UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA POLITÉCNICA

GUILHERME FABRI PEREIRA

**Otimização do crescimento de células Sf-9 em biorreator visando à
produção de biopesticida**

São Paulo
2017

GUILHERME FABRI PEREIRA

**Otimização do crescimento de células Sf-9 em biorreator visando à
produção de biopesticida**

Versão revisada

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

Área de concentração: Engenharia de Química

Orientador: Prof. Dr. Aldo Tonso

São Paulo
2017

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, 06 de Outubro de 2017

Assinatura do autor: Guilherme F. Pereira

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Pereira, Guilherme Fabri

Otimização do crescimento de células Sf-9 em biorreator visando à produção de biopesticida / G. F. Pereira -- versão corr. -- São Paulo, 2017.
112 p.

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

1.Células de inseto 2.Cultivo celular 3.Baculovírus 4.produção in vitro
5.Biorreator I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

Nome: Guilherme Fabri Pereira

Título: Otimização do crescimento de células Sf-9 em biorreator visando à produção de biopesticida

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de concentração: Engenharia Química

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser ... mas Graças a Deus, não somos o que éramos (Martin Luther King)

RESUMO

PEREIRA, Guilherme Fabri. **Otimização do crescimento de células Sf-9 em biorreator visando à produção de biopesticida**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Comparadas com células de mamífero, as células de inseto são mais fáceis de cultivar, não acumulam quantidade significativa de sub-produtos tóxicos e apresentam maiores rendimentos na expressão de proteínas heterólogas, porém apresentam uma menor capacidade de realizar modificações pós-traducionais. Células de inseto podem ser empregadas na produção *in vitro* de baculovírus, usados como pesticidas biológicos. As células Sf-9 estão entre as células de inseto com uso mais difundido. Entender o metabolismo destas células permitirá melhorias nos processos que as empregam, entretanto, ainda há relativamente pouca informação sobre o assunto. Considerando mais especificamente o uso dessas células para produção de baculovírus, também é necessário mais entendimento sobre o processo infectivo e parâmetros que o afetam. Este trabalho teve como objetivo estudar a influência da suplementação do meio de cultivo com diferentes aminoácidos no desenvolvimento das células Sf-9 e determinar a concentração de oxigênio dissolvido ideal para o cultivo destas células, visando elaborar uma metodologia de cultivo em biorreator otimizada e, paralelamente, estudar o processo de infecção de cultivos dessas células com o baculovírus *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) em diferentes escalas. Para estudar a influência que a adição de aminoácidos ao meio tem sobre o crescimento celular, células Sf-9 foram cultivadas em frascos schotts de 100 e 500 mL, com 20 mL do meio SF900III SFM (*serum free medium*) suplementados com cisteína, prolina, serina ou asparagina. Os resultados foram comparados com cultivos feitos sem suplementação (controles). A condição que apresentou o melhor resultado em frasco schott foi replicada em biorreator de 1 L de volume útil. Para estudar a influência do oxigênio dissolvido (O.D.) foram testados diferentes *setpoints* de O.D. em cultivos em biorreator. Em tais ensaios foram testadas as concentrações de O.D de 10%, 30% e 50% da saturação com o ar. Para o estudo do processo de infecção, foram realizadas infecções em frascos schotts de 500 mL, com 20 mL de cultivo, e em biorreator de 1 L. Também foram realizadas infecções em garrafas T-25 como forma de controle de virulência do inóculo viral e do vírus produzido. As principais variáveis analisadas foram $\mu_{\text{máx}}$, $X_{V\text{máx}}$ $Y_{X/\text{Glc}}$. Nos ensaios de influência de O.D., analisou-se também q_{O_2} e q_{CO_2} e, nos ensaios de infecção, a porcentagem de células contendo poliedros. A suplementação com prolina foi prejudicial ao cultivo. A adição de asparagina não teve qualquer influência no desenvolvimento celular. Os resultados das adições de cisteína e serina não foram muito conclusivos, em alguns ensaios houve aumento de $X_{V\text{máx}}$, já em outros não foi notado efeito significativo. Nos ensaios em biorreator, todos os valores de O.D. testados apresentaram resultados semelhantes, já a adição de cisteína ao meio em biorreator foi bastante maléfica ao crescimento celular. Os ensaios de infecção mostraram que células Sf-9 são bastante susceptíveis à infecção pelo baculovírus *Spodoptera frugiperda* e boas produtoras de poliedros virais, e que a vazão gasosa tem efeito negativo na concentração viral na fase líquida dos cultivos em biorreator (título viral).

Palavras-chave: Células de inseto. Cultivo celular. Baculovírus. Produção *in vitro*. Biorreator.

ABSTRACT

PEREIRA, Guilherme Fabri. **Optimization of Sf-9 cell growth in bioreactor for the production of biopesticide**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017

Compared to mammalian cells, insect cells are easier to culture, do not accumulate significant amounts of toxic byproducts and are capable of higher heterologous protein yields, but have a lower ability to perform post-translational modifications. Insect cells may be employed in the *in vitro* production of baculoviruses, used as biological pesticides. Sf-9 cells are among the most used insect cell lines. Understanding the metabolism of these cells would allow improvements in the processes that employ them, however, Howeverreports on the metabolism and physiology of Sf-9 cells and insect cells in general are scarce. When considering the use of these cells for baculovirus production, it is also necessary more understanding about the infective process and parameters that can affect it. This work aimed to study the influence that the supplementation of the culture medium with different amino acids have on the development of Sf-9 cells and to determine the ideal dissolved oxygen concentration for the culture of these cells, aiming to elaborate an optimized bioreactor culture methodology and, in parallel, to study the infection process of these cells with the *Spodoptera frugiperda* baculovirus (SfMNPV) at different scales. To study the influence that the addition of amino acids to the medium has on cell growth, Sf-9 cells were cultured in 100 and 500mL schott flasks with 20mL SF900III SFM (serum free medium) supplemented with cysteine, proline, serine or asparagine. The results were compared with cultures without supplementation (controls). The condition that presented the best result in schott flasks was replicated in a 1L bioreactor. To study the influence of dissolved oxygen (O.D.), experiments with different values of O.D. were conducted at a 1L bioreactor. The O.D. tested were 10%, 30% and 50% of air saturation. To study the infection process, infections were carried out in 500 mL schotted flasks, with 20 mL of culture, and in a 1L bioreactor. Infections were also carried out in 25 cm² T-flasks as a form of virulence control of the viral inoculum and virus produced. The main variables analyzed were μ_{max} , X_{Vmax} $Y_{X/Glc}$. In the O.D. tests, q_{O_2} and q_{CO_2} were also analyzed and, in the infection assays, the percentage of cells containing polyhedra. Proline supplementation was detrimental to the culture. The addition of asparagine had no influence on cellular growth. The results of cysteine and serine additions were not very conclusive, in some studies there was an increase of X_{Vmax} , while in others no significant effect was observed. In the bioreactor trials, all O.D. tested showed similar results and the addition of cysteine to the medium was quite harmful to cell growth. Infection assays showed that Sf-9 cells are quite susceptible to infection by the *Spodoptera frugiperda* baculovirus and good producers of viral polyhedra, and that the gas flow has a negative effect on the viral concentration in the liquid phase of the bioreactor cultures (viral titer).

Keywords: Insect cells. Cell culture. Baculovirus. *In vitro* production. Bioreactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- – Diferentes formas fenotípicas que os baculovírus apresentam durante seu ciclo de vida.	22
Figura 2 – Ciclo de vida do baculovírus. A) ingestão do corpo de oclusão (OB); B) formação e liberação BVs; C) infecção e produção de novos BVs; D) Infecção sistêmica, morte da lagarta e liberação de OBs.	24
Figura 3 - Análise por microscopia eletrônica de transmissão de células Sf-9 multiplicadas em biorreator e infectadas com o vírus SfMNPV. a) Célula Sf 9 controle (não infectada). Aumento de 8.000X. b) Núcleo de célula Sf-9 infectada – Inoculo inicial utilizado para subsequente infecção em sistema de biorreator. Aumento de 30.000X. c) Núcleo de célula Sf-9 infectada – Produto final obtido após infecção em sistema de biorreator. Aumento de 20.000X.	86
Figura 4 – Fotos de cultivos em garrafa T-25 120 horas após serem infectados com o sobrenadante do primeiro biorreator infectado: (a) Controle; (b) Teste de infecção forçada 1; (c) Teste de infecção forçada 2; (d) Teste de infecção forçada 3.	88
Figura 5– Cultivo controle (sem vírus) do teste da infectividade dos sobrenadantes dos biorreatores infectados	96
Figura 6- Fotos do teste de infectividade do sobrenadante do biorreator infectado com aeração de 0,2 L/min. a) infecção padrão com 100 microlitros de vírus; b) infecção padrão com 500 microlitros de vírus; c) infecção forçada com 1,5 mL de vírus.	97
Figura 7 - Fotos do teste de infectividade do sobrenadante do biorreator infectado com aeração de 0,05 L/min. a) infecção padrão com 100 microlitros de vírus; b) infecção padrão com 500 microlitros de vírus; c) infecção forçada com 1,5 mL de vírus.	98
Figura A 1– Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras retiradas dos ensaios com infecção em frasco schott realizados com primeiro lote viral, com MOI de aproximadamente 1; (a) Infecção 1; (b) Infecção 2. PM = padrão de peso molecular.	108
Figura A 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras retiradas do ensaio com infecção em biorreator realizado com primeiro lote viral, com MOI de aproximadamente 1 e aeração de 0,2 L/min. PM = padrão de peso molecular.	109
Figura A 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras retiradas do ensaio com infecção em biorreator realizado com segundo lote viral, com MOI de aproximadamente 1 e aeração de 0,05 L/min. PM = padrão de peso molecular.	109
Figura A 4– Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras retiradas do ensaio com infecção em frascos schott de 500 mL realizado com segundo lote viral, com MOI de aproximadamente 1; (a) Infecção 1; (b) Infecção 2. PM = padrão de peso molecular.	110

Figura A 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras retiradas de ensaio controle, sem infecção. PM = padrão de peso molecular. 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Coeficientes metabólicos das fases de crescimento e infecção das células High-Five e Sf-9 cultivadas em meio sem soro e sob condições nutricionais não-limitantes	31
Tabela 2– Estudos em biorreatores examinando o efeito de diferentes concentrações de oxigênio dissolvido no crescimento de células de inseto	33
Tabela 3– Concentração de aminoácidos no meio SF900II.....	37
Tabela 4– Concentração de aminoácidos no meio pós-suplementação.....	38
Tabela 5– Resultado da análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios com suplementação de cisteína em schotts de 100 mL.	50
Tabela 6 – Resultado da análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios com diferentes taxas de transferências de O ₂	54
Tabela 7 – Resultado da análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios com suplementação de cisteína em schotts de 500 mL	56
Tabela 8 – Resultado da análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios com suplementação de prolina e ensaios controle em schotts de 100 mL	60
Tabela 9 – Resultado da análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios com suplementação de asparagina em schotts de 500 m	63
Tabela 10 – Resultado da análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios com suplementação de serina em schotts de 500 mL	65
Tabela 11 – Resultado da análise estatística dos resultados obtidos na repetição dos ensaios com 200% de cisteína, serina e asparagina em schotts de 500 mL	67
Tabela 12 – parâmetros dos cultivos em biorreator.....	72
Tabela 13 - Valores de $\mu_{\text{máx}}$ (anterior à infecção) dos cultivos infectados em frasco schott.	84
Tabela 14 – Valores de qCO ₂ médios dos biorreatores infectados e do controle (biorreator com O.D. de 30%).....	93
Tabela 15 – Resumo das metodologias de infecção empregadas para testar os sobrenatantes dos biorreatores infectados.	96

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1– Cultivo de células Sf-21 em frascos schotts com meio SF900III em condições padrão.	46
Gráfico 2– Dados obtidos durante o cultivo de células Sf-9 em frascos schotts com meio SF900III em condições padrão	47
Gráfico 3– Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis ($\ln(X_v)$) e viabilidade dos ensaios com adição de cisteína e ensaio controle em schotts de 100 mL	48
Gráfico 4 – Cinética de crescimento de células viáveis (X_v), consumo de glicose (Glc) e produção de lactato (Lac) dos ensaios com adição de cisteína e ensaio controle em schotts de 100 mL	48
Gráfico 5 – Valores de (a) $\mu_{\max}$, (b) $Y_{X/Glc}^{Exp}$ e (c) $X_{v\max}$ obtidos nos ensaios com suplementação de cisteína em schotts de 100 mL realizados em triplicata. As barras de erro representam o desvio padrão calculado entre as repetições de cada condição	49
Gráfico 6- Cinética de produção de lactato (Lac) dos ensaios com adição de cisteína e ensaio controle em schotts de 100 mL	50
Gráfico 7 - Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis ($\ln(X_v)$) e viabilidade dos ensaios com diferentes formas de aumentar a taxa de transferência de oxigênio, onde con=controle (130 rpm,100mL); 160=(160 rpm, 100 mL); 500mL=(130 rpm, 500mL)	51
Gráfico 8 – Cinéticas de crescimento células viáveis (X_v), consumo de glicose (Glc) e produção de lactato (Lac) dos ensaios com diferentes formas de aumentar a taxa de transferência de oxigênio, onde com = controle (130 rpm,100mL); 160 = (160 rpm, 100 mL); 500mL = (130 rpm, 500mL).....	52
Gráfico 9 - – Valores de (a) $\mu_{\max}$, (b) $Y_{X/Glc}^{Exp}$ e (c) $X_{v\max}$ obtidos nos ensaios com diferentes formas de aumentar a taxa de transferência de oxigênio. Onde con=controle (130 rpm,100mL); 160=(160 rpm, 100 mL); 500mL=(130 rpm, 500mL)	53
Gráfico 10– Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis ($\ln(X_v)$) e viabilidade dos ensaios com adição de cisteína em frascos de 500 mL e ensaios controle em frascos de 500 e 100 mL.	55
Gráfico 11 – Valores de (a) $\mu_{\max}$ e (b) $Y_{X/Glc}^{Exp}$ obtidos nos ensaios com suplementação de cisteína em schotts de 500 mL e nos controles de 100 mL e 500 mL.	55
Gráfico 12 – Concentração de células totais (X_t) e viabilidade dos ensaios com adição de cisteína em frascos de 500 mL e ensaios controle em frascos de 500 e 100 mL.....	57

Gráfico 13 – Cinética de crescimento células viáveis (X_v), consumo de glicose (Glc) e produção de lactato (Lac) dos ensaios com adição de cisteína em frascos de 500 mL e ensaios controle em frascos de 500 e 100 mL.	58
Gráfico 14– Cinética de crescimento de células viáveis (X_v), consumo de glicose (Glc) e produção de lactato (Lac) dos ensaios com adição de prolina e ensaio controle em frascos de 100 mL.	59
Gráfico 15– Valores de (a) $\mu_{\text{máx}}$, (b) $Y_{X/\text{Glc}}^{\text{Exp}}$ e (c) $X_{v\text{máx}}$ obtidos nos ensaios com suplementação de prolina em schotts de 100 mL.....	59
Gráfico 16 – Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e viabilidade dos ensaios com suplementação de prolina em schotts de 100 mL.....	60
Gráfico 17 – Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e viabilidade dos ensaios com suplementação de asparagina em schotts de 500 mL.....	62
Gráfico 18– Valores de (a) $\mu_{\text{máx}}$, (b) $X_{v\text{máx}}$ obtidos nos ensaios com suplementação de asparagina em schotts de 500 mL.....	62
Gráfico 19 – Cinética de crescimento de células viáveis (X_v), consumo de glicose (Glc) e produção de lactato (Lac) dos ensaios com adição de asparagina e ensaio controle em frascos de 500 mL.....	63
Gráfico 20 – Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e viabilidade dos ensaios com suplementação de serina em schotts de 500 mL.....	64
Gráfico 21 – Valores de (a) $\mu_{\text{máx}}$, (b) $X_{v\text{máx}}$ obtidos nos ensaios com suplementação de serina em schotts de 500 mL.....	65
Gráfico 22 – Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e viabilidade da repetição dos ensaios com 200% de cisteína, serina e asparagina em schotts de 500 mL.....	66
Gráfico 23 – Valores de (a) $\mu_{\text{máx}}$, (b) $X_{v\text{máx}}$ obtidos na repetição dos ensaios com 200% de cisteína, serina e asparagina em schotts de 500 mL.....	67
Gráfico 24 – Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e viabilidade dos cultivos em frasco schott usados como controle para os cultivos em biorreator.....	69
Gráfico 25 – Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e viabilidade dos ensaios em biorreator....	70
Gráfico 26 – Logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] em função do tempo dos ensaios em biorreator.....	71

Gráfico 27 – Cinética de crescimento de células viáveis (X_v), consumo de glicose (Glc) e produção de lactato (Lac) nos ensaios em biorreator.	72
Gráfico 28 – Logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$]; 5 vezes a fração de CO_2 no gás de exaustão ($5 \cdot \text{CO}_2$) e velocidade específica de consumo de O_2 (q_{O_2}) em função do tempo do ensaio com 50% de O.D.	74
Gráfico 29 – Logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$]; 5 vezes a fração de CO_2 no gás de exaustão ($5 \cdot \text{CO}_2$) e velocidade específica de consumo de O_2 (q_{O_2}) em função do tempo do ensaio com 30% de O.D.	75
Gráfico 30 – Logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e 5 vezes a fração de CO_2 no gás de exaustão ($5 \cdot \text{CO}_2$) em função do tempo do ensaio com 10% de O.D.	76
Gráfico 31 – Produção específica de CO_2 (q_{CO_2}) do ensaio com 50% de O.D.	77
Gráfico 32– Produção específica de CO_2 (q_{CO_2}) do ensaio com 30% de O.D.	77
Gráfico 33– Produção específica de CO_2 (q_{CO_2}) do ensaio com 10% de O.D.	78
Gráfico 34 – Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e viabilidade dos cultivos em frasco schott usados como controle para os cultivos em biorreator com O.D. de 30% (sem suplementação) e com suplementação de cisteína	79
Gráfico 35 – Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e viabilidade dos ensaios em biorreator com O.D. de 30%, com e sem suplementação com cisteína.	80
Gráfico 36 – Duração da fase de crescimento celular exponencial dos cultivos em biorreator com O.D. de 30%, com e sem suplementação com cisteína.	80
Gráfico 37 – Perfil da fração de CO_2 do gás de exaustão dos cultivos em biorreator com O.D. de 30%, com e sem suplementação com cisteína	81
Gráfico 38- Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (%poliedro) do primeiro teste de infecção.	83
Gráfico 39 - Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (% poliedro) do segundo teste de infecção.	84
Gráfico 40 - Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$], viabilidade e porcentagem de células contendo poliedros em seus núcleos (% poliedros) do primeiro cultivo em biorreator com infecção.	85

Gráfico 41- Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (% poliedros) do teste realizado com o sobrenadante do primeiro biorreator.	87
Gráfico 42 - Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (% poliedros) do teste realizado com o segundo lote de vírus recebido da EMBRAPA.....	89
Gráfico 43 – Variação da vazão de entrada de gás no segundo cultivo em biorreator com infecção.....	90
Gráfico 44 : Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$], viabilidade e fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (% poliedros) do segundo cultivo em biorreator com infecção.	91
Gráfico 45 - Concentração de células viáveis (X_v) e logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] dos dois cultivos de infecção em biorreator e do controle (biorreator com O.D. 30%)	92
Gráfico 46 - Concentração de células viáveis (X_v) e fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (% poliedro) dos dois cultivos de infecção em biorreator e do controle (biorreator com O.D. 30%)	92
Gráfico 47 - Perfil da fração de CO_2 no gás de exaustão dos biorreatores infectados e do controle (biorreator com O.D. de 30%)	93
Gráfico 48 - Concentração de células viáveis (X_v), fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (% poliedro) e valores de q_{CO_2} calculados do cultivo em biorreator com vazão gasosa de 0,2 L/min.	94
Gráfico 49 - Concentração de células viáveis (X_v), fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (% poliedro) e valores de q_{CO_2} calculados do cultivo em biorreator com vazão gasosa de 0,05 L/min.	95

SUMÁRIO

Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE GRÁFICOS	10
SUMÁRIO	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVOS GERAIS	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 BIOPESTICIDAS	18
3.2 BACULOVÍRUS	20
3.3 EMPREGO DE CÉLULAS DE INSETO	25
3.4 METABOLISMO DE CÉLULAS DE INSETO	28
3.5 CULTIVO DE CÉLULAS DE INSETO	31
3.6 FORMA DE OPERAÇÃO DO BIORREATOR	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 LINHAGEM CELULAR	35
4.2 MEIO DE CULTURA, AMINOÁCIDOS E BACULOVÍRUS	35
4.3 PREPARO DO BANCO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS NO LABORATÓRIO	35
4.4 DESCONGELAMENTO	36
4.5 CULTIVO DE CÉLULAS EM FRASCOS SCHOTT	36
4.5.1 Testes com suplementação de aminoácidos	36
4.5.2 Testes de transferência de oxigênio	38
4.5.3 Testes iniciais de infecção	39
4.6 CULTIVO DE CÉLULAS EM BIORREATOR	39
4.6.1 Testes de concentração de oxigênio dissolvido (O.D.)	40
4.6.2 Teste de suplementação com aminoácido	40
4.6.3 Testes de infecção	40
4.7 INOCULAÇÃO DO BIORREATOR	41
4.8 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS VIÁVEIS (X_v), DE CÉLULAS TOTAIS E DE CÉLULAS COM POLIEDRO (X_p)	41
4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE, LACTATO, GLUTAMINA E GLUTAMATO	41
4.10 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	42
4.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA	44
4.12 ANÁLISE DOS RESULTADOS	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 ENSAIOS EM FRASCOS SCHOTT	46
5.1.1 Suplementação com cisteína em frascos schotts de 100 mL	47
5.1.2 Ensaios com diferentes taxas de transferência de oxigênio	51
5.1.3 Suplementação com cisteína em frascos schotts de 500 mL	54
5.1.4 Suplementação com prolina	58
5.1.5 Suplementação com asparagina	61
5.1.6 Suplementação com serina	64

5.1.7 Repetição dos testes de suplementação com cisteína, asparagina e serina.....	65
5.2 ENSAIOS EM BIORREATOR.....	68
5.2.1 Testes de O.D.	68
5.2.2 Teste de suplementação	78
5.3 ENSAIOS DE INFECÇÃO	81
5.3.1 Ensaios de infecção em frasco schott.....	82
5.3.2 Ensaios de infecção em biorreator	84
6. CONCLUSÕES	100
7. TRABALHOS FUTUROS.....	102
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
APÊNDICE	107

1. Introdução

Produzir alimento suficiente para suprir a demanda mundial de forma sustentável é um grande desafio. Neste contexto, o desenvolvimento de uma forma de controle de pragas ecologicamente correta é crucial, já que estas são responsáveis por grande parte das perdas da produção agrícola mundial (Bailey *et al.*, 2010; Glare *et al.*, 2012).

Para diminuir o impacto das pragas sobre as lavouras têm sido usados os defensivos agrícolas, agrotóxicos ou pesticidas químicos (inseticidas, fungicidas, herbicidas, entre outros). Estima-se que sem o uso desses defensivos, as pragas poderiam causar a perda de até 83% das lavouras cultivadas (Bailey *et al.*, 2010; Glare *et al.*, 2012).

Apesar de ajudarem a aumentar a produtividade agrícola, o emprego indiscriminado de pesticidas químicos traz grandes impactos negativos, tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana, que somados ao aparecimento de resistência a vários agrotóxicos empregados atualmente, apontam para a necessidade de formas alternativas de controle de pragas, como o uso de biopesticidas (Glare *et al.*, 2012; Leng *et al.*, 2011).

O baculovírus *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) foi amplamente usado no Brasil para proteger lavouras de soja contra a lagarta *Anticarsia gemmatalis*, provando que é possível o emprego de biopesticidas baseados em baculovírus no controle de pragas em larga escala (Szewczyk *et al.*, 2009).

A cultura do milho, considerado um dos principais produtos agrícolas do mundo, chega a ocupar 12 milhões de hectares no Brasil, porém sofre com ataque de pragas em toda sua cadeia produtiva, desde seu plantio até sua utilização final, o que pode levar a uma perda de até 73% da produção (Valicente e Tuellher, 2009)

Atualmente esta cultura é protegida prioritariamente com pesticidas químicos, porém o baculovírus *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (*SfMNPV*), quando aplicado de forma correta, é bastante eficiente no controle da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), uma das principais pragas do milho no Brasil (Valicente e Tuellher, 2009)

O uso de baculovírus como pesticidas biológicos traz vários benefícios por ter praticamente nenhum impacto para o meio ambiente e para a saúde humana, devido à sua especificidade. Porém, a produção *in vitro* de baculovírus ainda é uma limitação que precisa ser superada para que seu emprego como biopesticida possa ser difundido (Rohrmann, 2013; Szewczyk *et al.*, 2006, 2009)

Diante desses fatos, o presente trabalho visa otimizar o cultivo de células Sf-9 e sua infecção com o baculovírus SfMNPV visando a produção *in vitro* deste vírus, para produção de biopesticida viral.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Otimização do cultivo de células de inseto da linhagem Sf-9 para obtenção de cultivos de alta densidade celular e infecção dos cultivos com baculovírus *Spodoptera* (SfMNPV – *Spodopterafrugiperda* multiplenucleopolyhedrovirus) para a produção de bioinseticida.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar cultivos em batelada em frascos schotts com suplementação de diferentes aminoácidos buscando determinar o substrato limitante do crescimento celular;
- Estudar a influência da concentração de oxigênio dissolvido tanto no crescimento celular quanto na velocidade específica de respiração celular e determinar a faixa ideal para o desenvolvimento das células Sf-9;
- Testar a infecção da cultura com vírus selecionado em diferentes sistemas de cultivo celular;
- Analisar a taxa de infecção e produção de poliedros virais, correlacionando esses parâmetros com a multiplicidade de infecção (MOI).

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Biopesticidas

Existem várias definições de biopesticidas, uma definição bastante abrangente seria a que os define como organismos vivos ou produtos naturais derivados de organismos vivos que sejam capazes de suprimir populações de pragas que afetam a produção agrícola (Thakore, 2006).

De forma geral biopesticidas são organismos ou compostos naturais que controlam populações de insetos, fungos ou plantas consideradas ervas-daninhas sem afetar o restante do ecossistema.

Dentre as vantagens do uso dos biopesticidas, pode ser destacado que os biopesticidas são muito menos prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente que os pesticidas químicos, são bastante específicos e apresentam decomposição relativamente rápida, assim não há problemas de contaminação de solos, águas ou do produto final (Mazid, 2011).

Apesar de sua alta especificidade ser uma de suas principais vantagens, ela também restringe o uso de biopesticidas. Essa restrição, juntamente com a maior eficiência dos pesticidas convencionais, torna inviável, atualmente, a completa substituição dos pesticidas químicos pelos biológicos.

Várias estratégias têm sido propostas visando aumentar o uso de biopesticidas e diminuir o de pesticidas químicos, como a alternância entre os dois tipos de defensivos e o uso combinado dos dois nos chamados programas integrados de manejo de pragas (E. Birch, Begg e Squire, 2011; Glare *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2011).

Uma proposta mais radical é o uso concomitante de diferentes de biopesticidas, assim o limite imposto pela alta especificidade de cada um seria transposto e o uso de pesticidas químicos não seria necessário.

Avanços em áreas como biologia molecular e engenharia genética, que permitiram uma melhora na eficiência dos biopesticidas, têm levado a um aumento

no uso destes defensivos agrícolas mais amigáveis ao ambiente e ao homem (Leng *et al.*, 2011). Com isso mercado de biopesticidas está crescendo, porém ainda é difícil estimar o tamanho real deste mercado.

Os biopesticidas podem ser divididos em três grandes classes, os pesticidas microbianos, os protetores incorporados a plantas (PIP) e os pesticidas bioquímicos.

Dentro do grupo dos protetores incorporados a plantas estão substâncias capazes de matar pragas que são produzidas pelas próprias plantas, após estas serem geneticamente modificadas. Um exemplo são as plantas Bt, que receberam um gene da bactéria *Bacillus thuringiensis* que codifica uma proteína tóxica para as pragas (Mazid, 2011).

O grupo dos pesticidas bioquímicos compreende substâncias naturais, como extrato de plantas, ácidos graxos e feromônios, que diferem dos pesticidas convencionais pelo mecanismo de ação. Enquanto os pesticidas comuns normalmente matam ou inativam as pragas de alguma forma, os pesticidas bioquímicos atuam de forma não-tóxica, interferindo no desenvolvimento ou no acasalamento das pragas, ou agindo como repelentes (Mazid, 2011).

O ultimo grupo é o dos pesticidas microbianos, o tipo mais comum de biopesticida. Estes possuem como principio ativo um micro-organismo patogênico para a praga a ser controlada.

Este também é o grupo de biopesticidas mais abrangente. Dentro dele são encontrados defensivos contra vários tipos de peste, por exemplo, fungicidas (*Trichoderma*), herbicidas (*Phytophthora*) e inseticidas (*Bacillus thuringiensis*) (Mazid, 2011).

Os pesticidas microbiológicos tendem a ser bastante específicos, dificilmente afetando mais que algumas espécies de praga, porém existem vários pesticidas microbianos diferentes, de forma que muitos tipos de pragas podem ser controlados por eles. Porém é necessário que estes biopesticidas sejam continuamente monitorados, devido a possíveis mutações que podem sofrer, podendo torná-los prejudiciais a espécies não-alvo (Bailey, Boyetchko e Längle, 2010; Mazid, 2011).

Dentreos pesticidas microbianos, os pesticidas baseados em baculovírus têm despertado um grande interesse, por que além de serem usados no controle de pragas, os vírus podem ter seu material genético manipulado com certa facilidade.

Essa manipulação pode ter o objetivo de aumentar a virulência, no caso de vírus empregados no controle biológico de pragas, ou ter o objetivo de tornar o vírus um vetor de expressão de proteínas heterólogas (sistema de expressão célula de inseto/baculovírus)(Drugmand, Schneider e Agathos, 2012).

3.2 Baculovírus

Existem mais de 10 famílias virais conhecidas capazes de infectar insetos. Dentre essas famílias, a família *Baculoviridae*, da qual fazem parte os baculovírus, é a mais estudada e com maior aplicação no controle biológico de pragas(Moscardi *et al.*, 2011; Reid, Chan e Oers, 2013; Szewczyk *et al.*, 2009).

Os baculovírus são um grande grupo de vírus que possuem DNA dupla fita e são os mais adequados para serem usados como biopesticidas por infectarem apenas organismos pertencentes ao filo *Arthropoda*, assim não representam risco para o ambiente, para humanos e outros vertebrados ou para plantas. Não há nenhum relato de doenças causadas por baculovírus em vertebrados(Castro *et al.*, 1999; Moscardi *et al.*, 2011; Szewczyk *et al.*, 2009, 2011).

A eficiência dos pesticidas virais é comprovada tanto em teste em laboratório quanto em testes no campo, se aproximando bastante dos pesticidas químicos (Castro *et al.*, 1999; Leng *et al.*, 2011; Szewczyk *et al.*, 2009).

O interesse nos baculovírus surgiu, em grande parte, devido ao perigo que eles representavam para a produção de seda em algumas regiões da China e do Japão, mas percebeu-se que eles desempenhavam um importante papel no controle natural da população de insetos (Rohrmann, 2013).

O uso destes vírus como princípio ativo de inseticidas microbianos começou a ser mais fortemente defendida nos anos 60 e 70, porém o primeiro caso documentado de introdução de baculovírus no meio ambiente que resultou no

controle de uma praga é anterior à Segunda Guerra Mundial. O governo canadense importou um parasitoide para suprimir a população de *Diprion hercyniae*, inseto do grupo Hymenoptera, subordem Symphyta, que ataca coníferas. Juntamente com o parasitoide, uma espécie de baculovírus específica para esta praga foi acidentalmente introduzida no ambiente. Desde então não foi preciso tomar mais nenhuma medida para o controle desta praga (Szewczyk *et al.*, 2006, 2009).

Alguns representantes da família *Baculoviridae* são os principais responsáveis pelo controle da população de mariposas-ciganas na América do Norte. Baculovírus também desempenham um importante papel no controle dos surtos de *Orgyia pseudotsugata* (Rohrmann, 2013; Szewczyk *et al.*, 2006).

Posteriormente foi demonstrado que os baculovírus também possuem uma grande importância como ferramenta biotecnológica, no sistema de expressão de proteínas heterólogas células de inseto/baculovírus. Mais recentemente, os baculovírus têm se mostrado vetores ideais para algumas variedades de células de mamífero e potencial para uso em terapias gênicas (Kost, Condeary e Jarvis, 2005; Moscardi, 1999; Moscardi *et al.*, 2011).

O material genético do vírus envolto por um capsídeo proteico em forma de bastonete constitui sua unidade infectiva, chamada de nucleocapsídeo, que possui entre 230 e 285 nm de comprimento e de 40 a 60 nm de largura (Rohrmann, 2013).

Durante seu ciclo de vida, há a possibilidade de os vírions (um ou mais nucleocapsídeos envoltos por um envelope membranoso de proteína codificada pelo material genético viral) assumirem duas formas fenotipicamente diferentes, mas geneticamente idênticas, que diferem uma da outra na composição e origem de seu envelope proteico e em seu papel no ciclo de vida do vírus, como está representado na figura 01 (Reid, Chan e Oers, 2013; Rohrmann, 2013).

“Budded Vírus” (BV) é uma forma polarizada que brota da membrana citoplasmática do hospedeiro para o meio extracelular. Esta forma é responsável por tornar a infecção sistêmica, permitindo a transmissão do vírus para outras células e tecidos do inseto, processo chamado de infecção secundária (Szewczyk *et al.*, 2011).

A segunda forma (“Occlusion-derived virus” ou ODV) possui membrana sintetizada no núcleo da célula infectada, nesta forma podem ser encontrados vários nucleocapsídeos por vírion, chamados de multiple nucleopolyhedrovirus (MNPV), ou apenas um nucleocapsídeo por vírion, os single nucleopolyhedrovirus (SNPV), diferentemente dos BV que são envelopadas somente de forma individual) e são oclusos em cristais proteicos denominados corpos de oclusão (“*occlusion bodies*” - OB) ou poliedros virais. Os OB são a forma de resistência do vírus, responsáveis pela manutenção do vírus no meio ambiente e pela sua disseminação de um inseto para o outro. Esta é a forma viral usada como princípio ativo nos pesticidas microbianos (Castro *et al.*, 1999; Reid, Chan e Oers, 2013; Rodriguez, Belaich e Ghiringhelli, 2012; Szewczyk *et al.*, 2011).

Figura 1- – Diferentes formas fenotípicas que os baculovírus apresentam durante seu ciclo de vida.

Fonte: Rodriguez, Belaich e Ghiringhelli (2012).

A infecção na lagarta se inicia quando ela ingere os poliedros do baculovírus presentes na superfície das folhas. Ao chegar ao intestino do inseto, o envoltório

proteico do vírus é dissolvido por causa do pH altamente alcalino (aproximadamente pH 11) e da ação de proteases, e os vírions são liberados no lúmen do intestino da lagarta (Rohrmann, 2013).

Uma vez no lúmen intestinal, as partículas infectivas penetram nas células epiteliais do intestino médio via fusão de membrana, dando início ao processo de infecção primária, e se movem ao longo dos filamentos de actina, até chegarem ao núcleo (Ohkawa, Volkman e Welch, 2010; Reid, Chan e Oers, 2013).

Dentro do núcleo os nucleocapsídeos têm seu envelope removido e o material genético é exposto. A maquinaria de replicação de DNA da célula hospedeira passa a replicar o DNA viral. Paralelamente, proteínas do capsídeo viral começam a ser expressas e encapsulam o material genético viral recém replicado (Reid, Chan e Oers, 2013).

Os novos nucleocapsídeos produzidos brotam através da membrana celular da célula infectada, originando novos BVs que são liberados no meio extracelular, processo denominado de infecção secundária, levando a infecção a diferentes tecidos do inseto. Essa infecção sistêmica é repetida inúmeras vezes até a morte da lagarta. Paralelamente à produção de BVs, também são produzidos os ODVs, que são envoltos por uma camada protéica formando os corpos de oclusão (OB). Esses OBs se acumulam no interior do núcleo das células (Reid, Chan e Oers, 2013; Rohrmann, 2013; Szewczyk *et al.*, 2009, 2011).

Passadas algumas horas da infecção, a lagarta passa por diversas modificações comportamentais e fisiológicas que levam à sua morte. Em seguida, o inseto rompe-se facilmente, liberando grandes quantidades de OBs, que estavam acumulados no interior de suas células, no ambiente. Os novos vírus liberados podem então ser ingeridos por outras lagartas,

A liberação de vírus para o ambiente e infecção de novas lagartas caracteriza o processo de transmissão horizontal da doença. Dessa forma uma lagarta infectada serve de inóculo para infectar outras (Castro *et al.*, 1999; Szewczyk *et al.*, 2009, 2011). O ciclo de vida dos baculovírus está resumido na figura 02.

Figura 2 – Ciclo de vida do baculovírus. A) ingestão do corpo de oclusão (OB); B) formação e liberação BVs; C) infecção e produção de novos BVs; D) Infecção sistêmica, morte da lagarta e liberação de OBs.

Fonte: Rohrmann (2013)

Para a comercialização de baculovírus, em grande parte dos casos, tem-se recorrido às técnicas da produção *in vivo*. Seja ela pela pulverização do vírus contra o hospedeiro na plantação e coleta das larvas doentes ou mortas, ou criando o inseto alvo em laboratório e expondo-o ao vírus. Uma vez tendo lagartas contaminadas, elas são maceradas e utilizadas para pulverização da lavoura (Castro *et al.*, 1999; Szewczyk *et al.*, 2009, 2011).

A produção *in vivo*, atualmente empregada, geralmente, resulta em um produto final com custo elevado, muitas vezes não competitivo com os produtos químicos. A produção *in vitro* desse inseticida viral, utilizando cultura de células de inseto em biorreatores, pode torná-lo mais competitivo comercialmente, trazendo diversos benefícios como a possibilidade de se produzir grandes quantidades em espaços menores, maior controle do processo e elevação da esterilidade e da qualidade do produto (Moscardi e Souza, 2002; Szewczyk *et al.*, 2011).

A estratégia da produção do baculovírus em biorreatores é determinada, basicamente, pela seleção da multiplicidade de infecção (MOI), pela densidade celular na infecção (CDI) e pelo instante de infecção (TOI). MOI é definido como o

número de unidades infecciosas que são adicionadas por células no momento da infecção, TOI trata-se do momento em que se inicia a infecção das células e CDI é a densidade celular no momento da infecção (Micheloud *et al.*, 2009).

Esses fatores interagem entre si e devem ser manipulados para a otimização de cada processo, uma vez que essa interação dependa das características da linhagem celular e da composição do meio de cultura empregado (Micheloud *et al.*, 2009).

Um dos casos de maior sucesso de uso de baculovírus no controle de pragas, estima-se que nas últimas décadas o baculovírus *Anticarsia* (AgMNPV), empregado no combate à lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*), ajudou a poupar o despejo de 17 milhões de litros de inseticidas químicos no ambiente. A expectativa é que otimizando o processo de produção *in vitro*, um volume ainda maior de pesticidas químicos possam ser substituídos por este biopesticida, tornando a produção agrícola mais sustentável (Rohrmann, 2013).

Vale a pena ressaltar que, uma vez estabelecido um método eficiente de produção *in vitro* para o AgMNPV, é possível aplicá-lo para a produção de outros tipos de baculovírus. Por exemplo, a EMBRAPA isolou, em 2007, uma nova espécie de baculovírus que ataca a lagarta do trigo, e muitos outros tipos de baculovírus já tem uma aplicação estabelecida, além da possibilidade de utilizar o vírus como vetor para a expressão de proteínas heterólogas em células de inseto (Bishop, 1994; Drugmand, Schneider e Agathos, 2012; Glare *et al.*, 2012; Moscardi e Souza, 2002).

3.3 Emprego de células de inseto

Como já dito, uma forma de tornar a produção de baculovírus menos onerosa, aumentando sua competitividade no mercado e, como consequência, seu uso nas lavouras é sua produção *in vitro* através do cultivo de células de inseto.

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, depois passou a ser utilizada para a produção de baculovírus,

que seriam empregados no controle biológico de pragas nas plantações (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012).

A primeira tentativa de se cultivar células de inseto em sistemas *in vitro* é atribuída a Goldschmidt, que em 1915 tentou cultivar células do folículo de gônadas masculinas de pupas de mariposa Cercropia (*Samia cercropia*) usando como meio de cultivo a hemolinfa desta mesma espécie. Porém, apesar de as células permanecerem vivas por alguns dias, não foi constatado nenhum processo de divisão celular (Granados, Li e Blissard, 2008).

Aproximadamente 50 anos se passaram entre o experimento de Goldschmidt e o estabelecimento da primeira linhagem contínua de células de inseto. No entanto na década de 80, já estavam disponíveis para estudo várias linhagens diferentes (Wu, Ruan e Lam, 1998).

Quando se tornou possível a manipulação genética dos baculovírus, foi desenvolvido o chamado sistema de expressão célula de inseto-baculovirus (IC-BEVS), que consiste em cultivar as células de inseto e então infectá-las com baculovírus em cujo genoma foi inserido um gene de interesse, para a produção de proteínas recombinantes, tirando proveito da presença de promotores muito fortes no material genético do vírus (Granados, Li e Blissard, 2008; Lerch e Friesen, 1993; Rohrmann, 2013).

Este sistema tem sido usado para a expressão de várias proteínas de alto valor agregado, como hormônios, fatores de crescimento e vacinas (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012; Granados, Li e Blissard, 2008; Wu, Ruan e Lam, 1998).

As células de inseto ocupam um lugar estratégico na produção de proteínas recombinantes, pois são capazes de realizar modificações pós-traducionais muito mais complexas do que micro-organismos e seu cultivo não é tão caro e demorado como o de células de mamíferos. As células de inseto também são a única forma de produção *in vitro* de baculovírus (Jardin *et al.*, 2007).

Atualmente existem centenas de linhagens celulares isoladas de mais de 100 espécies diferentes, abrangendo mais de 6 ordens diferentes, sendo a ordem *Lepidoptera*, ordem das borboletas e mariposas, a origem de grande parte dessas

linhagens (Arif e Pavlik, 2013; Drugmand, Schneider e Agathos, 2012). As linhagens de célula de inseto mais empregadas em aplicações acadêmicas e industriais são a Tn368, High-Five, Sf-21 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, Li e Blissard, 2008; Hink, 1970).

A linhagem High-Five, cujo nome original é Tn5B1-4, foi desenvolvida a partir da linhagem parental (Tn5B1) isolada em 1986 a partir de ovos de *T. ni* e ficou conhecida com esse nome por possuir capacidade de expressar concentrações maiores de proteína recombinante que a sua linhagem parental (Arif e Pavlik, 2013; Granados, Li e Blissard, 2008).

A linhagem Sf-21 foi isolada em 1977 por Vaughn e colaboradores a partir de tecido do ovário de pupas de *Spodoptera frugiperda* em meio contendo hemolinfa (IPBL-SF-21), tendo sido posteriormente adaptada para meio sem hemolinfa (IPBL-SF-21 AE). Em 1983 foi estabelecida uma nova linhagem a partir de um clone de Sf-21, a Sf-9. As células Sf-9 apresentam um comportamento mais homogêneo que as células Sf-21, pelo fato de terem sido originadas de um único clone, enquanto que as Sf-21 foram originadas de uma população de células heterogêneas (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012; Vaughn *et al.*, 1977).

Dentre essas quatro linhagens, a High-Five é tipicamente a que consegue expressar maiores concentrações de proteína recombinante, porém a Sf-9 é a que melhor amplifica o *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (Arif e Pavlik, 2013; Drugmand, Schneider e Agathos, 2012; Granados, Li e Blissard, 2008). Esse baculovírus (AcMNPV) é utilizado amplamente como vetor para expressão de proteínas heterólogas.

As duas linhagens celulares isoladas da lagarta *S. frugiperda*, a Sf-21 e a Sf-9, são consideradas células robustas, ambas são células semi-aderentes, podendo ser cultivadas tanto aderidas quanto em suspensão e estão disponíveis no mercado já adaptadas para meios de cultivos sem soro.

A linhagem Sf-9 é mais tolerante a variações de pH, a choques osmóticos e ao cisalhamento, do que a Sf-21. Sendo uma opção mais adequada para processos industriais (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012; Granados, Li e Blissard, 2008).

Apesar de vantajosa em relação à produção *in vivo*, a produção de baculovírus em sistema *in vitro* tem sido limitada devido a alterações genéticas causadas pela passagem do vírus em cultura de células (Krell, 1996). Mutações no gene *25K fp* e a formação de partículas interferentes defectivas (DI) tem sido identificadas como as principais causas que levam a diminuição da produção de poliedros e, portanto, consequente perda da virulência do vírus produzido *in vitro* (Harrison *et al*, 1995; Krell, 1996; Lua *et al*, 2002).

Uma vez que a mesma espécie de baculovírus pode ser empregada como pesticida no controle de insetos ou sofrer diferentes modificações genéticas para carregar genes heterólogos diferentes, a otimização do cultivo de células de inseto para produção do vírus leva a um processo produtivo multifuncional, onde diferentes produtos podem ser obtidos.

3.4 Metabolismo de células de inseto

Estratégias mais eficientes de cultivo de células de inseto e meios de cultura mais adequados para as necessidades fisiológicas dessas células só podem ser desenvolvidos baseados em conhecimentos sobre o metabolismo dessas células. Entender seu metabolismo, suas limitações e necessidades é bastante importante para o avanço da tecnologia de cultivo destas células, e ainda há muito para se aprender nesta área (Chou, 2014).

Apesar de serem capazes de consumir uma variedade de carboidratos como fonte de carbono, como frutose, maltose e trealose, a glicose é a fonte de carbono e energia preferencial das células de inseto e sua taxa específica de consumo por essas células é alta, sendo maior do que a de células de mamífero, por exemplo.

Porém, na ausência de glicose, algumas células de inseto também são capazes de consumir frutose e maltose. Trealose, o carboidrato mais abundante na hemolinfa, e sacarose não são normalmente consumidos, mas há registro de consumo de sacarose por Sf-9 após sua infecção com baculovírus (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012; Ikononou, Schneider e Agathos, 2003).

Em cultivos *in vitro*, o metabolismo de carboidratos das células de inseto é parecido com o de outras células eucariontes, apresentando um ciclo TCA totalmente funcional. No entanto, a produção de lactato no cultivo de células de inseto é bem menor do que no cultivo de células de mamífero. Células de inseto produzem lactato apenas em condições de stress (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012; Ikonomou, Schneider e Agathos, 2003). No cultivo de células Sf-9, por exemplo, até 80% do piruvato gerado é canalizado para o ciclo TCA, quando as condições de crescimento são adequadas (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012).

Em algumas linhagens celulares, como a Sf-9, a falta de glicose pode desencadear o processo de apoptose; já seu excesso leva ao acúmulo subprodutos, como alanina (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012).

O metabolismo de lipídeos das células de inseto é incompleto, sendo a capacidade delas de sintetizar, alongar e dessaturar ácidos graxos limitada. Além disso, elas não são capazes de produzir colesterol, que é necessário na formação de membranas e na produção de hormônios. Dessa forma é preciso suplementar o meio de cultivo com lipídeos, pois sua ausência leva a degeneração celular e atrapalha a produção de partículas virais (Ikonomou, Schneider e Agathos, 2003; Ohman *et al.*, 1996).

As células de inseto podem empregar aminoácidos tanto na biossíntese como para geração de energia e tem sido assumido que as células de inseto não são capazes de produzir a maioria deles. Alguns estudos, no entanto, mostraram que as células Sf-9 são capazes de crescer em meios sem glutamina, glutamato ou aspartato, desde que íons amônio estejam presentes no meio (Ikonomou, Schneider e Agathos, 2003; Ohman *et al.*, 1996).

Os aminoácidos que podem ser usados como fonte de energia são glutamina, glutamato, aspartato, serina, arginina, asparagina e metionina. Dentre esses, a glutamina é considerada o mais importante no cultivo de células de linhagem Sf, pois em situações de limitação de glicose, estas células são capazes de converter glutamina em glutamato e este é convertido a α -cetoglutarato, que alimenta o ciclo TCA, produzindo energia (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012).

No entanto, Chou (2014) conseguiu uma concentração celular mais alta cultivando as células Sf-21 em meio sem glutamina do que no cultivo em meio

contendo glutamina, indo contra o consenso de que a presença de glutamina no meio de cultivo é imprescindível para células de inseto.

Esse resultado seria explicado pela presença de duas vias metabólicas, a via da glutamina sintase (GS), na qual a glutamina necessária para o crescimento celular seria produzida a partir de glutamato e íons amônio, e a via NADH-GOGAT, que a custo de uma molécula de NADH transfere o nitrogênio do grupamento amida da glutamina para uma molécula de α -cetoglutarato, formando duas moléculas de glutamato (Chou, 2014). Ambas essas vias estão presentes nas células Sf-9 (Drews, Doverskog e Lars, 2000).

Devido à via NADH-GOGAT, uma alta concentração de glutamina iria deslocar o metabolismo da célula para a produção de glutamato, a custa de NADH e α -cetoglutarato, ambos importantes para a produção de energia e para o crescimento celular. O primeiro é usado para gerar ATP através de fosforilação oxidativa e o segundo é um intermediário do ciclo TCA (Chou, 2014).

Os principais subprodutos gerados pelo metabolismo das células de inseto são alanina e amônio, decorrentes do metabolismo de aminoácidos, e lactato, decorrente do metabolismo da glicose. Tanto o amônio quanto o lactato, a partir de certa concentração, são tóxicos para as células de inseto, por isso as condições de cultivo empregadas devem ser tais que minimizem a geração destes subprodutos (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012).

Na tabela 01 são apresentados os coeficientes metabólicos de consumo e produção dos substratos e subprodutos mais importantes no cultivo de células de inseto de duas das linhagens celulares mais empregados atualmente, a High-Five e a Sf-9.

Tabela 1– Coeficientes metabólicos das fases de crescimento e infecção das células High-Five e Sf-9 cultivadas em meio sem soro e sob condições nutricionais não-limitantes

Taxas metabólicas ($\mu\text{mol}/10^9 \text{ cél.h}$)	Fase de crescimento		Fase de infecção	
	High-Five	Sf-9	High-Five	Sf-9
Consumo de glicose	100 - 200	21 - 93	160 - 260	59 - 61
Consumo de glutamina	34 - 54	23 - 40	58 - 78	18 - 19
Consumo de oxigênio	200 - 460	280 - 650	320 - 1220	200 - 760
Produção de lactato	6 - 25	4 - 12	14 - 39	3
Produção de amônio	55 - 180	2 - 18	38 - 46	22
Produção de alanina	32 - 54	39 - 45	21 - 50	27 - 28

Fonte: adaptado de Drugmand, Schneider e Agathos (2012).

3.5 Cultivo de células de inseto

A otimização de um processo produtivo que emprega o sistema células de inseto/baculovírus deve focar nas duas etapas do processo, a etapa de crescimento celular e a etapa de infecção com o baculovírus. Apesar de ser na etapa de infecção que ocorre a formação do bioproduto de interesse, a eficiência do processo de infecção e seu rendimento é bastante dependente do estado fisiológico das células.

Devido a essa dependência, a etapa de desenvolvimento celular tem igual importância no processo produtivo que a etapa de infecção, e também precisa ser otimizada (Deutschmann e Jäger, 1994).

A técnica de cultivo de células de inseto é uma adaptação do cultivo de células de mamíferos. Porém apesar de semelhantes, o cultivo destes dois tipos de células possui algumas diferenças significativas (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012).

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 outro fator bastante importante na otimização do cultivo de células de inseto. O pH ideal varia de acordo com a célula empregada no processo, porém costuma ficar por volta de 6,2. 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, Schneider e Agathos, 2012).

As células de inseto não são muito sensíveis a variações na osmolaridade, sendo capazes de se manterem viáveis em osmolaridades de 250 a 450 mOsm/Kg, nem à tensão de cisalhamento, podendo suportar um stress muito maior do que células de mamíferos, causado por biorreatores agitados mecanicamente ou do tipo coluna de bolhas (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012).

É sabido que a concentração de oxigênio dissolvido (O.D.) no meio de cultivo é bastante importante tanto para o desenvolvimento das células quanto para se obter um bom rendimento dos produtos desejados. Vários estudos foram realizados buscando determinar qual o melhor valor de OD para o cultivo de células de inseto (tabela 02).

É importante ressaltar que os diferentes estudos usaram diferentes modelos de biorreatores e formas de aeração. Os resultados obtidos variaram consideravelmente. Não existe um consenso sobre o valor ideal de OD no qual as células de inseto se desenvolvem melhor, mas acredita-se que este valor esteja entre 30% e 100% da saturação com ar atmosférico (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012; Palomares e Ramirez, 1996; Schmid, 1996).

Tabela 2– Estudos em biorreatores examinando o efeito de diferentes concentrações de oxigênio dissolvido no crescimento de células de inseto

Linhagem celular	Setpoint O.D. (% de saturação com ar) ^a	Parâmetro estudado	Referência
Sf-21	40, <u>70</u> , 100	$\mu_{\text{máx}}$	Deutschmann e Jäger (1994)
Tn-368	15, <u>50</u> , 100	$\mu_{\text{máx}}$	Hink e Strauss (1980) e Hink (1992), <i>apud</i> Schmid 1996, p46
Sf-9	10, <u>65</u> , 110	$\mu_{\text{máx}}$	Jain <i>et al.</i> (1991), <i>apud</i> Schmid 1996, p46
Sf-9	<u>20</u> , 40, 60, 80	$\mu_{\text{máx}}$	Klöppinger <i>et al.</i> (1990), <i>apud</i> Schmid 1996, p46
Sf-9	<u>30 - 60</u>	$\mu_{\text{máx}}$	Schlaeger e Schimid resultados não publicados, <i>apud</i> Schmid 1996, p46
Sf-9	<u>5</u> , 10, 50 100	$\mu_{\text{máx}}$	Hensler e Agathos (1994), <i>apud</i> Schmid 1996, p46
Bm5	10, <u>20</u> , <u>30</u> , 40, <u>60</u>	$\mu_{\text{máx}}$	Zhang <i>et al.</i> (1994), <i>apud</i> Schmid 1996, p46
Sf-9	2, <u>5</u> , 10, <u>30</u>	$\mu_{\text{máx}}$	Palomares e Ramirez (1996)
Sf-9	<u>2</u> , 5, 10, 30	$X_{v\text{máx}}$	Palomares e Ramirez (1996)

^a valores de O.D. sublinhados são os que levaram a um maior valor do parâmetro estudado

. Fonte: adaptado de Drugmand, Schneider e Agathos (2012) e Schmid (1996).

3.6 Forma de operação do biorreator

Outro fator que exerce muita influência na densidade celular alcançada, assim como na produtividade do processo, é a forma de operação do biorreator escolhida, pois ela afeta as condições nutricionais e ambientais no interior do biorreator (Shojaosadati *et al.*, 2008).

As três principais formas de operação do biorreator são batelada, batelada alimentada (fed-batch) e sistema contínuo, com suas variações.

O cultivo em batelada é o mais simples e o que exige menor investimento com equipamentos, porém com ele é mais difícil alcançar uma alta densidade celular, seja por limitação de nutrientes essenciais, ou por acúmulo de subprodutos tóxicos, como lactato, gerados devido ao excesso de substrato no início do processo.

O cultivo contínuo evita a limitação do crescimento por falta de nutrientes ou por inibição por subprodutos tóxicos. Uma variação do cultivo contínuo é o cultivo em perfusão, no qual um sistema de retenção de células é instalado dentro ou fora

do biorreator, possibilitando obter altas densidades celulares, assim como uma maior produtividade. Porém este sistema consome muito meio, pode diluir o produto final, além de que os sistemas de retenção celular normalmente são caros e podem danificar as células (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012; Shojaosadati *et al.*, 2008).

No caso do uso células de inseto infectadas com baculovírus, o cultivo em perfusão é difícil de ser empregado, pois ele pressupõe que o processo atingirá o estado estacionário e uma das características de processos empregando o sistema células de inseto-baculovírus é ser um processo transiente, devido à liberação de vírus ao final de cada ciclo (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012).

A forma de cultivo em batelada alimentada seria um intermediário entre cultivo em batelada e cultivo contínuo. Neste sistema o cultivo é iniciado como uma batelada com volume reduzido e, em algum momento durante o cultivo, passa-se a adicionar meio fresco ao reator, porém não há saída de material do biorreator. O sistema de batelada alimentada é o mais empregado na obtenção de cultivo de alta densidade celular (Shojaosadati *et al.*, 2008).

As principais vantagens desta forma de operação do biorreator na obtenção de altas densidades celulares são que ela estende a fase log do crescimento celular (fase de maior atividade celular e, no caso do sistema célula de inseto-baculovírus, a mais indicada para infecção), ela permite controlar a produção de subprodutos tóxicos e impede possíveis efeitos de inibição por excesso de substrato, alimentando no biorreator somente os nutrientes necessários e na concentração que a célula precisa para se desenvolver ou formar o produto (Shojaosadati *et al.*, 2008).

O cultivo em batelada alimentada foi empregado para aumentar a produção de rAAV e para aumentar a produção de rhNGF, por exemplo, ambos usando células de inseto. Mesmo assim, é preciso ter cuidado na hora de escolher a forma como será feita a alimentação, ou estratégia de alimentação, se através de pulsos, da adição do substrato limitante continuamente. Esta estratégia de alimentação é um dos principais fatores a determinar o sucesso ou falha de um processo em batelada alimentada (Liu *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 1993; Shojaosadati *et al.*, 2008).

4. Materiais e Métodos

4.1 Linhagem celular

Foram utilizadas células da linhagem Sf-9, adaptadas para meio SF900 III (Life Technologies, Grand Island, EUA), derivada da lagarta *Spodoptera frugiperda*, código de referência: 12659-017. Estas células são clones gerados a partir da linhagem original IPLB-Sf-21-AE. As células foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido e em ultrafreezer a – 80 °C.

4.2 Meio de cultura, aminoácidos e baculovírus

O meio sem soro SF900™ III SFM foi obtido da empresa Life Technologies, código de referência: 12658-027. Nos testes com suplementação, os aminoácidos utilizados foram cisteína, asparagina, serina e prolina, comprados da Merck.

O isolado I-19 do baculovírus *Spodoptera* (*Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus) foi utilizado neste trabalho. Esse isolado foi coletado no campo pelo Dr. Fernando Hercos Valicente (Embrapa Milho e Sorgo) a partir de larvas de *Spodoptera frugiperda* infectadas. O isolado SfMNPV I-19 foi multiplicado em cultura de células na forma de BVs, a partir da hemolinfa do inseto, pela Dra. Marlinda Lobo de Souza (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia). Foram cedidos dois lotes de suspensão viral para serem utilizados nos experimentos em nosso laboratório.

4.3 Preparo do banco e manutenção das células no laboratório

A manutenção das células foi realizada em frascos schott mantidos em shaker orbital com agitação de 130 rpm e temperatura controlada a 28°C.

A cultura foi então centrifugada a aproximadamente 2500 RCF por 4 minutos para a sedimentação das células. O sobrenadante foi separado para posterior uso e as células ressuspensas para uma concentração próxima de $2 \cdot 10^7$ cel. viáveis/mL no meio de criopreservação (constituído por 50% de meio novo, 40% de SFB e 10%

de DMSO). Alíquotas de 1 mL da suspensão celular em meio de criopreservação foram transferidas para criotubos de 1,5mL (aproximadamente 20 criotubos).

Os criotubos foram colocados em um container de congelamento, Mr. Frosty™ (Número de catálogo: 5100-0001, ThermoFischer, EUA), para abaixamento da temperatura em uma taxa de 1°C/min e posto no freezer a -80°C por 24 horas. Após esse período, os criotubos foram armazenados em nitrogênio líquido a -196°C.

4.4 Descongelamento

Para o descongelamento, o criotubo foi colocado diretamente em banho-maria a aproximadamente 37°C. O conteúdo do criotubo foi transferido para um schott de 100 mL contendo 20 mL de meio de cultivo novo a 28°C. O frasco foi então incubado a 28°C e 130 rpm e repicado a cada 3 dias, antes de a fase exponencial de crescimento ter terminado.

4.5 Cultivo de células em frascos schott

Em frascos schott foram realizados ensaios referência, de suplementação do meio com diferentes aminoácidos, diferentes taxas de transferência de oxigênio e os testes iniciais de infecção. A condição padrão original de cultivo foi 28°C, 130 rpm e 20 mL de volume final em frasco de 100 mL. Em alguns ensaios, o volume do frasco foi alterado para 500 mL. Em alguns testes foi utilizada agitação de 160 rpm. Com exceção dos ensaios com infecção, todos os ensaios em schott foram realizados em triplicata, porém houve ensaios em que uma das triplicatas foi descartada devido a contaminação ou desenvolvimento anormal das células. Quando for o caso, será informado na discussão dos resultados.

4.5.1 Testes com suplementação de aminoácidos

A suplementação de aminoácidos foi feita com base em suas concentrações no meio SF900II. As concentrações de aminoácidos do meio referência estão resumidas na tabela 03. Essas concentrações foram obtidas por análise em HPLC.

Tabela 3– Concentração de aminoácidos no meio SF900II

Aminoácidos	Concentração (g/L)
Alanina	0,36
Arginina	2,217
Asparagina	1,06
Aspartato	1,161
Cisteína	0,131
Fenilalanina	0,947
Glicina	0,72
Glutamato	2,053
Glutamina	1,936
Histidina	0,41
Isoleucina	0,76
Leucina	0,42
Lisina	0,876
Metionina	1,162
Prolina	0,767
Serina	0,661
Tirosina	0,301
Treonina	0,35
Valina	0,808

Fonte: Vieira (2010)

Foram realizados ensaios com 150% e 200% das concentrações iniciais dos aminoácidos testados (cisteína, prolina, asparagina e serina). A suplementação foi feita adicionando ao meio de cultivo uma solução aquosa estéril concentrada do aminoácido a ser testado.

As concentrações teóricas obtidas após a suplementação do meio estão descritas na tabela 04.

Tabela 4– Concentração de aminoácidos no meio pós-suplementação

Aminoácidos	Concentração (g/L)	
Cisteína	0,197	(150%)
	0,262	(200%)
Prolina	1,151	(150%)
	1,53	(200%)
Asparagina	1,59	(150%)
	2,12	(200%)
Serina	0,992	(150%)
	1,322	(200%)

Fonte: Autor

Foram realizados ensaios com 200% prolina e com 200% cisteína total, nos quais a suplementação de 100% foi realizada no início do cultivo (dia 0) e ensaios em que a suplementação foi feita no terceiro dia de cultivo. Já a suplementação com asparagina e com serina, tanto nos ensaios com 150% quanto nos com 200% da concentração inicial, foram feitas apenas no dia 0.

A suplementação com prolina foi feita apenas em schotts de 100 mL, a adição de asparagina e de serina ao meio foram realizadas apenas em schotts de 500 mL e a cisteína foi suplementada em cultivos em schotts de 100 mL e de 500 mL.

4.5.2 Testes de transferência de oxigênio

Duas formas de aumentar a transferência de oxigênio em cultivos em frascos schott foram testadas. A primeira foi aumentar a frequência de agitação e a segunda foi aumentar o volume do frasco, elevando a razão entre a área de troca gasosa e o volume de cultivo. Não foi determinada a taxa de transferência de oxigênio em nenhuma das condições testadas, sendo esta variada de modo qualitativo.

Nos ensaios com maior frequência de agitação, a agitação passou de 130 rpm para 160 rpm, e nos ensaios com menor altura de líquido, o volume do cultivo foi mantido constante, mas no lugar de schotts de 100 mL, foram usados schotts de 500 mL.

4.5.3 Testes iniciais de infecção

Para os testes iniciais de infecção, realizados em frasco schotts, os cultivos foram conduzidos em condição otimizada (28 °C, 130 RPM, 20 mL de cultivo em frascos de 500 mL) com meio sem suplementação e meio suplementado com cisteína.

O cultivo foi conduzido normalmente até que a concentração de células viáveis estivesse dentro da faixa desejável, de $3,5 - 4,5 \cdot 10^6$ cél/mL.

Ao atingir a concentração celular adequada, os cultivos foram infectados com volume de suspensão viral suficiente para se obter uma relação teórica de número de partículas virais por número de células viáveis (MOI) de aproximadamente 1.

Para o cálculo do valor de MOI dos experimentos realizados com o primeiro lote de suspensão viral foi considerado o título viral informado pela Dra. Marlinda Lobo de Souza ($7,5 \times 10^7$ pfu/ml).

O título viral do segundo lote de suspensão viral não foi informado. Para estimar o título deste lote foi realizado um experimento de infecção comparativo em garrafas T-25, infectando garrafas inoculadas com mesmo número de células com um volume igual dos dois lotes de suspensão viral.

4.6 Cultivo de células em Biorreator

Nos testes em biorreator foi utilizado um do modelo BioFlo 110 (Eppendorf, Estados Unidos) com o volume útil de um litro. O equipamento dispõe de completo sistema de controle das variáveis de processo (oxigênio dissolvido, pH, temperatura e frequência de agitação). Adicionalmente, há um programa desenvolvido no laboratório em LabVIEW (National Instruments, Estados Unidos) e implementado em microcomputador, para aquisição e visualização gráfica em tempo real das variáveis.

Para o controle de oxigênio dissolvido foi usado um MFC (controlador mássico de vazão), para garantir uma vazão total de gases constante, e o sistema do próprio biorreator (conjunto de válvulas solenóides), que permite a mistura de nitrogênio, ar e oxigênio, variando a concentração de oxigênio no gás de entrada no biorreator de forma a manter a concentração de oxigênio dissolvido no meio constante.

Essa combinação permite um controle acurado da vazão de gás e da fração de oxigênio que entra no sistema.

Todos os ensaios em biorreator foram conduzidos a 28°C, com agitação de 80 rpm e aeração por borbulhamento.

O pH foi apenas monitorado nos cultivos em biorreator. Não houve necessidade de controlar o pH, pois o crescimento celular não gerou grandes alterações desta variável.

4.6.1 Testes de concentração de oxigênio dissolvido (O.D.)

Para testar a influência da O.D. no crescimento de células Sf-9, foram conduzidos cultivos em biorreator com O.D. controlada em 10%, 30% e 50% da saturação com ar atmosférico. Foi utilizada uma vazão gasosa de 0,2 L/min para a aeração dos cultivos.

4.6.2 Teste de suplementação com aminoácido

O teste de suplementação do meio realizado em biorreator foi conduzido com O.D. controlada em 30% e aeração de 0,2 L/min. Para a suplementação, seguiu-se a mesma metodologia dos testes de suplementação em frascos schott. Porém apenas a suplementação com cisteína foi testada em cultivos em biorreator.

4.6.3 Testes de infecção

Os testes de infecção em biorreator também foram realizados com O.D. controlada em 30% da saturação com ar atmosférico e foi usada uma relação teórica de partículas virais e células viáveis (MOI) igual a 1, tendo como referência a concentração viral informada pela Dra. Marlinda Lobo de Souza.

Foram realizados ensaios com vazão gasosa de 0,2 L/min (padrão adotado para os cultivos em biorreator) e de 0,05 L/min.

4.7 Inoculação do Biorreator

O inóculo do biorreator foi feito a partir de suspensões de células provenientes de frascos schott, completando-se com meio de cultura fresco. O volume de inóculo foi calculado de modo a se obter uma concentração celular inicial no reator de $4 \cdot 10^5$ células/mL.

4.8 Determinação das concentrações de células viáveis (X_v), de células totais e de células com poliedro (X_p)

Para determinação das concentrações de células viáveis, de células totais e de células com poliedro foi utilizado um hemacitômetro (câmara de Neubauer), sendo as células contadas com a ajuda de um microscópio óptico.

A diferenciação entre as células viáveis e não viáveis foi possível através do método de exclusão pela coloração com o corante Azul de Tripán com concentração de 0,4% (Sigma, Estados Unidos).

A concentração de células totais foi obtida através da soma das concentrações de células viáveis e não viáveis.

A distinção entre células com poliedro e sem poliedro foi feita visualmente, através da identificação de corpos de oclusão no interior do núcleo celular.

No caso dos testes em frascos schotts, as amostras foram retiradas em intervalos de aproximadamente 24 horas. Já nos testes em biorreator, o intervalo entre amostragens foi de aproximadamente 8 ou 12 horas.

4.9 Determinação da concentração de glicose, lactato, glutamina e glutamato

As amostras provenientes tanto de experimentos em biorreator quanto em frascos schotts foram centrifugadas por 4 min a aproximadamente 2500 RCF em centrífuga Spin VI (Incibrás, Brasil) e o sobrenadante congelado a -20 °C. Posteriormente, as amostras foram filtradas em membranas de 0,45 µm e processadas em analisador bioquímico YSI 2700 (Yellow Springs, Estados Unidos).

A tecnologia do sensor enzimático do YSI faz uso de uma ou mais enzimas imobilizadas em membranas que degradam um substrato específico e produzem peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o qual é oxidado no ânodo de platina que produz uma corrente proporcional à concentração do substrato degradado. Nas análises deste trabalho foram usadas membranas com enzimas específicas para glicose, glutamina, glutamato e lactato.

4.10 Determinação dos parâmetros cinéticos

A velocidade específica de crescimento máxima e a duração da fase exponencial foram determinadas pela curva de $\ln X_v = f(t)$. As demais velocidades específicas de crescimento celular e de consumo de substratos foram obtidas através de ajustes polinomiais (Spline) aos pontos experimentais. O fator de conversão de glicose a célula foi calculado durante a fase exponencial ($Y_{X/Glc}^{EXP}$) através da seguinte equação:

$$Y_{X/Glc}^{Exp} = \frac{X_v - X_{v_0}}{Glc_0 - Glc} \dots\dots\dots (1)$$

onde X_v é a concentração de células no final da fase exponencial, X_{v_0} é a concentração de células no início da fase exponencial, Glc_0 é a concentração de glicose no início da fase exponencial e Glc é a concentração de glicose no final da fase exponencial.

O consumo específico de oxigênio (q_{O_2}) foi calculado usando o método dinâmico. Nesse método a transferência de oxigênio do biorreator é interrompida para que a O.D. caia por alguns minutos (sem atingir a 10% da saturação com o ar)

e depois a transferência é retomada. Para se interromper a transferência, costuma-se zerar a vazão gasosa e diminuir a frequência de agitação, porém é sabido que mesmo assim ainda ocorre uma transferência de oxigênio residual. O valor da velocidade de consumo de oxigênio (OUR) de determinado instante do cultivo corresponde ao oposto da tangente da inclinação da reta obtida plotando-se a O.D. pelo tempo, durante o intervalo sem transferência. O q_{O_2} é calculado dividindo-se OUR pelo valor de X_v no momento da realização do método dinâmico (Pamboukian, 2007).

O fenômeno da queda da concentração de oxigênio dissolvido devida à respiração celular na ausência de transferência de oxigênio para o meio pode ser descrito pela equação 2.

$$\frac{d(O.D.)}{dt} = -OUR = -q_{O_2} \cdot X_v \quad \dots\dots\dots (2)$$

Onde: O.D. é a concentração de oxigênio dissolvido (mgO_2/mL), t é o tempo (d), OUR é a velocidade de consumo de oxigênio de O_2 ($mgO_2/mL.d$), q_{O_2} é a taxa específica de consumo de O_2 ($mgO_2/cél.d$) e X_v é a concentração de células viáveis ($cél/mL$).

A produção específica de dióxido de carbono (q_{CO_2}) foi calculada através do balanço de CO_2 na fase gasosa. A fração de CO_2 na corrente de saída de gases do biorreator foi medida através de um analisador de gases (Applikon Biotechnology, Delft, Holanda). Conhecida a quantidade de CO_2 na corrente de entrada, baseado em sua concentração no ar atmosférico e assumindo estado pseudo-estacionário, foi feito balanço de massa de dióxido de carbono na fase gasosa, assim foi estimada a taxa de produção de dióxido de carbono (CER). O q_{CO_2} é obtido através da divisão de CER pela concentração celular. O balanço de CO_2 na fase gasosa pode ser descrito pela equação 3.

$$CER = \frac{Q_o \cdot y_{CO_2o} - Q_i \cdot y_{CO_2i}}{V} = q_{CO_2} \cdot X_v \quad \dots\dots\dots (3)$$

Onde: CER é taxa de produção de dióxido de carbono ($\text{molCO}_2/\text{mL.min}$), V é o volume de cultivo (mL), Q_o é a vazão de saída de gás (mol/min), y_{CO_2o} é fração de CO_2 no gás de saída, Q_i é a vazão de entrada de gás (mol/min), y_{CO_2i} é a fração de CO_2 no gás de entrada, considerada igual a 0,0001 (leitura com ar), q_{CO_2} é a produção específica de dióxido de carbono ($\text{molCO}_2/\text{cél.min}$) e X_v é a concentração de células viáveis (cél/mL).

Devido à grande variação da concentração de oxigênio no gás de entrada do biorreator durante os cultivos, não foi possível calcular q_{O_2} pelo balanço gasoso.

4.11 Microscopia eletrônica

Para análise ultraestrutural, as amostras de células controle e infectadas foram inicialmente fixadas em tampão de cacodilato de sódio 0,1M e glutaraldeído 2,5%. Após tratamento com tampão de pós-fixação contendo tetróxido 1%, a amostra foi submetida a uma serie de desidratações em etanol 30%, 70%, 90% e 100%, e condicionada em resina spurr. Em seguida, o bloco foi cortado em seções finas com ultramicrotomo (navalha de diamante) e colocado sobre telinhas de cobre. Finalmente, as telinhas com amostras foram coradas com acetato de uranila 2% e visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011.

A análise por microscopia eletrônica foi realizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com amostras enviadas para a Dra. Marlinda Lobos de Souza.

4.12 Análise dos resultados

Com os dados obtidos das análises das amostras, foram plotados os gráficos para o cálculo dos principais parâmetros cinéticos do processo, que permitiram comparar os processos.

Foram estudadas as seguintes cinéticas:

- de crescimento celular (concentração celular x tempo);
- do consumo de substrato (concentração de glicose x tempo);
- da formação de inibidores (concentração de lactato x tempo);
- de infecção (concentração de células com poliedro x tempo).

Como forma alternativa de acompanhar o acúmulo de poliedros no interior das células, foram realizadas corridas de eletroforese em gel de poliacrilamida com amostras retiradas de alguns cultivos infectados, apresentadas no apêndice.

Foram calculados os parâmetros: $\mu_{\max}$ (velocidade específica de crescimento máxima), $X_{v\max}$ (concentração celular máxima) e $Y_{X/Glc}^{Exp}$ (fator de conversão glicose à célula na fase exponencial), tanto para ensaios em schott quanto para ensaios em biorreator, e q_{O_2} (consumo específico de oxigênio) e q_{CO_2} (produção específica de CO_2) para os ensaios em biorreator. Tais parâmetros foram associados às condições de ensaio (OD e suplementação do meio) para determinação dos melhores parâmetros do processo.

Para análise estatística dos resultados os testes utilizados foram ANOVA one-way e teste de Tukey e a análise foi realizada com o auxílio do software ASSISTAT versão 7.7, software desenvolvido pelo Prof. Dr. Francisco de A. S. e Silva da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Brasil, e está disponível online (<http://www.assistat.com>).

Não foi feita a análise estatística dos dados dos ensaios de infecção e dos ensaios em biorreator, pois estes não foram conduzidos em replicata.

5. Resultados e discussão

5.1 Ensaios em frascos schott

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório de cinética de crescimento de células Sf-21 (linhagem parental das células Sf-9) em meio SF900III mostraram que a concentração de glicose residual no meio no momento que as células saíram da fase exponencial de crescimento era bastante alta, entre 6 g/L e 8 g/L, mais da metade de sua concentração inicial (10g/L). Já a concentração de glutamina caiu bastante, de 1,6g/L para aproximadamente 0,3g/L (gráfico 01). Esses dados indicam que não há limitação do crescimento por falta de glicose, mas que é possível que haja por falta de glutamina.

Gráfico 1– Cultivo de células Sf-21 em frascos schotts com meio SF900III em condições padrão.

Fonte: Del Padre (2016)

Estudos sobre o crescimento de células S2, usando o meio SF900II concluíram que não havia limitação de glicose e apontaram um grande consumo de asparagina, glutamina, serina, prolina e cisteína (Vieira, 2010).

Os ensaios iniciais com células Sf-9 em meio SF900III também mostraram que não há limitação por glicose, porém, diferentemente do que foi visto nos ensaios com as células Sf-21, notou-se que a concentração de glutamina quando as células

saem da fase exponencial ainda é relativamente alta (entre 0,8 g/L e 1,2 g/L), indicando que não há limitação por falta deste aminoácido (gráfico 02).

Gráfico 2– Dados obtidos durante o cultivo de células Sf-9 em frascos schotts com meio SF900III em condições padrão

Fonte: Autor

Como para a otimização da produção do baculovírus é necessário garantir uma elevada concentração de células no momento da infecção em adequado estado fisiológico, buscou-se aqui otimizar o crescimento de células Sf-9. Baseado nos dados acima foi levantada a hipótese de que os possíveis substratos limitantes para o crescimento de células Sf-9 no meio SF900III seriam cisteína, asparagina, serina ou prolina. Para testar esta hipótese foram conduzidos ensaios com suplementação desses aminoácidos isoladamente.

5.1.1 Suplementação com cisteína em frascos schotts de 100 mL

Devido à dificuldade de solubilizar a cisteína em meios aquosos, sua concentração no meio SF900III é baixa (em torno de 0,13 g/L), o que fortalece a hipótese deste aminoácido ser limitante para o crescimento celular nesse meio.

Foram realizados ensaios em frascos schotts de 100 mL com a suplementação do meio de cultivo com diferentes concentrações de cisteína. Os resultados destes ensaios estão resumidos nos gráficos 03, 04 e 05.

Gráfico 3– Concentração de células viáveis (Xv), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis (Ln(Xv)) e viabilidade dos ensaios com adição de cisteína e ensaio controle em schotts de 100 mL

Fonte: Autor.

Gráfico 4 – Cinética de crescimento de células viáveis (Xv), consumo de glicose (Glc) e produção de lactato (Lac) dos ensaios com adição de cisteína e ensaio controle em schotts de 100 mL

Fonte: Autor

Quando comparados os 3 ensaios com adição de cisteína ao meio em frascos de 100 mL e o controle, é possível perceber que são bastante semelhantes quanto à

cinética de crescimento celular e consumo de glicose, apresentando uma pequena diferença quanto à produção de lactato (gráficos 03 e 04).

A análise dos valores de $\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/\text{Glc}}^{\text{Exp}}$ mostra que não existe correlação entre o valor destes parâmetros e a adição de cisteína. No caso de $X_{V\text{máx}}$, existe uma aparente tendência de aumento com suplementação, já que todos os ensaios com cisteína apresentaram um valor médio maior do que o controle (gráfico 05).

Gráfico 5 – Valores de (a) $\mu_{\text{máx}}$, (b) $Y_{X/\text{Glc}}^{\text{Exp}}$ e (c) $X_{V\text{máx}}$ obtidos nos ensaios com suplementação de cisteína em schotts de 100 mL realizados em triplicata. As barras de erro representam o desvio padrão calculado entre as repetições de cada condição

Fonte: Autor.

Estes resultados estariam de acordo com os resultados que Vieira (2010) obteve para células S2 e indicariam um prolongamento da fase exponencial de crescimento.

Porém a análise estatística dos dados obtidos neste experimento refutou a hipótese de que $X_{V\text{máx}}$ foi maior nos ensaios com suplementação. De acordo com a análise realizada, não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros cinéticos estudados (tabela 05).

Tabela 5– Resultado da análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios com suplementação de cisteína em schotts de 100 mL.

	$Xv_{máx}$		$\mu_{máx}$		$Y_{X/Glc}$	
Controle	8,08	a*	0,579	a	2,590	a
150% Cis	8,93	a	0,588	a	3,047	a
200% Cis(0)	9,12	a	0,566	a	3,060	a
200% Cis (3)	8,64	a	0,571	a	2,683	a
p-valor	0,4301		0,5132		0,3129	

*Letras iguais indicam que não houve diferença significativa

Fonte: Autor

No gráfico 04 é possível observar que houve acúmulo de lactato ao final do cultivo em todos os ensaios, principalmente no controle. No gráfico 06 o acúmulo de lactato pode ser analisado com mais precisão, mostrando um aumento da concentração de lactato de 5 a mais de 20 vezes ao final do experimento.

Gráfico 6- Cinética de produção de lactato (Lac) dos ensaios com adição de cisteína e ensaio controle em schotts de 100 mL

Fonte: Autor

No cultivo de células de inseto o acúmulo de lactato normalmente indica falta de oxigênio dissolvido no meio de cultivo (Bédard, Tom e Kamen, 1993; Benslimane *et al.*, 2005).

Esse acúmulo levantou a dúvida se a limitação do crescimento nestes experimentos foi devida à falta de cisteína, de oxigênio ou à falta de ambos.

Para confirmar se houve limitação de oxigênio nos cultivos em schotts de 100 mL foram realizados ensaios aumentando a transferência de oxigênio.

5.1.2 Ensaios com diferentes taxas de transferência de oxigênio

Conforme mencionado no item 5.1.1 durante os primeiros ensaios com suplementação de cisteína notou-se o acúmulo de lactato no meio de cultivo, um indicador de falta de oxigênio no cultivo de células de inseto. Para contornar esta limitação foram testadas duas formas de aumentar a taxa de transferência de oxigênio do sistema, aumentar a agitação e diminuir a altura de meio de cultivo.

Para isso foram realizados ensaios em schotts de 100 mL com uma frequência de agitação de 130 (controle) e 160 rpm e ensaios em schotts de 500 mL com agitação de 130 rpm, todos com 20 mL de cultivo. Os resultados destes testes estão resumidos no gráfico 07.

Gráfico 7 - Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis ($\ln(X_v)$) e viabilidade dos ensaios com diferentes formas de aumentar a taxa de transferência de oxigênio, onde con=controle (130 rpm, 100mL); 160=(160 rpm, 100 mL); 500mL=(130 rpm, 500mL)

Fonte: Autor

Gráfico 8 – Cinéticas de crescimento células viáveis (Xv), consumo de glicose (Glc) e produção de lactato (Lac) dos ensaios com diferentes formas de aumentar a taxa de transferência de oxigênio, onde com = controle (130 rpm, 100mL); 160 = (160 rpm, 100 mL); 500mL = (130 rpm, 500mL)

Fonte: Autor

Ambos os métodos utilizados para aumentar a transferência de oxigênio levaram a alguma diminuição da produção de lactato, porém aumentar o volume do frasco utilizado se mostrou muito mais eficiente para esse propósito (gráfico 08).

Gráfico 9 - – Valores de (a) $\mu_{\text{máx}}$, (b) $Y_{X/\text{Glc}}^{\text{Exp}}$ e (c) $X_{v\text{máx}}$ obtidos nos ensaios com diferentes formas de aumentar a taxa de transferência de oxigênio. Onde con=controle (130 rpm, 100mL); 160=(160 rpm, 100 mL); 500mL=(130 rpm, 500mL)

Fonte: Autor

O aumento da frequência de agitação causou um leve decréscimo da produção de lactato, porém houve um aumento significativo de $X_{v\text{máx}}$. Além de alterar $X_{v\text{máx}}$, o aumento da agitação levou a uma aparente diminuição de $Y_{X/\text{Glc}}^{\text{Exp}}$, mas não causou alteração em $\mu_{\text{máx}}$ (gráfico 09).

De alguma forma, a frequência de agitação mais elevada levou a uma fase exponencial mais prolongada. Uma possível explicação para isso é que a agitação maior foi capaz de aumentar a disponibilidade de oxigênio para as células, porém a tensão de cisalhamento causada pela agitação foi estressante para as células, levando elas a produzirem certa quantidade de lactato e glicerol (dado não mostrado), o que teria causado acúmulo de lactato no meio e diminuição de $Y_{X/\text{Glc}}^{\text{Exp}}$.

Já o emprego de frascos maiores visando diminuir a altura de líquido no interior do frasco foi extremamente eficiente na redução da produção de lactato, praticamente eliminando seu acúmulo no meio e aumentando $X_{v\text{máx}}$, sem causar qualquer efeito negativo sobre nenhuma das variáveis estudadas.

A análise estatística dos dados confirmou que ambas as formas de aumentar a transferência de O_2 para o meio de cultivo tiveram levaram a um aumento de

$X_{v\text{máx}}$, porém as variações observadas nos outros parâmetros cinéticos estudados não foram estatisticamente significativas (tabela 06).

Tabela 6 – Resultado da análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios com diferentes taxas de transferências de O_2

	$X_{v\text{máx}}$		$\mu_{\text{máx}}$		$Y_{X/\text{Glc}}$	
Controle	8,17	b*	0,573	a	3,184	a
160 RPM	9,64	a	0,577	a	2,692	a
500 mL	10,05	a	0,590	a	3,487	a
<i>p-valor</i>	0,0029		0,4064		0,3821	

* Letras iguais indicam que não houve diferença significativa, letras diferentes indicam que houve diferença significativa

Fonte: Autor

Diante desses resultados, o emprego de schotts de 500 mL foi a forma escolhida para evitar que houvesse limitação de crescimento celular por falta de oxigênio.

5.1.3 Suplementação com cisteína em frascos schotts de 500 mL

Para confirmar o efeito da suplementação do meio de cultivo com cisteína sobre $X_{v\text{máx}}$, foram realizados novos ensaios com a adição deste aminoácido ao meio de cultivo, porém agora em schotts de 500 mL, para garantir que não houvesse limitação por falta de oxigênio.

Como praticamente não houve diferença entre os ensaios suplementados com cisteína no início do cultivo [Cis(dia0)] ou no terceiro dia de cultivo [Cis(dia3)] nos experimentos anteriores (gráficos 04 e 05) optou-se por não fazer a suplementação do meio ao terceiro dia.

Assim, visando ratificar os resultados da primeira cinética com suplementação de cisteína, foram conduzidos ensaios com 150% e 200% da concentração inicial de cisteína, dessa vez em schott de 500mL. Nesta bateria de ensaios foram realizados 2 ensaios sem suplementação, um em schotts de 100 mL e outro em schotts de 500 mL, para que fosse possível analisar tanto o efeito da suplementação, quanto do aumento de disponibilidade de oxigênio.

Gráfico 10– Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis ($\ln(X_v)$) e viabilidade dos ensaios com adição de cisteína em frascos de 500 mL e ensaios controle em frascos de 500 e 100 mL.

Fonte: Autor

Praticamente não houve variação no perfil de crescimento celular quando comparados os controles e os ensaios com adição de cisteína (gráfico 10).

No gráfico 11 é possível perceber que $\mu_{\text{máx}}$ praticamente não foi afetado nem pelo aumento do frasco empregado no cultivo, nem pela suplementação. No caso de $Y_{X/\text{Glc}}^{\text{Exp}}$, houve variação quando comparados os ensaios conduzidos em frascos de 500 mL com o controle feito em frasco de 100 mL (o controle feito em frasco de 100 mL nesta última bateria de ensaios apresentou valor de $Y_{X/\text{Glc}}^{\text{Exp}}$ semelhante aos obtidos na primeira bateria de ensaios, em frascos de 100 mL).

Gráfico 11 – Valores de (a) $\mu_{\text{máx}}$ e (b) $Y_{X/\text{Glc}}^{\text{Exp}}$ obtidos nos ensaios com suplementação de cisteína em schotts de 500 mL e nos controles de 100 mL e 500 mL.

Fonte: Autor

A análise estatística confirmou que a variação de $\mu_{\text{máx}}$ não foi estatisticamente significativa, já a variação no fator de conversão de glicose a biomassa do cultivo realizado em frasco de 100 mL foi significativamente menor do que dos cultivos realizados em frascos de 500 mL (tabela 07).

Dentre os ensaios realizados em frascos de 500 mL, aquele com 200% de cisteína apresentou um fator de conversão um pouco maior, porém também apresentou maior variância entre as triplicatas, de forma que é possível que essa diferença se deva a algum erro experimental, assim, conclui-se que o aumento de $Y_{X/\text{Glc}}^{\text{Exp}}$ seja devido ao aumento da transferência de oxigênio e não à suplementação com cisteína.

Tabela 7 – Resultado da análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios com suplementação de cisteína em schotts de 500 mL

	$Xv_{\text{máx}}$		$\mu_{\text{máx}}$		$Y_{X/\text{Glc}}$	
Con 100mL	9,543	a	0,530	a	2,526	b
Con 500mL	10,44	a	0,563	a	3,488	a
200% Cis 500	8,923	a	0,5733	a	3,897	a
150% Cis 500	11,017	a	0,607	a	3,497	a
p-valor	0,0677		0,2133		0,0057	

*Letras iguais indicam falta de diferença significativa e letras diferentes indicam diferença significativa
Fonte: Autor

Não foi possível realizar a amostragem do sexto dia de cultivo destes ensaios no intervalo de tempo correto. A sétima amostragem (correspondente ao sexto dia de cultivo) foi realizada aproximadamente 8 horas antes do que seria ideal e a oitava amostragem (correspondente ao sétimo dia de cultivo) foi realizada 8 horas após o que estava planejado.

Os cultivos de células Sf-9 realizados neste trabalho normalmente atingiram a máxima concentração de células viáveis neste intervalo, do sexto para o sétimo dia. Esse fato, juntamente com a forma não muito usual do gráfico que foi obtido ao serem plotados os dados de concentração celular viável deste experimento (gráfico 10), leva a crer que o valor verdadeiro de $Xv_{\text{máx}}$ ocorreu no intervalo entre as amostragens do sexto e sétimo dia.

Dessa forma, os valores de $Xv_{\text{máx}}$ nos ensaios deste experimento, cuja análise estatística indicou não haver variação significativa neste parâmetro, não são confiáveis. A concentração de células totais desses ensaios, juntamente com a

viabilidade, indica que $X_{v\text{máx}}$ dos cultivos com adição de cisteína foi um pouco maior do que dos controles, principalmente do cultivo realizado com 150% da concentração inicial de cisteína do meio (gráfico 12).

Gráfico 12 – Concentração de células totais (X_t) e viabilidade dos ensaios com adição de cisteína em frascos de 500 mL e ensaios controle em frascos de 500 e 100 mL.

Fonte: Autor

No gráfico 13 é possível observar que a mudança de frascos de 100 mL para frascos de 500 mL foi eficaz em evitar falta de oxigênio nos ensaios, uma vez que não houve acúmulo de lactato no meio em nenhum dos cultivos realizados os schotts de 500 mL.

Gráfico 13 – Cinética de crescimento células viáveis (Xv), consumo de glicose (Glc) e produção de lactato (Lac) dos ensaios com adição de cisteína em frascos de 500 mL e ensaios controle em frascos de 500 e 100 mL.

Fonte: Autor

5.1.4 Suplementação com prolina

Outra possibilidade apontada como substrato limitante foi a prolina. Foram feitos ensaios controle, com 150% da concentração inicial de prolina, 200% da concentração inicial de prolina com o meio tendo sido suplementado no início do cultivo e 200% da concentração inicial de prolina, com a suplementação tendo sido realizada ao terceiro dia de cultivo.

Uma das triplicatas do ensaio com suplementação com prolina no início do cultivo foi descartada por apresentar um crescimento anormal, com valores de $\mu_{\text{máx}}$ e $X_{\text{v máx}}$ bem menores do que das outras duas triplicatas.

Estes experimentos foram conduzidos em schotts de 100 mL, mas não houve acúmulo de lactato nos ensaios controle e com 150% de prolina (gráfico 14), resultado que vai contra o que foi notado nos ensaios com cisteína em schotts de 100 mL.

A adição deste aminoácido ao meio de cultivo não teve efeito no valor de $\mu_{\text{máx}}$, mas levou a uma aparente diminuição de $X_{\text{v máx}}$ (gráficos 15 e 16) e ambos os ensaios com 200% de prolina apresentaram uma produção de lactato muito grande (gráfico 14).

Gráfico 14– Cinética de crescimento de células viáveis (Xv), consumo de glicose (Glc) e produção de lactato (Lac) dos ensaios com adição de prolina e ensaio controle em frascos de 100 mL.

Fonte: Autor

Gráfico 15– Valores de (a) $\mu_{\max}$, (b) $Y_{X/Glc}^{Exp}$ e (c) $X_{v\max}$ obtidos nos ensaios com suplementação de prolina em schotts de 100 mL

Fonte: Autor

Gráfico 16 – Concentração de células viáveis (Xv), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [Ln(Xv)] e viabilidade dos ensaios com suplementação de prolina em schotts de 100 mL

Fonte: Autor

De fato, a análise estatística dos dados obtidos com o experimento com adição de prolina confirmou que todos os cultivos suplementados com este aminoácido apresentaram um $Xv_{\text{máx}}$ significativamente menor do que o controle, apesar de $\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/\text{Glc}}^{\text{Exp}}$ não terem variado significativamente (tabela 08).

Tabela 8 – Resultado da análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios com suplementação de prolina e ensaios controle em schotts de 100 mL

	$Xv_{\text{máx}}$		$\mu_{\text{máx}}$		$Y_{X/\text{Glc}}$	
Controle	10,333	a	0,550	a	2,680	a
150% Pro	8,870	b	0,560	a	2,406	a
200% Pro(0)	8,32	b	0,550	a	2,490	a
200% Pro(3)	8,103	b	0,550	a	2,243	a
p-valor	0,0001		0,4411		0,3119	

*Letras iguais indicam falta de diferença significativa e letras diferentes indicam diferença significativa
Fonte: Autor

Em seu trabalho com células S2 em meio SF900II, Vieira (2010) também observou uma diminuição de $Xv_{\text{máx}}$ ao adicionar prolina ao meio, porém, diferentemente do presente trabalho, naquele houve diminuição de $\mu_{\text{máx}}$, indicando inibição do crescimento pela prolina.

Os resultados obtidos neste trabalho não apontam para uma inibição por excesso de prolina como causa da diminuição de $X_{v\text{máx}}$, uma vez que todos os ensaios, incluindo o controle, apresentaram o mesmo padrão de crescimento e de consumo de glicose durante os primeiros 5 dias de cultivo e apresentaram o mesmo valor de $\mu_{\text{máx}}$ e valores de $Y_{X/\text{Glc}}^{\text{Exp}}$ bastante próximos.

Não é possível, com as análises realizadas neste trabalho, afirmar a causa da diminuição de $X_{v\text{máx}}$ nos ensaios com adição de prolina, nem o porquê de tão grande produção de lactato apenas nos ensaios com 200% de prolina, mas é provável que algum subproduto de seu metabolismo esteja acumulando no meio de cultivo a níveis que sejam tóxicos para as células.

Por causa dos resultados obtidos, a prolina foi descartada como substrato a ser testado em biorreator.

5.1.5 Suplementação com asparagina

A suplementação com asparagina foi realizada apenas em schotts de 500 mL, para evitar limitação de oxigênio. Os ensaios foram realizados com 150% e 200% da concentração inicial de asparagina, tendo sido feita a suplementação apenas no início do cultivo, e ensaios controle sem suplementação.

Não houve aumento aparente de $X_{v\text{máx}}$ como consequência da suplementação com asparagina (gráficos 17 e 18), porém também não houve diminuição do mesmo, como descrito por Vieira (2010) para células S2.

Gráfico 17 – Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis $[\ln(X_v)]$ e viabilidade dos ensaios com suplementação de asparagina em schotts de 500 mL

Fonte: Autor

O valor de $\mu_{\max}$ das triplicatas com 200% de asparagina aparentemente foi maior que o valor desta variável das triplicatas controle e com 150% de asparagina (gráfico 18). Tal resultado vai de encontro com o observado por Vieira (2010), onde a suplementação com asparagina levou a uma diminuição de $\mu_{\max}$ no cultivo de células S2.

Gráfico 18– Valores de (a) $\mu_{\max}$, (b) $X_{v\max}$ obtidos nos ensaios com suplementação de asparagina em schotts de 500 mL

Fonte: Autor

Os resultados de glicose das amostras deste experimento oscilaram bastante (gráfico 19), provavelmente devido à membrana usada no YSI estar em uso há muito tempo no momento da dosagem, por isso a análise de $Y_{X/Glc}^{Exp}$ não foi possível.

Gráfico 19 – Cinética de crescimento de células viáveis (Xv), consumo de glicose (Glc) e produção de lactato (Lac) dos ensaios com adição de asparagina e ensaio controle em frascos de 500 mL

Fonte: Autor

A análise estatística dos resultados da suplementação com asparagina mostra que a adição deste aminoácido não levou a variação significativa de nenhuma das variáveis estudadas (tabela 09), nem mesmo a aparente variação observada em $\mu_{\text{máx}}$ foi estatisticamente significativa. Portanto, é provável que asparagina não seja limitante para o cultivo.

Tabela 9 – Resultado da análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios com suplementação de asparagina em schotts de 500 mL

	$Xv_{\text{máx}}$		$\mu_{\text{máx}}$	
Controle	8,210	a b	0,610	a
150% Asn	7,927	b	0,593	a
200% Asn	8,700	a	0,637	a
p-valor	0,0419		0,1935	

*Letras iguais indicam falta de diferença significativa e letras diferentes indicam diferença significativa

Fonte: Autor

5.1.6 Suplementação com serina

Os ensaios de suplementação com serina, como os ensaios de suplementação com asparagina, foram realizados em frascos schotts de 500 mL para evitar a falta de oxigênio.

O experimento foi conduzido em triplicata, porém um cultivo de cada um dos grupos (controle, 150% serina e 200% de serina) apresentou um comportamento cinético muito diferente das outras replicatas. Por isso optou-se por descartar os cultivos anômalos, considerando o experimento como tendo sido feito apenas em duplicata.

Conforme padrão adotado para os experimentos de suplementação, os ensaios foram realizados com 150% e 200% da concentração inicial de serina, com suplementação apenas no início do cultivo, e ensaios controle.

Como é possível ver nos gráficos 20 e 21, a adição de serina levou a um aumento de $X_{v\text{máx}}$, sem ter efeito sobre $\mu_{\text{máx}}$.

Gráfico 20 – Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e viabilidade dos ensaios com suplementação de serina em schotts de 500 mL

Fonte: Autor

Gráfico 21 – Valores de (a) $\mu_{\text{máx}}$, (b) $Xv_{\text{máx}}$ obtidos nos ensaios com suplementação de serina em schotts de 500 mL

Fonte: Autor

A análise estatística confirmou que o efeito da serina em $Xv_{\text{máx}}$ foi significativo (tabela 10). Não foi possível dosar a concentração de glicose e lactato dos cultivos com serina, pois o equipamento que seria utilizado estava com defeito e não foi realizado o reparo em tempo hábil para que fossem feitas as dosagens.

Em seu trabalho, Vieira (2010) concluiu que suplementação do meio SF900II com serina não possui efeito na concentração celular em cultivos de células S2, porém causa um efeito negativo na velocidade específica de crescimento máxima dessas células, já para células Sf-9 os efeitos da suplementação do meio com este mesmo aminoácido foram bastante diferentes.

Tabela 10 – Resultado da análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios com suplementação de serina em schotts de 500 mL

	$Xv_{\text{máx}}$		$\mu_{\text{máx}}$	
Controle	7,960	b	0,550	a
150%Ser	9,750	a	0,525	a b
200% Ser	9,645	a	0,510	b
p-valor	0,0051		0,0483	

*Letras iguais indicam falta de diferença significativa e letras diferentes indicam diferença significativa
Fonte: Autor

5.1.7 Repetição dos testes de suplementação com cisteína, asparagina e serina

Houve indícios de que o momento em que os cultivos do ensaio de suplementação com cisteína atingiram $Xv_{\text{máx}}$ foi durante o intervalo entre as

amostragens do sexto e sétimo dias de cultivo. Assim a análise da concentração celular dos cultivos com cisteína provavelmente não levou a conclusões verdadeiras.

Essa suspeita, somada ao fato de que o experimento com adição de serina ao meio de cultivo (que teria levado a um aumento de $X_{v\text{máx}}$) foi realizado em duplicata, fez com que fosse realizado um último experimento de suplementação do meio com aminoácidos, tendo sido repetidos os ensaios com 200% da concentração de cisteína, serina e asparagina.

Optou-se por repetir apenas os ensaios com 200% destes aminoácidos, pois não houve indicativos que dobrar a concentração deles no meio levasse a qualquer tipo de inibição do desenvolvimento celular.

O ensaio original com prolina foi bastante consistente, indicando a ação inibitória que a adição deste aminoácido no meio de cultivo tem sobre as células. Por isso este ensaio não foi repetido nesta última cinética.

Os cultivos foram todos realizados em frascos schott de 500 mL. Os resultados desta bateria de cultivos estão resumidos nos gráficos 22 e 23, e a análise estatística desses dados está apresentada na tabela 11.

Gráfico 22 – Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e viabilidade da repetição dos ensaios com 200% de cisteína, serina e asparagina em schotts de 500 mL

Fonte: Autor

Gráfico 23 – Valores de (a) $\mu_{\text{máx}}$, (b) $X_{\text{v máx}}$ obtidos na repetição dos ensaios com 200% de cisteína, serina e asparagina em schotts de 500 mL

Fonte: Autor

Tabela 11 – Resultado da análise estatística dos resultados obtidos na repetição dos ensaios com 200% de cisteína, serina e asparagina em schotts de 500 mL

	$X_{\text{v máx}}$		$\mu_{\text{máx}}$	
Controle	8,408	a	0,616	a
200% Cis	9,118	a	0,617	a
200% Asn	8,315	a	0,616	a
200% Ser	8,997	a	0,568	a
p-valor	0,0554		0,05995	

*Letras iguais indicam falta de diferença significativa e letras diferentes indicam diferença significativa

Fonte: Autor

Os resultados deste último conjunto de cinéticas não foram muito conclusivos, pois apesar de $X_{\text{v máx}}$ dos cultivos que receberam adição de cisteína e de serina terem sido ligeiramente maiores do que dos cultivos controle e que foram suplementados com asparagina, a análise estatística sugere que não há diferença significativa entre os experimentos. Porém o p-valor obtido na análise está muito próximo de 0,05, o que diminui a certeza do resultado do teste estatístico.

Com os resultados obtidos nesta etapa do trabalho e baseado nos resultados de Vieira (2010) e no fato de que a concentração de cisteína no meio SF900III é significativamente mais baixa do que do restante dos aminoácidos, a cisteína foi o aminoácido escolhido para ensaios em biorreator.

5.2 Ensaio em Biorreator

Tendo como base os conhecimentos sobre a cinética de crescimento das células Sf-9 obtidos nos ensaios em frascos schott, foram planejados os experimentos em biorreator. Foi adotada como condição padrão para os cultivos em biorreator as condições que já eram usadas para o cultivo de células Sf-21 em nosso laboratório, temperatura de 28°C, agitação de 80 rpm, volume de cultivo de 1 L e aeração de 0,2 L/min, usando um aspersor em formato de anel com um total de 9 orifícios, que forma bolhas da ordem de 3 mm de diâmetro.

5.2.1 Testes de O.D.

Foram conduzidos ensaios em biorreator para determinar a concentração de oxigênio dissolvido (O.D.) ótima para o crescimento das células Sf-9.

Vários estudos foram feitos para testar a influência da O.D. no desenvolvimento de células de inseto. Há uma grande discrepância entre os resultados obtidos, o que levou ao senso comum de que células de inseto não são muito sensíveis à concentração de oxigênio dissolvido, crescendo bem em uma faixa bastante ampla de O.D. (de 30% a 100%) (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012).

Para determinar o valor ideal de O.D. ou para se determinar o mínimo valor desta variável no qual as células Sf-9 se desenvolvem bem (visando minimizar o uso de oxigênio puro no processo), foram realizados ensaios com O.D. de 10, 30% e 50% da saturação com ar.

Como o comportamento das células em cultivos em frascos schott já era conhecido, juntamente com cada ensaio em biorreator foi conduzido um cultivo em frasco schott, partindo do mesmo inóculo, como forma de controle.

A cinética de crescimento dos 3 cultivos controle em schott foram bastante similares (gráfico 24). Dessa forma é possível descartar a hipótese de que o inóculo tenha sido uma fonte de variação entre os 3 biorreatores.

Gráfico 24 – Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e viabilidade dos cultivos em frasco schott usados como controle para os cultivos em biorreator

Fonte: Autor

De forma semelhante ao que foi observado nos schotts controle, os cultivos em biorreator nas três diferentes condições de O.D. apresentaram cinéticas de crescimento bastante semelhantes nos primeiros dias. Porém notou-se que o cultivo feito com 10% de O.D. apresentou um período de fase lag aproximadamente 0,7 dia menor do que os outros e uma fase exponencial mais curta (gráficos 25 e 26)

Gráfico 25 – Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e viabilidade dos ensaios em biorreator

*As barras de erro presentes no gráfico correspondem ao desvio padrão de diferentes contagens da mesma amostra, os cultivos em biorreator foram realizados uma única vez.

** Os dados referentes ao cultivo com 10% de O.D. estão deslocados 0,5 dia em relação aos outros cultivos, assim, o ponto no gráfico referente ao dia 0,5 do cultivo com 10% de O.D corresponde ao dia 0 do experimento.

Fonte: Autor

É possível notar nos gráficos 25 e 26 que os valores de $\mu_{\max}$ e $X_{v\max}$ dos três cultivos são bastante similares (valores destes parâmetros cinéticos e do fator de conversão de glicose a biomassa estão resumidos na tabela 12).

Entre o quarto e o quinto dias de cultivo, o ensaio com 10% de O.D. apresentou uma desaceleração do crescimento celular, saindo da fase exponencial de crescimento e entrando em uma fase de transição, que durou até aproximadamente o oitavo dia de cultivo, para então entrar na fase estacionária.

Já os outros ensaios apresentaram uma fase exponencial mais longa, até aproximadamente o sexto dia de cultivo, e praticamente não tiveram fase de transição, entrando quase que imediatamente na fase estacionária.

Apesar desta diferença de duração de fases, a concentração celular da fase estacionária de todos os cultivos foi bem próxima.

Gráfico 26 – Logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [Ln(Xv)] em função do tempo dos ensaios em biorreator.

Fonte: Autor

Infelizmente não foi possível medir a concentração de glicose e lactato do cultivo com 10% de O.D. devido a problemas com o equipamento analítico. Como não há informações sobre acúmulo de lactato no meio de cultivo, não é possível afirmar que a diminuição da fase exponencial de crescimento tenha se dado por falta de oxigênio, mesmo que a única diferença entre este e os outros cultivos tenha sido a O.D.

Os cultivos com 30% e 50% de O.D. apresentaram um perfil de consumo de glicose e produção de lactato muito próximos. Podendo ser dito que, nestes dois cultivos, não houve limitação de oxigênio para as células, já que só houve acúmulo de lactato na fase de morte celular (gráfico 27).

Gráfico 27 – Cinética de crescimento de células viáveis (Xv), consumo de glicose (Glc) e produção de lactato (Lac) nos ensaios em biorreator.

*Não foram dosadas as concentrações de glicose e lactato do cultivo com 10% de O.D.

**As barras de erro presentes no gráfico correspondem ao desvio padrão de diferentes contagens da mesma amostra, os cultivos em biorreator foram realizados sem duplicatas

Fonte: Autor

Tabela 12 – parâmetros dos cultivos em biorreator.

	$\mu_{M\acute{A}X}$ (d ⁻¹)	Xv _{M\acute{A}X} (10 ⁶ cél/mL)	Y _{X/Glc} ^{Exp}
50% O.D.	0,59	9,00	3,32
30% O.D.	0,56	8,30	3,20
10% O.D.	0,53	8,70	—*

*Não foi possível medir a concentração de glicose das amostras do biorreator com 10% de O.D.

Fonte: Autor

Apesar de não ter sido feita uma análise estatística dos dados dos cultivos em biorreator, por estes terem sido feito em simplicata, é possível afirmar, baseado nos vários cultivos em triplicata realizados em frascos schott, que a variação vista entre os valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ dos cultivos em biorreator esta dentro da faixa de erro deste tipo de experimento.

O mesmo pode ser dito para os valores de Y_{X/Glc}^{Exp} dos biorreatores com 50% e 30% de O.D.

Palomares e Ramirez (1996) não constaram variação na cinética de crescimento celular nem em Xv_{m\acute{a}x} de células Sf-9 cultivadas em O.D.s de 5%, 10%

e 30% da saturação com o ar, tendo notado uma diminuição de $\mu_{\text{máx}}$ apenas no cultivo conduzido com 2% da saturação.

Os resultados de Palomares e Ramirez estão de acordo com o que foi visto no presente trabalho, porém naquele não foi analisada a duração da fase exponencial.

Define-se concentração crítica de oxigênio (C_{crit}) a concentração abaixo da qual há diminuição na velocidade de respiração (q_{O_2}) devido à falta de oxigênio. Com base nos dados de Palomares e Ramirez (2016), é possível estimar que a C_{crit} para as células Sf-9 seja por volta de 5% da saturação com ar.

As três O.D.s testadas neste trabalho estão acima desta provável concentração crítica, por isso a grande semelhança entre os resultados obtidos.

O cálculo do q_{O_2} pelo método dinâmico no reator com 50% de O.D. foi comprometido pelo acúmulo de espuma na interface do meio de cultivo e o “*headspace*” do reator. Os resultados obtidos com o método dinâmico neste ensaio estão apresentados no gráfico 28.

Mesmo com a interrupção da aeração do cultivo, que teoricamente interromperia a transferência de O_2 para a fase líquida, o gás preso nas bolhas acumuladas na superfície da fase líquida continuava transferindo oxigênio para o meio.

Considerando que quanto maior a concentração celular maior é a fração de O_2 no gás de entrada no reator, devido à forma de controle de O.D. do cultivo, com o decorrer do ensaio, a pressão parcial de O_2 no gás preso na camada de bolhas tende a aumentar, aumentando a interferência desta transferência superficial de oxigênio na medição de q_{O_2} pelo método dinâmico, levando a uma aparente diminuição em seu valor conforme concentração celular aumenta.

Gráfico 28 – Logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [Ln(Xv)]; 5 vezes a fração de CO₂ no gás de exaustão (5*CO₂) e velocidade específica de consumo de O₂ (qO₂) em função do tempo do ensaio com 50% de O.D.

Fonte: Autor

Teoricamente o valor de q_{O_2} é constante durante toda a fase exponencial de crescimento celular (Kamen *et al.*, 1996), porém devido às dificuldades da metodologia de medição usada tal constância não foi observada neste ensaio.

Outra forma de estimar o valor de q_{O_2} é através da produção de CO₂ pelas células. O coeficiente de respiração celular (RQ) é definido como a razão entre o dióxido de carbono produzido e o oxigênio consumido e seu valor tende a ser constante e próximo à unidade durante o período de crescimento exponencial em cultivos celulares (Bonarius *et al.*, 1995; Kamen *et al.*, 1991).

$$RQ = \frac{CER}{OUR} = \frac{q_{CO_2}/X_v}{q_{O_2}/X_v} = \frac{q_{CO_2}}{q_{O_2}} \dots\dots\dots (4)$$

No gráfico 28 é possível notar que no intervalo da fase exponencial há um aumento da fração de CO₂ no gás de saída do reator muito próximo a um aumento exponencial e uma queda brusca nesta fração ao final desta fase.

Considerando a hipótese de RQ constante durante fase exponencial, a produção de CO₂ é proporcional ao consumo de O₂. Dessa forma, o aumento exponencial da fração CO₂ na saída do reator durante o crescimento celular

exponencial, indica um valor de q_{CO_2} constante neste período do cultivo, consequentemente, também indica um valor de q_{O_2} constante.

Os resultados do cultivo com 30% O.D. apontam para um valor de q_{O_2} calculado na faixa de $7,0 - 7,8 \cdot 10^{-8}$ $mg_{O_2}/cél.d$ durante a fase exponencial e um valor em torno de $1,4 \cdot 10^{-8}$ $mg_{O_2}/cél.d$ durante a fase estacionária (gráfico 29).

Gráfico 29 – Logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$]; 5 vezes a fração de CO_2 no gás de exaustão ($5 \cdot CO_2$) e velocidade específica de consumo de O_2 (q_{O_2}) em função do tempo do ensaio com 30% de O.D.

Fonte: Autor

O perfil da fração de CO_2 no gás que sai do biorreator no ensaio com 30% de O.D. é bastante semelhante ao perfil obtido no cultivo com 50% de O.D. Como as cinéticas de crescimento celular dos dois cultivos também foram bastante parecidas, é provável que os perfis de q_{O_2} dos cultivos sejam muito próximos um do outro.

Devido à O.D. de 10% já ser bastante baixa, não foi possível realizar o método dinâmico para calcular o q_{O_2} deste cultivo, porém o perfil da fração de CO_2 no gás de saída do biorreator foi semelhante ao perfil dos outros ensaios em biorreator até o quarto dia de cultivo.

Entre o quarto e o sexto dia de cultivo houve um lento aumento na fração de CO_2 na saída do biorreator com O.D. de 10% e após o sexto dia, como os outros cultivos, houve uma queda brusca desta fração (gráfico 30).

Este perfil da fração de CO₂ na exaustão do biorreator condiz com os dados de concentração celular obtidos neste ensaio.

Gráfico 30 – Logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [Ln(X_v)] e 5 vezes a fração de CO₂ no gás de exaustão (5*CO₂) em função do tempo do ensaio com 10% de O.D.

Fonte: Autor

Além do q_{O_2} , também foi calculado o q_{CO_2} , através do balanço de massa do CO₂ na fase gasosa. Durante quase toda a fase exponencial, desconsiderando os pontos iniciais do ensaio com 50% de O.D., o valor de q_{CO_2} fica em torno de $5,5 \cdot 10^{-15}$ e de $5,0 \cdot 10^{-15}$ mol_{CO₂}/cél.min nos ensaios com 50% e 30% de O.D., respectivamente (gráficos 31 e 32). Esses valores estão de acordo com a faixa de $2,82 - 4,32 \cdot 10^{-15}$ mol_{CO₂}/cél.min, proposta por Kamen *et al.* (1996) para células Sf-9 em meio SF900II e com o q_{CO_2} encontrado por Jardin *et al.* para células Sf-9 antes de sua infecção com baculovírus, que foi de $3,72 \cdot 10^{-15}$ mol_{CO₂}/cél.min.

Já no ensaio com O.D. de 10% (gráfico 33) o valor de q_{CO_2} variou de 2,0 a $4,2 \cdot 10^{-15}$ mol_{CO₂}/cél.min, valores também bastante próximos ao que foi reportado por Jardin *et al.* (2007), porém relativamente menores do que os valores encontrados para os outros cultivos.

Gráfico 31 – Produção específica de CO₂ (qCO₂) do ensaio com 50% de O.D.

Fonte: Autor

Gráfico 32– Produção específica de CO₂ (qCO₂) do ensaio com 30% de O.D.

Fonte: Autor

Gráfico 33– Produção específica de CO₂ (qCO₂) do ensaio com 10% de O.D.

Fonte: Autor

Com os dados obtidos nos ensaios realizados para testar a melhor O.D para o cultivo de células Sf-9, optou-se pela O.D. de 30% da saturação com o ar para dar seguimento aos experimentos em biorreatores.

5.2.2 Teste de suplementação

Com um valor de O.D. otimizado, foi feito um ensaio em biorreator com suplementando o meio de cultivo com cisteína, aminoácido escolhido após os ensaios com suplementação em frasco schott.

Da mesma forma que foi feito nos ensaios de teste de O.D, foram conduzidos ensaios em frascos schotts em paralelo com o cultivo em biorreator, porém desta vez foram feitos dois schotts, um sem suplementação e um com suplementação de cisteína.

Tanto o schott quanto o biorreator foram suplementados com a mesma solução de cisteína e a concentração final de cisteína dos dois cultivos foi o dobro da concentração original deste aminoácido no meio, que de acordo com Vieira (2010) é de 0,131 g/L. A suplementação ocorreu no início dos cultivos apenas.

Uma comparação entre os cultivos em schott usados como controle novamente mostra que não houve diferença entre os inóculos. Um dos cultivos apresentou uma fase lag (o cultivo controle do biorreator com cisteína que não recebeu suplementação), porém deslocando os dados deste cultivo no eixo das

abscissas para desconsiderar a fase lag maior, percebemos que os três cultivos controle são bastante parecidos (gráfico 34).

Esse resultado é contrário às expectativas do experimento, pois se esperava que o cultivo que recebeu a suplementação com cisteína atingisse um $X_{v\text{máx}}$ maior, como os resultados dos testes em schott (item 5.1) sugeriram.

Gráfico 34 – Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e viabilidade dos cultivos em frasco schott usados como controle para os cultivos em biorreator com O.D. de 30% (sem suplementação) e com suplementação de cisteína

* O schott sem suplementação usado como controle do biorreator com cisteína foi deslocado em -0,75 dia no eixo das abscissas, de forma que o ponto no gráfico referente ao dia 0 deste ensaio corresponde ao dia 0,75 de cultivo.

Fonte: Autor

Apesar da similaridade dos cultivos controle em schott, a cinética de crescimento em reator suplementado com cisteína foi bastante diferente da cinética de todos os outros cultivos em biorreator feitas neste trabalho, inclusive à do reator com 30% de O.D., que foi a condição escolhida para o teste de suplementação.

No gráfico 35 é possível visualizar de forma clara essa diferença entre os cultivos com O.D. de 30% com e sem suplementação com cisteína.

Gráfico 35 – Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e viabilidade dos ensaios em biorreator com O.D. de 30%, com e sem suplementação com cisteína.

Fonte: Autor

O valor de $\mu_{\max}$ dos cultivos também foi bastante diferente (gráfico 36) e o perfil da fração de CO_2 no gás de saída do reator dos dois cultivos também diferiu consideravelmente (gráfico 37).

Gráfico 36 – Duração da fase de crescimento celular exponencial dos cultivos em biorreator com O.D. de 30%, com e sem suplementação com cisteína

Fonte: Autor

Gráfico 37 – Perfil da fração de CO₂ do gás de exaustão dos cultivos em biorreator com O.D. de 30%, com e sem suplementação com cisteína

Fonte: Autor

Contrariando os resultados obtidos em cultivos em frasco schott e os resultados de Vieira (2010), a suplementação com cisteína em biorreator teve efeito negativo tanto no $X_{v\text{máx}}$ quanto no $\mu_{\text{máx}}$ do cultivo.

Devido à limitação de tempo, esse resultado negativo fez com que a suplementação do meio em cultivos em biorreatores fosse preterida e foi dado prioridade aos ensaios de infecção.

Porém, os indicativos de que a suplementação do meio SF900III com cisteína é benéfica para o desenvolvimento celular sugerem que estudos futuros sobre a influência da adição deste aminoácido ao meio em cultivos em biorreator ainda sejam realizados.

5.3 Ensaios de infecção

Foram realizados ensaios de infecção tanto em frascos schott quanto em biorreator com baculovírus *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV - *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus) cedido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF).

Os ensaios de infecção realizados neste trabalho foram preliminares, tendo sido estudada uma variável clássica de processos de infecção, a Multiplicidade de Infecção (MOI). Porém, durante os ensaios, levantou-se a hipótese que a vazão gasosa pudesse influenciar na produtividade dos processos infectivos em biorreator. Então foi desenhado um experimento para confirmar essa influência.

5.3.1 Ensaios de infecção em frasco schott

Variáveis bastante importantes na produção *in vitro* de baculovírus são o MOI (razão da quantidade de vírus e da quantidade de células no momento da infecção) e a CDI (concentração celular do cultivo no momento da infecção) (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012; Micheloud *et al.*, 2009).

Infectar um cultivo celular com CDI elevada causa uma diminuição no número de poliedros produzidos por célula. Essa perda de produtividade específica é denominada efeito da densidade celular. Para evitar tal efeito, foi adotada para CDI uma concentração celular na faixa de $2,5 - 4 \cdot 10^6$ cel/mL, valor que fica dentro da faixa definida como ideal de até $4 \cdot 10^6$ cel/mL para cultivos de células Sf-9 (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012). Outra proposta para evitar o efeito da densidade celular é realizar a infecção dos cultivos com uma CDI que esteja abaixo da metade do valor de $X_{V_{\text{Max}}}$ que pode ser obtida na condições escolhidas para o cultivo (Reid, Chan e Oers, 2013).

Nas condições adotadas para os ensaios com infecção, os valores de $X_{V_{\text{máx}}}$ médio obtidos neste trabalho ficaram na faixa de $7,5 - 9,0 \cdot 10^6$ cel/mL, tanto em cultivos em frasco schott quanto em cultivos em biorreator. Assim, a faixa de CDI selecionada também atende a este segundo critério.

Devido à pequena quantidade de vírus que estava disponível no início do trabalho e para evitar a indução de mutações tais como mutantes FP e partículas DI.

Optou-se pelo uso de MOIs baixos. Foram testados MOIs de 0,7, 1 e 1,4. A primeira cinética com infecção foi feita com MOIs de 0,7 e 1,4, em seguida foi feita outra cinética de infecção com MOI de 1, dessa vez em duplicata. Para as duas cinéticas, o inóculo viral usado foi o mesmo, porém as células foram oriundas de descongelamentos diferentes.

Os resultados destas duas cinéticas estão resumidos nos gráficos 38 e 39 e os valores de $\mu_{\text{máx}}$ (anterior à infecção) de todos os cultivos estão na tabela 13.

Durante todo o período de cultivo, ambos os ensaios controles se comportaram de forma bastante parecida e de acordo com o esperado, baseado na experiência obtida nos ensaios em frasco schott realizados anteriormente.

Nos três primeiros dias dos experimentos, quando ainda não havia sido feita a infecção, os 6 cultivos possuem perfis de crescimento bastante parecido.

Após a infecção, os 4 cultivos infectados também apresentaram perfis parecidos entre si. Logo após a infecção, ainda houve certo crescimento celular; aproximadamente 48 horas após a infecção se começou a observar poliedros virais no interior das células e aproximadamente 120 horas após a infecção praticamente 90% das células continham poliedros virais em seus núcleos.

Gráfico 38- Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (%poliedro) do primeiro teste de infecção

* Linha vertical tracejada indica momento de infecção.

Fonte: Autor

Gráfico 39 - Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (% poliedro) do segundo teste de infecção

*Linha vertical tracejada indica momento de infecção.

Fonte: Autor

Tabela 13 - Valores de $\mu_{\text{máx}}$ (anterior à infecção) dos cultivos infectados em frasco schott.

	Con1	Vírus MOI 0,7	Vírus MOI 1,4	Con2	Vírus MOI 1 - A	Vírus MOI 1 - B
$\mu_{\text{máx}} (\text{d}^{-1})$	0,63	0,59	0,61	0,62	0,58	0,64

Fonte: Autor

Estes testes mostraram que dentro da faixa testada, o MOI usado não possui efeito na infecção do cultivo. Foi escolhido o valor de MOI igual a 1 para os testes de infecção em biorreator.

5.3.2 Ensaios de infecção em biorreator

Tendo definido um valor de O.D de 30% nos ensaios anteriores em biorreator e um MOI de 1 nos primeiros ensaios de infecção, foram realizados ensaios de infecção em biorreator.

O primeiro ensaio de infecção em biorreator foi conduzido com uma aeração de 0,2 L/min. Os resultados obtidos neste cultivo estão representados no gráfico 40.

Gráfico 40 - Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$], viabilidade e porcentagem de células contendo poliedros em seus núcleos (% poliedros) do primeiro cultivo em biorreator com infecção.

*As barras de erro presentes no gráfico correspondem, a diferentes contagens da mesma amostra

** Linha vertical tracejada indica momento de infecção.

Fonte: Autor

O perfil visto no biorreator foi similar ao visto em frasco schott, com um certo crescimento celular pós-infecção, percepção de poliedros no interior das células por volta de 48 horas pós-infecção e após 120 horas de infecção aproximadamente 90% das células continham poliedros em seu interior.

A infecção em biorreator foi bastante satisfatória, pois foi observado um perfil de formação de poliedros no interior das células adequado e semelhante ao observado nos ensaios com infecção conduzidos em frascos schotts.

Para confirmação da ultraestrutura do baculovírus produzido, foram enviadas amostras para a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde foi realizada a análise por microscopia eletrônica das células cultivadas em biorreator e infectadas com o vírus SfMNPV com vazão gasosa de 0,2 L/min (figura 3).

Figura 3 - Análise por microscopia eletrônica de transmissão de células Sf-9 multiplicadas em biorreator e infectadas com o vírus SfMNPV. a) Célula Sf 9 controle (não infectada). Aumento de 8.000X. b) Núcleo de célula Sf-9 infectada – Inoculo inicial utilizado para subsequente infecção em sistema de biorreator. Aumento de 30.000X. c) Núcleo de célula Sf-9 infectada – Produto final obtido após infecção em sistema de biorreator. Aumento de 20.000X.

Fonte: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A análise ultraestrutural das células Sf-9 infectadas pelo vírus SfMNPV I-19, coletadas do biorreator, revelou a presença de efeitos citopáticos típicos da infecção por baculovírus, tais como hipertrofia nuclear e celular, montagem de vírus no núcleo celular, virions envelopados contendo múltiplos nucleocapsídeos em seu interior e formação de corpos de oclusão (c), em comparação com as células controle (a), nas quais não foi detectada qualquer morfológica, como esperado. As estruturas citadas a cima também estão presentes em amostras de células cultivadas em cultura estática (garrafa T-25) e infectadas com o mesmo inoculo viral do biorreator (b).

Isso confirma a eficiência da infecção de cultivo celular com o baculovírus *Spodoptera* em sistema de biorreator, que levou à produção de poliedros completos.

No entanto, ao se realizar uma cinética de infecção em schott com o sobrenadante obtido do cultivo em biorreator, percebeu-se que não houve formação de poliedros no interior da célula, nem sinais característicos de infecção, como diminuição do crescimento celular (dado não mostrado).

Um segundo teste com o sobrenadante deste primeiro biorreator foi realizado com um volume de suspensão viral aproximadamente 3 vezes do que na primeira tentativa.

Novamente não houve formação de poliedros ou sinais de infecção. A única diferença percebida foi uma fase lag de aproximadamente 1 dia no cultivo controle que não ocorreu nos cultivos infectados, porém essa variação nada tem a ver com a infecção em si. Os resultados deste teste estão resumidos no gráfico 41.

Gráfico 41- Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (% poliedros) do teste realizado com o sobrenadante do primeiro biorreator.

*Linha vertical tracejada indica momento de infecção.

**O ensaio controle está deslocado -1,0 dia em relação aos ensaios com infecção. Assim o ponto do gráfico referente ao dia 0,0 deste ensaio, corresponde ao dia 1,0 de cultivo.

Fonte: Autor

Após duas tentativas de infecção sem sucesso, levantou-se duas hipóteses: o vírus sofreu algum tipo de mutação durante o cultivo em biorreator, tais como geração de mutantes FP e partículas DI, fazendo com que perdesse sua virulência, ou a concentração de vírus no sobrenadante do biorreator era ínfima.

Para testar essas hipóteses foi realizada uma infecção forçada em garrafas T-25 usando o sobrenadante do biorreator como inóculo viral.

No processo de infecção forçada, é esperado um intervalo de aproximadamente 4 horas após a inoculação, para que as células possam aderir ao fundo da garrafa, então todo o meio é removido cuidadosamente e a suspensão viral é adicionada à garrafa. Após uma hora de incubação sob leve agitação, 4 mL de meio de cultivo são adicionados à garrafa e é dado seguimento ao cultivo normalmente.

Nesta metodologia de infecção as células são colocadas diretamente em contato com os vírus, permitindo que mesmo uma quantidade mínima de vírus desencadeie um processo infectivo eficiente. O resultado obtido na infecção forçada está apresentado na figura 04.

Figura 4 – Fotos de cultivos em garrafa T-25 120 horas após serem infectados com o sobrenadante do primeiro biorreator infectado: (a) Controle; (b) Teste de infecção forçada 1; (c) Teste de infecção forçada 2; (d) Teste de infecção forçada 3.

Fonte: Autor

Os resultados obtidos nos testes de infecção forçada (figura 04) mostram claramente que houve um processo infectivo eficiente, uma vez que nos 3 testes uma grande porcentagem das células apresenta poliedros em seu interior. Isso indica que provavelmente não houve mutação no vírus, já que houve a formação de poliedros. Dessa forma, o problema de não infecção do sobrenadante do primeiro biorreator possivelmente é devido à baixa concentração viral presente nele.

Uma provável causa dessa baixa concentração viral seria o stress hidrodinâmico causado pelas condições de cultivo dentro do biorreator (agitação e aeração).

Células animais não apresentam parede celular, assim sua única forma de proteção mecânica é a membrana celular, sustentada pelo citoesqueleto. Isso torna as células animais bastante sensíveis ao stress hidrodinâmico, especialmente ao stress causado pelo borbulhamento em cultivos aerados (Chisti, 2000; Hu, Berdugo e Chalmers, 2011).

A forma BV dos baculovírus é protegida apenas por uma dupla membrana de lipídios, não possuindo nem o reforço do citoesqueleto que as células animais possuem (Rohrmann, 2013). Por isso é bastante provável que as condições em que foi conduzido o experimento de infecção no biorreator tenham sido muito agressivas para o vírus, em particular a presença de bolhas devido à aeração.

Para testar essa hipótese foi feito um segundo ensaio de infecção com vírus em biorreator, com o segundo lote de baculovírus *Spodoptera frugiperda* cedido pela EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, porém dessa vez foi usada uma vazão de gás de 0,05L/min, 4 vezes menor do que a aeração do primeiro ensaio em biorreator.

Para confirmar que o segundo lote de vírus recebido era similar ao primeiro, foram realizados testes de infecção em garrafas T-25, nos quais foi usado o mesmo volume dos dois lotes de vírus para infectar número semelhante de células. Como foram observados perfis de formação de poliedros no interior das células bastante semelhantes com os dois lotes de vírus (dado não mostrado), concluiu-se que ambos os lotes eram comparáveis em título viral e virulência.

Em paralelo à infecção do cultivo em biorreator (gráfico 43), foi feita uma infecção em frasco schott, em duplicata, para comparação (gráfico 42).

Gráfico 42 - Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] e fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (% poliedros) do teste realizado com o segundo lote de vírus recebido da EMBRAPA

*Linha vertical tracejada indica o momento de infecção.

Fonte: Autor

Os resultados de infecção obtidos com este segundo lote nas infecções em schott (gráfico 42) ficaram abaixo dos resultados obtidos em schott com o primeiro lote de vírus (gráficos 38 e 39), porém houve a formação de poliedros e interrupção de crescimento celular, indicando um processo efetivo de infecção.

No segundo cultivo em biorreator infectado, deixou-se a vazão gasosa de 0,2 L/min no início do cultivo e por volta de 3 horas antes da infecção, a vazão foi baixada para 0,05 L/min.

A vazão de 0,05 L/min foi escolhida, pois foi a menor vazão de gás na qual ainda foi possível manter o controle que O.D. Ao se tentar diminuir a vazão gasosa para valores a baixo de 0,05L/min, o controlador de O.D. não foi capaz de manter o setpoint de 30% de O.D., como mostra o gráfico 43.

Gráfico 43 – Variação da vazão de entrada de gás no segundo cultivo em biorreator com infecção

*Linha vertical tracejada indica o momento de infecção

Fonte: Autor

Apesar do resultado não muito satisfatório das infecções em schotts realizadas com o segundo lote de vírus, a infecção em biorreator com este lote viral (gráfico 44) obteve resultados comparáveis aos da infecção com o primeiro lote (gráfico 40).

Gráfico 44 : Concentração de células viáveis (X_v), logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$], viabilidade e fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (% poliedros) do segundo cultivo em biorreator com infecção.

*Linha vertical tracejada indica o momento de infecção

**As barras de erro presentes no gráfico correspondem, a diferentes contagens da mesma amostra

Fonte: Autor

Os valores de $X_{v\text{máx}}$ de ambos os cultivos infectados foram bastante parecidos, ficando na faixa de $5-6 \cdot 10^6$ cel/mL, com porcentagem de células que acumularam poliedros em seus núcleos por volta de 90% nos dois cultivos. A única diferença percebida foi no intervalo de tempo decorrido para que a formação de poliedros no interior das células fosse perceptível através de microscopia óptica. No cultivo infectado com o segundo lote viral, esse foi cerca de um dia mais longo.

Comparando os dados dos ensaios de infecção em biorreator com o ensaio com O.D. de 30% (controle sem infecção na condição escolhida), é possível perceber uma grande similaridade entre os cultivos no período pré-infecção, apesar de o reator infectado com vazão de gás de 0,2 L/min ter apresentado um padrão de crescimento um pouco diferente e nenhum dos dois ensaios com infecção ter tido fase lag (gráficos 45 e 46).

Gráfico 45 - Concentração de células viáveis (X_v) e logaritmo neperiano da concentração de células viáveis [$\ln(X_v)$] dos dois cultivos de infecção em biorreator e do controle (biorreator com O.D. 30%)

*As séries de dados que representam o cultivo em biorreator não infectado estão deslocadas -1 dia em relação às outras. Dessa forma, os pontos do dia 0,0 nas séries deste ensaio correspondem ao dia 1 de cultivo.

** Nas séries que representam o perfil de crescimento celular, linha cheia representa o período pré-infecção e linha pontilhada representa o período pós-infecção.

Fonte: Autor

Gráfico 46 - Concentração de células viáveis (X_v) e fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (% poliedro) dos dois cultivos de infecção em biorreator e do controle (biorreator com O.D. 30%)

*As séries de dados que representam o cultivo em biorreator não infectado estão deslocadas -1 dia em relação às outras. Dessa forma, os pontos do dia 0,0 nas séries deste ensaio correspondem ao dia 1 de cultivo.

** Nas séries que representam o perfil de crescimento celular, linha cheia representa o período pré-infecção e linha pontilhada representa o período pós-infecção.

Fonte: Autor

A análise dos perfis de CO₂ no gás de saída dos biorreatores (gráfico 47) indica uma boa similaridade dos cultivos antes da infecção.

Gráfico 47 - Perfil da fração de CO₂ no gás de exaustão dos biorreatores infectados e do controle (biorreator com O.D. de 30%)

*A série de dados que representa o cultivo em biorreator não infectado esta deslocada -1 dia em relação às outras. Dessa forma, o ponto do dia 0,0 na série deste ensaio corresponde ao dia 1 de cultivo.

Fonte: Autor

As várias mudanças na vazão gasosa do segundo cultivo com infecção que foram necessárias para estabilizar o controle de O.D. tornam o balanço de CO₂ na fase gasosa bastante complicado no intervalo entre o terceiro e quinto dia de cultivo, impedindo o cálculo de q_{CO_2} neste período.

Porém, os valores de q_{CO_2} calculados para ambos os cultivos infectados fora deste intervalo são bastante parecidos (gráficos 48 e 49). O valor médio de q_{CO_2} entre os dias 0 e 3 os dias 5 e 10 dos cultivos infectados e do biorreator com O.D. de 30% estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14 – Valores de q_{CO_2} médios dos biorreatores infectados e do controle (biorreator com O.D. de 30%)

Experimento	q_{CO_2} (molCO ₂ /cél.min)	
	0-3 dias	5-10 dias
Biorreator 30% O.D.	5,1E-15	2,1E-15
Biorreator Inf. 0,2 L/min	3,0E-15	2,3E-15
Biorreator Inf. 0,05 L/min	3,3E-15	2,58E-15

Fonte: Autor

Apesar de os valores de q_{CO_2} dos cultivos que foram infectados estarem um pouco menor do que os valores do cultivo que não foi infectado nos 3 primeiros dias, são valores bastante próximos e, novamente os valores calculados de q_{CO_2} estão de acordo com o descrito por Kamen *et. al.* (1996) e Jardin *et. al.* (2007).

Gráfico 48 - Concentração de células viáveis (X_v), fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (% poliedro) e valores de q_{CO_2} calculados do cultivo em biorreator com vazão gasosa de 0,2 L/min.

*Linha tracejada indica momento da infecção.

Fonte: Autor

Gráfico 49 - Concentração de células viáveis (X_v), fração de células totais com formação de poliedros em seu núcleo (% poliedro) e valores de q_{CO_2} calculados do cultivo em biorreator com vazão gasosa de 0,05 L/min.

*Linha tracejada indica momento da infecção.

** Não foi possível calcular o valor de q_{CO_2} entre os dias 3 e 5 do cultivo devido a grande variação da vazão de gás de entrada durante esse período.

Fonte: Autor

No cultivo com maior aeração é possível ver um aumento significativo no valor de q_{CO_2} nos 2 dias seguintes à infecção, indicando aumento na taxa de respiração celular, consequência da mudança no metabolismo celular causada pela infecção (Drugmand, Schneider e Agathos, 2012; Kamen *et al.*, 1996).

Infelizmente o período de 2 dias após a infecção foi justamente o intervalo em que houve dificuldade no controle de O.D., forçando repetidas mudanças na aeração, impedindo que o fosse calculado a taxa de produção específica de CO₂ nestes dias.

Para conferir se a mudança na vazão de gás surtiu algum efeito na preservação da forma BV dos baculovírus presentes no sobrenadante do biorreator, foi realizada uma série de infecções em garrafas T-25 com o sobrenadante dos dois biorreatores infectados.

O experimento consistiu em 7 cultivos em garrafa T-25 sendo um cultivo controle, três cultivos infectados com o sobrenadante de biorreator com maior vazão de gás (0,2 L/min) e três ensaios infectados com o sobrenadante do biorreator com menor vazão gasosa (0,05 L/min).

Para que uma análise mais crítica pudesse ser feita, foram realizadas 2 metodologias de infecção diferentes com cada um dos sobrenadante. Além disso, uma das metodologias foi repetida com dois volumes diferentes dos dois inóculos virais. Na tabela 15 estão apresentadas as metodologias de infecção e os volumes de vírus utilizados. Os resultados deste experimento estão apresentados nas figuras 05, 06 e 07.

Tabela 15 – Resumo das metodologias de infecção empregadas para testar os sobrenadantes dos biorreatores infectados.

Metodologia	Descrição	Volume de vírus (mL)	Volume total do cultivo (mL)
Infecção forçada	inóculo viral depositado diretamente sobre cultivo aderido em monocamada após remoção do meio de cultivo, o qual é repostado após o período de 1 hora.	1,5	5 mL
Infecção padrão	inóculo viral é adicionado à garrafa T-25 imediatamente após a adição das células.	0,1	5 mL
Infecção padrão	inóculo viral é adicionado à garrafa T-25 imediatamente após a adição das células.	0,5	5 mL

Fonte: Autor

Figura 5– Cultivo controle (sem vírus) do teste da infectividade dos sobrenadantes dos biorreatores infectados

Fonte: Autor

Figura 6- Fotos do teste de infectividade do sobrenadante do biorreator infectado com aeração de 0,2 L/min. a) infecção padrão com 100 microlitros de vírus; b) infecção padrão com 500 microlitros de vírus; c) infecção forçada com 1,5 mL de vírus.

Fonte: Autor

Figura 7 - Fotos do teste de infectividade do sobrenadante do biorreator infectado com aeração de 0,05 L/min. a) infecção padrão com 100 microlitros de vírus; b) infecção padrão com 500 microlitros de vírus; c) infecção forçada com 1,5 mL de vírus.

Fonte: Autor

Na figura 07, que representa os resultados dos testes realizados com o sobrenadante do biorreator infectado com aeração mais baixa (0,05 L/min), observa-se que a partir do terceiro dia pós-infecção é possível perceber um significativo acúmulo de poliedros no interior das células nas três formas de infecção testadas.

Já na figura 06, que resume os resultados dos testes com sobrenadante do biorreator com vazão gasosa de 0,2 L/min, nota-se um número bastante reduzido de células contendo poliedro em seu interior, mesmo após 5 dias de infecção em qualquer das metodologias de infecção empregadas.

A diferença entre a capacidade dos sobrenadantes dos dois biorreatores de infectar cultivos celulares é evidente, indicando que a aeração por borbulhamento possui um efeito nocivo sobre baculovírus na forma BV.

6. Conclusões

Neste trabalho foi possível concluir que:

- No cultivo de células Sf-9 em meio SF900III não se observou limitação de crescimento celular por falta de glicose ou glutamina, que de acordo com a literatura são as duas mais importantes fontes de carbono e energia para células de inseto.
- O cultivo das células em frascos de 500 mL com 20 mL de cultura a 130 rpm, nas condições empregadas neste trabalho, é suficiente para evitar limitação de oxigênio, sem ter efeitos negativos sobre o desenvolvimento celular.
- Não há limitação de crescimento celular no meio SF900III por falta de asparagina, serina, prolina ou cisteína.
- A adição de prolina ao meio de cultivo levou a uma diminuição de $X_{v_{\max}}$, mas não teve influência significativa sobre $\mu_{\max}$ e $Y_{X/Glc}^{Exp}$, o que desacredita a hipótese de inibição por excesso de prolina. É possível que tenha ocorrido o acúmulo de algum subproduto do metabolismo da prolina que tenha influenciado no desenvolvimento das células.
- As concentrações de oxigênio dissolvido testadas (10%, 30% e 50% da saturação com ar) foram suficientes para o desenvolvimento das células, não havendo qualquer indício de falta de oxigênio em nenhum dos ensaios.
- O perfil de CO_2 no gás de exaustão do biorreator pode ser usado para o acompanhamento *on-line* do estado fisiológico das células, pois acompanha o perfil de concentração celular.
- Na faixa de MOI testada (0,7 – 1,4) não houve efeito significativo no processo de infecção de células Sf-9 por baculovírus *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV I-19).
- O processo de infecção de células Sf-9 pelo baculovírus *Spodoptera* conduzido em sistema de biorreator resultou na indução de efeitos citopáticos típicos de infecção por baculovírus e formação de poliedros completos tanto com uma vazão gasosa de 0,2 L/min quanto de 0,05 L/min.

- Aeração por borbulhamento é prejudicial ao “*budded vírus*” do baculovírus *Spodoptera frugiperda*, devendo ser mantida o mais baixo possível durante processos infectivos.

7. Trabalhos futuros

Para trabalhos futuros, sugere-se:

- Confirmar que não há limitação de crescimento por falta de glutamina na condição de cultivo otimizada (frascos de 500 mL). Esse aminoácido foi descartado no início do trabalho por não haver indicativos de sua exaustão, mas nenhum ensaio realizado em frascos de 500 mL teve a concentração de glutamina dosada para certificar de que nessa nova condição a glutamina continua sendo não-limitante;
- Testar novamente a suplementação do meio de cultivo com cisteína em biorreator, uma vez que no presente trabalho os resultados obtidos em biorreator e frasco schott nos ensaios com cisteína diferiram significativamente;
- Desenvolver e padronizar metodologia de análise por eletroforese (SDS-PAGE) da produção de poliedros virais;
- Testar outros valores de vazão gasosa em infecções com baculovírus conduzidas em biorreator e tentar otimizar a estratégia de controle para que vazões gasosas menores do que 0,05 L/min possam ser utilizadas, evitando potencial cisalhamento no *budded virus*. Alternativamente, pode-se conduzir ensaio em biorreator com sistema de transferência livre de bolhas;
- Desenvolver uma estratégia de alimentação para realizar ensaios de infecção em biorreator em batelada alimentada, para tentar aumentar a produção de poliedros;
- Determinar a virulência dos poliedros virais produzidos em biorreator na lagarta *Spodoptera frugiperda* (bioensaio);
- Testar o processo desenvolvido com outras espécies de baculovírus.

8. Referências bibliográficas

- ARIF, B.; PAVLIK, L. Insect cell culture: Virus replication and applications in biotechnology. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, n. SUPPL.1, p. S138–S141, 2013.
- BAILEY, A. *et al.* **BIOPESTICIDES: Pest management and regulation**. Cambridge: [s.n.].
- 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.
- 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. **Biotechnology Progress**, v. 9, n. 6, p. 615–624, 1993.
- BENSLIMANE, C. *et al.* Insights into the central metabolism of *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) and *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5) insect cells by radiolabeling studies. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 1, p. 78–86, 2005.
- BISHOP, D. H. Biopesticides. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 307–311, jun. 1994.
- BONARIUS, H. P. J. *et al.* Determination of the respiration quotient in mammalian cell culture in bicarbonate buffered media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 45, n. 6, p. 524–535, 1995.
- CASTRO, M. E. B. *et al.* **Biologia Molecular de Baculavírus e seu uso no Controle Biológico de Pragas no Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1733–1761, 1999.
- CHISTI, Y. Animal-cell damage in sparged bioreactors. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 10, p. 420–432, 2000.
- 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, 2014.
- DEUTSCHMANN, S. M.; JÄGER, V. 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, jun. 1994.
- DREWS, M.; DOVERSKOG, M.; LARS, O. Pathways of glutamine metabolism in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells : evidence for the presence of the nitrogen assimilation system , and a metabolic switch by 1 H / 15 N. **Journal of biotechnology**, v. 78, p. 23–37, 2000.
- DRUGMAND, J.-C.; SCHNEIDER, Y.-J.; AGATHOS, S. N. Insect cells as factories for biomanufacturing. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1140–1157, 2012.
- E. BIRCH, A. N.; 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.

GLARE, T. *et al.* Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 250–258, 2012.

GRANADOS, R. R.; LI, G.; BLISSARD, G. W. Insect cell culture and biotechnology. **Virologica Sinica**, v. 22, n. 2, p. 83–93, 2008.

HARRISON, R. L.; SUMMERS, M. D. Mutations in the Autographa californica Multinucleocapsid Nuclear Polyhedrosis Virus 25 KDa protein gene result in reduced virion occlusion, altered intranuclear envelopment and enhanced virus production. *Journal of General Virology* 76, 1451–1459, 1995.

HINK, W. F. Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Nature**, v. 226, n. 5244, p. 466–467, 1970.

HU, W.; BERDUGO, C.; CHALMERS, J. J. The potential of hydrodynamic damage to animal cells of industrial relevance: Current understanding. **Cytotechnology**, v. 63, n. 5, p. 445–460, 2011.

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, 2003.

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, jun. 2007.

KAMEN, A. A. *et al.* Culture of insect cells in helical ribbon impeller bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 6, p. 619–628, 1991.

KAMEN, A. A. *et al.* On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, n. 1, p. 36–48, 1996.

KOST, T. A.; CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 5, p. 567–575, 2005.

KRELL, P.J. 1996. Passage effect of virus infection in insect cells. **Cytotechnology** 20, 125–137.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680–685, 1970.

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

LERCH, R. A.; FRIESEN, P. D. The 35-kilodalton protein gene (p35) of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus and the neomycin resistance gene provide dominant

selection of recombinant baculoviruses. **Nucleic acids research**, v. 21, n. 8, p. 1753–1760, 1993.

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.

LUA, L. H. L. *et al.* Phenotypic and genotypic analysis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus serially passed in cell culture. *Journal of General Virology* 83, 945-955, 2002

MAZID, S. 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, 2011.

MICHELOUD, G. A. *et al.* 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**, v. 162, n. 1–2, p. 258–266, 2009.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual review of entomology**, v. 44, p. 257–289, 1999.

MOSCARDI, F. *et al.* Baculovirus Pesticides: Present State and Future Perspectives. *In*: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. (Eds.). **Microbes and Microbial Technology**. New York, NY: Springer New York, 2011. 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.

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.

OHKAWA, T.; VOLKMAN, L. E.; WELCH, M. D. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. **Journal of Cell Biology**, v. 190, n. 2, p. 187–195, 2010.

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.

PADRE, G. A. DEL. **Estudo da cinética de crescimento de células de inseto Sf21 e infecção por baculovírus**. [s.l: s.n.].

PALOMARES, L. A; RAMIREZ, O. T. The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. **Cytotechnology**, v. 22, n. 1–3, p. 225–37, 1996.

PAMBOUKIAN, M. M. **Estudo da atividade respiratória de linhagens selvagens e transfectadas de células de insetos através de cultivos em biorreatores**. [s.l: s.n.].

REID, S.; CHAN, L.; OERS, M. M. VAN. Production of Entomopathogenic Viruses. *In*:

Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. p. 437–482.

RODRIGUEZ, V.; BELAICH, M.; GHIRINGHELLI, P. Baculoviruses : Members of Integrated Pest Management strategies. **Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics**, p. 463–480, 2012.

ROHRMANN, G. Baculoviruses as insecticides : Three examples. **Baculovirus Molecular Biology**, n. 4, p. 5–8, 2008.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus Molecular Biology**. Third Edit ed. Corvallis, OR: [s.n.].

SCHMID, G. Insect cell cultivation: growth and kinetics. **Cytotechnology**, v. 20, n. 1–3, p. 43–56, 1996.

SHOJAOSADATI, S. A. *et al.* Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 63–84, 2008.

SZEWCZYK, B. *et al.* Baculoviruses - Re-emerging biopesticides. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 143–160, 2006.

_____. Baculovirus biopesticides - a safe alternative to chemical protection of plants. **Journal of Biopesticides**, v. 2, n. 2, p. 209–216, 2009.

_____. Baculovirus Biopesticides. **Pesticides - Formulations, Effects, Fate**, p. 24–36, 2011.

THAKORE, Y. **The biopesticide market for global agricultural use.** [s.l: s.n.].

VALICENTE, F. H.; TUELLHER, E. DE S. **Controle Biológico da lagarta do cartucho, Spodoptera frugiperda, com Baculovirus** Circular técnica - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sete Lagoas, MG: [s.n.].

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.** [s.l: s.n.].

WU, J.; RUAN, Q.; LAM, H. Y. P. Evaluation of spent medium recycle and nutrient feeding strategies for recombinant protein production in the insect cell-baculovirus process. **Journal of Biotechnology**, v. 66, n. 2–3, p. 109–116, 1998.

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.

Apêndice

Nesse trabalho houve dificuldades na quantificação dos poliedros produzidos, porém numa tentativa de comparar a produção de corpos de oclusão entre os diferentes cultivos infectados, iniciou-se a utilização de uma metodologia baseada em eletroforese em gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970) para análise qualitativa da produção de poliedros virais.

Essa metodologia consiste na lise das células contendo os poliedros, seguida da desnaturação dos mesmos. Após a desnaturação, recupera-se a amostra e é feita a eletroforese.

O poliedro é composto principalmente de poliedrina, uma proteína de 30 kDa, assim a análise qualitativa da produção de poliedros é feita a partir da intensidade da banda com massa molecular correspondente a 30 kDa.

A lise celular foi feita misturando-se 1 volume de suspensão celular com 1 volume de SDS 1% e incubando por 1,5 horas a 28°C sob leve agitação.

A recuperação do material resultante da lise celular contendo os poliedros foi feita por centrifugação em centrífuga minispin a aproximadamente 8900 g por 10 min.

O pellet obtido foi ressuspensionado em tampão de corrida e fervido por aproximadamente 5 minutos, para então ser aplicado em gel de poliacrilamida na concentração de 12%.

Durante o período do trabalho, não houve padronização de variáveis como volume de amostra de cultivo, volume de tampão de corrida usado para ressuspender o pellet e tempo de centrifugação. Por isso os resultados obtidos não foram inseridos no corpo do trabalho, mas apresentados na forma de apêndice.

Seguem abaixo os resultados obtidos nas tentativas de padronização do protocolo de análise de produção de poliedros.

Foram utilizadas amostras dos cultivos em frasco schott infectados com o primeiro lote de vírus recebidos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - figura A 1 (a) e (b), amostras de ambos os cultivos em biorreator infectados com baculovírus, tanto com vazão gasosa de 0,2 L/min (figura A 2) quanto com vazão gasosa de 0,05 L/min (figura A 3).

Também foi realizado esse protocolo com amostras de infecção em frasco schott com o segundo lote de vírus cedido pela Embrapa – figura A 4 (a) e (b) e com amostras de um cultivo controle, no qual não houve infecção (figura A 5)

Apesar da diferença entre os géis, em todos, com exceção do gel referente ao controle, é possível notar bandas mais fortes na região de 30 kDa, indicando acúmulo de poliedros no interior das células infectadas.

Figura A 1– Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras retiradas dos ensaios com infecção em frasco schott realizados com primeiro lote viral, com MOI de aproximadamente 1; (a) Infecção 1; (b) Infecção 2. PM = padrão de peso molecular.

Fonte: Autor

Figura A 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras retiradas do ensaio com infecção em biorreator realizado com primeiro lote viral, com MOI de aproximadamente 1 e aeração de 0,2 L/min. PM = padrão de peso molecular.

Fonte: Autor

Figura A 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras retiradas do ensaio com infecção em biorreator realizado com segundo lote viral, com MOI de aproximadamente 1 e aeração de 0,05 L/min. PM = padrão de peso molecular.

Fonte: Autor

Figura A 4— Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras retiradas do ensaio com infecção em frascos schott de 500 mL realizado com segundo lote viral, com MOI de aproximadamente 1; (a) Infecção 1; (b) Infecção 2. PM = padrão de peso molecular.

Fonte: Autor

Figura A 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras retiradas de ensaio controle, sem infecção. PM = padrão de peso molecular.

Fonte: Autor