostra o momento da infecção com SfMNPV MOI 0,1.

Gráfico 32: Comparativo do crescimento celular e infecção viral para cultivos em Sf-900 III dos reatores R10 e R11

Processo de infecção viral com SfMNPV MOI 0,1 (contagem de poliedros e porcentagem de células infectadas). A linha vertical preta representa o momento em que ocorreu a infecção com SfMNPV MOI 0,1.

Tabela 20: Comparativo dos fatores de conversão metabólicos para R10 e R11
Densidade celular máxima, velocidade específica de crescimento máximo, e fatores de conversão de glicose à célula e glutamina à célula para a fase exponencial e durante a etapa de infecção viral

	$X_{v\text{máx}}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	$\mu_{\text{máx}}$ (dias ⁻¹)	$Y_{X/\text{Glc}} \text{ exponencial}$ ($\times 10^9$ cel/g)	$Y_{X/\text{Gln}} \text{ exponencial}$ ($\times 10^9$ cel/g)	$Y_{X/\text{Glc}} \text{ infecção}$ ($\times 10^9$ cel/g)	$Y_{X/\text{Gln}} \text{ infecção}$ ($\times 10^9$ cel/g)
R10	6,2	0,59	2,5	4,5	0,7	2,5
R11	10,0	0,49	2,3	4,6	2,7	7,3

A suplementação de glutamina no início do cultivo não pareceu causar grande efeito no crescimento celular em R10, porém a ação do aminoácido pode não ter sido percebida devido à infecção viral e alteração no metabolismo causada por este. Já para R11, a combinação da alta disponibilidade do nutriente com o baixo estresse celular fornecido pela abordagem *bubble free*, parece ter sido o principal fator para a concentração celular máxima atingida, a maior entre os processos analisados neste trabalho juntamente com R13, também operado em modo *bubble free*.

Por conta deste alto valor, a quantidade de vírus adicionada pode não ter sido suficiente para estabelecer uma infecção subsequente efetiva, sendo assim, a produtividade de poliedros foi mais baixa, com menos poliedros por célula (Gráfico 32 e Tabela 19). Mais estudos são necessários para melhor compreender o processo, entre eles, o teste com MOI maiores e a adição do inóculo viral em diferentes concentrações celulares.

Por fim, foi feita a análise de alguns genes virais-chave (item 2.3.3.- *polh*, *fprotein*, *25kfp*, *pp34* e *p10*) utilizando-se PCR convencional, para investigar se houve ocorrência de mutações devido a replicação viral sucessiva nas células no reator. Possivelmente devido ao baixo MOI utilizado, a infecção viral estabelecida não alcançou grande concentração de células. No entanto, sabe-se que passagem serial do vírus em cultivos celulares leva a formação de mutantes (Krell, 1996). Dessa forma, o monitoramento da geração de mutantes é importante já que isso pode afetar a infectividade viral e, por consequência, prejudicar grandemente a qualidade do como produto final como biopesticida.

A Imagem 7 tem os géis resultantes das amplificações por PCR com a legenda das canaletas no lado da imagem. Foi utilizado como controle positivo os isolados SfMNPV I-19 nas passagens zero, um e dois (I19-P0, P1 e P2) e a combinação deste com *Anticarsia gemmatalis* (I19+AG), todos coletados no campo e em baixa passagem por conta da comparação de genes íntegros. Como controle negativo foi utilizado água (H₂O) e como marcador molecular de pares de bases (bp) foi utilizado padrão lambda/PstI. Foram analisados para R10 e R11 os momentos zero (corresponde ao momento imediato a adição do vírus), 3, 5 e 7 dpi.

A análise do gene da poliedrina é relevante, pois ele é altamente conservado e mutações neste gene, devido a passagem serial, tem sido relatada na literatura. Considerando os limites dessa análise qualitativa nota-se a banda mais discreta no momento zero e mais exacerbada em 5 e 7 dpi na altura de 754 bp, para fragmento amplificado do gene da poliedrina, tanto no ensaio R10 como R11; ademais, não há aparente deleção ou outra mutação gênica de forma a alterar a posição da banda no gel (Imagem 7A). Da mesma forma, a verificação da integridade do gene da proteína FP25K é essencial, por conta de deleções comuns que ocorrem nesse locus gênico, definindo a região como um “hot spot” para mutações gênicas que causam perda de virulência. Para todas as amostras analisadas, pode-se detectar uma banda evidente na altura de 625 bp, sem distinção de outras bandas, dessa forma, não aparenta ocorrer mutações significativas para este gene (Imagem 7B).

Para o gene da proteína F, nota-se uma banda muito tênue para R10 no momento zero, logo após adição do inóculo, na posição de 1217 bp. Para os momentos 3, 5 e 7 dpi, há diferenciação de uma banda principal, porém nota-se também a presença de uma banda em outra altura. Em geral, nestes casos, as possibilidades são de amplificação inespecífica ou deleção de uma região do gene, levando à amplificação de um amplicon mais curto. O sequenciamento posterior desta segunda banda não acusou diferenças significativas quando comparado com controle, apenas substituições de ácidos nucleicos que levam a mutações neutras na estrutura secundária do aminoácido.

De qualquer maneira, o fato de a banda molar de tamanho correto estar mais proeminente que qualquer ruído na análise por gel, sugere que o gene selvagem é maioria na amostra (Imagem 7C). Ainda, a proteína em questão promove a fusão do vírus e da membrana celular (processo chamado *budding*), então uma mutação drástica e não silenciosa nesse gene poderia resultar na ausência de infecção viral, o que não foi observado nos experimentos (Gráfico 30, 31 e 32).

Para os genes das proteínas p10 e pp34, amplificados por PCR, todas as bandas apresentaram o tamanho esperado de 496 bp e 1063 bp, respectivamente (Imagem 7D e 7E). Os fragmentos de DNA amplificados por PCR, de amostras coletadas ao final da infecção no reator (7 dpi), foram purificados do gel e enviados para sequenciamento.

Assim, a análise das sequências dos fragmentos de DNA amplificados por PCR convencional, confirmou que nenhum dos cinco genes estudados (*polh*, *fprotein*, *25kfp*, *pp34* e *p10*) apresentou mutação, deleção ou mudança de *frameshift* que pudesse alterar a estrutura ou ordem secundária proteica, gerada pela predição de tradução, de modo a modificar o cerne e as características químicas dos aminoácidos.

Observa-se, ainda, o acúmulo de *primers* proveniente do uso em excesso, que não foram gastos na reação de amplificação, isso se observa por regiões na base do gel de bandas *smear* (Imagem 7A, 7C e 7E). Porém, isso não afeta a reação ou a análise de forma alguma. Por conseguinte, considerando as análises cinéticas, morfológicas e moleculares em conjunto, não há indícios de que esteja ocorrendo detrimento da multiplicação viral e geração de mutantes devido a passagem do vírus nas células no biorreator (Gráfico 32, Tabela 19 e Imagem 5, 6 e 7).

Por fim, é relevante ressaltar que os genes analisados fazem parte de uma população genética, sendo assim, o sequenciamento realizado foi feito a partir de um conjunto de genótipos produzidos nas células. A observação de mutações significativas só seria possível se uma grande parcela dos genótipos virais sofresse a mesma mutação, assim, poderiam ser tão representativas e proeminentes quanto o gene selvagem. Como forma de contornar este problema, o infográfico do sequenciamento foi analisado para sobreposição de curvas de nucleotídeos diferentes para o mesmo ponto de modo significativo. Além disso, em uma análise qualitativa, como é o caso da análise por PCR convencional, seria possível visualizar mutação gênica causada apenas por truncamento e deleção proteica expressivas.

Ainda assim, as análises moleculares são ferramentas importantes para melhor compreender a estabilidade genética do vírus. No entanto, um grande indício de que o vírus selvagem permanece estável é a presença de alterações morfológicas típicas nas células, como a indução de efeitos citopáticos e a produção de poliedros de formato regular.

Imagem 7: Géis de PCR dos genes que codificam Poliedrina (A), FP25K (B), Proteína F (C), p10 (D) e pp34 (E) Marcação do tamanho molecular do gene e legenda explicativa à direita. I19 = *SfMNPV* I-19, AG = *Anticarsia gemmatilis*, P0, P1, P2 correspondem a passagens zero, um e dois, padrão molecular foi usado como referência e água como controle negativo. O número entre parênteses corresponde ao número de dias pós infecção (dpi) da amostra.

6.4.2. Ensaio de infecção em biorreator STR aspergido (MOI 1,0)

Após os testes R10 e R11, foi definido que o valor de MOI utilizado, de 0,1, poderia ser aumentado com a finalidade de melhorar a infecção viral em biorreator. Sendo assim, foi realizado novo experimento igual ao R10, ou seja, STR aspergido, porém com adição do inóculo viral SfMNPV (lote 2-2019) com MOI 1,0; titulado a $5,9 \times 10^7$ pfu/mL.

Assim, foi utilizado o reator BioFlo 110 em modo de aspersão, e também foi realizada a adição de 1,0 g/L (ou 6,8 mM) de glutamina no início do cultivo, totalizando um valor teórico inicial de cerca de 2,0 g/L. A infecção no R12 foi iniciada durante a fase exponencial de crescimento celular com concentração de, aproximadamente, $3,3 \times 10^6$ cel/mL. Acompanhamento do padrão de crescimento celular em *shaker* foi usado como controle do processo; tanto o controle não infectado, quanto infectado foram feitos de modo a mimetizar o biorreator e analisados da mesma forma (Gráfico 33).

A infecção viral, tanto nos reatores como em *shaker*, foi acompanhada por 14 dias pós infecção, em contraste com as outras análises de 7 dpi, para avaliar melhor a progressão viral e cinética de produção de poliedros. A contagem de poliedros, porcentagem de células infectadas, imagens da progressão da infecção viral, bem como análise do diâmetro médio celular foram realizadas e as amostras foram coletadas para posterior análise metabólica e viral completa, como cálculos cinéticos, quantificação de metabólitos e quantificação de DNA viral por RT-qPCR, que apresentou amplificação específica e homogênea pela análise das curvas de *melting*.

O comparativo gráfico de ambos os controles em frasco Schott (infectado e não infectado) tem um perfil da curva cinético bastante similar (Gráfico 33), sustentado pelo cálculo cinético (Tabela 21) e com densidade celular máxima e velocidade específica de crescimento máximo análogos. Isto pode significar que o desvio metabólico para a produção e montagem viral não foi rigoroso a ponto de afetar significativamente o perfil cinético, talvez isso explique a baixa concentração celular infectada de cerca de 30% da população celular total.

De forma não esperada, é possível observar no Gráfico 33 que a viabilidade do controle não infectado decrescendo mais rapidamente, resultando em viabilidade celular final maior para o controle infectado quando comparado com o não infectado (Tabela 21). Esse fato precisa ser melhor investigado no futuro, no entanto, supõe-se que isso se dá, talvez, pelo fato de, até certo ponto, a infecção sustentar a viabilidade celular para ser possível utilizar a maquinaria da célula para replicação viral.

Tabela 21: Relação dos parâmetros cinéticos para CSR13, CSR12 e R12
Densidade celular máxima (cel/mL), velocidade específica de crescimento máximo ($\mu_{\text{máx}}$) e porcentagem de viabilidade celular final para ambos os Controles em frasco Schott (CSR12 e CSR13) e R12; bem como porcentagem de células infectadas, concentração de poliedros (pol/mL) e produtividade específica (pol/cel) para CSR12 e R12.

	Schott Controle Reator 13 (CSR13)	Schott Controle infectado Reator 12 (CSR12inf)	Reator R12
$X_{v_{\text{máx}}} (x10^6 \text{ cel/mL})$	5,20	5,20	6,20
$\mu_{\text{máx}} (\text{dia}^{-1})$	0,75	0,65	0,73
Viabilidade no $X_{v_{\text{máx}}}$ (%)	84,20	91,60	82,50
% de células infectadas	-	28,00	32,00
pol/mL ($x10^8$)	-	2,50	9,00
pol/cel	-	182,00	339,10

Gráfico 33: Comparativo do crescimento celular (CSR12 x CSR13) e infecção viral (CSR12) Células viáveis e viabilidade celular em relação ao tempo para os cultivos em Sf-900 III dos controles em frascos shaker não-infectado (CSR13) e infectado (CSR12). Análise do perfil viral do controle em shaker infectado (CSR12) com a relação do crescimento celular com a produção de poliedros, mostrado pela porcentagem de células infectadas e concentração de poliedros, bem como o diâmetro celular médio. A barra vertical preta mostra o momento da infecção com vírus SfMNPV MOI 1,0.

Apesar de visualmente a progressão da infecção ser bastante sutil com cerca de 30% de células infectadas (Gráfico 34, Imagem 8 e 9), ao realizar a lise celular para acesso e contagem dos poliedros livre, é notável que a concentração de poliedros é alta, assim como a produção de poliedros específica, com um número mais próximo a um valor ideal para processo industrial e confirmada pela quantificação de DNA viral por RT-qPCR (Gráfico 34 e Tabela 22). Isso sinaliza que a análise visual nem sempre é completamente confiável e deve ser utilizada com outros métodos de investigação viral, especialmente quantitativos, como os relatados a seguir.

O cultivo em reator teve uma curva cinética padrão e coerente com o que foi previamente observado, é possível visualizar a concentração de células inviáveis crescendo após a adição do inóculo viral (Gráfico 34). Novamente, é difícil concluir sobre o efeito que a suplementação com glutamina causa na progressão do crescimento celular e da infecção viral, devido a desvios metabólicos que a presença do vírus no interior celular e o uso da maquinaria da célula podem causar nos perfis cinéticos.

A visualização de corpos de oclusão no interior celular é perceptível pela refração diferenciada dos poliedros e pelo acúmulo dos mesmos formando núcleos negros; especialmente no aumento de 640 vezes na lente do microscópio e após 7 dpi até o último ponto de 14 dpi (Imagem 9). A contagem da concentração de células infectadas e da concentração de poliedros parece estabilizar após 7 dpi. A quantificação de DNA do baculovírus mostra um platô para os dois últimos pontos – 11 e 14 dpi – com concentrações significativamente maiores, cerca de três vezes, quando comparado com 7 dpi (Tabela 22 e Gráfico 34).

Nota-se um ponto de saturação de produção de poliedros entre 11 e 14 dpi, ou seja, por conta da parada na divisão celular e consequente morte celular, não há novas células para serem infectadas e, além disso, a multiplicação viral dentro de cada célula atingiu seu ponto máximo. Isso sugere que TOH (tempo de coleta) ideal seria em meio a estes tempos, pois os dois últimos valores de concentração de material genético viral são praticamente iguais, entrando numa região gráfica da cinética de platô (Tabela 22 e Gráfico 34).

Dessa forma, seria interessante realizar coleta com TOH antes da saturação para otimizar rendimento, este ponto provavelmente ocorre entre 7 e 11 dpi, conforme análises de RT-qPCR (Tabela 22 e Gráfico 34). De qualquer maneira, a partir de 7 dpi, a lise celular é intensificada e até 14 dpi a quantidade de células íntegras cai drasticamente e é possível observar grande quantidade de debris celular (Imagem 9) e queda na viabilidade celular. O rompimento celular é embasado também pela queda bruta do diâmetro celular no último dia de análise (Imagem 9).

Logo, outra possibilidade para explicar a saturação é de que a decantação de poliedros livres gerados pela lise celular pode não ter sido eficaz, já que foi feita através de centrífuga clínica. Por conta disso, a contagem de poliedros e quantificação de DNA viral pode ter um erro metodológico intrínseco que levou a impressão de um platô na produção de partículas virais (Tabela 22 e Gráfico 34). Para contornar e verificar esta situação, seria necessário, no futuro, realizar a adequada separação de poliedros por ultracentrifugação.

Tanto o parâmetro cinético de concentração celular máxima quanto a velocidade específica de crescimento máxima tiveram valores maiores no R12 do que nos controles em *shaker* infectado e não infectado. A viabilidade celular final no biorreator foi bastante similar ao controle infectado, cerca de 30%, assim como a porcentagem de células infectadas. E os parâmetros de cultivos se mantiveram estáveis durante o processo segundo monitoramento (Apêndice 11).

Contudo, a concentração final de poliedros no biorreator foi significativamente maior que no controle em *shaker*, cerca de quatro vezes superior. Em consequência disso, a produção específica foi mais elevada e atingiu valores de rendimento considerados apropriados para

produção *in vitro* (300 pol/cel – Reid *et al.*, 2014), de cerca de 340 pol/cel (Tabela 21). Com informações baseadas na literatura, é possível especular que a produção de poliedros de R12 em um litro de reator é mais do que o suficiente para tratar um hectare de plantação, levando em consideração o valor de 10^{11} a 10^{12} OB/ha (Reid *et al.*, 2014) e considerando que a virulência do vírus seja similar ao produzido em sistema *in vivo*.

Por fim, a análise metabólica mostrou fator de conversão glicose à célula de $3,8 \times 10^9$ cel/g, valor um pouco mais alto que a média dos cultivos deste estudo, no entanto isso é explicado pela saída da fase log antecipadamente devido à adição do vírus. Ainda assim, a concentração final do substrato no cultivo foi de 0,04 g/L (ou 0,2 mM). Isso ocorreu, pois $Y_{X/Glc}$ pós infecção foi de $0,4 \times 10^9$ cel/g, ou seja, a célula infectada apresentou alta demanda energética e glicose segue sendo nutriente preferencial. O valor de glicose final sugere depleção e, mais uma vez, sugere que para alcançar densidades maiores que 10×10^6 cel/mL seria necessária a adição de glicose. No entanto, não ocorre limitação de crescimento celular pelo substrato, já que os números observados foram no fim do cultivo, quando a fase exponencial de crescimento já havia finalizado. Sendo assim, é possível que os baixos valores de glicose no meio tenham sido um obstáculo na produção de partículas virais (Gráfico 34).

Por conta do alto consumo de glicose, o valor máximo de lactato foi de 1,35 g/L (ou 14,9 mM), concentração considerada tóxica, mas não crítica ao cultivo (3,6 g/L). Valores do subproduto acima de 0,9 g/L foram verificados apenas em concentração de glicose abaixo de 1,0 g/L, indicando que este valor deve ser o limiar da concentração do nutriente para que não ocorra produção exacerbada de lactato. Ademais, vale ressaltar que as altas concentrações de lactato no meio foram observadas apenas depois do 13º dia, sendo que o processo R12 foi conduzido por mais tempo que o padrão, até 17º dia ou 14 dpi, para melhor entendimento da estabilidade e progressão da infecção viral (Gráfico 34).

O fator de conversão de glutamina célula foi de $5,8 \times 10^9$ cel/g, da mesma forma que para glicose, este fator está um pouco mais alto que a média por conta do desenvolvimento da infecção. Esse mesmo parâmetro para período pós-infecção foi de $3,9 \times 10^9$ cel/g, confirmando mais uma vez a alta necessidade metabólica celular durante a produção de partículas virais. O menor valor de glutamina anotado para R12 foi de 0,165 g/L (ou 1,1 mM), com uma taxa de consumo estável durante infecção viral. Portanto, não constata limitação pelo substrato e, apesar de não ser possível visualizar efeito da suplementação do aminoácido, este foi consumido com altos valores de fator de conversão, demonstrando, novamente, sua importância metabólica (Gráfico 34).

Por fim, a concentração máxima de amônio foi alta, sendo de 0,79 g/L (ou 46,4 mM). Esse fenômeno já foi observado em outros conjuntos de dados e já foi discutido anteriormente: aparentemente o sistema de reciclagem de nitrogênio não parece estar sendo tão eficaz como reportado na literatura. Entretanto, a produção de glutamato que normalmente acompanha as altas concentrações de amônio, devido ao complexo enzimático GS/GDH/GOGAT, não foi observada com tanta nitidez para R12, a formação de glutamato ocorreu apenas na fase final de cultivo e de forma mais sutil quando comparada aos outros dados e sem o típico acompanhamento da formação de glutamina (Gráfico 34).

Gráfico 34: Análise do crescimento celular, metabolismo e infecção viral – R12

Curva de crescimento celular com células viáveis e não viáveis e a respectiva viabilidade do processo em relação ao tempo para o cultivo em Sf-900 III do reator R12 (BioFlo 110, aspersor), X_{v0} de $4,6 \times 10^5$ cel/mL. Gráfico da análise metabólica com glicose, lactato, glutamina e glutamato quantificado em YSI2700 e amônio quantificado por kit colorimétrico, comparado com a curva de crescimento celular. Análise da infecção viral da relação do crescimento da célula com a progressão da infecção através dos parâmetros de porcentagem de células infectadas, concentração de poliedros, diâmetro médio celular e concentração de DNA viral. A barra vertical preta demonstra o momento da adição do inóculo viral SfMNPV MOI 1,0.

Imagem 8: Captura de Imagens da progressão da infecção viral do cultivo em Sf-900 III do CSR 12 infectado com SfMNPV MOI 1,0 para os tempos 0, 3, 5, 7, 11 e 14 dpi (dias pós infecção). A primeira coluna é lente de aumento de 64X, a segunda de 160X e a terceira de 640X. As flechas amarelas apontam acúmulo de poliedros ou alterações morfológicas difíceis de serem notadas.

Controle em Schott do R12 + SfMNPV MOI 1,0

Imagem 9: Captura de Imagem da progressão da infecção viral do cultivo em Sf-900 III do R12 com SfMNPV MOI 1,0 para os tempos 0, 3, 5, 7, 11 e 14 dpi (dias pós infecção). A primeira coluna é lente de aumento de 64X, a segunda de 160X e a terceira de 640X. As flechas amarelas apontam acúmulo de poliedros ou mudanças morfológicas difíceis de serem notadas.

Reator R12 + SfMNPV MOI 1,0

Tabela 22: Análise quantitativa por RT-qPCR do DNA viral para o R12 e CSR12

Na tabela está definido o instante de coleta da amostragem em dpi (dias pós infecção), o intervalo de confiança do valor calculado e a concentração do material genético para o gene *sf32* para cada ponto em ng/mL.

	TOH (dpi)	IC (95%)	ng/mL
R12	0	não detectado	não detectado
	3	$8,78 \times 10^{-5} - 4,15 \times 10^{-4}$	0,19
	7	$5,34 \times 10^{-3} - 1,42 \times 10^{-2}$	8,72
	11	$1,64 \times 10^{-2} - 4,56 \times 10^{-2}$	27,4
	14	$1,66 \times 10^{-2} - 4,63 \times 10^{-2}$	27,8
CSR12	14	$4,59 \times 10^{-4} - 1,58 \times 10^{-3}$	0,02

USDA – Forest Service Northern Research Station

6.4.3. Ensaio de infecção em biorreator STR aspergido (MOI 1,0)

A infecção com vírus SfMNV foi realizada com MOI de 1,0 com diferentes suplementações, a análise cinética do crescimento celular e da infecção viral estão nos Gráficos 35 e 36. Ainda que a suplementação em biorreator STR aspergido não tenha resultado em um acréscimo significativo na densidade celular, testaram-se duas das suplementações que apresentaram melhor desempenho na análise em frasco *shaker* para avaliar crescimento e, especialmente, efeito na infecção viral.

O reator US06 foi realizado com suplementação de 2,0 g/L de glutamina (ou 13,7 mM), 200 mg/L (ou 1,2 mM) de ácido cisteico e 3,0 g/L (ou 16,6 mM) de glicose e infectado ao atingir cerca de 3×10^6 cel/mL com MOI 1,0 da variante Nicarágua B de SfMNPV. As curvas de crescimento de células viáveis e não viáveis, bem como a análise da infecção estão indicadas no Gráfico 35.

O parâmetro $\mu_{\text{máx}}$ teve um valor considerado padrão, de $0,53 \text{ dia}^{-1}$. Apesar de a suplementação ter apresentado resultados vantajosos em escala de frascos *shaker*, em escala de biorreator o parâmetro X_v atingiu seu valor máximo em $4,3 \times 10^6$ cel/mL, cerca de um dia após a adição do inóculo viral (Tabela 23 e Gráfico 35). No conjunto de dados anteriores já se havia observado que a suplementação de nutrientes não surtiu o efeito esperado e se especulou que poderia ser consequência do aumento da escala e do estresse de cisalhamento, consequência de forças originadas da aspersão por bolhas e da agitação do biorreator.

Neste ensaio pode ter ocorrido o mesmo fenômeno, entretanto a adição do vírus pode também ter causado, e até fomentado, este efeito através do deslocamento metabólico que a infecção gera. Ao comparar com os controles em frasco *shaker* (SFC06 e SFC06inf), fica mais claro um desvio do metabolismo decorrente do uso da maquinaria celular pelo vírus, já que o controle não infectado (SFC06) têm valores de parâmetros cinéticos mais altos que o controle infectado (SFC06inf) e o reator (US06) (Tabela 23).

A viabilidade celular do reator foi também menor que ambos os controles em frasco *shaker* (SFC06 e SFC06inf), isso é esperado já que o aumento de escala costuma gerar estresse celular (Tabela 23). A produção final de poliedros e porcentagem de células infectadas de US06 foram de $4,3 \times 10^7$ pol/mL e 36%, respectivamente, enquanto SFC06inf teve concentração de poliedros de $6,0 \times 10^7$ pol/mL, resultante de uma maior porcentagem de células infectadas que o reator, de 47% (Tabela 23).

Neste mesmo cenário, foram conduzidos dois ensaios, duplicatas em biorreator STR aspergido com suplementação de 3,0 g/L de glicose e 200,0 mg/L de ácido cisteico, condição que mais incrementou a densidade celular máxima em teste com frascos *shaker*. Da mesma forma, o complemento nutricional não causou o efeito esperado em $X_{v_{máx}}$, US07 teve densidade celular máxima de $4,3 \times 10^6$ cel/mL e $\mu_{máx}$ $0,48 \text{ dia}^{-1}$ e US10, $3,6 \times 10^6$ cel/mL e $\mu_{máx}$ $0,45 \text{ dia}^{-1}$, respectivamente, tendo média de $3,95 \times 10^6$ cel/mL, $\mu_{máx}$ $0,47 \text{ dia}^{-1}$ e viabilidade celular média final de 50% (Tabela 23). A produção média de US07+US10 para poliedros foi de $4,95 \times 10^7$ pol/mL e para porcentagem de células infectadas totais de 36%. O perfil cinético médio dos dois ensaios está plotado no Gráfico 36 com o desvio padrão mostrado em barras.

Da mesma maneira que para US06, os cultivos controles em frasco *shaker* do conjunto US07+US10 tiveram valores de parâmetros cinéticos mais altos que a média dos dois reatores. Isso pode ser resultado não só do deslocamento metabólico para favorecer a progressão da infecção viral, como também do estresse celular gerado pelo biorreator. Também, os valores para porcentagem de células infectadas e concentração de poliedros forma maiores para os ensaios em frasco *shaker* do que para os reatores US07+US10 (Tabela 23).

Dessa forma, parece ocorrer algum efeito prejudicial em escala de biorreator que não acontece em escala de frascos *shaker*, provavelmente fortemente relacionada a danos de cisalhamento. Aparentemente então, a suplementação com nutrientes chave, que favorece metabolicamente a divisão celular em frascos *shaker*, não é o suficiente para criar um ambiente favorável para infecção viral em escala de biorreator. Portanto, é necessário buscar outras alternativas para que as células em cultivo no reator superem este dano e, assim, talvez, a suplementação provocará o efeito observado em escala menor e, por consequência, melhorará a produção de poliedros. Uma alternativa para tratar o dano celular que ocorre em reator é diminuir o estresse de cisalhamento.

Tabela 23: Relação dos parâmetros cinéticos de crescimento celular e infecção viral dos ensaios US06, SFC06, SFC06inf, Média US07+US10, SFC07 e SFC07inf

Densidade celular máxima, velocidade específica de crescimento máxima, viabilidade celular no momento de $X_{v_{máx}}$, porcentagem de células infectadas e concentração final de poliedros para Reatores US06 e a média US07+US10 com seus respectivos controles não infectados e infectados, SFC06 e SFC06inf e SFC07 e SFC07inf.

	Suplementação	$X_{v_{máx}}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	$\mu_{máx}$ (dia^{-1})	Viabilidade no $X_{v_{máx}}$ (%)	% de células infectadas	pol/mL ($\times 10^7$)
US06	Cya, Gln e Glc	4,30	0,53	88,70	36,00	4,30
SFC06 (Controle não infectado US06)	Cya, Gln e Glc	7,80	0,70	90,00	-	-
SFC06inf (Controle infectado US06)	Cya, Gln e Glc	3,40	0,47	76,50	47,00	6,00
Média US07+US10	Cya e Glc	3,95	0,47	80,80	36,00	4,95
SFC07 (Controle não infectado US07+US10)	Cya e Glc	8,80	0,67	87,90	-	-
SFC07inf (Controle infectado US07+US10)	Cya e Glc	7,40	0,65	75,50	48,00	9,60

Gráfico 35: Análise do crescimento celular e infecção viral – US06

Curva cinética de crescimento celular com células viáveis e não viáveis e respectiva viabilidade do cultivo em ExCell 420 do Reator US06 com suplementação de 200 mg/L ácido cisteico, 2 g/L de glutamina e 3 g/L de glicose, X_{v0} de $3,8 \times 10^5$ cel/mL. Análise da infecção relacionada à concentração de poliedros, porcentagem de células infectadas comparado ao crescimento celular. A barra preta vertical mostra o momento da infecção com SfMNPV MOI 1,0.

Gráfico 36: Análise do crescimento celular e infecção viral – Média de US07 e US10

Curva cinética média de crescimento celular com células viáveis e não viáveis e respectiva viabilidade dos cultivos em meio ExCell 420 dos Reatores US07 e US10 com suplementação de 200 mg/L ácido cisteico e 3 g/L de glicose, X_{v0} de $2,8 \times 10^5$ cel/mL e $7,7 \times 10^5$ cel/mL, respectivamente. Análise média da infecção relacionada a concentração de poliedros, porcentagem de células infectadas comparadas ao crescimento celular. A barra preta vertical mostra o momento da infecção com SfmNPV MOI 1,0.

6.4.4. Ensaio de infecção em biorreator STR aspergido – aumento de escala

Por fim, para fins de comparação e viabilidade do processo, ensaios na mesma condição foram realizados em biorreatores STR aspergido com volume útil de 5,0 litros (US08) e 10,0 litros (US09) com suplementação de 3,0 g/L (ou 16,6 mM) de glicose. Os dados foram comparados à média dos reatores de volume útil de 1,0 litro US07 e US10, que foram suplementados com glicose e ácido cisteico (Gráfico 37).

US08 teve $X_{v_{\max}}$ de $5,2 \times 10^6$ cel/mL e $\mu_{\max}$ de $0,44 \text{ dia}^{-1}$, enquanto US09, $5,0 \times 10^6$ cel/mL e $\mu_{\max}$ de $0,48 \text{ dia}^{-1}$, viabilidade celular final para US08 e US09 foi de 40% e 45,5%. Na análise da infecção tem-se valores de produção de $4,2$ e $4,6 \times 10^7$ pol/mL e porcentagem final de células infectadas de 42 e 44%, respectivamente (Gráfico 38 e 39, Tabela 24), mostrando resultados muito similares entre si e à média de reatores de 1,0 litro (US07 e US10) (Tabela 24) e reprodutíveis para escalonamento. Mesmo que a produtividade específica de produção de poliedros não tenha sido ótima, a consistência no aumento da escala, revela robustez do processo e é mais um indício da viabilidade de produção em maior escala (Tabela 24).

Os ensaios controles em frasco *shaker* tiveram valores de $X_{v_{\max}}$ e $\mu_{\max}$ maiores que os ensaios em reator, tanto para US08, quanto para US09 e a média US07+US10, como relatado anteriormente (Tabela 24). Isso, novamente, destaca o desvio metabólico do crescimento celular para a infecção viral que ocorre para que o vírus utilize da maquinaria celular. Além disso, é mais uma evidência que o cultivo celular em reator sofre estresse celular significativo e, portanto, tem a densidade celular máxima e, conseqüentemente, a produção de poliedros mais baixos comparado ao cultivo em frasco *shaker* (Tabela 24).

O estresse celular observado em biorreatores é um empecilho pois a suplementação nutricional não parece estar sendo efetiva para otimização do crescimento celular, prejudicando assim, a produção do biopesticida. Portanto, outras estratégias serão empregadas em busca de contornar este problema.

Tabela 24: Relação dos parâmetros cinéticos dos ensaios US08, US09 e a média de US07 e US10, SFC08 e SFC08inf (controles em frasco infectado e não infectado de US08 e US09) e SFC07 e SFC07inf (controles em frasco infectado e não infectado de US07+US10) Valores para crescimento celular ($X_{v_{\max}}$, $\mu_{\max}$ e viabilidade celular no momento de $X_{v_{\max}}$) e para infecção viral (concentração de poliedros e porcentagem de células infectadas) e os respectivos volumes de cada ensaio.

	Volume (L)	$X_{v_{\max}}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	$\mu_{\max}$ (dia^{-1})	Viabilidade no $X_{v_{\max}}$ (%)	% de células infectadas	pol/mL ($\times 10^7$)
Média US07+US10	1,00	3,95	0,47	80,80	36,00	4,95
SFC07 (Controle não infectado US07+US10)	0,05	8,80	0,67	87,90	-	-
SFC07inf (Controle infectado US07+US10)	0,05	7,40	0,65	75,50	48,00	9,60
US08	5,00	5,20	0,44	83,00	42,00	4,20
US09	10,00	5,00	0,48	92,00	44,00	4,60
SFC08 (Controle não infectado US08 e US09)	0,05	7,60	0,76	82,40	-	-
SFC08inf (Controle infectado US08 e US09)	0,05	6,20	0,70	76,70	51,00	8,00

Gráfico 37: Análise do crescimento celular – US08, US09 e Média US07+US10

Comparação dos cultivos em ExCell 420 dos reatores US08 e US09, para 5,0 e 10,0 litros respectivamente, ambos com suplementação de 3,0 g/L de glicose, assim como da média dos cultivos em ExCell 420 dos reatores US07 e US10 como padrão de volume útil de 1,0 litro e suplementação de 3,0 g/L de glicose e 200 mg/L de ácido cisteico. A análise de comparação é feita com a curva de crescimento celular de células viáveis (Xv) e não viáveis (Xnv). A barra de erros mostra a média dos reatores US07 e 10. A barra preta vertical mostra o momento em que foi adicionado o vírus SfMNPV com MOI 1,0.

Gráfico 38: Análise da infecção viral – US08

Reator com volume útil de 5,0 litros, cultivo em meio ExCell 420, suplementação de 3 g/L de glicose e X_{v0} de $5,0 \times 10^5$ cel/mL. Relação entre a curva de crescimento celular e os parâmetros de infecção que são: concentração de poliedros e porcentagem de células infectadas. A barra preta vertical mostra o momento da infecção com MOI 1,0.

Gráfico 39: Análise da infecção viral – US09

Reator com volume útil de 10,0 litros, cultivo em meio ExCell 420, suplementação de 3 g/L de glicose e X_{v0} de $5,0 \times 10^5$ cel/mL. Relação entre a curva de crescimento celular e os parâmetros de infecção que são: concentração de poliedros e porcentagem de células infectadas. A barra preta vertical mostra o momento da infecção com MOI 1,0.

6.4.5. Ensaios de infecção em biorreator Wave (MOI 1,0)

Com os experimentos anteriores, chegou-se à conclusão de que a suplementação nutricional não reproduziu, em reatores, o efeito de aumento da densidade celular que apresentou em frascos *shaker*; e, por consequência, não teve o resultado esperado de aumentar a produção de poliedros. Os ensaios em frasco *shaker* tiveram densidade celular e produção de poliedros, em média, duas vezes maior que os ensaios em reatores.

Em razão disso, levantou-se a hipótese de que o estresse celular gerado pelo reator dificulta a ação da suplementação nutricional. Já que as células estão num estado de estresse, o fluxo metabólico é direcionado para um estado de manutenção, não de multiplicação celular. Uma das principais diferenças entre a escala de frasco *shaker* e o reator é o modo de aeração, sendo o biorreator muito mais agressivo à célula devido à aspersão de bolhas e às forças de cisalhamento.

Assim, para estudar a possibilidade de o estresse de cisalhamento estar afetando não apenas o crescimento celular e a infecção viral, mas também ser um grande empecilho para a otimização do processo por meio de suplementação, foram realizados ensaios em biorreator Wave. O Wave é um reator de gangorra com movimento de ondas que é gentil à célula, sendo possível controlar a velocidade e o ângulo que este é agitado.

Após executado o ensaio padrão para Wave (Wave01) e os ensaios com adição de nutrientes (Wave02 e Wave03), anteriormente reportados, a infecção foi feita com MOI 1,0 e duas suplementações distintas em busca da melhoria da etapa de crescimento celular e, consequentemente, da infecção.

O ensaio com adição de 2,0 g/L (ou 13,7 mM) de glutamina, 200,0 mg/L (ou 1,2 mM) de ácido cisteico e 3,0 g/L (ou 16,6 mM) de glicose (Wave 04) teve os seguintes parâmetros cinéticos: $X_{v_{\max}}$ de $3,0 \times 10^6$ cel/mL, $\mu_{\max}$ de $0,52 \text{ dia}^{-1}$, viabilidade celular final de 5% e produção final de poliedros de 23×10^7 pol/mL e 71% das células totais infectadas (Gráfico 40).

Gráfico 40: Análise do crescimento celular e infecção viral – Wave04

Curva cinética de crescimento celular com células viáveis e não viáveis e respectiva viabilidade do cultivo em ExCell 420 do Reator Wave04 com suplementação de 200 mg/L ácido cisteico, 2 g/L de glutamina e 3 g/L de glicose, X_{v0} de $4,8 \times 10^5$ cel/mL. Análise da infecção relacionado à concentração de poliedros, porcentagem de células infectadas comparado ao crescimento celular. A barra preta vertical mostra o momento da infecção com SfMNPV MOI 1,0.

Tabela 25: Relação dos parâmetros cinéticos dos ensaios Wave04 e seus controles infectado e não infectado em frasco (SFC06 e SFC06inf), Wave05, Wave06, Wave07, Wave08, a média dos 4 reatores e seus controles infectado e não infectado em frasco (SFC07 e SFC07inf.)

Valores para crescimento celular ($X_{v_{máx}}$, $\mu_{máx}$ e viabilidade celular no momento de $X_{v_{máx}}$) e para infecção viral (concentração de poliedros e porcentagem de células infectadas) com desvio padrão da média quando pertinente e as respectivas suplementações de cada ensaio.

	Suplementação	$X_{v_{máx}}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	$\mu_{máx}$ (dia ⁻¹)	Viabilidade no $X_{v_{máx}}$ (%)	% de células infectadas	pol/mL ($\times 10^7$)
Wave04	Cya, Gln e Glc	3,00	0,52	92,30	71,00	23,00
SFC06 (Controle não infectado Wave04)	Cya, Gln e Glc	7,80	0,70	90,00	-	-
SFC06inf (Controle infectado Wave04)	Cya, Gln e Glc	3,40	0,47	76,50	47,00	6,00
Wave05	Cya e Glc	7,00	0,60	87,80	88,00	43,00
Wave06	Cya e Glc	7,00	0,54	87,20	90,00	44,00
Wave07	Cya e Glc	7,00	0,47	86,30	89,00	46,00
Wave08	Cya e Glc	7,00	0,49	81,60	93,00	39,00
Média W05+W06+W07+W08	Cya e Glc	$7,00 \pm 0,00$	$0,53 \pm 0,06$	$85,75 \pm 2,82$	$90,00 \pm 2,16$	$43,00 \pm 2,94$
SFC07 (Controle não infectado W05+W06+W07+W08)	Cya e Glc	8,80	0,67	87,90	-	-
SFC07inf (Controle infectado W05+W06+W07+W08)	Cya e Glc	7,40	0,65	75,50	48,00	9,60

O suplemento composto desta combinação não teve resultado esperado de aumento da concentração celular no ensaio Wave04, provavelmente devido a desvios metabólicos causados pela ação viral, efeito comum e evidente pela comparação com o controle em frasco *shaker* não infectado (Tabela 25). Contudo, a diminuição do cisalhamento teve um efeito drástico na produção de poliedros (23×10^7 pol/mL), causando um aumento de cinco vezes comparado com a média em STR aspergido ($4,6 \times 10^7$ pol/mL), levando a uma produção específica de mais de 100 pol/cel.

Dessa forma, parece que a adição da combinação ácido cisteico, glutamina e glicose não é benéfica e não aumenta $X_{v_{máx}}$, não sendo uma boa escolha para o processo, diferentemente do que se notou em escala de frascos *shaker*. Todavia, a diminuição das forças de cisalhamento afetou diretamente a produção viral quando comparada com os dados de STR aspergido, mesmo que a multiplicação celular não tenha sido otimizada.

Os biorreatores Wave 05, 06, 07 e 08 são replicatas e foram feitos com suplemento de 3,0 g/L de glicose e 200,0 mg/L de ácido cisteico. Os parâmetros médios foram: $X_{v_{máx}}$ de $7,0 \times 10^6 \pm 0,0$ cel/mL, $\mu_{máx}$ de $0,53 \pm 0,06$ dia⁻¹, viabilidade celular final de $44,6 \pm 7,0\%$ (Gráfico 41 e Tabela 25). A análise da infecção viral está reunida no Gráfico 42 e na Tabela 25, os parâmetros principais médio foram: produção de $43,0 \times 10^7 \pm 0,3$ pol/mL e $90,0 \pm 2,0\%$ de células totais infectadas, sendo assim, a produção específica foi em torno de 70 pol/cel.

Os Gráfico 41 e 42, bem como a Tabela 25 confirmam uma reprodutibilidade alta para as condições deste grupo de experimentos (suplementação de ácido cisteico e glicose em biorreator Wave com infecção viral de MOI 1,0). Os dados gerados pela quadriplicata mostram grande consistência e robustez do processo. A porcentagem de infecção foi a maior para este trabalho, sendo de 90% de células infectadas, resultando numa produção de poliedros de quase dez vezes maior quando comparado a média dos reatores “US” STR aspergido ($4,6 \times 10^7$ pol/mL para STR aspergido e $43,0 \times 10^7$ pol/mL para Wave). Isso indica grande sucesso no contato do vírus com a célula e a progressão da infecção na mesma. Com base nesses dados, pode-se buscar a introdução de novas variáveis visando o aperfeiçoamento da produção específica, como por exemplo, o aumento do MOI.

Assim, podemos concluir que a suplementação de glicose e ácido cisteico é muito eficiente para aprimorar a divisão celular, sendo que o componente principal dessa diferença deve ser a glicose, já que no ensaio anterior, com glutamina e ácido cisteico, não se nota essa melhoria. Essa é então a combinação de otimização do meio ExCell 420 que parece ser ideal. E, apesar de o aperfeiçoamento do processo de infecção viral não depender da adição nutricional, a combinação

da suplementação correta de substrato e a diminuição do estresse de cisalhamento tem um efeito sinérgico e relevante na produção de partículas virais.

Por fim, a adição de glutamina na combinação parece ter um efeito negativo em escala de biorreator, diminuindo consideravelmente a densidade celular máxima e causando rápida queda na viabilidade e, por consequência, prejudicando a infecção viral. Isso é particularmente verdade na presença do vírus, já que no controle em frasco *shaker* não infectado, a concentração celular não parece estar sendo afetada (Tabela 25). Isso pode ser em decorrência de deslocamentos metabólicos que acontecem durante a infecção viral, desta maneira, é provável que tenha relação com produção de amônio a partir de glutamina no metabolismo de nitrogênio, gerando condição tóxica à célula.

Gráfico 41: Análise do crescimento celular – Wave05, Wave06, Wave07 e Wave08

Comparação curva de crescimento celular de células viáveis (Xv) e sua respectiva viabilidade celular de quatro cultivos em meio ExCell 420 dos reatores (Wave 05, 06, 07 e 08). Os reatores foram suplementados com 3 g/L de Glicose e 200 mg/L de Ácido cisteico. As concentrações iniciais de células viáveis são as seguintes: 3,8; 3,6; 11,0 e 8,6x10⁵ cel/mL. O eixo x foi adequado para compensação de eventuais fases lag. A linha vertical mostra o momento médio nos quatro reatores da infecção com SfMNPV MOI 1,0 (3,1 dias).

Gráfico 42: Análise da infecção viral – Wave05, Wave06, Wave07 e Wave08

Comparação da produção de poliedros (pol/mL) e porcentagem de células infectadas em relação à média da curva de crescimento celular de quatro cultivos em meio ExCell 420 dos reatores (Wave 05, 06, 07 e 08). Os reatores foram suplementados com 3 g/L de Glicose e 200 mg/L de Ácido cisteico. A barra de erros mostra o desvio padrão da quadruplicata para células viáveis. A linha vertical é uma média dos quatro reatores e mostra o momento médio da infecção com SfMNPV MOI 1,0 (3,1 dias).

A Imagem 10 apresenta micrografias da progressão média da infecção viral deste conjunto de dados comparado com as infecções realizadas em STR aspergido para 3, 5 e 7 dpi. Nota-se claramente que a produção, assim como o acúmulo de poliedros por célula é substancialmente maior em biorreatores Wave. Observa-se ainda intensa lise celular com liberação de poliedros ao 7 dpi no sistema Wave. Este conjunto de dados corrobora não apenas a suposição de que o estresse de cisalhamento - causado pelo borbulhamento da aspersão - afetaria a etapa de crescimento celular, como também, a de infecção viral, promovendo otimização significativa do $X_{v\text{máx}}$ e aumento considerável de produção de baculovírus de quase dez vezes sem, necessariamente, ser intermediado pela suplementação de nutrientes.

Imagem 10: Imagem representativa da progressão da infecção por SfMNPV-NicB em 3, 5 e 7 dpi para biorreator STR aspergido (US10) versus Wave (Wave07) em meio de cultivo ExCell 420

	BioFlo 110 – STR aspergido	Biorreator Wave
3dpi
5dpi
7dpi

6.5. Comparações para etapa de infecção viral

Um dos fatores chave do processo de infecção viral é o valor de MOI, para otimização do processo deve-se achar um equilíbrio para que não ocorra a geração de mutantes FP ou o favorecimento de partículas DIP, mas que tenha presente partículas virais o suficiente para causar uma boa infecção (Krell, 1996; Zhang *et al.*, 2005). Ao mudar MOI de 0,1 para 1,0 no biorreator STR aspergido houve uma diferença expressiva na produção de poliedros. O MOI de 1,0 utilizado no conjunto CSR12 e R12, apesar de infectar uma porcentagem de células similar ao CSR11 e R10 (MOI 0,1), teve como consequência uma concentração de poliedros muito mais elevada, resultando em uma produtividade específica maior e mais adequada ao objetivo do bioprocessamento (Tabela 26). Ademais, a definição da concentração de DNA viral por amostra por RT-qPCR está de acordo com o que foi previamente discutido e se mostrou um bom método para quantificação da produção (Tabela 27).

Tabela 26: Relação dos parâmetros cinéticos para CSR10, R10, CSR12 e R12

Concentração celular máxima atingida, velocidade específica de crescimento máximo, viabilidade celular, porcentagem de células infectadas em relação ao total de células, concentração de poliedros e produtividade específica de poliedro por célula para biorreator STR aspergido com MOI de 0,1 (R10) versus MOI de 1,0 (R12) e seus respectivos controles em shaker (CSR10 e CSR12).

	MOI 0,1		MOI 1,0	
	CSR10 + SfMNPV	R10 + SfMNPV	CSR12 + SfMNPV	R12 + SfMNPV
$X_{v_{\max}}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	6,90	6,20	5,20	6,20
$\mu_{\max}$ (dia ⁻¹)	0,47	0,59	0,65	0,73
Viabilidade no $X_{v_{\max}}$ (%)	92,00	87,40	91,60	82,50
% de células infectadas	30,00	30,00	28,00	32,00
pol/mL ($\times 10^7$)	0,16	6,50	25,00	90,00
pol/cel	0,68	30,40	182,00	339,10

Tabela 27: Relação dos parâmetros cinéticos com foco na comparação da análise viral para R10, R11, R12 (em 7 e 14 dpi) e CSR12

Parâmetros individuais dos reatores R10, R11 e R12 e CSR12 com estratégia de transferência de oxigênio, tempo de coleta (dpi), MOI, $X_{v_{\max}}$, porcentagem de células infectadas, concentração de poliedros (pol/mL), produtividade específica (pol/cel) e com foco na concentração de DNA viral das amostras em 7 ou 14 dpi, dependendo do ensaio.

Amostra	Modo transferência O ₂	TOF	MOI	$X_{v_{\max}}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	%cél infectadas	pol/mL ($\times 10^7$)	pol/cel	DNA viral ng/L
R10	STR aspergido	7dpi	0,10	6,20	30,00	6,50	30,40	2,03
R11	STR bubble free	7dpi	0,10	10,00	20,00	8,50	41,30	1,94
R12	STR aspergido	7dpi	1,00	6,20	31,60	90,00	339,10	8,72
R12	STR aspergido	14dpi	1,00					27,80
CSR12	shaker	14dpi	1,00	5,20	22,60	25,00	182,00	0,02

Tabela 28: Relação dos parâmetros cinéticos para controle e infecção das diferentes estratégias de transferência de oxigênio

Parâmetros do controle: concentração celular máxima atingida, velocidade específica de crescimento máximo, viabilidade celular no momento do cultivo de 7 dias. Parâmetros de infecção viral: porcentagem de células infectadas em relação ao total de células, concentração de poliedros e produtividade específica de poliedro por célula para os modos GEnBio STR aspergido - R10 e R12, USDA STR aspergido – US06, US07, US008, US09 e US10, GEnBio bubble free – R11, USDA Wave – Wave04, Wave05, Wave06, Wave07 e Wave08, assim como respectivo MOI e meio de cultura de cada ensaio.

	Ensaio	MOI	Meio de cultura	PARÂMETROS CONTROLE				
				Xv _{máx} (x10 ⁶ cel/mL)	μ _{máx} (dia ⁻¹)	Viabilidade com 7 dias (%)		
Genbio - STR aspergido	R10 e R12	0,1 -1,0	Sf-900 III	6,70 ± 0,82	0,57 ± 0,07	87,70 ± 2,80		
USDA - STR aspergido	US06-10	1,0	ExCell 420	4,70 ± 0,23	0,49 ± 0,03	88,90 ± 6,60		
Genbio - bubble free	R11	0,1	Sf-900 III	10,00	0,30	83,70		
USDA - Wave	W04-08	1,0	ExCell 420	6,75 ± 0,35	0,44 ± 0,03	84,70 ± 7,90		
	Ensaio	MOI	Meio de cultura	PARÂMETROS INFECÇÃO				
				Células infectadas (%)	Número de poliedros (x10 ⁷ pol/mL)		Produtividade específica (pol/cel)	
					MOI 0,1	MOI 1,0	MOI 0,1	MOI 1,0
Genbio - STR aspergido	R10 e R12	0,1 -1,0	Sf-900 III	30,80 ± 1,10	6,50	90,00	30,00	339,00
USDA - STR aspergido	US06-10	1,0	ExCell 420	54,70	-	4,60	-	13,00
Genbio - bubble free	R11	0,1	Sf-900 III	20,00	8,50	-	41,00	-
USDA - Wave	W04-08	1,0	ExCell 420	92,50	-	43,00	-	61,00

A comparação final da infecção viral está na Tabela 28 e considera os diferentes tipos de meios de cultura utilizados neste estudo e suas otimizações/suplementações (Sf-900 III e ExCell 420) e os diferentes métodos de transferência de oxigênio aplicados (STR aspergido, STR *bubble free* e biorreator Wave). O método de transferência de oxigênio *bubble free* em meio de cultura Sf-900 III suplementado com glutamina, considerando o crescimento celular apenas, tem vantagem notória frente aos outros. Entretanto, esse benefício não parece se repetir quando analisado os parâmetros de produção de poliedros. Dessa forma, essa estratégia ainda requer estudos para sua otimização, incluindo a comparação dos distintos biorreatores com utilização de diferentes multiplicidades de infecção (MOIs).

Apesar da desvantagem nutricional previamente discutida no uso do meio ExCell 420, o valor de densidade celular máxima entre o USDA-Wave e o GEnBio-STR aspergido não difere significativamente, provavelmente devido a diminuição do estresse de cisalhamento do primeiro e a otimização nutricional do segundo. Contudo, a produtividade específica do aspergido ainda é mais alta, sendo assim, é a estratégia que teria mais aplicabilidade.

Baseado na literatura, encontram-se divergências quanto ao melhor MOI a ser utilizado. Em resumo, é relatado com abrangência que as multiplicidades de infecção baixas têm maior potencial de efetividade para casos de produção de proteína recombinante pelo sistema IC-BEVS (Liebman *et al.*, 1999). Em contrapartida, há autores também que argumentam que o uso de MOI acima de uma unidade é imprescindível para a produção do baculovírus e que baixos MOIs devem ser usados apenas em situações que o inóculo viral apresenta volume insuficiente ou que o produto apresenta alta instabilidade. Multiplicidades altas são mais previsíveis, reproduzíveis e mais ajustáveis por meio de TOI (Radford *et al.*, 1997).

Dessa forma, fica claro que o valor de MOI deve ser estabelecido dependendo do propósito, das características do produto (como suscetibilidade de clivagem, secreção ou não do produto e estabilidade), do poder de infecção do vírus e do processo em si. É provável que para produção de vírus selvagem, seja mais eficiente à infecção concomitante de um grande número de células em modo de infecção secundária, sendo assim, um MOI mais alto pode ser benéfico nessa

situação. Vale ressaltar também, que o monitoramento da formação de partículas DIPs, de mutantes FP e mutações virais é importante, como consequência do uso de MOIs altos (Krell, 1996; Zhang *et al.*, 2005).

Neste caso, o MOI de 1,0 apresentou clara vantagem frente ao MOI 0,1, tendo efeito exacerbado na produtividade específica e não na porcentagem de células infectadas ao passo que mantém a viabilidade do processo ao considerar volume inicial de inóculo viral. Ainda assim, um fator a se considerar é a virulência e a susceptibilidade celular. Apesar da linhagem celular SF21 e o clone Sf-9 serem suscetíveis ao vírus SfMNPV, é possível que algumas amostras sejam mais dependentes da condição que se encontram devido a fatores tais como diversidade populacional, qualidade nutricional, conservação etc. (Sihler *et al.*, 2018). Uma alternativa para melhor compreender o fenômeno é o uso de diferentes MOIs, um isolado viral mais virulento ou a seleção de um clone de Sf-9 altamente passível de infecção e com grande produtividade viral.

A dificuldade em comparar os experimentos com cultivos celulares realizados na USP com os do USDA já foi bastante discutida, especialmente quando direcionada a diferenças nutricionais no meio de cultivo e estratégias de diminuição do cisalhamento celular. No entanto, é válido ressaltar que, neste contexto, a remoção do estresse causado pelo estouro das bolhas parece afetar significativamente o crescimento celular, enquanto que a abordagem com biorreator de gangorra Wave parece ter grande impacto na produção viral ao anular o cisalhamento causado pelo movimento do impelidor.

Por fim, há relatos na literatura de o efeito de densidade afetar diretamente a produção viral, por meio de perda na eficiência metabólica dependente da densidade celular do cultivo e, consequentemente, afeta grandemente a etapa de infecção e produção viral (Jardin *et al.*, 2007). A baixa produtividade viral quando em alta densidade celular foi observada em conjunto com depleção de nutrientes (Bédard *et al.*, 1994; Bhatia *et al.*, 1997) e em cultivos em biorreatores controlados (Bernal *et al.*, 2009).

Esse fenômeno pode ser explicado pelo acúmulo extracelular de fatores presentes no meio condicionado, que inibem a atividade metabólica geral. Assim, dificulta a utilização de nutrientes e fica mais notável quando em alta densidade celular, tornando a suplementação nutricional menos eficaz. Esse mecanismo pode ser uma estratégia de proteção para evitar exaustão do meio de cultivo quando em condição de estresse (Doverskog *et al.*, 1997, 2000; Bernal *et al.*, 2009).

6.6. Considerações finais

O resumo de todos os parâmetros relevantes para os ensaios conduzidos no USDA e no GEnBio estão descritos nos Apêndices 13 e 14, respectivamente. Há também um resumo das concentrações de metabólitos em pontos chave do cultivo, bem como de todos os valores de fatores de conversão substrato à célula e a produto para os ensaios realizados no GEnBio nos Apêndices 15 e 16.

Durante a etapa de crescimento celular, mais especificamente na fase log, o perfil de consumo de substrato parece ser independente do estresse de cisalhamento, já que apresenta um perfil com tendências bem similares nos reatores com diferentes estratégias de dissolução de gás. Já na etapa de infecção viral, os fatores de conversão e a divisão celular mudam significativamente entre os biorreatores, acontecimento que tem relação direta com o perfil de crescimento dos modos STR aspergido e *bubble free* (Apêndices 15 e 16).

De modo geral, para os reatores com célula Sf-9 e meio Sf-900 III na fase de crescimento celular (sem infecção viral), tanto os fatores de conversão quanto o consumo específico de glicose e glutamina suportam dados da literatura; sendo, respectivamente de $Y_{X/Glc}$ $3,0 \pm 0,8 \times 10^9$ cel/g e $Y_{X/Gln}$ $7,0 \pm 2,0 \times 10^9$ cel/g; e μ_{Glc} de 52 ± 21 nmol/ 10^6 cel.h e μ_{Gln} de $26,0 \pm 8,0$ nmol/ 10^6 cel.h. Ademais, os valores de consumo e produção para glutamato e lactato também estão dentro da faixa de abrangência reportada. Os parâmetros para a fase de infecção viral estão dentro da normalidade ao comparar com diversos outros estudos. O único valor discrepante é a taxa de produção de amônio, que, para a fase exponencial de crescimento, tem valor bastante alto, fenômeno relatado na discussão dos resultados (Mendonça *et al.*, 1999; Benslimane *et al.*, 2005; Bernal *et al.*, 2009; Carinhas *et al.*, 2010; Drugmand *et al.*, 2012; Beas-Catena *et al.*, 2013; Monteiro *et al.*, 2016) (Tabela 29 e 30).

Contudo, vale ressaltar que a literatura disponível não corresponde fielmente ao contexto deste trabalho. Para efeito de comparação procurou-se identificar estudos que utilizaram a linhagem Sf-9, no entanto, o vírus, o meio de cultivo e as condições de processo, especialmente MOI, não são idênticos. Existem poucos trabalhos que fazem análises metabólicas utilizando baculovírus selvagem em cultivos celulares em biorreator. A espécie do vírus empregada neste trabalho (SfMNPV) também não tem grande número de relatos na literatura. A espécie mais estudada é o vírus *Autographa californica* MNPV, especialmente por seu uso como recombinante e vetor de expressão, ainda assim os dados foram utilizados para efeito de comparação metabólica (Tabela 29). Assim, as comparações são apenas utilizadas como referências e nota-se que ao analisar como um todo, estas também apresentam discrepâncias, justificável pela grande variação dos parâmetros citados (Tabela 29).

Tabela 29: Comparação de parâmetros cinéticos de crescimento celular e infecção viral deste estudo com estudos da literatura

Parâmetros cinéticos X_{vmax} e μ_{max} e taxas de consumo e produção dos principais nutrientes (glicose, lactato, glutamina, glutamato e amônia). Valores de μ_s e μ_p em $nmol/10^6 cel.h$. Valores listados como “este trabalho” são uma média de 10 ensaios em biorreatores em diferentes condições*. Valores encontrados na literatura são uma média de estudos em biorreatores de 12 artigos diferentes**

		Média de 12 estudos da literatura		Este trabalho: média de 10 reatores		
		Crescimento celular	Infecção viral	Crescimento celular	Infecção viral	
	Etapas					
	Vírus	-	AcMNPV recombinantes (até 3 dpi)	-	SfMNPV (até 7 dpi)	
	Fase	Fase exponencial	MOI 0,1 - 30	Fase exponencial	MOI 0,1	MOI 1,0
	Meio de cultura	Sf-900 II	Sf-900 II	Sf-900 III		
	$X_v \text{ max (x}10^6 \text{ cel/mL)}$	7,7 - 11,0	-	5,7 - 10,0	-	
	$\mu \text{ (dia}^{-1}\text{)}$	0,60 - 0,65	-	0,6 $\pm$ 0,1	-	
μ_s e μ_p $nmol/10^6 \text{ cel.h}$	Glicose	51,0 - 94,4	18,0 - 126,0	52,4 $\pm$ 20,9	25,8 $\pm$ 19,1	115,5
	Lactato	1,6 - 14,1	0,3 - 20,9	3,3 $\pm$ 2,8	0,9 $\pm$ 0,7	1,7
	Glutamato	3,6 - 17,0	0,0 - 68,0	4,8 $\pm$ 0,9	2,7 $\pm$ 0,4	1,5
	Glutamina	5,4 - 43,9	1,5 - 35,5	26,0 $\pm$ 8,0	9,8 $\pm$ 5,9	12,3
	Amônia	0,9 - 18,0	0,1 - 54,3	55,1	0,91 $\pm$ 0,74	13,4

* Média de R01, R04, R05, R06, R08, R09, R10, R11, R12, R13.

**Benslimane et al. (2005); Bernal et al. (2009); Carinhas et al. (2010); Monteiro et al. (2016); Bédard et al. (1993); Kamen et al. (1996); Palomares e Ramirez (1996); Rhie et al. (1997); Donaldson e Shuler (1998a); Donaldson e Shuler (1998b); Mendonça et al. (1999); Drugmand (2007).

Tabela 30: Comparação dos fatores de conversão substrato à célula para glicose e glutamina de diferentes trabalhos gerados pelo grupo de pesquisa GENBio para diferentes linhagens celulares rS2: linhagem de *Drosophila melanogaster* recombinante. Os valores listados como “este estudo” são uma média de seis reatores para fase de crescimento celular e três reatores para fase de infecção viral.

	Del Padre, 2016	Fabri, 2017	Oliveira, 2019	Este estudo	
	Crescimento celular	Crescimento celular	Crescimento celular	Crescimento celular	Infecção viral
Linhagem celular	Sf-21	Sf-9	rS2	Sf-9	Sf-9
$Y_{X/Glc} \text{ (x}10^9 \text{ cel/g)}$	1,0	3,1 $\pm$ 0,4	3,75	3,0 $\pm$ 0,8	1,3 $\pm$ 1,3
$Y_{X/Gln} \text{ (x}10^9 \text{ cel/g)}$	3,0	-	4,8	6,7 $\pm$ 2,1	4,6 $\pm$ 2,5

Tabela 31: Comparação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (kLa) para as escalas de shaker, STR aspergido, STR bubble free e biorreator Wave para cultivos de 1,0 litro. Os dados em shaker e Wave provêm do manual de uso do reator Wave (GE Healthcare.)

1L	Shaker	STR aspergido	STR bubble free	Wave
hora⁻¹	0,9	3,8	1,7	3,0
dia⁻¹	21,6	91,0	40,3	72,0

Em relação ao consumo de substratos na etapa de infecção viral, é mais comumente relatado que o consumo de glicose diminui devido ao fato da divisão celular não compensar a taxa acentuada de morte celular, já que os principais eventos de multiplicação viral estão sendo processados (Elias *et al.*, 2000; Roldão *et al.*, 2008; Carinhas *et al.*, 2009; Bernal *et al.*, 2010). No entanto, de maneira não usual, é também descrito que a habilidade de incorporar nutrientes para sustentar o processo de divisão viral se mantém sem redução no consumo e no metabolismo geral, ou seja, ocorre uma adaptação metabólica específica, assim o consumo específico de glicose aumenta (Hensler e Agathos, 1994; Gioria *et al.*, 2006).

A intensificação do metabolismo pós-infecção também é suportada por Monteiro e colaboradores (2016) que realizou estudo de fluxoma metabólica e demonstrou que o metabolismo em célula Sf-9 fica ainda mais eficiente via TCA após e durante o processo de infecção viral (Figura 6). Esses relatos contraditórios são provavelmente devido a demandas nutricionais diferentes dependendo da linhagem celular e espécie viral, bem como da condição de cultivo pós-infecção (Gioria *et al.*, 2006; Beas-Catena *et al.*, 2013).

Neste estudo, nota-se um aumento da eficiência de uso de glicose para biossíntese e produção de energia pós-infecção comparado com a etapa de crescimento celular de uma maneira geral (Tabela 29 e 30), reforçando mais uma vez a importância metabólica e preferência por este substrato. Argumenta-se que a forma como o vírus manipula a célula para utilizá-la na montagem de partículas pode induzir maior consumo de nutrientes com fonte de carbono (neste caso, glicose principalmente e glutamina em menor escala) para manter a viabilidade celular tornando possível a utilização destas células durante a replicação viral.

Em favor a esta hipótese, foi observado desvio cinético após a adição viral diferente do esperado, de forma que o deslocamento não é tão proeminente quanto previamente estipulado. Isso tem relação forte com o aumento do consumo de substrato durante a infecção viral. Assim, aparentemente e até um certo grau, tem como consequência um menor deslocamento da fase log, ao comparar com cultivos não infectados, para conservar a integridade celular.

Nas estratégias de produção viral em biorreator STR (R10 e R12) este aumento é muito exacerbado, enquanto na estratégia *bubble free* (R11) encontra-se valores padrão, similares ao reportado na literatura (Radford *et al.*, 1997; Rodas *et al.*, 2005). Isso ocorre talvez pela baixa porcentagem de células infectadas no modo *bubble free*, devido à alta densidade celular e em virtude do baixo MOI utilizado (0,1), requerendo menos eficiência metabólica ou ainda devido ao baixo coeficiente de transferência de oxigênio que essa estratégia apresenta (Tabela 31). Sendo assim, há indícios que o estresse de cisalhamento pode causar uma mudança de perfil de consumo de substratos pós-infecção viral, provavelmente por conta da condição de estresse que a célula se encontra. De qualquer maneira, serão necessários mais estudos para esclarecer os mecanismos deste fenômeno.

7. Conclusões

7.1. Conclusões obtidas com base nos resultados gerados na Escola Politécnica da USP – Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GEnBio)

- A suplementação com cisteína não pareceu vantajosa para otimização do crescimento celular da célula Sf-9 em meio Sf-900 III, assim como a suplementação com ácido cisteico;
- O meio de cultivo ExCell 420 não apresentou impacto positivo no cultivo celular de Sf-9, sendo assim, Sf-900 III segue sendo a melhor escolha para meio de cultivo celular neste contexto;
- As análises metabólicas indicaram diversas evidências de limitação de crescimento celular por glutamina;
- A suplementação com glutamina aumentou o consumo do substrato, indicando que havia necessidade metabólica deste. No entanto, os efeitos da adição não ficaram claros e podem talvez agir apenas em sinergismo quando outros estresses celulares também forem diminuídos;
- A abordagem *bubble free* aliada à suplementação com glutamina, aumentou a concentração celular máxima, supõem-se que este efeito foi observado devido à diminuição do cisalhamento celular. Ademais, aparenta diminuir a velocidade específica de crescimento máxima de forma a caracterizá-la como fase linear de crescimento;
- A concentração celular máxima atingida em modo STR *bubble free* foi de 10×10^6 cel/mL e o cultivo teve concentrações finais de glicose e glutamina baixas, sendo assim, se o intuito for potencializar a densidade celular para valores acima desse número, seria necessária uma revisão dos componentes do meio de cultivo, com suplementação não só de glutamina, como também glicose;
- Apesar dos benefícios da estratégia STR *bubble free* na etapa de crescimento celular, aparentemente isso não se repete na produtividade viral, com baixa porcentagem de células infectadas;
- Aparentemente, através das análises por PCR convencional e sequenciamento genético, não há alteração genética viral durante a progressão da infecção que impacte significativamente o processo;
- Os testes de infecção em escala menor ajudaram a compreender melhor a complexidade do sistema célula-vírus e da interação entre eles, fenômenos que deveriam ser mais estudados para aplicação em larga escala;
- A infecção com um MOI de 1,0 para biorreator STR aspergido apresenta um desempenho consideravelmente melhor na produção e rendimento específico de poliedros do que o MOI de 0,1; bem como da concentração total, que teve no ensaio R12 (MOI 1,0) o valor máximo de 9×10^{11} pol/L;
- O acompanhamento por mais tempo do processo de infecção determinou melhor o perfil de produção de poliedros, esclarecendo a saturação da produção e assim, ajudando a determinar um TOH mais adequado, que deve ser entre 7 e 11 dpi;
- A produção e acúmulo de lactato só aparenta ocorrer em situações de consumo de glicose intenso, confirmando mais uma vez a eficiência metabólica de Sf-9 para desintoxicação de subprodutos potencialmente tóxicos;
- Houve, contudo, uma produção e acúmulo tóxico de amônio, sinalizado também pela formação de glutamato, mostrando assim uma falha no sistema enzimático GS/GDH/GOGAT para reciclagem de subprodutos do nitrogênio. Porém, esse evento foi observado na maioria dos ensaios em biorreator e não aparenta ter prejuízo restritivo;
- Foram utilizados com sucesso as estratégias de monitoramento do diâmetro celular, análise molecular-genética e quantificação do DNA viral (PCR em Tempo Real) para acompanhamento da

progressão viral, reafirmando a necessidade de se utilizar métodos mais precisos para compreensão do processo de infecção como um todo;

- O processo tem viabilidade científica e comercial, visto que a aplicação do bioinseticida tem o potencial de proteger a cultura de milho, bem como outros plantios susceptíveis a lagarta *S. frugiperda*; chegou-se a essa conclusão considerando uma planta produtiva de apenas um biorreator de 300L com operação em torno de 20 vezes ao ano e uma produção próxima a 10^{12} poliedros por litro como descrito no ensaio R12. Nesse contexto, a demanda atendida seria em torno de 60 mil hectares ao ano com faturamento próximo de 2,5 milhões de reais ao analisar o mercado atual com venda de cerca de 40 reais por hectare. Vale ressaltar que isso somente pode levado em consideração caso a virulência dos poliedros produzidos em cultura de células (*in vitro*) seja similar ao dos poliedros produzidos no inseto (*in vivo*).

7.2. Conclusões obtidas com base nos resultados gerados na USDA – Forest Service Northern Research Station

- A otimização do meio ExCell 420 foi bem-sucedida, tendo um impacto positivo na densidade celular máxima. A melhor resposta foi com a adição combinada de glicose e ácido cisteico, sendo que glicose parece ser indispensável. Isso leva a crer que a limitação por substrato vem de uma demanda metabólica não atendida por substrato a base de carbono;
- Os ensaios em cultivo de suplementação em biorreator STR aspergido não tiveram o seguimento esperado pelos experimentos em escala de frascos *shaker*. Entretanto, a adição dos mesmos nutrientes em estudos em Wave tiveram resultados similares ao de escala em frasco *shaker*. Assim, há evidências de que o estresse de cisalhamento presente no modo STR aspergido, e não no modo Wave, afeta o crescimento celular a ponto de inibir a multiplicação celular mesmo com condições nutricionais otimizadas;
- Assim, a concentração celular nos ensaios em biorreator Wave com ExCell 420 suplementado foram consideravelmente mais altas. Por consequência, a concentração de poliedros teve valores quase dez vezes maiores quando comparado com o modo STR aspergido;
- Dessa forma, considerando este conjunto de dados, a abordagem com maior produção viral foi no biorreator Wave com meio suplementado de ácido cisteico e glicose, com valor de $4,6 \times 10^{11}$ pol/L. É notável aqui a robustez e reprodutibilidade desta série de experimentos, fato até então não observado neste processo;
- A diminuição das forças de cisalhamentos afeta principalmente a produção viral, mas também a divisão celular. Pois mesmo em condições não ótimas de nutrição e, consequentemente, crescimento celular, a produção de poliedros em Wave ainda mostrou clara vantagem frente à abordagem STR aspergido. Sendo assim, a melhora no desempenho da infecção viral não, necessariamente, depende da otimização da densidade celular máxima mediada pela suplementação de substrato, mas age em sinergismo com a diminuição do cisalhamento. De qualquer modo, ambas as etapas têm forte relação com estresse de cisalhamento quando analisados em biorreator Wave e comparadas com modo STR aspergido;
- A aplicação deste estudo para maiores escalas (5 e 10 litros) foi realizado com sucesso sem perda de produtividade, indicando validade para um processo industrial; da mesma forma que os resultados obtidos na Escola Politécnica da USP, descritos anteriormente, o processo aqui relatado apresenta viabilidade comercial, tendo em vista que a aplicação do bioinseticida tem o potencial de proteger cultivos susceptíveis a lagarta *S. frugiperda*, caso não haja perda de produtividade, redução da virulência ou problemas de *scale-up*.

8. Perspectivas

- Realizar adsorção viral induzida, ou seja, parar a agitação do motor do biorreator no momento da adição do inóculo viral para que ocorra uma mimetização da condição estática e assim, aconteça uma infecção induzida pela facilitação da adsorção viral na célula. Essa estratégia potencialmente aumentaria porcentagem de células infectadas;
- Avaliar se o possível efeito negativo de protetores como Kolliphor™ P-188 na adsorção do vírus supera o efeito positivo no estresse de cisalhamento celular;
- Testar o uso de soro fetal bovino (SFB) para melhorar a condição celular, especialmente no momento da infecção. Além disso, é possível que o soro atue como protetor e tenha papel na diminuição da tensão de cisalhamento;
- Estudar tipo de morte celular causada pelo desvio metabólico do crescimento celular para produção viral por meio de citometria de fluxo (FACS) para melhor entender o período no ciclo celular em que ocorre a parada para *shift* metabólico e analisar como isso afeta o restante da população celular;
- Estudar melhor o aumento do MOI para 1,0, especialmente no modo de aspersão *bubble free*;
- Estudar a possibilidade de formulação do meio de cultivo, pois esta não só traz a possibilidade de suplementação nutricional e melhor adequação nutricional, como também de barateamento do processo;
- Para evitar formação de biofilme em situação de baixo cisalhamento e alta densidade celular, testar recobrir o vidro interno da dorna com silicone para que a superfície não funcione como ponto de adesão e assim, formação de biofilme.

9. Referências Bibliográficas

- ABCBio - Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico, 2016. Disponível em: <https://www.abcbio.org.br/informativos/legislacao/> e <https://www.abcbio.org.br/informativos/publicacoes/> e <https://www.abcbio.org.br/biodefensivos-registrados/>, acessado em 28 de outubro de 2019.
- Abrahams, P., Bateman, M., Beale, T., Clotey, V., Cock, M., Colmenarez, Y., Corniani, N., Day, R., Early, R., Godwin, J., Gomez, J., Gonzalez Moreno, P., Murphy, S. T., Oppong-Mensah, B., Phiri, N., Pratt, C., Silvestri, S., Witt, A., 2017. Fall Armyworm: Impacts and Implications for Africa, Evidence Note:(2), September 2017 CABI, Wallingford, UK
- Agathos, S.N. Insect cell bioreactors. *Cytotechnology* 20: 173-189, 1996.
- Agathos, S. N. Insect Cell Culture. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, p. 212–223, 2010.
- Almeida, A.F., Macedo, G.R., Chan, L.C.L., Pedrini, M.R.S., 2010. Kinetic analysis of in vitro production of wild-type *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53, 285–291.
- Arif, B., Pavlik, L. Insect cell culture: virus replication and applications in biotechnology. *Journal of invertebrate pathology*, v. 112 Suppl, p. S138–41, mar. 2013.
- Au, S., Wu, W., Panté, N. Baculovirus Nuclear Import: Open, Nuclear Pore Complex (NPC) Sesame. *Viruses*. 2013 Jul; 5(7): 1885–1900.
- Bailey, K.L., Boyetchko, S.M., Längle, T. Social and economic drivers shaping the future of biological control: A Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. *Biological Control*, v. 52, n. 3, p. 221–229, 2010.
- Beas-Catena, A., Sanchez-Miron, A., Garcia-Camacho, F., Molina-Grima, E. Adaptation of the Se301 insect cell line to suspension culture. Effect of turbulence on growth and on production of nucleopolyhedrovirus (SeMNPV). *Cytotechnology* (2011) 63:543–552 DOI 10.1007/s10616-011-9387-0.
- Bédard, C., Kamen, A., Tom, R., Massie, B. 1994. Maximization of recombinant protein yield in the insectcell/baculovirus system by one-time addition of nutrients to high density batch cultures. *Cytotechnology* 15,129–138.
- Bédard, C., Perret, S., Kamen, A.A., 1997. Fed-batch culture of Sf-9 cells supports 3×10^7 cells per ml and improves baculovirus-expressed recombinant protein yields. *Biotechnol. Lett.* 19, 629–632.
- Bédard C, Tom R, Kamen A. Growth, nutrient consumption, and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: insights into growth limitation and metabolism. *Biotechnol Prog* 1993;9:615–24.
- Benslimane, C., Elias, C.B., Hawari, H., Kamen, A. 2005. Insights into the central metabolism of *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) and *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5) insect cells by radiolabeling studies. *Biotechnol. Prog.* 21: 78-86.
- Beperet, I., Barrera, G., Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M., Gasmi, L., *et al.* (2013) The sf32 Unique Gene of *Spodoptera frugiperda* Multiple Nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) Is a

Non-Essential Gene That Could Be Involved in Nucleocapsid Organization in Occlusion-Derived Virions. PLoS ONE 8(10): e77683. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077683>

Bernal, V., Carinhas, N., Yokomizo, A.Y., Carrondo, M.J.T., Alves, P.M., 2009. Cell density effect in the baculovirus-insect cells system: a quantitative analysis of energetic metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 162–180.

Bernal, V., Monteiro, F., Carinhas, N., Ambrósio, R., Alves, P.M. 2010. An integrated analysis of enzyme activities, cofactor pools and metabolic fluxes in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* Sf-9 cells. *J. Biotechnol.* 150: 332-342.

Bernardi, D., Salmeron, E., Horikoshi, R.J., Bernardi, O., Dourado, P.M., Carvalho, R.A., Martinelli, S., Head, G.P., Omoto, C. 2015. Cross-Resistance Cry1 Proteins in Fall Armyworm May Affect the Durability of Current Pyramided Bt Maized Hybrids in Brazil. PLoS One: 10(10): e0140130.

Bettiol W (2011) Biopesticides use and research in Brazil. *Outlooks on Pest Management* p.280-283, DOI 10.1564/22dec10.

Bhatia, R., Jesionowski, G., Ferrance, J.P., Ataai, M.M., 1997. Insect cell physiology. *Cytotechnology* 24, 1–9.

Birch, A.N.E., Begg, G.S., Squire, G.R. How agro-ecological research helps to address food security issues under new IPM and pesticide reduction policies for global crop production systems. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 10, p. 3251–3261, 2011.

Bishop, D.H. 1994. Biopesticides. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 5, n. 3, p. 307–311.

Blissard, G.W., 1996, Baculovirus-insect cell interactions. *Cytotechnology*, 20: 73-93.

Braunagel, S.C., Russel, W.K., Rosas-Acosta, G., Russell, D.H., Summers, M.D. 2003. Determination of protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*;100;9797– 802.

Braunagel, S.C., Williamson, S.T., Saksena, S., Zhong, Z., Russell, W.K., Russell, D.H., Summers, M.D. Mutations within the *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus FP25K Gene Decrease the Accumulation of ODV-E66 and Alter Its Intranuclear Transport. *Journal of Virology* 73(10):8559-70 · 1999.

Brito, A.F., Braconi, C.T., Weidmann, M., Dilcher, M., Alves, J.M., Gruber, A., Zanotto, P.M. The Pangenome of the *Anticarsia gemmatilis* Multiple Nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). *Genome Biol Evol.* 2015 Nov 27;8(1):94-108. doi: 10.1093/gbe/evv231.

Buerger, P., Hauxwell, C., Murray, D., 2007. Nucleopolyhedrovirus introduction in Australia. *Virol. Sin.* 22, 173–179.

Burlet, L.M., Bernardi, O., Melo, A.A., Pes, M.P., Strahl, T.T., Guedes, J.V. 2017 - Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. – *Pest Manag. Sci.* 73(12):2569-2577

CABI – Centre for Agriculture and Bioscience International 2018 – *Spodoptera frugiperda* Datasheet. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/29810>, acessado em 01 de outubro de 2018.

Carinhas, N., Bernal, V., Yokomizo, A.Y., Carrondo, M.J.T., Oliveira, R., Alves, P.M. 2009. Baculovirus production for gene therapy: the role of cell density, multiplicity of infection and medium exchange. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 1041-1049.

Carinhas, N., Berval, V., Monteiro, F., Carrondo, M.J.T., Oliveira, R., Alves, P.M. Improving baculovirus production at high cell density through manipulation of energy metabolism. *Metabolic Engineering* 12 (2010) 39–52

Castro, M.E.B. DE *et al.* 1999. *Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 34, n. 10, p. 1733–1761.

Cecchini, S., Virag, T., Kotin, R.M., 2011. Reproducible high yields of recombinant adeno-associated virus produced using invertebrate cells in 0.02-to 200-liter cultures. *Hum. Gene Ther.* 22, 1021–1030.

Chan, L.C.L., Young, P.R., Bletchy, C., Reid, S. Production of the baculovirus-expressed dengue virus glycoprotein NS1 can be improved dramatically with optimised regimes for fed-batch cultures and the addition of the insect moulting hormone, 20-Hydroxyecdysone. *Journal of Virological Methods* 105 (2002) 87–98.

Chou, C.C. Identification of the pivotal role of glutamate in enhancing insect cell growth using factor analysis. *Cytotechnology*, v. 66, n. 5, p. 853–60, out. 2014.

CONAB V. 7 - SAFRA 2019/20 - N. 9 - Nono levantamento | Junho 2020. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/32042_910765cf5dc2d088c377e32cdef6fc72, acessado em 14 de junho de 2020

Cox, M.M.J., 2004. Commercial production in insect cells. One company's perspective. *BioProcess Int.* 2 (Suppl.), 34–38.

Cruz, H.J., Freitas, C.M., Alves, P.M., Moreira, J.L., Carrondo, M.J.T. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme Microb Technol* 2000; 27:43–52.

Cruz, I., Santana da Paixão, M.A., Lopes, S.R. Economic feasibility of bio-factory of *Trichogramma pretiosum*, for use against agricultural pest of the Lepidoptera Order. *Revista iPecege* 4(1):44-50, 2018. e-ISNN: 2359-5078 DOI: 10.22167/r.ipecege.2018.1.44

Cruz, P.E., Cunha, A., Peixoto, C.C., Clemente, J., Moreira, J.L., Carrondo, M.J. Optimization of the production of virus-like particles in insect cells. (1998) *Biotechnol Bioeng* 60:408-418.

Defesa vegetal, 2017. Disponível em: <http://www.defesavegetal.net/laphfr>, acessado em 4 de fevereiro de 2018.

Del Padre, G.A. Estudo da cinética de crescimento de células de inseto SF21 e infecção por baculovírus *Anticarsia gemmatilis* (AgMNPV) para a produção de bioinseticida. [dissertação de mestrado]. São Paulo, Brasil: Universidade de São Paulo, 2016.

Deng, F., Wang, H., Hu, Z., Wang, M., Gan, Y., Shen, S. Incorporation of GP64 into *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus enhances virus infectivity in vivo and in vitro. *J Gen Virol.* 2012 Dec;93(Pt 12):2705-11. doi: 10.1099/vir.0.046458-0. Epub 2012 Sep 5.

Deutschmann, S. M., Jäger, V. 1994. Optimization of the growth conditions of SF21 insect cells for high-density perfusion culture in stirred-tank bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 16, n. 6, p. 506–512.

Donaldson MS, Shuler ML. Effects of long-term passaging of BTI-Tn5B1-4 insect cells on growth and recombinant protein production. *Biotechnol Prog* 1998a; 14:543–7.

Donaldson MS, Shuler ML. Low-cost serum-free medium for the BTI-Tn5B1-4 insect cell line. *Biotechnol Prog* 1998b; 14:573–9.

Doverskog, M., Bertram, E., Ljunggren, J., Ohman, L., Sennerstam, R., Haggstrom, L., 2000. Cell cycle progression in serum-free cultures of Sf-9 insect cells: modulation by conditioned medium factors and implications for proliferation and productivity. *Biotechnol. Prog.* 16, 837–846.

Doverskog, M., Han, L., Haggstrom, L. Cystine/cysteine metabolism in cultured Sf-9 cells: influence of cell physiology on biosynthesis, amino acid uptake and growth. *Cytotechnology* 26: 91–102, 1998.

Doverskog, M., Ljunggren, J., Ohman, L., Haggstrom, L., 1997. Physiology of cultured animal cells. *J. Biotechnol.* 59, 103–115.

Drews, M. *et al.* Pathways of glutamine metabolism in *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) insect cells: evidence for the presence of the nitrogen assimilation system, and a metabolic switch by ¹H/¹⁵N NMR. *Journal of biotechnology*, v. 78, n. 1, p. 23–37, 28 fev. 2000.

Drugmand, J.C. Study of the metabolism and physiology of High-Five insect cells for the development of processes for the production of recombinant protein. [Ph.D. Thesis]. Louvain-la-Neuve, Belgium: Université Catholique de Louvain; 2007.

Drugmand, J.C., Schneider, Y.-J., Agathos, S. N. Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnology advances*, v. 30, n. 5, p. 1140–57, 2012.

Elias, C.B., Zeiser, A., Bédard, C., Kamen, A.A. 2000. Enhanced growth of Sf-9 cells to a maximum density of 5.2×10⁷ cells per ml and production of β-galactosidase at high cell density by fed batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* 68: 381–388.

Embrapa Soja - Controle Biológico Baculovirus Anticarsia. 2004. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/html/baculov.htm>, acessado em 06 de janeiro de 2018.

EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization (2014) PQR database on quarantine pests (available online). Disponível em: <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>, acessado em 01 de outubro de 2018.

EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization (2018) Global database (available online). Disponível em: <https://gd.eppo.int>, acessado em 01 de outubro de 2018.

FAO – Food and Agriculture Organization 2017 - FAO Advisory Note on Fall Armyworm (FAW) in Africa:7 pp. 5 June 2017.

FAO – Food and Agriculture Organization 2018 - Briefing Note on FAO Actions on Fall Armyworm in Africa 31 January 2018:6 pp

Ferrance, J.P., Goel, A., Ataai, M.M. Utilization of glucose and amino acids in insect cells cultures: quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development. *Biotechnol Bioeng* 1993; 42:697–707.

Ferreira, B.C. Análise da diversidade genética de genes responsáveis pela infecção por os(pif)e de fatores associados à virulência de *Anticarsia gemmatilis* multiple nucleopolyhedrovirus. 2013. xviii, 143 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) —Universidade de Brasília, 2013.

Fraser, M.J., Smith, G.E., Summers, M.D. Acquisition of Host Cell DNA Sequences by Baculoviruses: Relationship Between Host DNA Insertions and FP Mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* Nuclear Polyhedrosis Viruses. *J Virol.* 1983 Aug;47(2):287-300.

- Gioria, V.V., Jäger, V., Claus, J.D. 2006. Growth, metabolism and baculovirus production in suspension cultures of an *Anticarsia gemmatalis* cell line. *Cytotechnology* 52: 113-124.
- Giri, L., Feiss, M.G., Bonning, B.C., Murhammer, D.W., 2011. Production of baculovirus defective interfering particles during serial passage is delayed by removing transposon target sites in fp25k. *J. Gen. Virol.*
- Glare, T. *et al.* 2012. Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, v. 30, n. 5, p. 250–258.
- Granados, R.R., Li, G., Blissard, G.W. Insect cell culture and biotechnology. *Virologica Sinica*, v. 22, n. 2, p. 83–93, 2008.
- Harrap, K.A., Payne, C.C., Robertson, J.S., 1977. The properties of three baculoviruses from closely related hosts. *Virology* 79, 14–31.
- Hefferon, K.L., Oomens, A.G., Monsma, S.A., Finnerty, C.M. & Blissard, G.W. (1999). Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology* 258, 455–468.
- Hensler, W.T., Agathos, S.N. Evaluation of monitoring approaches and effects of culture conditions on recombinant protein production in baculovirus-infected insect cells. *Cytotechnology* 1994, Volume 15, Issue 1–3, pp 177–186.
- Hink, F. W. Established Insect Cell Line from the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni*. *Nature*, v. 226, p. 466–467, 1970.
- Huynh, H.T., Chan, L.C.L., Tran, T.T.B., Nielsen, L.K., Reid, S. Improving the Robustness of a Low-Cost Insect Cell Medium for Baculovirus Biopesticides Production, Via Hydrolysate Streamlining Using a Tube Bioreactor-Based Statistical Optimization Routine. March 12, 2012 in Wiley Online Library. DOI 10.1002/btpr.1529.
- Ibama – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Boletins anuais de produção, importação, exportação, e vendas de agrotóxicos no Brasil - Boletim 2017. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=594&Itemid=54, acessado em 28 de outubro de 2019.
- IITA – The International Institute of Tropical Agriculture - First report of outbreaks of the "Fall Armyworm" on the African continent. *IITA Bulletin*, 2016, No. 2330.
- Ijkel, W.F.J., Westenberg, M., Goldbach, R.W., Blissard, G.W., Vlak, J.M. & Zuidema, D. (2000). A novel baculovirus envelope fusion protein with a proprotein convertase cleavage site. *Virology* 275, 30–41.
- Ikonomou, L., Bastin, G., Schneider, Y.J., Agathos, S.N. 2001. Design of an efficient medium for insect cell growth and recombinant protein production. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 37: 549–559.
- Ikonomou, L., Schneider, Y.J., Agathos, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 62, n. 1, p. 1–20, jul. 2003.
- INPI – Instituto Nacional da Propriedade Intelectual. Disponível em: <https://gru.inpi.gov.br/pePI/jsp/patentes/PatenteSearchBasico.jsp>, acessado em 15 de junho de 2020.

IPPC – International Plant Protection Convention 2017 - First detection of Fall Army Worm (*Spodoptera frugiperda*). IPPC Official Pest Report. Disponível em: <https://www.ippc.int/>, acessado em 01 de outubro de 2018.

IPPC - International Plant Protection Convention 2018. Report on Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) IPPC Official Pest Report, No. GHA-01/4

Jakubowska, A. Ferré, J, Herrero, S. Enhancing the multiplication of nucleopolyhedrovirus in vitro by manipulation of the Ph. *Journal of Virological Methods* 161 (2009) 254–258.

Jardin, B.A. *et al.* High cell density fed batch and perfusion processes for stable non-viral expression of secreted alkaline phosphatase (SEAP) using insect cells: comparison to a batch Sf-9-BEV system. *Biotechnology and bioengineering*, v. 97, n. 2, p. 332–45, 2007.

Jarman-Smith, R.F., Armstrong, S.J., Mannix, C.J., Al-Rubeai, M. Chromosome Instability in *Spodoptera frugiperda* Sf-9 Cell Line. *Biotechnol. Prog.* 2002, 18, 623-628.

Jehle, J.A., Blissard, G.W., Bonning, B.C., Cory, J.S., Herniou, E.A., Rohrmann, G.F., Theilmann, D.A., Thiem, S.M., Vlak, J.M. *et al.* (2006). "On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision". *Arch Virol.* 151 (7): 1257–1266.

Kabaluk, J.T., Svircev, A.M., Goettel, M.S., Woo, S.G. (ED). The use and regulation of microbial pesticides in representative jurisdictions worldwide. IOBC Global, 99pp, 2010.

Keddie, A. & Volkman, L.E. 1985. Infectivity difference between the two phenotypes of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus: Importance of the 64K envelope glycoprotein. *J. Gen.Virol.* 66, 1195-1200

Kamen, A.A., Bédard, C., Tom, R., Perret, S., Jardin, B. On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures. *Biotechnol Bioeng* 1996;50:36–48.

King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. [S.l.] Elsevier Academic Press, 2011. 1272 p. (Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses)

Kingsley, D.H., Behbahani, A., Rashtian, A., Blissard, G. W. & Zimmerberg, J. (1999). A discrete stage of baculovirus GP64- mediated membrane fusion. *Mol Biol Cell* 10, 4191–4200.

Kloppinger, M., Fertig, G., Fraune, E., Miltenburger, H.G., 1990. Multistage production of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis-virus in insect cell-cultures. *Cytotechnology* 4, 271–278.

Kost, T.A, Condreay, J.P., Jarvis, D.L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology*, v. 23, n. 5, p. 567–575, 2005.

Leng, P. *et al.* Applications and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 86, p. 19864–19873, 30 dez. 2011.

Liang, C., Song, J. & Chen, X. (2005). The GP64 protein of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus rescues *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus transduction in mammalian cells. *J Gen Virol* 86, 1629–1635.

Liebman *et al.* When Less is More: Enhanced Baculovirus Production of Recombinant Proteins at Very Low Multiplicities of Infection. *Benchmarks: BioTechniques* 26:36-42 (January 1999)

- Liu, Y.K. *et al.* Using a fed-batch culture strategy to enhance rAAV production in the baculovirus/insect cell system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 110, n. 2, p. 187–193, 2010.
- Manning, J.S., Whitt, M.A. A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body. *Virology*, 1998 Mar; 163 (1): 33-42.
- MAPA - Valicente, F.H., Tuelher, E.S. Controle Biológico da Lagarta do Cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com Baculovírus. 2009 ISSN 0100-9915.
- Maranga, L., Cruz, P.E., Aunins, J.G., Carrondo, M.J.T. Production of Core and Virus-Like Particles with Baculovirus Infected Insect Cells. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, Vol. 74 Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2002.
- Maranga, L., Cunha, A., Clemente, J., Cruz, P., Carrondo, M.J.T. Scale-up of virus-like particles production: effects of sparging, agitation and bioreactor scale on cell growth, infection kinetics and productivity. *Journal of Biotechnology* 107 (2004) 55–64.
- Mazid, S., Kalita, J., Rajkhowa, R. 2011. A review on the use of biopesticides in insect pest management. *International Journal of Science and Advanced Technology*, v. 1, n. 7, p. 169–178.
- Meghrou, J., Aucoin, M.G., Jacob, D., Chahal, P.S., Areand, N., Kamen, A.A. Production of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors Using a Baculovirus/Insect Cell Suspension Culture System: From Shake Flasks to a 20-L Bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 2005, 21, 154-160.
- Mena, J.A. & Kamen, A.A. 2011. Insect cell technology is a versatile and robust vaccine manufacturing platform. *Expert review of vaccines*, 10, 1063-81.
- Mendonça, R.Z., Palomares, L.A., Ramirez, O.T. 1999. An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. *J. Biotechnol.* 72: 61-75.
- Michaels, J.D., Mallik, A.K., Papoutsakis, E.T. Sparging and agitation-induced injury of cultured animals' cells: Do cell-to-bubble interactions in the bulk liquid injure cells? *Biotech and Bioeng* 1996. Volume 51, Issue 4, Pages 399-409.
- Micheloud, G.A., Gioria, V.V., Eberhardt, I., Visnovsky, G., Claus, J.D. Production of the *Anticarsia gemmatilis* multiple nucleopolyhedrovirus in serum-free suspension cultures of the saUFL-AG-286 cell line in stirred reactor and airlift reactor. *Journal of Virological Methods* 178 (2011) 106–116.
- Micheloud, G.A., Gioria, V.V., Perez, G. & Claus, J.D. 2009. Production of occlusion bodies of *Anticarsia gemmatilis* multiple nucleopolyhedrovirus in serum-free suspension cultures of the saUFL-AG-286 cell line: Influence of infection conditions and statistical optimization. *Journal of Virological Methods*, 162, 258-266.
- Ministério da Agricultura, 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/agropecuaria-brasileira-em-numeros>, acessado em 30 de outubro de 2019.
- Monsma, S.A., Oomens, A.G.P., Blissard, G.W. The gp64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *Journal of Virology*, v.70, p.4607-4616, 1996.
- Monteiro, F., Bernal, V., Alves, P.M. The Role of Host Cell Physiology in the Productivity of the Baculovirus-Insect Cell System: Fluxome Analysis of *Trichoplusia ni* and *Spodoptera frugiperda* Cell Lines. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 114, No. 3, March 2016.

- Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 44, 257-289.
- Moscardi, F., Souza, M.L., Castro, M.E.B., Moscardi, M.L., Szewczyk, B., 2011. Baculovirus Pesticides – Present State and Future Perspectives, In *Microbes and Microbial Technology*, Ahmad, I., F. Ahmad & J. Pichtel (eds) Springer, New York, USA, p. 415-445.
- Moscardi, F., Souza, M. L. de. Baculovírus para o controle de pragas. *Biotecnologia Ciência E Desenvolvimento*, v. 24, p. 22–29, 2002.
- Murhammer, D.W., Goochee, C.F. Sparged animal cell bioreactors: mechanism of cell damage and Pluronic F-68 protection. *Biotechnol Prog.* 1990 Sep-Oct;6(5):391-7.
- Murphy, F.A.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Ghabrial, S.A.; Jarvis, A.W.; Martelli, G.P.; Mayo, M.A. & Summers, M.D. 1995. In: *Virus taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, Viena,
- Neermann, J., Wagner, R., 1996. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J. Cell Physiol.* 166, 152–169.
- Nguyen, B. *et al.* Fed-batch culture of insect cells: a method to increase the yield of recombinant human nerve growth factor (rhNGF) in the baculovirus expression system. *Journal of biotechnology*, v. 31, n. 2, p. 205–217, 1993.
- Nguyen, Q., Tran, T.T.B., Chan, L.C.L., Nielsen, L.K., Reid, S. In vitro production of baculoviruses: identifying host and virus genes associated with high productivity. 2016. *Appl Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s00253-016-7774-3.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K., Luckow, V.A. *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. New York: W. H. Freeman and Co. (1992). 347 pp.
- Ohman, L. *et al.* Glutamine is not an essential amino acid for Sf-9 insect cell. *Biotechnology letters*, v. 18, n. 7, p. 765–770, 1996.
- Ohman, L., Ljunggren, J., Häggström, L. Induction of a metabolic switch in insect cells by substrate-limited fed batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995; 43:1006–13.
- Oliveira, C.R. *Uso do modo de operação em contínuo para avaliar aspectos fisiológicos de linhagem recombinante de Drosophila melanogaster*. [tese de doutorado] São Paulo, Brasil: Universidade Federal de São Paulo, 2019.
- Omoto, C., Bernardi, O., Salmeron, E., Farias, J.C. Manejo da resistência de Spodoptera frugiperda a inseticidas e plantas Bt. IRAC-BR (Comitê Brasileiro de ação a resistência a inseticidas) – ESALQ/USP, Piracicaba SP, junho 2013.
- Omoto, C., Bernardi, O., Salmeron, E., Sorgatto, R.J., Dourado, P.M., Crivellari, A., Carvalho, R.A., Willse, A., Martinelli, S., Head, G.P. 2016. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by Spodoptera frugiperda in Brazil. *Pest Management Science*, 72(9):1727-1736.
- Organis, 2017. Consumo de produtos orgânicos no Brasil – Primeira pesquisa nacional sobre o consumo de orgânicos. Conselho Brasileiro da produção orgânica sustentável e Market Analysis. Disponível em: https://www.organicnewsbrasil.com.br/wp-content/uploads/2017/06/Pesquisa-Consumo-de-Produtos-Org_nicos-no-Brasil-Palestra-07Jun-1.pdf, acessado em 30 de janeiro de 2020.

- Palomares, L.A., Estrada, S., Ramirez, O.T. Principles and applications of the insect cell-baculovirus expression vector system. In: Ozturk SS, Hu W-S, editors. Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies. New York, U.S.A: Taylor & Francis; 2006. p. 627–92.
- Parra, J.R.P., Botelho, P.S.M., Correa-Ferreira, B.S., Bento, J.M.S. Controle biológico: terminologia. Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores. São Paulo: Manole, p. 1-16, 2002.
- Pearson, M.N., Groten, C. & Rohrmann, G.F. (2000). Identification of the *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein provides evidence for a phylogenetic division of the Baculoviridae. *J Virol* 74, 6126–6131.
- Pedrini, M.R.S., Christian, P., Nielsen, L.K., Reid, S., Chan, L.C.L. 2006. Importance of virus-medium interaction on the biological activity of wild-type *Heliothis* nucleopolyhedrovirus. *J. of Virological Methods*. V.136, p. 267-272.
- Pedrini, M.R.S.; Wolff, J.L.C.; Reid, S. 2004. Fast accumulation of Few Polyhedra mutants during passage of a *Spodoptera frugiperda* multicapsid nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) in Sf-9 cell cultures. *Annals Appl Biol* 145:107-112.
- Peng, K., van Lent, J.W., Boeren, S., Fang, M., Theilmann, D., *et al.* (2012) Characterization of novel components of the baculovirus per os infectivity factor complex. *J Virol* 86: 4981–4988.
- Pereira, G.F. Otimização do crescimento de células Sf-9 em biorreator visando à produção de biopesticida. [tese de mestrado] São Paulo, Brasil: Universidade de São Paulo, 2017.
- Pignati, W.A., Souza e Lima, F.A.N., Sommerfeld de Lara, S., Correa, M.L.M., Barbosa, J.R. Leão, L.H.C., Pignatti, M.G. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. *Ciência & Saúde Coletiva*, 22(10):3281-3293, 2017 DOI: 10.1590/1413-812320172210.17742017
- Pimentel, D. 2005. Environmental and Economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environmental, Development and Sustainability*, 7:229-252.
- Powell, K.A. & Faull, J.L. 1989. Commercial approaches to the use of biological control agents. In: WHIPPS, J. M. & LUMSDEN, R. D. (eds.) *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Radford, K.M., Cavegn, C., Bertrand, M., Bernard, A.R., Reid, S., Greenfield, P.F. The indirect effects of multiplicity of infection on baculovirus expressed proteins in insect cells: secreted and non-secreted products. *Cytotechnology* 24: 73–81, 1997.
- Radford, K.M., Reid, S., Greenfield, P.F. Substrate limitation in the baculovirus expression vector system. *Biotechnol Bioeng* 1997; 56:32–44.
- Reid, S., Chan, L., van Oers, M.M. Production of Entomopathogenic Viruses. 2014 Elsevier Inc. Chapter 13 - Mass Production of Beneficial Organisms. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-391453-8.00013-3>.
- Rezende, S.H.M.S., Castro, M.E.B., Souza, M.L. 2009. Accumulation of few-polyhedra mutants upon serial passage of *Anticarsia gemmatilis* multiple nucleopolyhedrovirus in cell culture. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100: 153 - 9
- Rhiel, M., Mitchell-Logean, C.M., Murhammer, D.W. 1997. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High Five™) and *Spodoptera frugiperda* Sf 9 insect cell line metabolism in suspension cultures. *Biotechnol Bioeng*; 55:909–20.

- Riet, K.V.V., Tramper, J., 1991. Basic bioreactor design. Marcel Dekker, Inc., New York. Segura, M.d.I.M., Kamen, A., Garnier, A., 2006. Downstream processing of oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors. *Biotechnol. Adv.* 24, 321–337.
- Rodas, V.M., Marques, F.H., Honda, M.T., Soares, D.M., Jorge, S.A.C., Antoniazzi, M.M., Medugno, C., Castro, M.E.B., Ribeiro, B.M., Souza, M.L., Tonso, A., Pereira, C.A. Cell culture derived AgMNPV bioinsecticide: biological constraints and bioprocess issues. *Cytotechnology* 2005, 48:27–39. DOI 10.1007/s10616-005-3175-7.
- Rohrmann, G.F. Baculoviruses as insecticides: Three examples. In: *Baculovirus Molecular Biology*. Third Edit ed.[s.l.] Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2013.
- Roldão, A., Carrondo, M.J.T., Alves, P.M., Oliveira, R. 2008. Stochastic simulation of protein expression in the baculovirus/insect cells system. *Comput. Chem. Eng.* 32, 68–77.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanderson, C. *et al.* 1999. A structured, dynamic model for animal cell culture systems: application to murine hybridoma. *Biochemical Engineering Journal*, v. 3, n. 3, p. 213–218.
- Schlaeger, E.J., 1996. Medium design for insect cell culture. *Cytotechnology* 20, 57–70.
- Schmidell, W., Lima, U.A., Aquarone, E., Borzani, W. *Biotecnologia Industrial - volume 2 – Engenharia Bioquímica*. Editora Edgard Blucher Ltda. São Paulo, 2001.
- Shapiro, M., 1986. In vivo production of baculoviruses. In: Granados, R.R., Federeci, B.A. (Eds.), *The Biology of Baculoviruses*, vol. II. CRC Press, Boca Raton, pp. 31–61.
- Sihler, W., Souza, M.L., Valicente, F.H., Falcão, R., Sanches, M.M. 2018. In vitro infectivity of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus to different insect cell lines. *Pesq. agropec. bras.* vol.53 no.1 Brasília.
- Souza, J.S.I., Peixoto, A.M., Toledo, F.F. *Enciclopédia Agrícola*. EdUSP, 1995. 1 ed. 508p.
- Summers, M.D., Smith, G.E. 1987. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Tex AES Bull*, 1555: 1–56.
- Summers, M.D., Volkman, L.E., 1976. Comparison of biophysical and morphological properties of occluded and extracellular nonoccluded baculovirus from in vivo and in vitro host systems. *J. Virol.* 17, 962–972.
- Szewczyk, B., Souza, M.L., Castro, M.E.B., Moscardi, M.L., Moscardi, F. 2011. Baculovirus Biopesticides, In *Pesticides - Formulation, Effects, Fate*, Ed. Margarita Stoytcheva, Intech, 2011, p. 25-36.
- Szewcyk, B., Rabalski, L., Krol, E., Sihler, W., Souza, M.L. *et al.* 2009. Baculovirus biopesticides - a safe alternative to chemical protection of plants. *Journal of Biopesticides*, v. 2, n. 2, p. 209–216.
- Szewczyk, B., Hoyos-Carvajal, L., Paluszek, M., Skrzecz, W. & de Souza, M.L. 2006. Baculoviruses - re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances*, 24, 143-160.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. 2013. *Mol. Biol. Evol.* 30(12):2725–2729.
- Thakore, Y. The biopesticide market for global agricultural use. *Ind Biotechnol* 2:192–208, 2006.

Tramper, J., Williams, J.B., Joustra, D., Vlak, J.M. Shear sensitivity of insect cells in suspension. *Enzyme Microb Technol* 1986, 8:33–6.

USDA, 2018 – Report - Safra Mundial de Milho 2017/2018 – 11º levantamento.

Valicente, F.H. Manejo Integrado de Pragas na cultura do milho. Circular Técnica 208, Embrapa Milho e Sorgo, p. 01-03. 2016.

Valicente, F.H., Tuelher, E.S, Barros, E. C. Processo de Formulação do Baculovirus *Spodoptera* em Pó Molhável. Circular Técnica 156 e 157 (EMBRAPA-CNPMS) – Sete Lagoas, MG. 5p. 2010.

Valicente, F.H., Tuelher, E.S., Paiva, C.E.C., Guimarães, M.R.F., Macedo, C.V., Wolff, J.L. A new baculovirus isolate that does not cause the liquefaction of the integument in *spodoptera frugiperda* larvae. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.7, n.1, p. 77-82, 2008

Volkman, L.E. & Summers, M.D. 1977. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: comparative infectivity of the occluded, alkali-liberated, and nonoccluded forms. *J. Invert. Path.* 30: 102-103

Van Oers, M.M., Vlak, J.M. The baculovirus 10-kDa protein. *J Invertebr Pathol.* 1997 Jul,70(1):1-17. DOI: 10.1006/jipa.1997.4675

Vaughn, J.L. *et al.* The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE). *In Vitro*, v. 13, n. 4, p. 213–217, 1977.

Vieira, P.B. Cultura de células de *Drosophila melanogaster* (S2) em processo contínuo. [dissertação de mestrado]. São Paulo, Brasil: Universidade de São Paulo, 2010.

Villamizar, L., Barrera, G., Cotes, A.M., Martínez, F. Eudragit S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: Physicochemical characterization, photostability and in vitro virus release. *Journal of Microencapsulation*, 2010, 27(4): 314–324

Vlak, J.M., Zuidema, D., Rohrmann, G.F., Klinge-Roode, E.C., Groene, J.T., Van Lent, J.W. Localization of the 34 kDa polyhedron envelope protein in *Spodoptera frugiperda* cells infected with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Arcj. Virol.* 1990, 111 (1-2): 103-14.

Waquil, J.M., Mendes, S.M., Vasconcelos, M.J., Paiva, E., Guimarães, C.T. Manejo de milho transgênico. In: *Milho: O produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. Cap. 13, p. 203-216.

Wickham, T.J., Davis, T., Granados, R.R., Hammer, D.A., Shuler, M.L., Wood, H.A. Baculovirus defective interfering particles are responsible for variations in recombinant protein production as a function of multiplicity of infection. *Biotechnology Letters*, v.13, p.483-488, 1991.

Wolff, J.L., Valicente, F.H., Martins, R., Oliveira, J.V., Zanotto, P.M. Analysis of the genome of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV-19) and of the high genomic heterogeneity in group II nucleopolyhedrovirus. *The Journal of General Virology* [01 May 2008, 89(Pt 5):1202-1211].

Xu, X.M. *et al.* Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*, v. 101, n. 9, p. 1024–1031, 2011.

Yang, S., Zhao, L., Ma, R., Fang, W., Hu, J., Lei, C., Sun, X. Improving Baculovirus Infectivity by Efficiently Embedding Enhancing Factors into Occlusion Bodies. *Applied and Environmental Microbiology*. July 2017 Volume 83 Issue 14 e00595-17

Young, J.D. Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures. *Curr Opin Biotechnol.* 2013 Dec, 24(6):1108-15. doi: 10.1016/j.copbio.2013.04.016

Zannoto, P.M., Sampaio, M.J., Johnson, D.W., Rocha, T.L., Maruniak, J.E. The *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus polyhedron gene region: sequence analysis, gene product and structural comparisons. *J Gen Virol.* 1992, 73 (Pt 5): 1049-56.

Zeiser, A., Bédard, C., Voyer, R., Jardin, B., Tom, R., Kamen, A.A., 1999. On-line monitoring of the progress of infection in Sf-9 insect cell cultures using relative permittivity measurements. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 122–126.

Zeiser, A., Elias, C.B., Voyer, R., Jardin, B., Kamen, A.A., 2000. On-line monitoring of physiological parameters of insect cell cultures during the growth and infection process. *Biotechnol. Prog.* 16, 803–808.

Zhang, Y.H., Enden, G., Mershal, J.C. 2005. Insect cells–Baculovirus system: Factors affecting growth and low MOI infection. *Biochemical Engineering Journal* 27, 8–16.

10. Apêndice

Apêndice 1: Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R01

Curva de monitoramento do cultivo com meio Sf-900 III dos parâmetros temperatura, pH, agitação, oxigênio dissolvido (OD) e porcentagem de CO₂ na saída do reator minuto a minuto do R01 (BioFlo 110) utilizando programa localmente implementado com linguagem LabVIEW.

Apêndice 2: Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R02

Curva de monitoramento do cultivo com meio Sf-900 III dos parâmetros temperatura, pH, agitação, oxigênio dissolvido (OD) e porcentagem de CO₂ na saída do reator minuto a minuto do R02 (BioFlo 110) utilizando programa localmente implementado com linguagem LabVIEW.

Apêndice 3: Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R03

Curva de monitoramento do cultivo com meio Sf-900 III dos parâmetros temperatura, pH, agitação, oxigênio dissolvido (OD) minuto a minuto do R03 (BioFlo 110) utilizando programa localmente implementado com linguagem LabVIEW.

Apêndice 4: Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R04

Curva de monitoramento do cultivo com meio Sf-900 III dos parâmetros temperatura, pH, agitação, oxigênio dissolvido (OD) e porcentagem de CO₂ na saída do reator minuto a minuto do R04 (BioFlo 110) utilizando programa localmente implementado com linguagem LabVIEW.

Apêndice 5: Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R05

Curva de monitoramento do cultivo com meio Sf-900 III dos parâmetros temperatura, pH, agitação, oxigênio dissolvido (OD) e porcentagem de CO₂ na saída do reator minuto a minuto do R05 (BioFlo 110) utilizando programa localmente implementado com linguagem LabVIEW.

Apêndice 6: Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R06.

Curva de monitoramento do cultivo com meio Sf-900 III dos parâmetros temperatura, pH, agitação, oxigênio dissolvido (OD) e porcentagem de CO₂ na saída do reator minuto a minuto do R06 (BioFlo 110) utilizando programa localmente implementado com linguagem LabVIEW.

Apêndice 7: Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R08

Curva de monitoramento do cultivo com meio Sf-900 III dos parâmetros temperatura, pH, agitação, oxigênio dissolvido (OD) e porcentagem de CO₂ na saída do reator minuto a minuto do R08 (BioFlo 110) utilizando programa localmente implementado com linguagem LabVIEW.

Apêndice 8: Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R09

Curva de monitoramento do cultivo com meio Sf-900 III dos parâmetros temperatura, pH, oxigênio dissolvido (OD) e GasMix (porcentagem de tempo que o controlador deixa a válvula de O₂ aberta, estando aberta a de ar o resto do tempo) minuto a minuto do R08 (BioStat B) utilizando programa localmente implementado com linguagem LabVIEW.

Apêndice 9: Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R10

Curva de monitoramento do cultivo com meio Sf-900 III dos parâmetros temperatura, pH, agitação, oxigênio dissolvido (OD) e porcentagem de CO₂ na saída do reator minuto a minuto do R10 (BioFlo 110) utilizando programa localmente implementado com linguagem LabVIEW.

Apêndice 10: Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R11

Curva de monitoramento do cultivo com meio Sf-900 III dos parâmetros temperatura, pH, oxigênio dissolvido (OD) e GasMix (porcentagem de tempo que o controlador deixa a válvula de O₂ aberta, estando aberta a de ar o resto do tempo) minuto a minuto do R11 (BioStat B) utilizando programa localmente implementado com linguagem LabVIEW.

Apêndice 11: Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R12

Curva de monitoramento do cultivo com meio Sf-900 III dos parâmetros temperatura, pH, agitação, oxigênio dissolvido (OD) e porcentagem de CO₂ na saída do reator minuto a minuto do R12 (BioFlo 110) utilizando programa localmente implementado com linguagem LabVIEW.

Apêndice 12: Monitoramento dos parâmetros de cultivo – R013

Curva de monitoramento do cultivo com meio Sf-900 III dos parâmetros temperatura, pH, oxigênio dissolvido (OD), GasMix (porcentagem de tempo que o controlador deixa a válvula de O₂ aberta, estando aberta a de ar o resto do tempo) e porcentagem de CO₂ na saída do reator minuto a minuto do R13 (BioStat B) utilizando programa localmente implementado com linguagem LabVIEW.

	Suplementação	Infeção (MOI 1,0)	$X_{v\text{máx}}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)	Viabilidade celular final (%)	pol/mL ($\times 10^7$)	% cél infectadas
BioFlo (US)	X	X	4,67	0,49	86,67	-	-
	Gln	X	3,60	0,67	72,00	-	-
	Cya	X	4,30	0,64	58,30	-	-
	Glc	✓	5,10	0,46	42,75	4,40	43,00
	Glc e Cya	✓	3,95	0,47	50,00	4,95	36,00
	Glc, Gln e Cya	✓	4,30	0,53	37,20	4,30	36,00
Wave	X	X	2,40	0,44	44,40	-	-
	Gln	X	6,50	0,41	56,40	-	-
	Cya	X	7,00	0,46	59,00	-	-
	Glc e Cya	✓	7,00	0,52	44,65	43,00	90,00
	Glc, Gln e Cya	✓	3,00	0,52	5,00	23,00	71,00
SFC	X	X	6,40	0,60	73,03	-	-
	Gln	X	7,00	0,45	27,70	-	-
	Cya	X	7,30	0,58	47,20	-	-
	Glc	X ✓	6,90	0,73	40,25	8,00	51,00
	Glc e Cya	X ✓	8,10	0,66	12,00	9,60	48,30
	Glc, Gln e Cya	X ✓	5,60	0,59	58,75	6,00	47,00

Apêndice 13: Tabela resumo de todos os experimentos conduzidos no USDA-NRS/FS e seus respectivos resultados

Análise inclui suplementação, infecção viral, densidade celular máxima, velocidade específica de crescimento máximo, viabilidade celular final, concentração de poliedros e porcentagem de células infectadas para os biorreatores em modo STR aspergido (BioFlo 110 – referido como US-nos textos), biorreator Wave e os controles em frascos shaker referentes (SFC).

	Condição	Infeção	Transferência de oxigênio	$X_{v\text{máx}}$ ($\times 10^6$ cel/mL)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)	Viabilidade celular final (%)	pol/mL ($\times 10^7$)	% cél infectadas
R04	padrão	x	STR aspergio	6,0	0,51	62,9	-	-
R05	padrão	x	STR aspergio	6,5	0,62	34,6	-	-
R06	padrão	x	STR aspergio	7,6	0,59	68,6	-	-
R08	+ 1,0 g/L Gln (7 dias)	x	STR aspergio	6,8	0,45	68,3	-	-
R09	+ 1,0 g/L Gln (7 dias)	x	STR aspergio	5,7	0,44	48,6	-	-
R10	+ 1,0 g/L Gln	MOI 0,1	STR aspergio	6,2	0,59	54,0	6,5	30
R11	+ 1,0 g/L Gln	MOI 0,1	STR bubble free	10,0	0,53	74,0	8,5	20
R12	+ 1,0 g/L Gln	MOI 1,0	STR aspergido	6,2	0,80	31,0	90	32
R13	+ 1,0 g/L Gln	x	STR bubble free	10,0	0,30	34,0	-	-
CSR04	padrão	x	shaker	9,1	0,62	40,9	-	-
CSR05	padrão	x	shaker	10,0	0,56	17,5	-	-
CSR06	padrão	x	shaker	9,9	0,58	30,8	-	-
CSR08	+ 1,0 g/L Gln (4,2 dias)	x	shaker	7,0	0,58	54,5	-	-
CSR10	+ 1,0 g/L Gln	x	shaker	6,2	0,45	62,0	-	-
CSR11	+ 1,0 g/L Gln	MOI 0,1	shaker	6,9	0,47	63,0	0,16	30
CSR12	+ 1,0 g/L Gln	MOI 1,0	shaker	5,2	0,65	29,0	25	28
CSR13	+ 1,0 g/L Gln	x	shaker	5,2	0,75	10,0	-	-

Apêndice 14: Tabela resumo de todos os experimentos conduzidos no GEnBio - USP e seus respectivos resultados

Análise inclui condição do ensaio (suplementação), infecção viral, estratégia de transferência de oxigênio, densidade celular máxima, velocidade específica de crescimento máximo, viabilidade celular final, concentração de poliedros e porcentagem de células infectadas para todos os Reatores (R) e seus respectivos controles em frasco shaker (CSR).

		g/L										
	Condição	Glc ₀	Glc _{final}	Lac _{final}	Lac _{máx}	Gln ₀	Gln _{final}	Gln _{min}	Glt ₀	Glt _{final}	Glt _{min}	NH ₃ ⁺ máx
R01	STR aspergido padrão	10,00	6,09	0,05	0,05	2,66	0,86	0,86	1,80	1,14	1,14	-
R04	STR aspergido padrão	10,40	3,28	0,06	0,13	1,18	0,37	0,09	1,86	1,30	1,17	1,28
R05	STR aspergido padrão	10,20	2,13	0,02	0,16	1,24	0,57	0,15	1,60	1,37	1,24	-
R06	STR aspergido padrão	10,50	0,10	0,05	0,10	1,02	0,69	0,07	1,48	1,30	1,21	1,29
R08	STR aspergido padrão + Gln	9,80	3,23	0,10	0,13	1,04	0,59	0,59	1,60	1,46	1,27	-
R09	STR aspergido padrão + Gln	10,90	4,46	0,11	0,18	1,01	0,37	0,37	1,58	1,44	1,37	0,98
R10	STR aspergido padrão + Gln + SfMNPV MOI 0,1	9,80	2,30	0,15	0,15	2,60	0,53	0,53	1,59	1,44	1,31	1,14
R11	STR bubble free padrão + Gln + SfMNPV MOI 0,1	10,10	1,46	0,04	0,16	2,66	0,52	0,52	1,62	1,30	1,10	1,21
R12	STR aspergido padrão + Gln + SfMNPV MOI 1,0	10,40	0,04	1,35	1,35	2,11	0,16	0,16	1,46	1,27	1,02	0,79
R13	STR bubble free padrão + Gln	10,40	0,62	0,54	0,54	2,17	0,16	0,16	1,52	1,46	1,05	-
ExCell 420	shaker	8,90	0,13	0,75	0,75	0,95	0,09	0,09	1,06	0,64	0,64	0,13

Apêndice 15: Tabela resumo dos valores iniciais, finais e máximos/mínimos – quando pertinentes - dos metabólitos analisados: glicose, lactato, glutamina e glutamato e amônio para os ensaios em biorreator realizados no GEnBio – USP (reatores e adaptação de Sf-9 para meio ExCell 420)

		x10 ⁹ cel/g					
		fase exponencial		após suplementação Gln			
	Condição	Y _{X/Glc}	Y _{X/Gln}	Y _{X/Gln}			
R01	STR aspergido padrão	2,60	1,00	-			
R04	STR aspergido padrão	1,90	5,80	-			
R05	STR aspergido padrão	4,10	10,40	-			
R06	STR aspergido padrão	2,60	7,10	-			
R08	STR aspergido padrão + Gln	3,40	9,30	2,40			
R09	STR aspergido padrão + Gln	3,60	5,30	2,50			
R13	STR bubble free padrão + Gln	4,10	7,90	-			
ExCell 420	shaker	1,20	6,30	-			
		x10 ⁹ cel/g			x10 ⁹ pol/g		
		fase exponencial		infecção viral			
	Condição	Y _{X/Glc}	Y _{X/Gln}	Y _{X/Glc}	Y _{X/Gln}	Y _{P/Glc}	Y _{P/Gln}
R10	STR aspergido padrão + Gln + SfMNPV MOI 0,1	2,50	4,50	0,70	2,50	1,2	8,1
R11	STR bubble free padrão + Gln + SfMNPV MOI 0,1	2,30	4,60	2,70	7,30	14	73
R12	STR aspergido padrão + Gln + SfMNPV MOI 1,0	3,80	5,80	0,40	3,90	94	1100

Apêndice 16: Tabela resumo dos fatores de conversão substrato à célula de glicose e glutamina para os ensaios conduzidos em biorreator no GEnBio – USP

Também, a análise das células Sf-9 adaptadas para meio ExCell 420, quando pertinente, também há os valores destes fatores para o período de infecção viral, de suplementação de nutrientes e para conversão de substrato a produto nos experimentos com infecção por baculovírus.