

GUILHERME AUGUSTO DEL PADRE

Estudo da cinética de crescimento de células de inseto Sf21 e infecção por baculovírus *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) para a produção de bioinseticida

São Paulo

2016

GUILHERME AUGUSTO DEL PADRE

Estudo da cinética de crescimento de células de inseto Sf21 e infecção por baculovírus *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) para a produção de bioinseticida

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

**São Paulo
2016**

GUILHERME AUGUSTO DEL PADRE

Estudo da cinética de crescimento de células de inseto Sf21 e infecção por baculovírus *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) para a produção de bioinseticida

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

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Livre-Docente Aldo Tonso

São Paulo

2016

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

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Del Padre, Guilherme Augusto

Estudo da cinética de crescimento de células de inseto Sf21 e infecção por baculovírus *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) para a produção de bioinseticida / G. A. Del Padre -- versão corr. -- São Paulo, 2016.
127 p.

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

1. Baculovírus 2. Produção in vitro 3. Células animais 4. Cultivo em suspensão 5. Biorreator I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II. t.

Aos meus pais que sempre me convenceram que é possível, sim, realizar os sonhos

AGRADECIMENTOS

Acredito que o ato de agradecer envolve, de alguma forma, tentar devolver a energia boa que foi recebida.

Assim, agradeço a oportunidade de ter entrelaçado meu caminho profissional ao do meu orientador. Mas, principalmente, por termos construído uma amizade cheia de felicidade. Por termos conseguido conciliar aprendizado, ensinamento e descontração durante esses 3 anos. Aldo, muito obrigado pela oportunidade que me concedeu! Escolhi um orientador e, de brinde, veio um grande amigo.

Nenhuma pesquisa é desenvolvida com singularidade. Desta forma, agradeço pela colaboração com a EMBRAPA. Marlinda e William, vocês foram fundamentais e essenciais para que esse trabalho fosse realizado. Muito obrigado por me receber no laboratório de vocês e por me ensinar praticamente tudo que sei hoje em relação aos baculovírus. Muitíssimo obrigado pela recepção de braços tão abertos. São parcerias como essa que inspiram a continuar construindo ciência no Brasil!

Aos meus pais sou grato por todo apoio e encorajamento, por me mostrarem motivos para sempre continuar, por sempre terem acreditado no meu sonho de ser cientista (às vezes, mais do que eu mesmo) e, principalmente, por sempre me permitirem escolher quais caminhos percorrer.

Agradeço a minha família, meus avôs e avós, minhas tias e tios, meus primos e primas pelos momentos que me mostraram a importância de meus estudos.

À Turma V de Engenharia Biotecnológica sou agradecido pelos momentos de companheirismo e pelas confraternizações, as quais foram essenciais para recarregar as energias e renovar a concepção de amizade. Em especial, devo agradecer a minha grande irmã, Bi, pela ajuda na análise estatística do planejamento experimental.

Sou grato aos meus irmãos da 4 de Paus, a melhor república de todas, Kairo, Fitu, Xuxão, Zappy, Fer, Rick, Caio, Mini e Dog pelos melhores momentos de minha vida durante a graduação e também durante o mestrado. Ao Zappy, principalmente, agradeço pela “encheção” para terminar a dissertação o quanto antes. Sobretudo, pela companhia. Voltar a morar com você torna meus dias uma reprodução do nosso tempo de graduação. Ter isso é impagável e foi um grande combustível durante a redação desse trabalho.

As minhas irmãs de república, Lu e Fer, agradeço por todas as risadas e pela gigante amizade formada. São Paulo tornou-se mais suportável graças à companhia de vocês.

Aos meus amigos de infância, Távião, Su e Amanda sou grato por tantos momentos especiais juntos. Vocês sempre me fizeram me sentir no caminho certo, independente dos obstáculos e desafios que foram aparecendo.

Agradeço imensamente a equipe de Células Animais do Cristália, Aline, Talita, Adriana, Eduardo e Léo, pela compreensão, apoio e, especialmente, por toda colaboração!

Ao sensei, Yassaka san, agradeço a paciência ao reler meus textos depois de treinos cansativos e com a energia já totalmente esgotadas.

Ao André, Débora e Karen pelos jantares cheio de descontração e divertimento. Momentos como esses são insubstituíveis.

Ao Fabri sou infinitamente grato por toda ajuda durante os experimentos. Esse trabalho não teria acontecido se não fosse por sua colaboração. Espero poder retribuir um dia toda esse apoio. Por hora, saiba que não tenho palavras para descrever o tamanho de minha gratidão.

Sou extremamente grato a Dr. Maria Isabel pela ajuda com a análise dos dados do planejamento experimental.

Agradeço aos alunos e funcionários do B20 pelos horários de almoço compartilhados, pelas companhias em aula. Às técnicas, Orlinda e Dea, agradeço pela solidariedade e ajuda em todos os momentos necessários.

Aos pesquisadores e técnicos do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantã agradeço pelas discussões e por todo auxílio técnico. Especialmente à Dani pela ajuda com os cultivos em biorreator e companhia durante os ensaios de final de semana. À Ana por ser minha descongeladora de células oficial e à Vera pela prestatividade em manter o LCA organizado e por ter me acolhido como um filho!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) agradeço pelo suporte financeiro através da concessão das bolsas.

Por fim, agradeço a Deus por ter possibilitado o acontecimento de toda essa etapa de minha vida da maneira que ocorreu.

“Enquanto eu tiver perguntas e não houver resposta continuarei a escrever”.

(Clarice Lispector)

RESUMO

O interesse em estudar o cultivo das células de inseto está relacionado entre outros usos a sua utilização na produção de biopesticidas. Há muitos anos os pesticidas químicos vêm contribuindo no controle de pragas na agricultura. Entretanto, o uso desses compostos prolongadamente tem resultado na seleção de insetos resistentes e em poluição ambiental. Diante disso, torna-se necessário o desenvolvimento e aprimoramento dos bioinseticidas. No Brasil, o baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) foi o principal agente de controle biológico da praga da soja *Anticarsia gemmatalis*. Assim, estudos que viabilizem a produção desses vírus *in vitro* possibilitariam uma produção mais controlada e de melhor qualidade desses biopesticidas. Neste trabalho, investigou-se a suscetibilidade à infecção por AgMNPV de diferentes linhagens celulares de Sf21 e o crescimento dessas células em diferentes sistemas: cultivos em *schotts*, em *spinner* e em biorreator, variando-se a idade do inóculo (IA) e a concentração celular inicial (X_0). Constatou-se variação no perfil de infecção das linhagens, sendo as linhagens mais adequadas para a produção de bioinseticida as linhagens de Sf21 denominadas EMBRAPA, UFRN e GibcoG, uma vez que estas apresentaram mais do que 40 % das células com poliedros em cultivos em suspensão, enquanto a linhagem denominada GibcoSF teve menos de 2 % das células infectadas com poliedros. Ao se estudar o efeito do número de subcultivos na morfologia e crescimento celular, foi averiguado um aumento no diâmetro de 10 % e no volume de 26 % das células UFRN em relação às células GibcoSF. Além disso, o crescimento das células UFRN foi 49% menor do que das células GibcoSF. Quando realizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para se analisar o efeito da IA e a X_0 na taxa de crescimento específica máxima (μ_{max}) e na concentração celular máxima ($X_{v_{max}}$) em cultivos em *schott* com células UFRN, obteve-se um modelo empírico. Quando analisadas as variáveis IA e X_0 separadamente, não foram encontradas diferenças significativas para as respostas $X_{v_{max}}$ e μ_{max} em relação a X_0 . Para a IA, entretanto, obteve-se os resultados mais satisfatórios para os inóculos com IA de 72 e 96 horas: $X_{v_{max}}$ de $5,97 \cdot 10^6$ cel/mL e $5,99 \cdot 10^6$ cel/mL, e μ_{max} de $0,70 \text{ dia}^{-1}$ e $0,63 \text{ dia}^{-1}$, respectivamente. Nos cultivos em *spinner* com células UFRN, foi observada a formação de grumos, o que levou a $X_{v_{max}}$ de $2,00 \cdot 10^6$ cel/mL. No cultivo em

biorreator com células UFRN, foi obtido um $X_{v_{max}}$ de $6,21 \cdot 10^6$ cel/mL, μ_{max} de $0,70 \text{ dia}^{-1}$, Q_{O_2} na fase exponencial de $67,3 \pm 3,6 \cdot 10^{-18} \text{ molO}_2/\text{cel/s}$, rendimento de glicose em célula igual a $1,0 \cdot 10^9$ cel/g de glicose e um rendimento de glutamina em células de $3,0 \cdot 10^9$ cel/mL. Comprovou-se, portanto, a existência de alterações na infecção entre diferentes linhagens de Sf21; a importância do estado fisiológico da célula nos subcultivos, a ocorrência de mudanças no crescimento celular de acordo com os sistemas de cultivo e o efeito do número de subcultivos na morfologia e crescimento de células Sf21

Palavras-chave: baculovírus, Sf21, produção *in vitro*, AgMNPV, cultivo em suspensão, DOE, biorreator, células animais.

ABSTRACT

Investigate the cultivation of insect cells is related to its use in the production of biopesticides among others. For many years, chemical pesticides have contributed in pest control in agriculture. However, the use of these compounds for prolonged periods has resulted in the selection of resistant insects and environmental pollution. Therefore, it is necessary the development and improvement of biopesticides. In Brazil, the baculovirus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) is the main biological control agent of the plague of soy *Anticarsia gemmatalis*. Thus, studies that enhance the production of these viruses *in vitro* would allow a more controlled production and better quality of biopesticides. In the present research, it was investigated the susceptibility of different Sf21 cell lines to infection by AgMNPV and the growth of these cells in different systems: cultivations in schotts, in spinner flasks and in bioreactor, varying the inoculum age (IA) and initial cell concentration (X_0). Variation was observed in the lineage's infection profile. The most appropriate lineage for the production of biopesticida where the ones denominated EMBRAPA, UFRN and GibcoG, since these showed more than 40% of the infected cells with polyhedra, while the one denominated GibcoSF had less than 2% of the infected cells with polyhedra. When studying the effect of the number of subcultures in morphology and in cell growth, an increase of 10% of the diameter and 26% in the volume of the UFRN cells was observed compared to the GibcoSF cells. Moreover, the cell growth of UFRN was 49% lower than the GibcoSF's. When performed the Rotational Central Composite Design (RCCD) to analyze the effect of IA and X_0 , the maximum specific growth rate (μ_{max}) and the maximum cell concentration ($X_{v_{max}}$) in cultures in schott with UFRN cells, it was obtained an empirical model. When the IA and X_0 were separately analysed, it was not found significant differences for $X_{v_{max}}$ and μ_{max} in relation to X_0 . For IA, however, it was achieved the most satisfactory results for inocula with IA of 72 and 96 hours: $X_{v_{max}}$ equals to 5.97×10^6 cells/mL and to 5.99×10^6 cells/ml, and μ_{max} of 0.70 day^{-1} and 0.63 day^{-1} , respectively. Cultures in spinner with UFRN cells clumped what led to $X_{v_{max}}$ of 2.00×10^6 cells/mL. In cultivation in bioreactor with UFRN cells, was reached $X_{v_{max}}$ of 6.21×10^6 cells/mL, μ_{max} of 0.70 day^{-1} , Q_{O_2} in the exponential phase of $67.3 \pm 3.6 \times 10^{-18} \text{ molO}_2/\text{cell/s}$, glucose to the cell yield equal to 1.0×10^9 cell/g of glucose and glutamine to cell yield of 3.0×10^9 cell/g of glutamine. It was shown, therefore, the existence of the infection

alterations among different lineages of Sf21, the importance of the physiological state of the cell for the subcultivation, the occurrence of changes in cell growth according to the cultivation systems and the effect of the number of subcultivation in morphology and in growth of Sf21 cells.

Keywords: baculovirus, Sf21, *in vitro* production, AgMNPV, suspension culture, DOE, bioreactor, animal cells.

SUMÁRIO

Lista de variáveis.....	15
Lista de abreviações	16
1. Introdução	18
2. Revisão Bibliográfica.....	20
2.1. Tipos de células de inseto	20
2.2. Cultivo, fisiologia e bioquímica das células de insetos	23
2.2.1. Efeito da temperatura, pH, osmolalidade, cisalhamento e oxigenação	24
2.2.2. Metabolismo de carboidratos	27
2.2.3. Metabolismo de aminoácidos.....	28
2.2.4. Metabolismo de lipídios.....	30
2.2.5. Formação de subprodutos	31
2.3. Bioprocessos com células animais (mamíferos e insetos).....	33
2.4. Tecnologias baseadas no uso de células de insetos.....	39
2.5. Os baculovírus.....	40
2.5.1. Ciclo de vida do baculovírus	42
2.5.2. Biopesticidas	45
3. Problemática	57
4. Hipótese	58
5. Objetivos	59
5.1. Objetivos gerais	59
5.2. Objetivos específicos.....	59
6. Materiais e métodos.....	60
6.1. Meios de cultura	60
6.1.1. TNM-FH (<i>Trichoplusia ni</i> Medium Composition).....	60
6.1.2. SF900™ II SFM e SF900™ III SFM.....	60
6.2. Células.....	60
6.3. Vírus	61
6.4. Criopreservação e manutenção do banco de células.....	61
6.4.1. Congelamento.....	61
6.4.2. Descongelamento	62
6.5. Captura de imagens	62
6.6. Cálculo dos parâmetros cinéticos	62
6.6.1. Taxa específica de crescimento.....	62
6.6.2. Fatores de conversão.....	63
6.6.3. Taxa específica de consumo de oxigênio	63
6.7. Infecção em células de diferentes origens.....	64

6.7.1. Teste em cultura estática	64
6.7.2. Teste em cultura em suspensão	65
6.8. Estudo do efeito da concentração celular inicial (X_0) e da idade do inóculo (IA)	65
6.8.1. Planejamento experimental composto completo rotacional (DCCR).....	65
6.8.2. Uma variável por vez “ <i>one-at-time</i> ”	66
6.9. Teste do efeito do número de passagens no metabolismo e morfologia de células Sf21	67
6.10. Cultivo de células Sf21 em <i>spinners</i>	67
6.11. Cultivo em biorreator de 1 L.....	68
6.12. Metodologia analítica	68
6.12.1. Determinação da concentração de células viáveis e totais e do biovolume.....	68
6.12.2. Medida do diâmetro e volume das células	69
6.12.3. Determinação da concentração de glicose, lactato, glutamina e glutamato	70
7. Resultados e discussão.....	71
7.1. Relação entre a infectividade do AgMNPV em células Sf21 e sua procedência	71
7.1.1. Infecção de células Sf21 com AgMNPV em cultivos estáticos.....	71
7.1.2. Infecção de células Sf21 com AgMNPV em cultivos em suspensão.....	78
7.2. Influência do número de subcultivos no metabolismo e morfologia celular	81
7.3. Estudo da cinética de crescimento das células Sf21 em diferentes sistemas e condições.....	85
7.3.1. Delineamento composto central rotacional (DCCR).....	85
7.3.2. Uma variável por vez.....	95
7.4. Sistemas para aumento de escala.....	106
8. Conclusões.....	114
9. Referências bibliográficas	117
10. Apêndice	124
10.1. Cinética de crescimento dos cultivos do Delineamento Composto Central (DCC).....	124

Lista de variáveis

ΔP	variação da concentração do produto no intervalo de tempo analisado
$-\Delta S$	variação da concentração do substrato no intervalo de tempo analisado
μ	taxa de crescimento específico
μ_{\max}	taxa de crescimento específica máxima
μ_{O_2}	taxa de consumo de oxigênio por unidade de substrato
μ_P	taxas específicas de produção de produto
μ_S	taxas específicas de consumo de substrato
Q_{O_2}	taxa específica de consumo de oxigênio
r_p	taxa instantânea de formação do produto ou metabólito
r_s	taxa instantânea de consumo do substrato
r_x	taxa instantânea de crescimento celular
S	concentração do substrato
t	Tempo
X_0	Concentração celular inicial
X_m	concentração de células não viáveis
X_t	concentração de células totais
X_v	Concentração de células viáveis
$X_{v_{\max}}$	concentração celular máxima
$Y_{P/S}$	coeficiente (ou fator) de conversão de substrato em produto
$Y_{X/S}$	coeficiente (ou fator) de conversão de substrato em células
$Y_{X/Glc}$	rendimento de glicose em células
$Y_{X/Gln}$	rendimento de glutamina em célula

Lista de abreviações

AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus</i>
Ala	Alanina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
bioV _{max}	biovolume máximo
BV	Vírus extracelulares (budded vírus)
DCC	delineamento composto central
DCCR	delineamento composto central cotacional
dCO ₂	gás carbônico dissolvido
DIPs	partículas interferentes defectivas (<i>Defective Interfering Particles</i>)
DO	oxigênio dissolvido
DOE	<i>Design of Experiment</i>
dpi	dias após a infecção
EMB	células provenientes da EMBRAPA
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FP	<i>Few Polyhedra</i>
GenBio	Grupo de Engenharia de Bioprocessos
GibcoG	células provenientes da Life Technologies adaptadas ao meio <i>Grace's Insect Medium</i>
GibcoSF	células provenientes da Life Technologies adaptadas ao meio SF900
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GV	Granulovírus
H ₂ O ₂	peróxido de oxigênio
IA	Idade do Inóculo
IC-BEVS	<i>insect cell baculovirus expression vector system</i>
ICD	concentração celular inicial
MM	meio Mitsuhashi-Maramorosch
MNPV	multiple nucleopoliedrovirus
MOI	multiplicidade de infecção
MP	<i>Many Polyhedra</i>
NPV	Nucleopoliedrovírus
O [•] ₂	Superóxido
OB	corpos de oclusão
ODV	vírus derivados dos corpos de oclusão (<i>occlusion derived vírus</i>)
OH [•]	Hidroxil
OUR	taxa instantânea de consumo de oxigênio
PC	Ponto central
PIFs	fatores de infectividade por via oral (<i>per os infectivity factors</i>)
RCF	<i>força de centrifugação relativa (relative centrifugal force)</i>
ROS	espécies reativas de oxigênio

S2AcGPV	células S2 transformadas para expressar a glicoproteína da raiva
S2MtEGFP	células S2 transformadas para expressar a proteína verde fluorescente
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SFB	soro fetal bovino
SNPV	single nucleopoliedrovirus
TCA	ciclo do ácido tricarboxílico
TOI	tempo da infecção
UFRN	células provenientes da Universidade do Rio Grande do Norte
UV	ultravioleta
VLP	<i>virus like particle</i>
α -keto	α -cetogluturato

1. Introdução

A capacidade da agricultura suportar a população crescente tem sido alvo de discussões por gerações e continua sendo um dos principais tópicos da política global. A erradicação da pobreza e da fome foi, inclusive, incluída como um dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio das Nações Unidas (*United Nations Millennium Development Goals*) em 2000. Para alcançar a segurança alimentar são necessárias reformas políticas e de investimento em frentes múltiplas. Dentre elas, são as principais: os recursos humanos, as pesquisas na área da agropecuária, a infraestrutura rural, os recursos hídricos e a gestão de comunidades rurais e de recursos naturais. Outra maneira de otimizar a produtividade agrícola é através de abordagens agroecotecnológicas que buscam conciliar o uso das terras tanto para produção quanto para conservação ambiental (COPPING; MENN, 2000).

O aumento da produção da soja brasileira e sua capacidade competitiva estão intimamente ligados aos avanços científicos e a disponibilização de tecnologias ao setor produtivo. Sejam essas tecnologias baseadas no desenvolvimento de novas variedades através do melhoramento genético, da transgenia, em cuidados com problemas fitossanitários, em conhecer as regiões mais propícias ao desenvolvimento da cultura, em conhecer os principais fatores responsáveis por perdas durante o processo, ou novos métodos para o controle de pragas (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2015).

Melhorias nas estratégias de manejo de pragas representam um método de se obter simultaneamente alta quantidade e qualidade na produção. Com isso, surge a necessidade do desenvolvimento e aprimoramento dos bioinseticidas que são eficientes, biodegradáveis e, em sua maioria, não apresentam nenhum efeito prejudicial ao meio ambiente e ao homem (MAZID, 2011).

A produção atual dos inseticidas virais, porém, é baseada, majoritariamente, na estratégia *in vivo*, a qual não consegue suprir a demanda do mercado. A produção do baculovírus utilizando cultivos celulares em biorreatores levaria a uma facilidade no aumento de escala e também a uma melhora no controle de qualidade do bioinseticida (SOUZA; MOSCARDI, 2002; MOSCARDI et al., 2011).

A multiplicação de baculovírus em cultivos celulares em suspensão permitirá a obtenção de importantes dados cinéticos, os quais serão utilizados para avaliar a viabilidade de produção dessas partículas virais em biorreatores. Além disso, a

caracterização molecular das principais alterações causadas pela passagem de vírus em células e o estudo da função de genes é essencial para desenvolvimento de sistemas de produção *in vitro*.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) tem sido responsável pela transferência de tecnologia e produção de baculovírus e outros tipos de biopesticidas e programas de controle biológico no Brasil. O grupo da EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia – vem estudando a utilização de variantes virais do baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) para a produção *in vitro* desse bioinseticida. Nesse sentido, a equipe do Laboratório de Células Animais do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo buscou realizar, em parceria com a Embrapa, estudos sobre diferentes linhagens de células de *Spodoptera frugiperda* (Sf21). Assim, essa dissertação pesquisou a cinética de crescimento e a infecção dessas células pelo baculovírus AgMNPV e seus variantes AgMP2 e AgMP5, para a produção de biopesticida.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Tipos de células de inseto

As primeiras linhagens de células de inseto foram isoladas por volta do fim da década de 1950 e começo de 60 com o intuito de se estudar seu metabolismo e fisiologia e, principalmente, para a produção *in vitro* de baculovírus. Mas a cultura de células de inseto teve sua importância evidenciada somente com o desenvolvimento de técnicas de manipulação genética dos baculovírus, por volta da década de 80, que tornou possível utilizá-los como vetores para expressão de proteínas recombinantes (AGATHOS, 2010).

Mais de 450 linhagens de células de insetos já foram estabelecidas a partir de mais de 100 diferentes espécies, englobando sete ordens e originárias tanto de gametas quanto de tecidos adultos como ovários e disco imaginal. O estabelecimento de uma linhagem celular pode ser feito através da dissociação mecânica ou enzimática do tecido de interesse. As células então dissociadas são mantidas em um meio de cultivo rico em nutrientes até que possa ser observado crescimento celular. Posteriormente, subcultiva-se essa mistura de células até que seja obtido uma cultura homogênea (PALOMARES; ESTRADA; RAMIREZ, 2006).

Devido à suscetibilidade das células à infecção pelo baculovírus, a tecnologia de sistema de expressão com vetor baculovírus em células de inseto (*insect cell baculovirus expression vector system* – IC-BEVS) utiliza as células, em sua maioria, provenientes de lepidópteros, em particular de *Bombyx mori* (bicho-da-seda), *Mamestra brassicae* (mariposa do repolho), *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho), *Trichoplusia ni* (lagarta-medea-palmo) e de *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja) (CASTRO; RIBEIRO; SOUZA, 2006; AGATHOS, 2010; MICHELOUD et al., 2011). Um resumo dos tipos de células utilizadas e por quais vírus conseguem ser infectadas pode ser observado na tabela 2-1.

Dentre essas, destacam-se, no uso industrial, as Sf21 e a Sf9, isoladas da *Spodoptera frugiperda* (Sf). A Sf21 foi a primeira linhagem a ser utilizada intensivamente na pesquisa e com aplicações tecnológicas (AGATHOS, 2010) e foi isolada de tecidos do ovários da *S. frugiperda* por Vaughn *et al.* (1977). Porém, a Sf9 (SUMMERS; STATION; SMITH, 1987), um clone produzido a partir da Sf21, é, possivelmente, a linhagem mais amplamente utilizada de todas as células de

insetos, devido ao seu crescimento aprimorado (maiores valores concentração celular máxima, por exemplo) e à alta suscetibilidade à infecção por baculovírus o que, na maioria das vezes, leva a uma excelente produção de título viral e de rendimentos de proteínas (AGATHOS, 2010).

Tabela 2-1. Linhagens celulares de lepidópteros usadas frequentemente para a produção de baculovírus selvagens e recombinantes (adaptado de SOLONESKI, 2012)

Linhagem celular	Inseto	Tecido de origem	Vírus que são suscetíveis
IPLB-Sf-21 (VAUGHN <i>et al.</i> , 1977)/ Sf9 (SUMMERS; STATION; SMITH, 1987)	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Ovários	AcMNPV, AgMNPV, SfMNPV, SINPV, TnSNPV
BTI-TN-5B1-4 (High Five™) (GRANADOS <i>et al.</i> , 1994)	<i>Trichoplusia ni</i>	Embriões	AcMNPV, AgMNPV, TnSNPV
BCIRL-HZ-AM1 (MCINTOSH; IGNOFFO, 1983)	<i>Heliothiszea Zea</i>	Ovários	AcMNPV, HaNPV, HzSNPV
Bm5 (GRACE, 1967)	<i>Bombyx mori</i>	Ovários	AcMNPV, BmNPV
IPLB-LdEIta (LYNN, 1989)	<i>Lymantria dispar</i>	Embriões	AcMNPV, LdMNPV
UFL-AG-286 (SIEBURTH; MARUNIAK, 1988)	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Embriões	AcMNPV, AgMNPV

A versatilidade dessas células também é responsável pelo seu grande emprego. A maioria das células de insetos são semi-aderentes, ou seja, podem ser cultivadas tanto em sistemas estáticos quanto em suspensão. As células de *Spodoptera frugiperda* podem ser adaptadas para suspensão e também são facilmente soltas das superfícies de poliestireno, sem o emprego de tripsina (AGATHOS, 2010). Apesar de algumas culturas aderentes apresentarem um rendimento e qualidade melhores, o escalonamento de processos baseados em células aderentes é mais trabalhoso. Assim, devido à facilidade de se cultivar as células *Sf* em suspensão, a maioria dos trabalhos passou a ser feita com células em suspensão (SCHMID, 1996).

A produtividade das células de inseto, tanto em células quanto em proteínas recombinantes ou baculovírus, está intimamente relacionada com o número de subcultivos que a célula se encontra, principalmente, se essas passagens seriadas forem realizadas em meios sem soro fetal bovino (SFB). Em alto número de passagens, a concentração celular máxima ($X_{v_{max}}$) e a produção de proteínas recombinantes tendem a diminuir, há um aumento da quantidade de proteínas celulares e também do tamanho das células. Isso pode ser explicado por uma

possível adaptação ao meio sem SFB mais intensa que leva a essa queda de produção e modificações morfológicas. Ademais, há a possibilidade de acontecer seleções não intencionais de células com baixo rendimento produtivo durante as passagens (DONALDSON; SHULER, 1998).

Frente toda essa diversidade de tipos celulares, para selecionar a melhor linhagem para a produção ou estudo a ser desenvolvido deve-se considerar, primeiramente, o produto em questão – vírus ou proteína. Juntamente, deve-se analisar a taxa máxima de crescimento, concentração celular máxima, estabilidade genética, suscetibilidade viral e processamentos pós-traducionais (BETENBAUGH et al., 2002). Apesar da maioria das células de lepidópteros serem capazes de realizar modificações pós-traducionais, como glicosilações dos terminais N e O, fosforilações, acetilação de ácidos graxos, sialilação, α -amidação, amidação do terminal N, carboximetilação e isoprenilação, cada tipo de célula tem seu padrão de modificações e armazenamento ou secreção. Geralmente, as células de *Spodoptera frugiperda* são utilizadas para produção de biopesticidas e para a síntese de proteínas intracelulares e periplasmáticas, enquanto as células *High Five*TM apresentam melhor desempenho para expressar proteínas glicosiladas e secretadas (AGATHOS, 2010).

Nesse aspecto, tratando-se da produção do baculovírus *Anticarsia gemmatalis nucleopoliedrovirus* (AgMNPV), Almeida (2010) obteve uma produtividade volumétrica de $5,30 \pm 0,85 \times 10^8$ corpos de oclusão (OB)/ mL em cultivos de Sf21 em frascos agitados e em meio SF900 II sem soro. Em cultivos de células saUFL-AG-286, foram descritas produtividades volumétricas de $2,49 \pm 0,28 \times 10^8$ OB/mL, em meio UNL-10 (MICHELOUD et al., 2011), e 3×10^8 OB/mL, em meio específico para cultivo de células saUFL-AG-286 (composição descrita em MICHELOUD et al., 2009) também em frascos agitados. Tratando-se da suscetibilidade de células Sf21 e Sf9 à infecção por AgNMPV, Castro et al. (2006) relataram uma produção de vírus extra celulares (BV) de $9,0 \times 10^6$ pfu/mL e de $3,40 \times 10^6$ pfu/mL para as células Sf21 e Sf9 respectivamente, em cultivos em meio TNM-FH. Nesse mesmo trabalho, enquanto as células Sf9 apresentaram uma porcentagem de $25\% \pm 1$ das células com poliedros após 96 horas de infecção, as células Sf21 apresentaram $70\% \pm 1$. Esses autores, porém, descreveram os melhores resultados de infecção para as células TN-5BI-4, com $17,0 \times 10^6$ pfu/mL de BVs e $95\% \pm 1$ das células com poliedros, e para a hospedeira natural, saUFL-AG-

286 (GIORIA; JÄGER; CLAUS, 2006), com $14,0 \times 10^6$ pfu/mL de BVs e $95\% \pm 1$ das células com poliedros. Assim, células Sf21 também podem ser consideradas uma opção para a produção de AgNMPV, sendo mais produtivas, em termos de OB e vírus extracelulares (BV), que as células Sf9.

2.2. Cultivo, fisiologia e bioquímica das células de insetos

Células de insetos necessitam de muitos componentes para o crescimento e os requerimentos das células infectadas e das células não infectadas por baculovírus são muito similares. Carboidratos, aminoácidos, fatores de crescimento, hormônios, lipídios, vitaminas e muitos elementos traços são alguns dos nutrientes indispensáveis para o cultivo dessas células. Entretanto, as taxas de consumo desses nutrientes podem variar de acordo com o estado fisiológico das células (Tabela 2-2).

A tecnologia de propagação de células de inseto *in vitro*, entretanto, as expõe a um ambiente bem diferente daquele fisiologicamente controlado no organismo completo, uma vez que os nutrientes não são constantemente regulados e os metabólitos não são eliminados. Além disso, há o estresse devido à hidrodinâmica, ao pH e à osmolalidade. (PALOMARES; ESTRADA; RAMIREZ, 2006).

O interesse em estudar o metabolismo das células de inseto está relacionado a sua utilização na produção de biopesticidas a base de baculovírus e também na expressão de proteínas recombinantes (FRESHNEY, 2010). Entender melhor o funcionamento do metabolismo dessas células é essencial para desenvolver meios de culturas mais adequados e formular estratégias de alimentação em bioprocessos, possibilitando, assim, a otimização nos procedimentos em interesse (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003).

Tabela 2-2. Coeficientes metabólicos para nutrientes em células Sf9 e BTI-Tn-5BI-4

	Sf9	BTI-Tn-5BI-4
<i>Células não infectadas</i>		
Coeficiente de manutenção específico (10^{-10} mmolATP/cell/hr)	2,5 3	na
Taxa de consumo específico de glicose (10^{-10} mmol/cell/hr)	0,5 2-0,78	1-2
Taxa de consumo específico de glutamina (10^{-10} mmol/cell/hr)	0,3 7-0,4	0,54
Taxa de consumo específico de oxigênio (10^{-10} mmol/cell/hr)	2-4	2,8-5,4
<i>Células infectadas</i>		
Taxa de consumo específico de glicose (10^{-10} mmol/cell/hr)	0,6 1	2,6-1,8
Taxa de consumo específico de glutamina (10^{-10} mmol/cell/hr)	0,1 8	0,58- 0,78
Taxa de consumo específico de oxigênio (10^{-10} mmol/cell/hr)	2- 7,6	3,2-5,8

Fonte: Traduzido de PALOMARES; ESTRADA e RAMIREZ, (2006)

2.2.1. Efeito da temperatura, pH, osmolalidade, cisalhamento e oxigenação

O intervalo ótimo de temperatura no qual as células de inseto crescem é relativamente pequeno em relação à células microbianas e situa-se entre 25 e 30° C, porém maior que células de mamíferos. Em estudos com variação da temperatura de 22 a 35° C, a taxa de crescimento específico (μ) apresentou um valor crescente com o aumento da temperatura até 30° C (de 0,41 a 1,13 dia⁻¹) e uma diminuição a partir de 35° C (atingindo 0,82 dia⁻¹). A temperatura ótima, em termos de μ , viabilidade celular e concentração celular final, foi de 27° C, uma vez que, nessa temperatura, atingiu-se a concentração máxima com viabilidade de 100%. Em valores mais baixos, o tempo necessário para atingir a concentração máxima foi maior e em

valores mais altos houve comprometimento da viabilidade das células (REUVENY *et al.*, 1993).

Há trabalhos com células Sf9 e Sf21 adaptadas para crescer em 37° C, mostrando uma capacidade termotolerante pelas células. Nessa condição, as células apresentaram um tempo de duplicação maior do que as células que cresciam a 28° C, mas começavam a morrer mais cedo. A composição da membrana celular sofreu um aumento na razão entre esfingomiéline e fosfatidilcolina e a porcentagem de ácidos graxos saturados também foi aumentada (GERBAL *et al.*, 2000).

Em relação ao pH, várias células crescem em valores por volta de 6,0 – 6,8. Para as células Sf9, descreve-se como ideal um pH entre 6,2 – 6,4 (HENSLE; AGATHOS, 1995). Com isso, o uso do tampão fosfato é o mais adequado para manter esses valores e não há a necessidade de se utilizar o sistema tamponante a base de CO₂/bicarbonato comumente utilizado nos cultivos com células de mamífero (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012).

Em pH mais baixo ou mais alto do que os descritos, observa-se um aumento da fase lag e um decréscimo da μ e da concentração celular máxima.

A sensibilidade das células de inseto a osmolalidades extremas é menor quando comparada às células de mamíferos. Enquanto as primeiras são cultivadas no intervalo de 350 e 385 mOsm/Kg (ZHANG; KALOGERAKIS; BEHIE, 1994), as últimas entre 260 e 320 mOsm/Kg (FRESHNEY, 2010).

Tratando-se do consumo de O₂, células de inseto apresentam uma taxa específica de consumo de oxigênio (Q_{O₂}) maior que as células de mamíferos, mas isso não exige que elas sejam cultivadas em reatores com controles de gás diferenciados (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012). Pamboukian *et al.* (2008) estudou a respiração de células Sf9 e S2 selvagens cultivadas em meio SF900 II. A Q_{O₂} máxima dessas células foi, respectivamente, igual a 7,3.10⁻¹⁴ mmolO₂/cel/s e 3,1.10⁻¹⁵ mmolO₂/cel/s. No mesmo trabalho, foi investigado os valores de Q_{O₂} de células S2 transformadas para expressar a glicoproteína da raiva (S2AcGPV) e para expressar a proteína verde fluorescente (S2MtEGFP). Essas células apresentaram valores de Q_{O₂} de 1,7.10⁻¹⁴ mmolO₂/cel/s e 1,9.10⁻¹⁴ mmolO₂/cel/mL, respectivamente.

Os dados da literatura referente às melhores condições de oxigenação para o crescimento das células de inseto são bastante variados e divergentes. Entretanto,

algumas considerações podem ser feitas: a maioria das células apresentam menor concentração celular máxima quando o oxigênio dissolvido (DO) é ajustado para valores próximos de 100% da saturação com ar e cultivos conduzidos com DO menores que 15% causaram um aumento dos vacúolos nas células, além de um decréscimo na concentração celular máxima. Confirmando, deste modo, a teoria de que DO muito baixas levam a uma limitação por O_2 , necessário para o metabolismo central de carboidratos como receptor final de elétrons, enquanto que altas DO podem ter efeitos tóxicos (SCHMID, 1996). Esse efeito tóxico do oxigênio, descrito como estresse oxidativo, refere-se a um desequilíbrio nos níveis celulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) como, por exemplo, superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxil OH^{\bullet} e peróxido de oxigênio (H_2O_2) e moléculas antioxidantes protetoras. ROS são responsáveis por mediar sinais de efeitos citostáticos, de crescimento ou metabólicos em culturas de células. O aumento na concentração de ROS pode levar à senescência, à morte celular ou à adaptação (HALLIWELL, 2003, 2014).

Para células Sf21, em meio IPL-41 e reator de tanque agitado com volume de trabalho de 2 litros, variando o DO de 40-100% da saturação com ar, obteve-se valores de μ máximo ($\mu_{m\acute{a}x}$) entre 0,39 – 0,60 dia^{-1} , sendo o valor máximo obtido com um DO de 70 %. Em 40% de DO, o número máximo de células reduziu mais que três vezes e o tempo de duplicação aumentou em 50% (DEUTSCHMANN; JÄGER, 1994).

Contudo, há autores que relatam valores similares tanto de $\mu_{m\acute{a}x}$ quanto de concentração máxima de células para valores de DO variando entre 15-100% em cultivos de células de *Trichoplusia ni* (SCHMID, 1996).

Recentemente, há estudos relacionando os valores de gás carbônico dissolvido (dCO_2) com a produtividade de proteínas recombinantes. Esse parâmetro passou a ser estudado e monitorado devido ao efeito adverso que alguns cultivos apresentaram quando o dCO_2 acumulava no meio de cultura durante o cultivo. Meghrous et al. (2015) mostraram que valores maiores que 100 mm Hg de dCO_2 resultaram em uma redução das atividades metabólicas, crescimento celular mais lento, viabilidade celular prolongada e redução da infecção viral. Esse trabalho ainda constatou que, devido ao acúmulo de CO_2 no meio de cultura, houve uma queda na produção de hemaglutinina, produto recombinante em foco no trabalho.

Dentro de sistemas agitados e/ou aerados, as células ficam sujeitas ao estresse de cisalhamento. Esse dano é em função do tipo da célula, duração e

magnitude das forças hidrodinâmicas causadas pela agitação e aeração. A resiliências das células de insetos para esse tipo de distúrbio é relativamente maior do que a apresentada pelas células de mamíferos. Características morfológicas de necrose ou apoptose aparecem quando o cisalhamento laminar é maior que $0,59 \text{ N/m}^2$ e quando a energia de dissipação ultrapassa $2,25 \times 10^4 \text{ W/m}^3$ em cultivos com células de insetos (PALOMARES; ESTRADA; RAMIREZ, 2006). Quando exposta a valores muito elevados de estresse hidrodinâmico, as células sofrem danos irreversíveis e morre por necrose (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012). Se submetida a valores médios desse stress, a célula tem sinais fisiológicos ativados que podem desencadear a apoptose (CHISTI, 2000).

2.2.2. Metabolismo de carboidratos

Dentre os diversos tipos de carboidratos utilizados pelas células de inseto, glicose é o mais importante e a fonte de energia e carbono preferível (DREWS; PAALME; VILU, 1995). Quando fornecida concomitante com outros carboidratos, ela é na maioria das vezes consumida primeiramente, indicando um fenômeno similar à repressão catabólica (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003). Se substituída por frutose ou maltose em cultivos com células Sf9, tem tanto o rendimento em célula quanto em produto diminuído. Apesar de ser ativado a via apoptótica quando a glicose é esgotada do cultivo (MENESES-ACOSTA et al., 2001), em ausência de carboidratos, as células de insetos puderam sobreviver por até 96 horas, mas não apresentaram crescimento (PALOMARES; RAMIREZ, 1996).

Entretanto, a amplitude e a eficiência na utilização de carboidratos diferem muito entre os tipos celulares. Para as células de *Trichoplusia ni* (comercialmente conhecida como *High Five™*), somente cinco carboidratos suportaram o crescimento celular: glicose, frutose, manose, maltose e trealose (BHATIA et al., 1997). Para Sf9, glicose, frutose e maltose podem ser utilizados para o crescimento. Apesar de alguns meios – TNM-FH, por exemplo – possuírem altas concentrações de sacarose, células *High Five™* não conseguem consumir esse dissacarídeo e células Sf9 a utilizam como fonte primária de energia mesmo na presença de glicose e após infectadas por baculovírus (SUGIURA; AMANN, 1996). Mesmo sendo a trealose o sacarídeo predominante na hemolinfa, quando outros carboidratos estão presentes,

ela não é utilizada (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003) (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012).

Comparando com as células de mamíferos, as células de inseto possuem uma taxa de consumo de glicose específica maior e também podem crescer em meios com glicose como único carboidrato (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012).

Células Sf9 apresentam um metabolismo de glicose eficiente, com 80% do piruvato formado sendo direcionado para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). A maioria dos derivados de glicose são direcionados para a formação de acetil-CoA e, assim, contribuem para o crescimento celular, enquanto somente uma pequena parcela é conduzida para a formação de alanina e de lipídios (BERNAL *et al.*, 2009). Porém, recentes estudos mostram que, apesar do perfeito funcionamento do TCA (BHATIA *et al.*, 1997), quando em cultivos de alta concentrações celulares, o fluxo da glicólise, do TCA e das vias anapleróticas é suprimido, levando a uma queda na energia metabólica. Isso interfere diretamente na produção de proteínas recombinantes e baculovírus.

2.2.3. Metabolismo de aminoácidos

O uso dos aminoácidos pelas células de insetos envolve tanto o catabolismo quanto o anabolismo (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003). Arginina, asparagina, aspartato, glutamato e glutamina podem ser facilmente oxidadas até CO₂, demonstrando, diante disso, a utilização desses componentes para a geração de energia. Além desses, a metionina também pode ser utilizada para o fornecimento energético. Aspartato, asparagina, glutamato, glutamina e serina são utilizados em uma taxa muito maior do que a necessária para a incorporação biosintética às proteínas celulares e outras estruturas (FERRANCE; GOEL; ATAAI, 1993; IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003). A questão nesse metabolismo descrito é saber se a energia fornecida pelo catabolismo dos aminoácidos é necessária para as biossínteses ou se esse direcionamento para a oxidação a CO₂ ocorre quando esses nutrientes são fornecidos em concentrações maiores direcionando, deste modo, sua utilização com função energética (BHATIA *et al.*, 1997).

Bhatia *et al.* (1997) explicaram através dos seus estudos que a maioria dos aminoácidos não são sintetizados pelas células de insetos. Isoleucina, lisina, histidina, leucina e treonina são aminoácidos cruciais quando se tratando das células Sf9 e metionina e tirosina são necessárias para atrasar a morte celular (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003). Sf21 e Sf9 apresentaram crescimento quando cultivadas em meios sem cisteína (DOVERSKOG; HAN; HÄGGSTRÖM, 1998), glutamina, glutamato e aspartato, se fornecido o íon amônio. Isso talvez seja explicado pela presença da glutamina sintetase nas células de *Spodoptera frugiperda*. No catabolismo da glutamina, que ocorre geralmente quando a glicose é limitante, ela é convertida a glutamato e amônio (Figura 2-1). Em seguida, o glutamato é transformado em α -celtoglutarato pela glutamato desidrogenase e, assim, direcionado ao TCA. A glutamina sintetase torna essa via reversível, possibilitando, portanto, a formação de glutamina a partir do íon amônio e glutamato. A formação de aspartato, por sua vez, advém do oxalacetato, o qual pode ser suprido pelas vias anapleróticas, principalmente, através do piruvato (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012). Todavia, a privação de glutamina afeta a taxa de crescimento, uma vez que sua síntese pelas células de inseto não é tão eficiente quanto o fornecimento pelo próprio meio (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003).

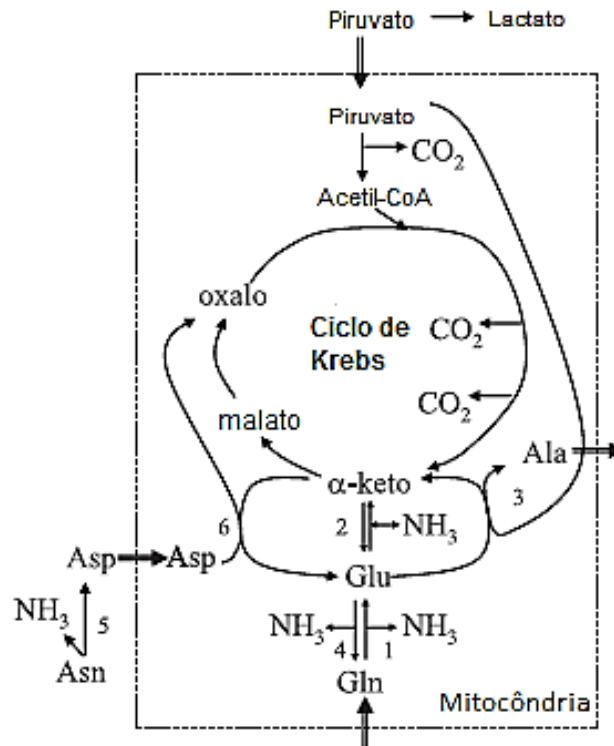


Figura 2-1. Metabolismo de Glutamina/Glutamato e Asparagina/Aspartato em células de inseto. Enzimas: 1. Glutaminase, 2. Glutamato desidrogenase, 3. Alanina aminotransferase, 4. Glutamina sintetase, 5. Asparaginase e 6. Aspartato aminotransferase. Adaptado de DRUGMAND et. al. (2012). Ala: alanina; Glu: glutamato; Gln: glutamina; Asn: asparagina; Asp: aspartato e α -keto: α -cetoglutarato.

2.2.4. Metabolismo de lipídios

O metabolismo de lipídeos em células de inseto não é muito bem relatado na literatura e apresenta algumas controvérsias. É claro que essas células são capazes de metabolizar os ácidos graxos para obter energia. No entanto, enquanto Bhatia *et al.* (1997) assumem que células de *Spodoptera frugiperda* são autossustentáveis em relação à produção de ácidos graxos, uma vez que elas até secretam lipídeos ao invés de usar os que estão disponíveis no meio; Ikonomou, Schneider e Agathos (2003) relatam que a via lipogênica das células de inseto é incompleta e, por isso, precisam de suplementação através do meio. Segundo eles, essas células são limitadas em sintetizar, desnaturar e alongar as cadeias dos ácidos graxos. Ao mesmo tempo, elas são incapazes de produzir o colesterol, necessário para a produção de hormônios e responsável por manter a fluidez da membrana citoplasmática. A privação de lipídeos leva a uma produção deficiente de baculovírus e à degeneração celular.

2.2.5. Formação de subprodutos

As altas taxas de consumo dos nutrientes, excedendo as quantidades necessárias tanto para a biossíntese de precursores quanto para a geração de energia, resultam em um fluxo aumentado da glicólise e da glutaminólise que, por sua vez, ocasiona um desequilíbrio metabólico e a formação de subprodutos como o lactato, amônio e alanina (DOVERSKOG *et al.*, 1997).

A principal diferença na formação de subprodutos entre as células de mamíferos e as células de insetos encontra-se na produção de lactato. Células Sf9 são bem conhecidas pela sua baixa síntese de lactato em cultivos sem limitação por oxigênio, mesmo com altas concentrações de glicose inicial (40 – 50 mM) (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003). Porém, células *High Five*TM pode chegar a uma produção de 7 a 45 mM de lactato (RHIEL; MITCHELL-LOGEAN; MURHAMMER, 1997). Isso pode estar relacionado com a formação de grumos que acontece nos cultivos com células *High Five*TM que não tiveram uma boa adaptação para a suspensão, uma vez que, nas células devidamente adaptadas para crescimento unicelular, essa alta produção de lactato não é observada (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003). Tanto células *High Five*TM quanto as células Sf9 conseguem consumir o lactato após a depleção do carboidrato (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012).

Há uma toxicidade intrínseca do lactato que ainda não foi totalmente compreendida. Sabe-se que a produção do lactato pela lactato desidrogenase é controlada por *feed-back* negativo e, por isso, sua produção tende a diminuir com o próprio acúmulo no citoplasma. O efeito tóxico do lactato em células de inseto é, provavelmente, similar ao apresentado nas células de mamíferos e está relacionado à diminuição do pH intracelular e ao aumento da osmolalidade do meio. Com a acidificação intracelular causada pelo acúmulo de lactato, há uma diminuição dos derivados da glicólise, os quais são necessários tanto para a biossíntese de fosfolípidios quanto para o funcionamento correto do TCA. Isso leva a um comprometimento tanto do crescimento celular quanto da produção de proteínas recombinantes (CRUZ *et al.*, 2000). Em células Sf9, concentrações de até 10 mM não apresentam influência no crescimento celular. Por volta de 12,5 mM, há um aumento sucinto da apoptose em células Sf9 e em *High Five*TM. Para as células Bm-

5, ocorre a inibição do crescimento em concentrações próxima a 8,5 mM (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012).

Outro subproduto das células de inseto, mas com menor significância, é o etanol. Células SF9 chegam a produzir um máximo de 11,5 mM foi relatado para três linhagens celulares em meio Mitsunashi-Maramorosch (MM) (TAKAHASHI et al., 1995).

Um importante produto catabólico em cultura de células animais é o amônio. Comparado às células de mamíferos, as células de insetos são menos sensíveis às concentrações de amônio resultantes do metabolismo de aminoácidos. Quando em níveis tóxicos, o amônio leva a apoptose, fragmentação do DNA e diminuição do volume celular. Sf9 não tem seu crescimento afetado se a concentração de NH_4^+ alcançam 10 mM (CRUZ et al., 2000; IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003). A toxicidade desse íon ainda é um pouco indefinida, mas provavelmente deve-se a uma alteração do pH intracelular. O acúmulo desse íon pode ainda ocasionar uma perturbação no gradiente eletroquímico das células que, por sua vez, causa uma acidificação do pH intracelular (CRUZ et al., 2000). A regulação do pH intracelular em resposta a amônia adicional é complexa. A razão entre a concentração de amônia livre em forma de gás e do íon amônio é um equilíbrio determinado pelo pH: em forma gasosa, a amônia pode ser absorvida pelas células muito rapidamente e, assim, eleva o pH intracelular; a penetração do íon amônio nas células de forma lenta diminui, então, o pH de volta. Qualquer mudança nesse equilíbrio, pode levar a distúrbios no pH intracelular e, com isso, modificar a atividade de diversas enzimas metabólicas, além de aumentar o consumo de energia necessário para manter a homeostasia do pH (OZTURK; RILEY; PALSSON, 1992; CRUZ et al., 2000).

Esse mesmo tipo celular pode ainda direcionar a produção de amônio através da produção de alanina na presença de glicose em excesso. Esse sistema funciona como um reservatório de amônio na desintoxicação do meio. A tolerância das células de inseto à alanina é muito maior do que ao amônio. Esse aminoácido não é tóxico a essas células em concentração de até 100 mM (ÖHMAN; LJUNGGREN; HÄGGSTRÖM, 1995).

Há, ainda, um efeito sinérgico entre o amônio e o lactato. Em cultivos de células de mamíferos, quando a concentração de lactato alcançou valores altos (maiores que 12 mM), houve uma potencialização dos efeitos inibitório do amônio no crescimento e uma maior alteração nas taxas de consumo de nutrientes. Entretanto,

em concentrações baixas de lactato, a toxicidade do amônio foi reduzida. Além disso, o lactato diminui a excreção do íon amônio. Há duas hipóteses para esse fenômeno: ou o lactato age como quelante do cálcio, influenciando nas bombas transmembranas e, assim, diminuindo a exocitose; ou o lactato inibe a glutaminólise e, conseqüentemente, reduz a liberação de amônio proveniente da glutamina (HASSELL; GLEAVE; BUTLER, 1991).

2.3. Bioprocessos com células animais (mamíferos e insetos).

Com o avanço dos estudos na produção de biopesticidas e proteínas recombinantes, tornou-se necessário o desenvolvimento do conhecimento e das técnicas relacionados ao aumento de escala e monitoramento dos processos. Desde então, tem-se buscado definir as melhores condições ambientais de cultivo para a proliferação celular e para produção de diversas proteínas recombinantes de uso, principalmente, farmacêutico. Como consequência desses estudos, muitos tipos de equipamentos para controlar as condições físico-químicas de cultivo foram desenvolvidos, originando os sistemas de biorreatores aplicados atualmente nas indústrias farmacêuticas.

O desafio principal no *design* de biorreatores, no caso de cultivo de células animais é garantir a transferência de oxigênio sem causar estresse às células. A formação de regiões com grandes diferenças de gradientes de concentração e locais com condições subótimas de temperatura e aeração causaria a morte indesejada de grande parte da população de células (CASTILHO et al., 2008, cap. 9).

Para assegurar a propagação celular e a biossíntese do produto de interesse, os biorreatores devem atender aos seguintes requerimentos:

- a) Controlar o equilíbrio ácido-base (pH) do meio de cultura;
- b) Controlar a temperatura;
- c) Realizar a troca gasosa, suprimindo a demanda de oxigênio pelas células e eliminando o excesso de gás carbônico do meio;
- d) Permitir o fornecimento de nutrientes através da alimentação de formulação adequada de meios de cultura;
- e) Prover superfície de adesão suficiente, no caso de células dependentes de adesão;

- f) Manter a condição asséptica, evitando, assim, a contaminação do cultivo por outras células, por vírus ou por micro-organismos.

É extremamente importante compreender o comportamento das células em diferentes condições de cultivo. Esse conhecimento permite identificar componentes que possam limitar ou inibir tanto o crescimento das células quanto a formação de produtos. Com isso, é possível modificar formulações de meios de cultura e parâmetros de cultivos e, assim, manter as condições de cultivo dentro dos valores ótimos até o final do processo.

A identificação do fenômeno que explica o comportamento do sistema estudado depende da análise dos dados da cinética. As taxas específicas e os coeficientes de rendimento são as variáveis mais estudadas para esses casos. Quando dados de concentração celular são acessíveis, crescimento e morte celular, assim como a viabilidade, são as melhores variáveis para a caracterização do estado fisiológico que se encontra a cultura. Na ausência desses dados, como no caso de células imobilizadas, a análise deve ser feita com base no consumo de substratos ou na formação de metabólitos (CASTILHO et al., 2008).

O estudo cinético de um processo fermentativo é baseado na análise da mudança das variáveis de estudo (concentração celular, viabilidade, concentração de substrato e de metabólitos, concentração de produtos, etc.) durante o tempo de cultivo (SCHMIDELL et al., 2001, cap. 6). Com a representação desses valores em função do tempo, é possível construir modelos que representem o processo estudado.

Para isso é necessário determinar as taxas de transformação características. A taxa de crescimento celular instantâneo pode ser calculada de acordo com a equação (1) abaixo:

$$r_x = \frac{dX_v}{dt} \quad (1)$$

onde, r_x é a taxa instantânea de crescimento celular, X_v é a concentração de células viáveis (cel/mL) e t o tempo (horas, dias, etc.).

Equações similares podem ser escritas para a taxa de consumo instantânea de um determinado substrato (glicose e glutamina, por exemplo) e para a taxa de produção instantânea de um determinado produto ou metabólito (a proteína recombinante de interesse ou algum inibidor, por exemplo).

$$r_S = - \frac{dS}{dt} \quad (2)$$

$$r_P = \frac{dP}{dt} \quad (3)$$

onde, r_S é a taxa instantânea de consumo do substrato, S é a concentração do substrato (g/L, mM, mg/L), r_P a taxa instantânea de formação do produto ou metabólito e P a concentração do produto ou metabólito (g/L, mM, mg/L).

Essas taxas são necessárias para a caracterização fisiológica da cultura, mas não são suficientes. Isso ocorre porque em um determinado intervalo de tempo a concentração de células pode variar muito e isso reflete nas taxas de transformação instantâneas (CASTILHO et al., 2008, cap. 8). Assim, tem-se a taxa de crescimento específico (μ), a taxa característica da população, a qual é a taxa de crescimento celular instantânea dividida pela concentração celular naquele momento e pode ser representada de acordo com a equação 4, abaixo descrita:

$$\mu_x = \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dX_v}{dt} = \frac{r_x}{X_v} \quad (4)$$

Mantendo o mesmo raciocínio é possível, então, calcular as taxas específicas de consumo de substrato (μ_s) (Equação 5) e de formação de produto (μ_p) (Equação 6):

$$\mu_s = - \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dS}{dt} = \frac{r_s}{X_v} \quad (5)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dP}{dt} = \frac{r_p}{X_v} \quad (6)$$

Ainda há os coeficientes de rendimento e de manutenção, os quais medem a conversão de substrato em células e de substrato em produto. A conversão de substrato se dá para muitos componentes (Figura 2-2), uma vez que, além de se multiplicar, as células precisam de nutrientes para a própria manutenção. Esses coeficientes ajudam muito na compreensão das mudanças metabólicas que as células apresentam durante o cultivo (SCHMIDELL et al., 2001, cap. 6).

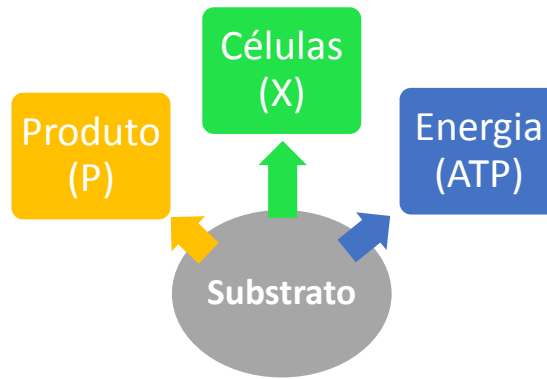


Figura 2-2. Partição da conversão celular entre as vias metabólicas celular

Assim, pode-se descrever os coeficientes de conversão de substrato em célula e de substrato em produto (ou metabólito) em um intervalo de tempo Δt , de acordo com as equações (7) e (8).

$$Y_{X/S} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (7)$$

onde, $Y_{X/S}$ é o coeficiente (ou fator) de conversão de substrato em células (cel/mL/g), ΔX a variação da concentração celular no intervalo de tempo analisado (cel/mL) e ΔS variação da concentração do substrato no intervalo de tempo analisado.

$$Y_{P/S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (8)$$

onde, $Y_{P/S}$ é o coeficiente (ou fator) de conversão de substrato em produto (g de produto/g de substrato), ΔP a variação da concentração do produto no intervalo de tempo analisado (cel/mL) e $-\Delta S$ variação da concentração do substrato no intervalo de tempo analisado.

Os fatores de conversão instantâneos podem ser calculados usando-se a relação entre a taxa de consumo de substrato e a taxa de crescimento celular e a taxa de formação de produto (Equação 9 e 10).

$$Y_{X/S} = \frac{r_x}{r_s} = \frac{\mu_x}{\mu_s} \quad (9)$$

$$Y_{P/S} = \frac{r_p}{r_s} = \frac{\mu_p}{\mu_s} \quad (10)$$

Correlações podem ser feitas com os mesmos princípios para gerar algumas informações a respeito do consumo e direcionamento dos diferentes substratos. Como, por exemplo, $Y_{O_2/S}$, a taxa de consumo de oxigênio por unidade de substrato (Equação 11).

$$Y_{O_2/S} = - \frac{\mu_{O_2}}{\mu_s} \quad (11)$$

onde, $Y_{O_2/S}$ é a taxa de consumo de oxigênio por unidade de substrato e μ_{O_2} a taxa de consumo específico de oxigênio.

A partir da análise dos valores de μ , o crescimento celular pode ser dividido em pelo menos 4. Dependendo do cultivo, algumas dessas fases podem ser observadas ou não (SCHMIDELL et al., 2001, cap. 6; CASTILHO et al., 2008, cap. 8 e 2).

A fase *lag* (de adaptação ou latente) pode aparecer no começo de alguns cultivos, durante a qual nenhum crescimento é registrado, caracterizando, desta forma, valores nulos de μ . Nessa fase as células estão se adaptando a condição de cultivo. Após essa adaptação, as células começam a se dividir, apresentando um μ crescente, característico da fase de aceleração. Ao chegar ao valor máximo e constante de μ as células encontram-se em sua melhor condição fisiológica para o sistema e passam a crescer exponencialmente (*log*), caracterizando a fase exponencial. A duração dessa fase pode ser influenciada pela concentração do inóculo, pela disponibilidade dos nutrientes e pelo acúmulo de metabólitos inibidores (CASTILHO et al., 2008). Com o fim das condições ótimas de cultivo, como, por exemplo, o exaurimento de um substrato fundamental para o crescimento, as células começam a parar de se dividir. Há, então, uma queda progressiva na μ_x e a concentração celular entra em um novo *plateau*, a fase estacionária. Em alguns casos, o crescimento nessa fase se cessa: existe um equilíbrio entre a quantidade de células que estão morrendo e as células que ainda se dividem. Quando o número de células que morrem ultrapassa o número de células formada, ocorre uma diminuição da concentração de células viáveis e uma queda na viabilidade celular, características da fase de declínio ou morte (Figura 2-3).

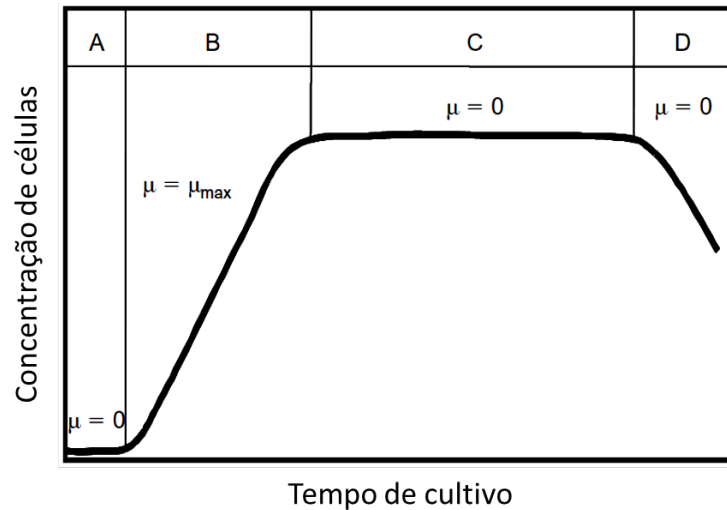


Figura 2-3. Fases do crescimento celular em um cultivo em batelada. A: fase lag ou de adaptação; B: fase exponencial ou Log; C: fase estacionária; D: fase de declínio ou morte. (Ordenada corresponde ao $\ln(\text{concentração de células})$) (CASTILHO et al., 2008).

As cinéticas de crescimento celular, de consumo de substrato e de formação de produto podem variar muito entre os sistemas de cultivo (batelada, batelada alimentada, contínuo). No sistema de batelada, a Figura 2-4 representa o comportamento característico das principais variáveis de processo.

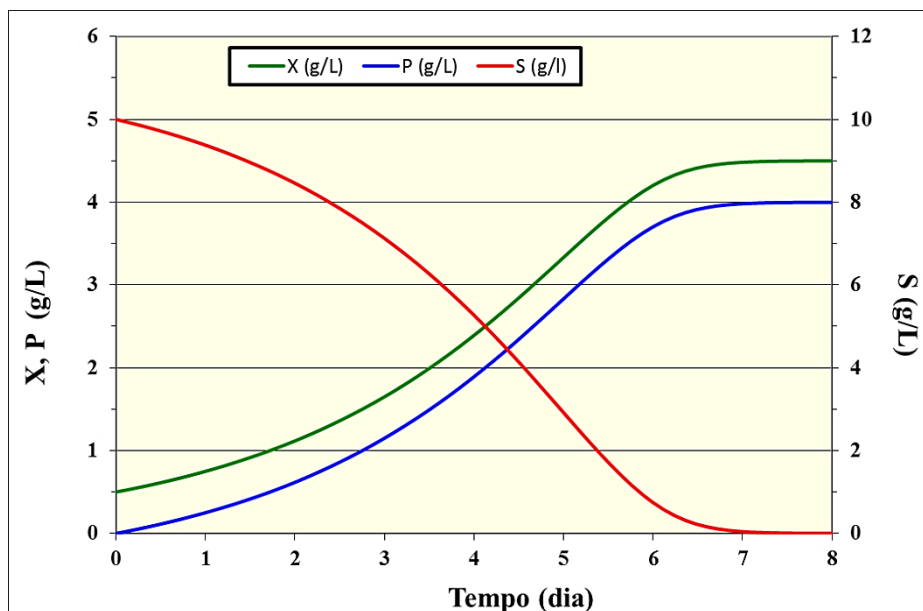


Figura 2-4. Cinética de crescimento celular, consumo de substrato e síntese de produto em um cultivo em batelada. P: produto; X: concentração de células e S: substrato.

O estudo das cinéticas do processo e seus respectivos parâmetros possibilita a compreensão dos fatores limitantes tanto durante a produção de células quanto

durante a síntese do produto de interesse. A partir desse conhecimento, consegue-se planejar estratégias de otimização como, por exemplo, alimentação do cultivo com substratos (aminoácidos, vitaminas, carboidratos, entre outros) e, assim, aumentar o rendimento.

2.4. Tecnologias baseadas no uso de células de insetos

Os principais produtos obtidos através da aplicação de células de inseto são os bioinseticidas e proteínas recombinantes, sendo que as últimas podem ser para fins de pesquisa, teste de diagnósticos ou para uso terapêutico como biofármacos (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003; AGATHOS, 2010; DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012).

Hoje, mais de 40 tipos de baculovírus selvagens produzidos *in vivo* são usados como biopesticidas contra lepidópteros que atacam algodão, milho, tabaco, uvas e muitas outras culturas (GLARE *et al.*, 2012).

O desenvolvimento da tecnologia do IC-BEVS (*Insect cell – baculovirus expression vector system*) levou a uma variedade na produção de proteínas recombinantes para aplicações comerciais, biomédicas, diagnóstico e pesquisas. Atualmente, mais de 500 genes já foram expressos em IC-BEVS (PALOMARES; ESTRADA; RAMIREZ, 2006).

Devido à eficiência, segurança e custos, para aplicações biomédicas, a produção de proteínas recombinantes e agentes virais usando o IC-BEVS tem uma perspectiva promissora. Esse sistema apresenta boas condições para a produção de subunidades de vacinas através da expressão de antígenos proteicos ou de partículas semelhantes a vírus (VLP - *virus like particle*). Porém, ainda é necessário considerar o padrão de glicosilação dessas células, o qual difere das células de mamíferos. Mesmo assim, para produção de vacinas, a falta de padrão de glicosilação semelhante à dos humanos não é crítica e até pode otimizar a resposta imune à vacina (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012).

O primeiro produto terapêutico baseado no IC-BEVS foi uma vacina veterinária contra o vírus da febre suína, aprovado em 2000. A primeira vacina para uso humano foi desenvolvida pela empresa GlaxoSmithKline (Bélgica), Cervarix®, uma vacina para o papilomavírus humano (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012). Há também a FluBlok®, a primeira vacina para influenza baseada em

hemaglutinina recombinante (“Flublok Homepage,” 2014). Em testes clínicos, encontram-se diversos produtos em fase II e III: Novavax (uma vacina de VLP recombinante para a influenza H1N5) (fase II), vacina para o câncer de próstata da empresa Dendreon Corporations (fase III), entre outras (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012).

IC-BEVS também vem sendo adaptado para a produção de vetores virais para a terapia gênica e para a expressão de proteínas multiméricas ou proteínas que são difíceis de serem expressas e de grande interesse na pesquisa de atividades biológicas, na descoberta de novas drogas, para a sustentabilidade na agricultura, etc (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012). O entendimento mais profundo da fisiologia das células infectadas e não infectadas através da engenharia metabólica e um aprimoramento constante dos meios de cultura e das técnicas de cultivo podem contribuir para a validação de processos a base de IC-BEVS que sejam eficientes, escalonáveis e seguros (AGATHOS, 2010).

2.5. Os baculovírus

Existem pelo menos 12 famílias virais associadas com insetos e outros artrópodes. Esses vírus ocorrem naturalmente nas populações de insetos e são normalmente nomeados a partir do hospedeiro do qual foram isolados. Dentre essas famílias, a mais investigada é a *Baculoviridae*, devido a sua aplicação em bioregulação de pragas na agricultura e como uma valiosa ferramenta biotecnológica, como vetor de expressão (MOSCARDI *et al.*, 2011; SZEWCZYK *et al.*, 2011).

Baculovírus são um amplo e diverso grupo de vírus (mais de 1.000 baculovírus já foram isolados) de DNA duplo e circular, fechado covalentemente, com genoma variando de 80 Kbp até 200 Kbp e codificando entre 100 – 180 proteínas (SZEWCZYK *et al.*, 2011). São patogênicos aos artrópodes, principalmente aos insetos das ordens Lepidóptera, Himenóptera e Díptera (MOSCARDI *et al.*, 2011; KING *et al.*, 2012).

Há duas formas fenotípicas do baculovírus: vírus derivados dos corpos de oclusão (*occlusion derived virus* – ODV) e os vírus extracelulares (*budded virus* – BV), os quais possuem uma estrutura de nucleocapsídeo em comum e a mesma informação genética (MOSCARDI *et al.*, 2011). Esses tipos virais são produzidos em

diferentes tempos de infecção, apresentam proteínas e membranas virais desiguais e com funções e modo de infecção diferentes. BVs são produzidos na fase tardia da infecção, obtêm sua membrana da membrana celular e necessitam de uma proteína de fusão – GP64 ou proteína F – para viabilizar a infecção celular (REID; CHAN; OERS, 2013); ODVs são produzidos na fase muito tardia da infecção quando os nucleocapsídeos são envelopados, dentro do núcleo, e, posteriormente, ocluídos numa estrutura de cristal proteico, formando os corpos de oclusão (*Occlusion Bodies* – OBs) .

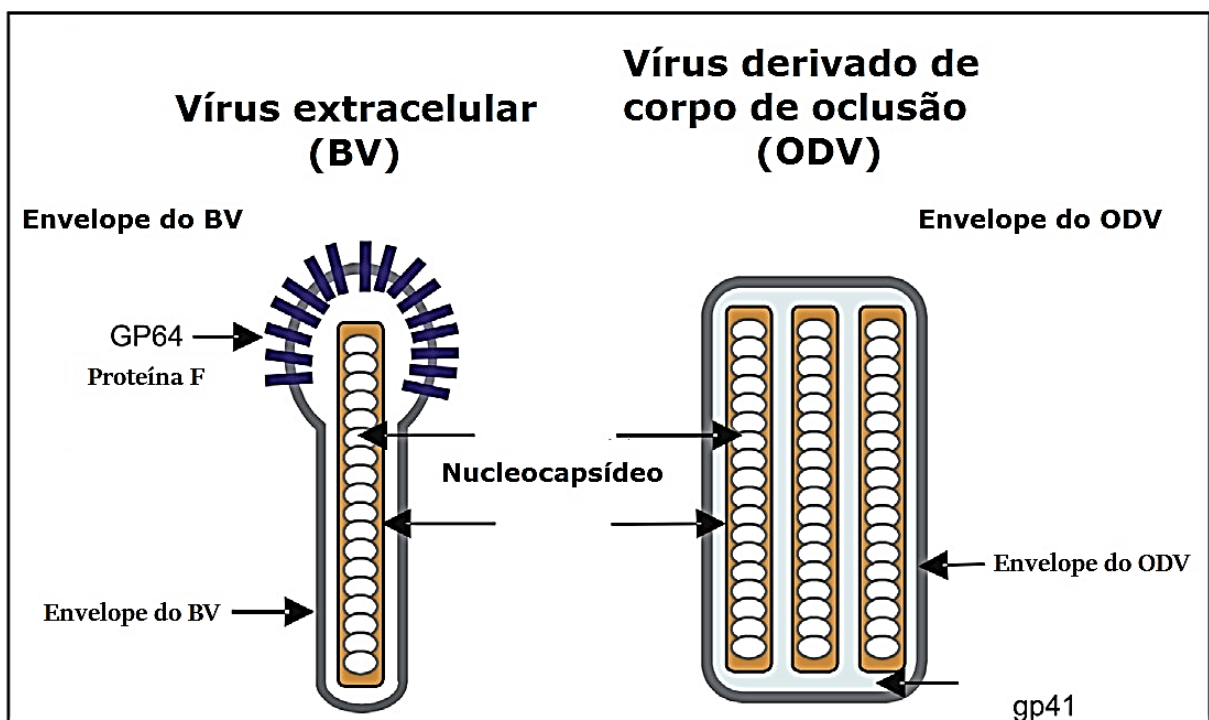


Figura 2-5. Fenótipos dos baculovírus. Adaptado de REID; CHAN e OERS (2013).

Dependendo da morfologia e dos OBs, os baculovírus são divididos em nucleopoliedrovírus (NPV) e granulovírus (GV) (Figura 2-6). O primeiro é caracterizado pela presença de várias partículas virais por OB e pelo encapsulamento dos nucleocapsídeos pela poliedrina. Os NPV podem ainda conter ODVs com apenas um vírion (*single* - SNPV) ou vários vírions (*multiple* – MNPV). Os GV são caracterizados por possuírem apenas um ODV por OB com um único vírion e a proteína que encapsula o nucleocapsídeo é a granulina (MOSCARDI et al., 2011; REID; CHAN; OERS, 2013).

A família *Baculoviridae* é dividida em quatro gênero: *Alphabaculovirus* (contém os *nucleopoliedrovírus* (NPVs) que infectam os lepidópteros), *Betabaculovírus* (contém os GV e são encontrados em lepidópteros também), *Gammabaculovírus* (NPVs que infectam os himenópteros) e *Deltabaculovírus* (NPVs que infectam os dípteros) (REID; CHAN; OERS, 2013). Os *Alphabaculovirus*, por sua vez, são divididos taxonomicamente em dois grupos de acordo com a proteína de fusão presente no BV: NPV I para os vírus que possuem a proteína de fusão GP64 e NPV II para os vírus que possuem a proteína F. O baculovírus *AgMNPV* é um alphabaculovirus MNPV do grupo I.

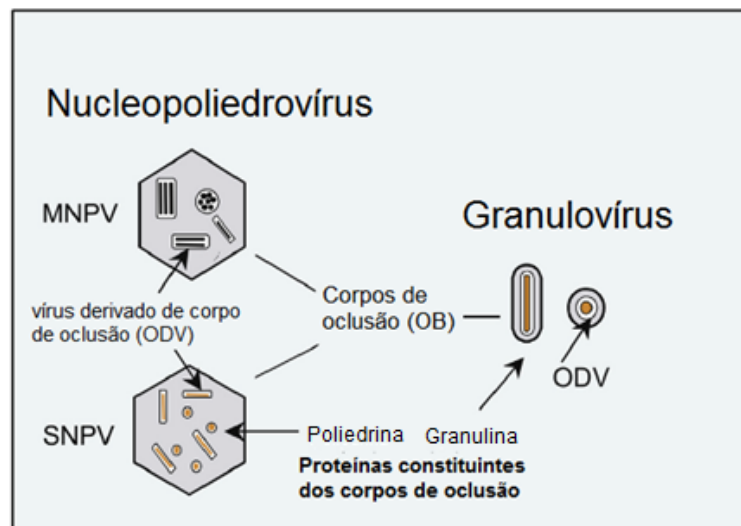


Figura 2-6. Morfologia e composição dos tipos de OBs

2.5.1. Ciclo de vida do baculovírus

O ciclo viral começa quando um inseto hospedeiro suscetível ingere OBs que foram depositados na folhagem por um inseto infectado. ODVs estabelecem a infecção primária, no intestino médio, ao serem liberados da digestão de OBs. A matriz paracristalina da poliedrina ou granulina que envolve os ODVs é solubilizada no ambiente alcalino do intestino médio das larvas, liberando os ODVs que entram nas células intestinais através de uma fusão com a membrana celular.

A infecção primária que ocorre no intestino médio do inseto é o principal evento para que o baculovírus se estabeleça no organismo do hospedeiro via oral. O primeiro contato do vírus com as células epiteliais do intestino médio do inseto ocorre quando os ODVs são liberados pela solubilização da poliedrina dos OBs.

Essa primeira interação células-vírus é mediada pelos fatores de infectividade por via oral (*per os infectivity factors*) (PIFs) presentes no envelope dos ODVs. Atualmente, já foram identificados seis tipos de PIFs conservados na família *Baculoviridae*: P74, PIF1, PIF2, PIF3, PIF4 e PIF5. A deleção de qualquer um desses fatores inviabiliza por completo a infecção oral do vírus (HUANG et al., 2012). Assim, trata-se de um componente indispensável no desenvolvimento de biopesticidas. Os BVs, por sua vez, não necessitam dos PIFs para a sua formação. BVs com deleções dos genes PIFs, inclusive, são infectantes mediante injeção direta no hemocelo do hospedeiro.

Uma vez dentro das células epiteliais do intestino médio, o nucleocapsídeo viral migra através dos filamentos de actina do citoesqueleto para o núcleo, onde a replicação do DNA viral é iniciada (OHKAWA; VOLKMAN; WELCH, 2010). Com a intensa formação e acúmulo do novo material genético, desenvolve-se uma estrutura celular denominada estroma virogênico, uma região eletrodensa no núcleo celular. Ao mesmo tempo, as proteínas do capsídeo viral são sintetizadas para encapsular o material genético viral, dando origem aos nucleocapsídeos progênitos. Na superfície da célula, ao realizar um “brotamento”, o nucleocapsídeo recebe o envelope membranoso da membrana da célula do hospedeiro, formando, assim, o BV. É nessa estrutura viral que se encontra a proteína de fusão F (presente na maioria dos gêneros de baculovírus) e a proteína GP64 (presente no grupo I NPV dos alphabaculovirus). São essas proteínas que mediam a fusão pH dependente do envelope do BV com a membrana da célula alvo (REID; CHAN; OERS, 2013).

Como as células do epitélio intestinal do inseto são renovadas constantemente, a produção de BV precisa ser rápida para impedir a prevenção da infecção pela renovação das células já infectadas. Acredita-se que isso é feito através da migração direta do nucleocapsídeo, originário do ODV, da extremidade apical para a extremidade basal da célula. No caminho, o nucleocapsídeo adquire a proteína de fusão expressa (GP64) de um promotor precoce (*early promoter*) e forma o BV funcional que irá dar sequência a infecção secundária. Dessa forma, a infecção secundária acontece antes mesmo da replicação completa do DNA parental (WASHBURN et al., 2003).

Na infecção secundária, o processo de infecção e de “brotamento” se repete, mas com uma retenção dos nucleocapsídeos no interior do núcleo. Esses nucleocapsídeos recebem um envoltório originário da membrana nuclear interna e

se tornam os novos ODVs (BRAUNAGEL; COX; SUMMERS, 2009). Esses ODVs são, então, encapsulados pelas proteínas do corpo de oclusão (poliedrina ou granulina) para formar os OBs. Esses OBs formados durante a infecção são liberados com a morte e desintegração ou liquefação do hospedeiro infectado e, assim, iniciam um novo ciclo de infecção em outros insetos. As etapas do ciclo podem ser visualizadas na Figura 2-7.

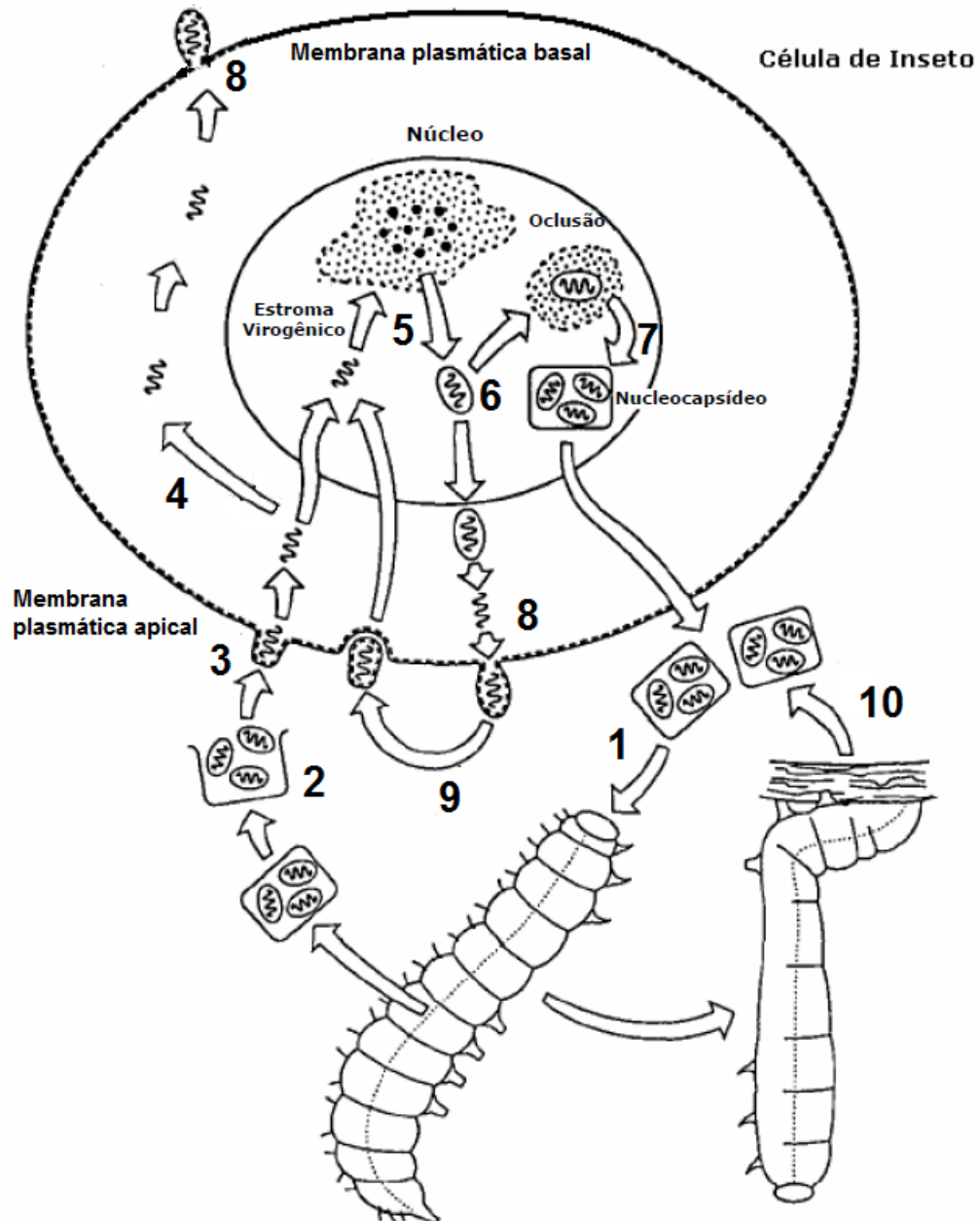


Figura 2-7. Ciclo de vida dos baculovírus. 1 – ingestão dos OBs; 2 – solubilização do envelope protéico do OB e liberação dos ODVs; 3 – fusão do ODV com a membrana celular; 4 – passagem direta do nucleocapsídeo para a infecção secundária; 5 – replicação do DNA viral e formação do estroma virogênico; 6 – formação do nucleocapsídeo progênito; 7 – oclusão dos nucleocapsídeos e formação dos OBs; 8 – formação dos BVs por brotamento; 9 – liberação de BVs para infecção secundária; 10 - liberação dos OBs pela morte do hospedeiro. Adaptado de BONNING e HAMMOCK (1996).

2.5.2. Biopesticidas

Há vários anos os pesticidas químicos vêm contribuindo no controle de pragas e doenças na agricultura. Entretanto, o uso desses compostos durante muitos anos tem apresentado seleção de insetos resistentes e poluição ambiental. Problemas como contaminação de águas pluviais e solo e a presença de resíduos danosos em muitos produtos agrícolas primários e derivados têm aumentado e, assim, colocado em risco a saúde dos ecossistemas em geral e do próprio homem. Estima-se que os custos ambientais e sociais relacionados a esses danos são por volta de US\$ 8,1 bilhões anuais (LENG *et al.*, 2011).

Diante disso, uma alternativa ambientalmente adequada é necessária para que se possibilite uma produção agrícola que acompanhe a demanda mundial, mas que não seja negligente ao meio ambiente. Aprimoramentos nas estratégias de controle de pragas são uma das alternativas que pode propiciar um aumento na qualidade e na quantidade dos produtos agrícolas. Nesse sentido, torna-se imprescindível o desenvolvimento de pesticidas que sejam eficientes, biodegradáveis e que, em sua maioria, não deixem nenhum resíduo ou efeito danoso no ambiente (MAZID, 2011).

2.5.2.1. Aspectos gerais e classificação

Biopesticidas são um tipo de pesticida derivado de materiais de origens naturais como bactérias, plantas e animais (LENG *et al.*, 2011). Biopesticidas podem ser organismos vivos (geralmente, inimigos naturais) ou o produto desses organismos (produtos fitoquímicos ou microbianos) ou subprodutos metabólicos que podem ser usados para o controle de pragas sem afetar as plantações (MAZID, 2011).

O principal interesse no uso de biopesticidas está baseado nas vantagens a eles associadas:

- Desenvolvido para afetar somente uma espécie ou, em alguns casos, um número bem restrito de espécies, contribui para a segurança de animais não-alvos e do agricultor (MAZID, 2011);
- Decompõem-se rápido e, desta maneira, resultam a uma menor exposição e evitam a poluição ambiental (MAZID, 2011);

- Podem trazer benefícios adicionais como aprimoramento da absorção dos macro- e micronutrientes pelas plantas (GLARE *et al.*, 2012);
- Possuem a mesma eficiência que os pesticidas químicos (SZEWCZYK *et al.*, 2011).

Os biopesticidas são classificados em três categorias principais:

1. Pesticida microbiano: pesticidas que possuem em sua formulação um micro-organismo (bactéria, fungo, vírus, protozoário ou alga) como ingrediente ativo (MAZID, 2011). O exemplo mais comum desse tipo de pesticida é o *Bacillus thuringiensis* (Bt) que produz uma proteína tóxica aos insetos, a proteína Cry, e é usado para controlar pragas de várias lavouras como plantações de repolho, batata, entre outras (SZEWCZYK *et al.*, 2006);
2. Protetores incorporados às plantas (*Plant-Incorporated-Protectants*) (PIPs): são plantas que passaram pelo processo de modificação genética e adquiriram a capacidade de produzir substâncias que tem capacidade pesticida (MAZID, 2011). Hoje, diversas sementes de plantas geneticamente modificadas são comercializadas. A modificação mais comum é a inserção do gene *cry* do Bt que permite à planta expressar a proteína Cry e, assim, evitar ataques de pragas desfolhantes (Monsanto | Biotecnologia, 2014; SZEWCZYK *et al.*, 2006);
3. Pesticidas bioquímicos: são substâncias naturais como extratos de plantas, ácidos graxos ou feromônios que possibilitam o controle de pragas através de mecanismos não tóxicos. Essas substâncias interferem com o crescimento ou acasalamento do inseto ou agem como repelente ou atrativo (MAZID, 2011).

Dentre os diversos tipos de biopesticidas, os produtos à base de baculovírus tem apresentado grande destaque e apresentam diversos casos de sucesso na literatura (BISHOP, 1994; SZEWCZYK *et al.*, 2006).

2.5.2.2. Biopesticidas a base de baculovírus

Atualmente, o número de registro de pesticidas à base de baculovírus excede cinquenta. O primeiro inseticida viral lançado, Elcar™, era uma preparação de *Heliothis zea* NPV, um baculovírus de ação relativamente ampla que infecta espécies do gênero *Helicoverpa* e *Heliothis*. Pestes como a lagarta da espiga e outras espécies do mesmo gênero eram controladas através da aplicação desse produto. Depois do Elcar™, muitos outros biopesticidas virais foram desenvolvidos e comercializados: SPOD-X™, a base de *Spodoptera exigua* NPV, Gransual™, Carpovirusine™, entre outros, a base de *Cydia pomonella* GV, além de muitos que não possuem nome comercial. Alguns desses produtos tiveram sua produção interrompida devido à concorrência com os pesticidas químicos, mas, com o surgimento de pragas resistentes, tiveram a atenção e a produção retomadas (SZEWCZYK *et al.*, 2011). A Tabela 2-3 mostra um resumo dos principais baculovírus utilizados, a cultura na qual é empregado e a região que é mais significativa a aplicação.

O paradoxo do uso dos baculovírus como controle de pragas encontra-se em uma das suas vantagens: sua alta especificidade. Cada tipo de baculovírus, na maioria dos casos, ataca somente uma espécie (GLARE *et al.*, 2012). Dessa forma, a sua aplicação fica limitada a certas pragas. Em uma cultura atacada por mais de uma praga, a utilização apenas do baculovírus não é suficiente para conter os danos a elas relacionados.

Além disso, existe uma certa relutância por parte dos agricultores e agrônomos em empregar o uso de pesticidas à base de baculovírus. Essa oposição deve-se à diferença no tempo de ação entre o biopesticidas e os pesticidas químicos e os monitoramentos necessários para cada um. Enquanto os inseticidas químicos necessitam menos de um dia para levar à morte de alguns insetos e, com isso, passar a sensação de segurança aos profissionais da agricultura, principalmente ao agricultor, os baculovírus demoram por volta de 1 semana para levar o hospedeiro ao óbito. Em relação aos agrônomos, a resistência deve-se ao trabalho no monitoramento das lavouras que é muito maior quando se utiliza o biopesticida. Com isso, não é necessário somente uma melhora na produção dos biopesticidas, mas também um educação ambiental dos consumidores (MOSCARDI *et al.*, 2011; REID; CHAN; OERS, 2013).

Tabela 2-3. Principais baculovirus utilizados

Espécie do inseto alvo	Tipo do Baculovirus	Cultura afetada pelo hospedeiro	País/Região que utiliza o baculovirus
<i>Adoxophyes orana</i>	GV	Maçã	Suíça
<i>Anagrapha falcifera</i>	NPV	Algodão e hortaliças	EUA
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	NPV	Soja	Brasil e Paraguai
<i>Autographa californica</i>	NPV	Algodão e hortaliças	EUA e China
<i>Cydia pomonella</i>	GV	Maçã e pera	EUA, Rússia e Europa
<i>Dendrolimus sibiricus</i>	NPV	Pinheiros	Rússia
<i>Erinyis ello</i>	GV	Mandioca	Brasil
<i>Helicoverpa spp.</i>	NPV	Algodão, hortaliças e leguminosas	China, Índia, Austrália, Rússia, Tailândia e EUA
<i>Homona magnanima</i>	GV	Chá	Japão
<i>Hypantiria cunea</i>	GV e NPV	Frutíferas e parques	Bulgária e Rússia
<i>Leucoma salicis</i>	NPV	Parques ornamentais	Rússia e Polônia
<i>Lymantiria díspar</i>	NPV	Florestas	EUA, Canadá e Rússia
<i>Mamestra brassicae</i>	NPV	Couve, ervilha e beterraba	Europa e Rússia
<i>Neodiprion lecontei</i>	NPV	Florestas	Canadá
<i>Neodiprion sertifer</i>	NPV	Pinheiro	EUA, Europa e Rússia
<i>Orgyia pseudotsugata</i>	NPV	Florestas	EUA e Canadá
<i>Pieris rapae</i>	GV	Hortaliças	China
<i>Spodoptera litura</i>	NPV	Algodão e hortaliças	China
<i>Spodoptera litoralis</i>	NPV	Algodão	África e França
<i>Spodoptera exigua</i>	NPV	Hortaliças e plantas ornamentais	EUA, Europa e Tailândia
<i>Spodoptera frugiperda</i>	NPV	Milho	Brasil

Fonte: DE CASTRO et al. (1999)

Com o intuito de otimizar a ação do vírus tanto em relação ao tempo necessário para matar o hospedeiro quanto a seu espectro de ação (SOUZA; MOSCARDI, 2002), algumas táticas vêm sendo desenvolvidas:

1. Permitir o uso de inseticidas químicos quando a população da praga, em termos de intensidade e tamanho das larvas, não estiver dentro dos limites recomendados;
2. Aumentar a virulência, reduzindo o tempo necessário para causar mortalidade do inseto hospedeiro ou causar a interrupção de sua alimentação.

No primeiro caso, tem-se usado, por exemplo, a associação de AgNMPV com doses muito reduzidas de pesticidas químicos (1/4 a 1/5 da dose recomendada) para

reduzir a população de pragas de lagarta em populações já muito elevadas para a aplicação do AgMNPV isoladamente (SOUZA; MOSCARDI, 2002). No segundo caso, as principais estratégias incluem o uso de substâncias que potencializam a ação viral e modificações genéticas no baculovírus.

A estabilidade dos baculovírus é um dos fatores mais importante quando se analisa sua permanência no ambiente de aplicação. A radiação ultravioleta (UV) é um dos principais inativadores do material viral. Assim, o uso de agentes químicos protetores de radiação UV, também chamados de branqueadores ópticos, têm sido utilizados para aumentar a eficiência do biopesticida (SZEWCZYK et al., 2011).

Tratando-se de baculovírus recombinantes, tem-se feito modificações tanto para deleção de genes do vírus quanto para inserção de sequências exógenas. A eliminação do gene *egt* (ecdisteróide UDP-glicosiltransferase) de alguns baculovírus, por exemplo, resultou no decréscimo do tempo necessário para causar a morte de seus hospedeiros em 30 % (SUN et al., 2004). O gene *egt* é responsável pela inativação do hormônio ecdisteróide, bloqueando, portanto, a capacidade da lagarta infectada passar para o estágio seguinte de pupa, o que resulta em maior produção da progênie viral. A eliminação desse gene do genoma viral faz com que o inseto infectado tente mudar prematuramente para o estágio seguinte, morrendo no processo (SZEWCZYK et al., 2011).

Alternativamente, pode-se inserir no genoma do baculovírus genes que codifiquem toxinas inseto-específicas. As toxinas mais potentes utilizadas até agora foram as originárias do veneno de escorpião e de aranhas. O uso do gene da toxina proveniente do escorpião *Andractonus australis* trouxe uma redução da desfolhagem causada pelas lagartas em 60 % quando comparado com as infecções com o baculovírus selvagem (FROY et al., 2000). Há também modificações genéticas que levam a produção de OBs que tenham em sua matriz proteica a toxina *Bt* da bactéria *Bacillus thuringiensis*. Isso foi realizado através da construção de uma proteína de fusão composta de poliedrina e da toxina Bt. A patogenicidade do baculovírus recombinante diminuiu o tempo de sobrevivência das larvas após a infecção de 92,8 horas para 33,9 horas (CHANG et al., 2003).

Mesmo com essas limitações dos baculovírus geneticamente modificados, há muitos casos de sucesso, como já dito anteriormente. Um dos maiores sucessos até hoje aconteceu no controle da *Anticarsia gemmatalis* nas culturas de soja do Brasil.

O ótimo desempenho pelo projeto de controle do Brasil reviveu o interesse em utilizar baculovírus como biopesticidas (SZEWCZYK *et al.*, 2009).

2.5.2.3. Baculovírus AgMNPV

Para controlar a infestação em plantações de soja pela lagarta da *Anticarsia gemmatalis* o biopesticida a base do baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) pode ser utilizado e tem efeitos de eficiência equivalente aos inseticidas químicos utilizados para a mesma (SZEWCZYK *et al.*, 2009)

O baculovírus pode ser utilizado, em campo, através de quatro estratégias principais, de acordo com Souza e Moscardi (2002):

1. Introdução e Colonização: há regiões nas quais o baculovírus não ocorre naturalmente. Assim, é necessário introduzir o vírus no ambiente para que ele possa se estabelecer no ambiente do hospedeiro e controlar sua propagação permanentemente (controle biológico clássico);
2. Introdução inoculativa: há a aplicação do patógeno em regiões que ele já é possivelmente encontrado. Consequentemente, ocorre sua proliferação no ambiente controlando o inseto hospedeiro por mais de uma geração, mas podendo ser reaplicado caso necessário;
3. Manipulação do ambiente: por meio de práticas culturais, faz-se com que a ocorrência natural do vírus seja aumentada ou preservada. Essas práticas consistem em técnicas como, por exemplo, a adição de agentes químicos que auxiliam a conservação do vírus ou o seu transporte do solo até o substrato de alimentação do inseto (MOSCARDI, 1999);
4. Inseticida microbiano: a aspersão de doses letais de baculovírus nas plantações tanto quanto necessário, similar aos pesticidas químicos, para o controle da população do inseto hospedeiro.

No começo da década de 80, um programa piloto para o uso do AgMNPV nas culturas de soja foi iniciado pela Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (Embrapa). No início, cerca de 2.000 ha foram tratados com AgMNPV. Na safra de 2003/2004, o uso desse biopesticida viral teve seu pico histórico com mais de

2.000.000 ha (Figura 2-8). No entanto, com a implantação do sistema de plantio direto no Brasil, os agricultores tiveram que aplicar herbicidas como dessecantes antes da semeadura da soja. Nessa operação, os fazendeiros começaram a misturar inseticidas de amplo espectro juntamente com os herbicidas. O mesmo tipo de mistura era aplicada também 15-20 dias após a germinação das sementes. Com isso, ocorreu um distúrbio na população de inimigos naturais que levou ao aparecimento de outras pragas como, por exemplo, *Spodoptera spp.*, moscas brancas e ácaros que eram considerados como pragas secundárias. Diante disso, os agricultores precisaram utilizar pesticidas de amplo espectro e, assim, o AgMNPV não podia mais ser utilizado (MOSCARDI *et al.*, 2011).

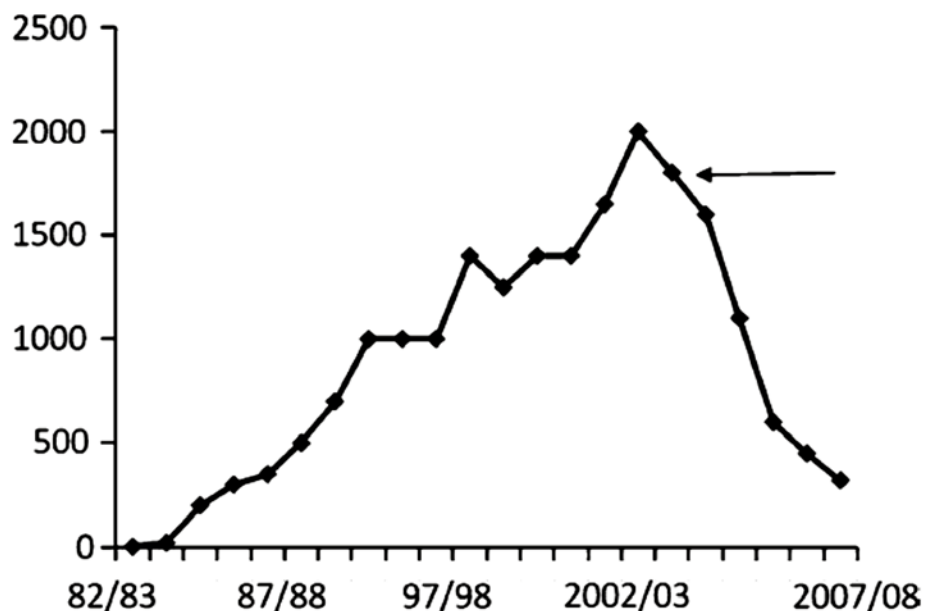


Figura 2-8. Evolução do uso do AgMNPV no Brasil. No eixo Y, número de hectares tratados (x1.000); no eixo X, safras da cultura de soja desde 1982/1983. A seta indica quando o sistema integrado de produção de soja no Brasil teve seu declínio iniciado (MOSCARDI *et al.*, 2011).

Em todo caso, o uso do AgMNPV no Brasil trouxe muitos benefícios econômicos, sociais e ecológicos. Os agricultores conseguiram economizar por volta de US\$ 7/ha/safra; as economias anuais chegaram a somar US\$ 11.000.000. Mais de 17 milhões de litros de pesticidas químicos deixaram de ser pulverizados, resultando em um benefício ecológico considerável (SZEWCZYK *et al.*, 2006).

2.5.2.4. Produção *in vivo*

Até o momento, a maioria das produções comerciais de baculovírus vem sendo realizadas *in vivo*. Seja através da aplicação do vírus nos insetos hospedeiros em campo e da coleta das larvas adoecidas; ou por meio da produção do inseto alvo, em laboratórios, com dietas artificiais contaminadas com o vírus para uma posterior coleta do inseto morto pela infecção. A segunda opção é a mais comum na maioria dos países. Entretanto, para algumas espécies de insetos, não há dietas artificiais. Com isso, torna-se difícil, se não impossível, a criação desses insetos em laboratório e, assim, inviabilizada a produção de baculovírus referente a esse hospedeiro, a não ser pelo método em campo. Porém, a produção em campo é complicada quando a liquefação do corpo do inseto é muito intensa, como no caso das larvas infectadas por baculovírus *Spodoptera* spp., uma vez que é quase impossível coletar as lagartas infectadas (MOSCARDI *et al.*, 2011).

Em geral, $10^{11} - 10^{12}$ OB/ha são necessários para controlar lagartas em uma cultura e $10^9 - 10^{10}$ OB podem ser produzidos através da infecção de cada larva. Isso significa que de 10 – 1.000 lagartas são necessárias para produzir vírus suficiente por hectare tratado (REID; CHAN; OERS, 2013). Muitos problemas ainda precisam ser superados na produção *in vivo*: otimização da dieta, efetividade na coleta do vírus da mistura lagarta-dieta, controle de qualidade do produto final (ELVIRA *et al.*, 2010).

Ao analisar o mercado mundial para os baculovírus selvagens, tem-se por volta de 100.000-500.000 ha para cada uma das principais pragas controladas através da aplicação de baculovírus de produção *in vivo* (HearNPV, AgMNPV, CpGV, PlxyGV e vários *Spodoptera* NPV). Com um preço estimado de US \$ 20/ha, pode ser feito uma estimativa para os valores viáveis da produção do baculovírus *in vitro* (REID; CHAN; OERS, 2013). Considerando que há uma grande flutuação nas demandas anuais de cada tipo de vírus, é muito importante que as instalações industriais sejam capazes de produzir várias espécies virais ao mesmo tempo. Diante disso, a produção *in vitro* seria preferível a *in vivo*, devido a flexibilidade na produção. É muito mais fácil o gerenciamento de estoques virais e celulares criopreservados, do que o manuseio de grandes colônias de diferentes insetos. A produção *in vitro* ainda evita o problema de aparecimento de doenças nas colônias

dos insetos e a contaminação do produto final por outros micro-organismos e por partes alergênicas do inseto hospedeiro (HARRISON; HOOVER, 2012).

2.5.2.5. Produção *in vitro*

A produção de baculovírus em culturas de células oferecem algumas vantagens sobre a produção *in vivo* por ser uma operação controlável, estéril, com alto rendimento de produto final puro e possuir várias linhagens celulares já estabelecidas (MOSCARDI *et al.*, 2011). Durante a produção *in vitro* células e vírus são produzidos, inicialmente, em frascos de volumes pequenos (100 mL – 20 L) para serem utilizados como inóculos (viral e celular) em biorreatores de volumes muito maiores (400 L – 10.000 L) (REID; CHAN; OERS, 2013). Durante essa amplificação do vírus, é necessário um número de passagens seriadas dele em cultivos celulares *in vitro*. Quando a amplificação demanda altos números de passagens (geralmente, mais do que 5), ocorre perda de virulência do produto final devido a alterações genéticas que ocorrem no DNA viral (PEDRINI *et al.*, 2006; MOSCARDI *et al.*, 2011). A Figura 2-9 mostra uma proposta de Reid *et al.* (2013) para a produção de HearNPV em sistema de batelada alimentada. Nesse processo, é possível analisar o número de passagens necessárias para a produção dos inóculos virais e celulares.

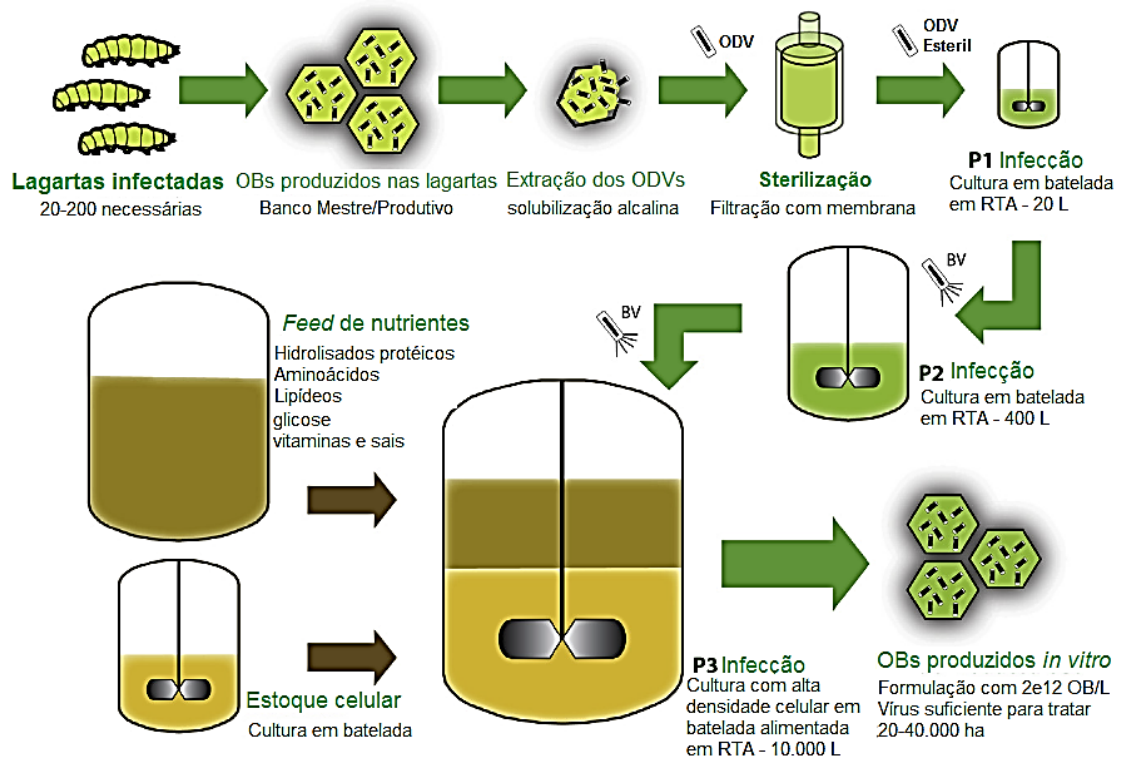


Figura 2-9. Proposta para produção de HearNPV. OBs de HearNPV produzidos em lagartas são usados para a obtenção ODVs. A partir dos ODVs se produziu o banco de BVs (Passagem 1 – P1). A produção do inóculo viral a partir do banco de BV (Passagem 2 - P2) foi utilizada para infectar células HzAM1 no reator principal de tanque agitado (RTA) (Passagem 3 – P3). Através de um processo de batelada alimentada de cultivo com altas concentrações celulares, é obtido alto rendimento de produção de OBs de HearNPV para serem usados como biopesticidas. Traduzido de Reid *et al.* (2013)

A estratégia da produção do baculovírus em biorreatores é determinada, basicamente, pela seleção da multiplicidade de infecção (MOI), pela concentração celular inicial (ICD) e pelo tempo da infecção (TOI). MOI é definido como o número de unidades infecciosas por células que são adicionadas no momento da infecção; enquanto TOI trata-se do momento em que se inicia a infecção das células do inseto. Em cinéticas de crescimento bem definidas, para um determinado TOI, espera-se que ocorra valores semelhantes de concentração celular e, por isso, TOI pode ser confundido com o ICD. Tanto a fração da população celular infectada quanto a cinética da infecção estão relacionadas à MOI e ao TOI. Em um bioprocessamento com células de insetos infectadas com o baculovírus, a escolha da ICD e do TOI determina a composição do meio de cultura no instante da infecção; assim como o estado fisiológico da massa celular. Esses fatores interagem entre si e podem ser manipulados para a otimização do processo. Apesar de alguns processos já estarem bem padronizados quanto a esses parâmetros, a combinação dos três

deve ser estabelecida para cada sistema por causa da dependência na característica da linhagem celular e a capacidade nutricional do meio de cultura empregado (MICHELOUD et al., 2009)

Outro requisito na produção de baculovírus em cultura de células é a necessidade de linhagens celulares altamente produtivas. Para uma linhagem ser considerada uma boa opção para a produção de baculovírus ela deve apresentar um tempo de duplicação próximo de 24 horas e ter a capacidade de produzir vírus ativos em um rendimento específico de pelo menos 300 OB/célula (REID; CHAN; OERS, 2013).

Um dos mais importantes efeitos de passagem (modificação que o baculovírus sofre ao ser usado como inóculo viral em cultivos sequencialmente) é a mudança do fenótipo parental *Many Polyhedra* (MP) para o fenótipo *Few Polyhedra* (FP). Nessa alteração, há uma queda drástica na produção de OBs por célula e perda de virulência. Algumas mutações foram identificadas em uma região específica, o locus 25k *fp*, nos mutantes FPs. Esse gene codifica uma proteína de 25 KDa que é essencial para a oclusão do vírus e para a formação da poliedrina. Outro tipo de mutante gerado durante as passagens seriadas é a formação de partículas interferentes defectivas (*Defective Interfering Particles – DIP*). Esses mutantes perdem a habilidade de se replicar na célula hospedeira sem a ajuda de um vírus *helper* e, geralmente, grandes sequências de seu genoma são deletadas (SOUZA; MOSCARDI, 2002; MOSCARDI et al., 2011). Para evitar que essas mutações ocorram, tem-se utilizado a estratégia de se infectar as culturas celulares com baixos MOI e, assim, diminui-se as chances de acúmulo de DIPs durante as passagens (HARRISON; HOOVER, 2012).

Recentemente, uma estratégia de produção *in vitro* nova baseada na utilização de variantes MPs foi proposta para aumentar a produção específica de OBs. Esses variantes são clones selecionados usando a técnica de *plaque assay* depois do vírus ser submetido a várias passagens seriadas (REZENDE, 2008; RANGEL et al., 2009; ALMEIDA, 2010). MPs mantêm as características do vírus selvagem como a formação de muitos poliedros no núcleo das células e altos títulos de BVs, o que os possibilita, a princípio, ser competitivo com os variantes FPs (MOSCARDI et al., 2011). A investigação de fatores associados a perda de estabilidade genética e o uso de novas estratégias como a seleção de variantes mais estáveis (MPs), a redução do custo dos componentes do meio de cultivo

celular e o melhoramento desses meios são importantes requisições para a otimização da produção de baculovírus *in vitro* (AGATHOS, 1996; MOSCARDI et al., 2011; SZEWCZYK et al., 2011; REID; CHAN; OERS, 2013).

3. Problemática

1. Há diferença na infecção de diferentes linhagens de células Sf21 pelo baculovírus AgMNPV?
2. A idade do inóculo influencia nos parâmetros cinéticos de cultivos com células Sf21?
3. A concentração celular inicial influencia nos parâmetros cinéticos de cultivos com células Sf21?
4. O número de passagens influencia nas características metabólicas e/ou morfológicas das células Sf21?

4. Hipótese

1. Todas as linhagens de células Sf21 são oriundas de uma mesma espécie de inseto, a lagarta *Spodoptera frugiperda*. Assim, é provável que, independente de qual banco foi obtido essas células, o perfil de infecção delas por qualquer vírus deve ser igual entre elas, se mantidas as mesmas condições de infecção e cultivo.
2. Tratando-se das condições de cultivos, é sabido que o estado fisiológico que a célula se encontra ao iniciar uma cultura reflete nas fases de crescimento e nos parâmetros cinéticos. Isso ocorre porque diferentes genes são expressos e/ou silenciados durante as diversas fases de crescimento das células, uma vez que em cada uma dessas etapas há diferentes funções sendo desempenhadas (síntese de material genético, divisão celular, manutenção celular e morte celular). Se a passagem for realizada precoce ou tardiamente, até que a célula se re programe metabolicamente para o crescimento pode ocorrer uma queda na taxa de crescimento específico ou mesmo alterar a concentração celular máxima do cultivo (ZHANG; ENDEN; MERCHUK, 2005).
3. Células animais em geral são sensíveis à concentração celular inicial. Essas células precisam de fatores de crescimento que são produzidos, inclusive, por elas mesmas. Assim, é possível que altas concentrações celulares iniciais aumentem as concentrações desses fatores autócrinos no meio de cultivo e, com isso, aumentem as taxas de crescimento específico e/ou a concentração celular máxima (KIOUKIA et al., 1995).
4. Durante as passagens, as células podem sofrer mutações e/ou perder cromossomos. Com o decorrer dos subcultivos, alguns fenótipos celulares, que apresentem mudanças metabólicas e/ou morfológicas, acabam sendo selecionados aleatoriamente. Com isso, cultivos com células da mesma linhagem, mas com passagens muito diferentes, podem apresentar tanto a morfologia quanto o metabolismo diferenciados (DONALDSON; SHULER, 1998).

5. Objetivos

5.1. Objetivos gerais

Analisar a infecção por AgMNPV em diferentes linhagens de células Sf21 e selecionar os melhores candidatos para a produção de biopesticidas a base desse baculovírus.

Estudar os parâmetros cinéticos de crescimento de células Sf21 em diferentes sistemas de cultivo (frascos agitados e biorreator) com vistas à sua infecção por AgMNPV e produção de biopesticida.

5.2. Objetivos específicos

- Analisar a infectividade do AgMNPV em células de diferentes linhagens de Sf21;
- Determinar a melhor idade de inóculo para os subcultivos em meio SF900 III;
- Determinar a concentração celular inicial ótima para os cultivos em meio SF900 III;
- Caracterizar o crescimento, consumo de nutrientes e a formação de subprodutos pelas células Sf21 em frascos agitados, *spinners* e biorreator.
- Analisar diferenças morfológicas entre células Sf21 com altas e baixas passagens.

6. Materiais e métodos

6.1. Meios de cultura

6.1.1. TNM-FH (*Trichoplusia ni* Medium Composition)

O meio TNM-FH é uma suplementação do *Grace's Insect Medium* com 0,35 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich®, Número de catálogo: S8875), 3,4 g/L de hidrolisado de lactalbumina (*lactalbumin hydrolysate*) (Life Science®) e 3,4 g/L de yeastolate (Difco®), 10 mL de antibiótico/antimicótico (Gibco®, número de catálogo: 15240-096) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®, número de catálogo: 12664-025), à formulação preparada a partir do meio Grace em pó fornecido pela Gibco®, código de referência: 11595-030.

6.1.2. SF900™ II SFM e SF900™ III SFM

Obtidos da empresa Gibco® – código de referência 10902-088 e 12658-027, respectivamente –, esses meios são ausentes de SFB e, no caso do SF900 III, compostos por baixas concentrações de hidrolisados.

6.2. Células

A linhagem de célula de inseto Sf21, descrita por Vaughn *et al.* (1977) foi utilizada para os estudos de cinética e de infecção viral.

Essas células foram adquiridas de três fontes: Embrapa/Cenargen, Universidade do Rio Grande do Norte (UFRN) e Gibco®. As células cedidas pela pesquisadora Dra. Marlinda Lobo de Souza (Embrapa/Cenargen) estavam adaptadas ao meio TNM-FH e possuíam passagens superior a 500 (chamadas neste trabalho de EMB). Essas células foram adaptadas ao meio SF900™ II pela pesquisadora Dra. Márcia Pedrini (Universidade Federal do Rio Grande do Norte) que nos forneceu essas células (referidas no trabalho como UFRN). Ainda foram compradas células Gibco® adaptadas ao meio *Grace's Insect Medium* (denominadas no trabalho GibcoG) e ao meio SF900™ II (especificado no trabalho como GibcoSF) por serem de baixas passagens – 10 a 20 (códigos de referência: B821-01 e 11497-013, respectivamente).

6.3. Vírus

Todos os variantes virais foram cedidos pela Dra. Marlinda Lobo de Souza, Embrapa/Cenargen.

O clone viral AgMNPV isolado 2D (Ag2D) foi obtido a partir do vírus selvagem AgMNPV-79 pela técnica *plaque-assay* (KNUDSON; TINSLEY, 1974) e cedido a Embrapa/Cenargen pelo Dr. James Maruniak, University of Florida – USA.

Os variantes MPs foram obtidos através do *plaque-assay* da 7ª passagem seriada do Ag2D em células BTI-Tn5B1-4 (REZENDE, 2008) pelo grupo da doutora Marlinda Lobo de Souza.

6.4. Criopreservação e manutenção do banco de células

6.4.1. Congelamento

Células foram cultivadas em *schotts* de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL com uma concentração celular inicial (X_0) de $0,5 \cdot 10^6$ cel. viáveis/mL de um inóculo de 2-3 dias (meio TNM-FH) ou 3-4 dias (meio SF900™), a 28° C e a 120 rpm.

A cultura foi então centrifugada a aproximadamente 2500 RCF (*relative centrifugal force* – força de centrifugação relativa à aceleração gravitacional terrestre g) por 4 minutos para a sedimentação das células. O sobrenadante foi separado para posterior uso e as células resuspendidas para uma concentração próxima de $1 \cdot 10^7$ cel. viáveis/mL no meio de criopreservação (constituído por: 40% de meio TNM-FH novo, 40% de meio TNM-FH condicionado (o meio que foi separado na centrifugação), 10% de DMSO e 10% de SFB, para as células em meio TMN-FH; e 45% de meio SF900™ (II ou III) novo, 45% de meio SF900™ (II ou III) condicionado e 10% de DMSO, para as células em SF900™). 1 mL dessa suspensão com células foi então transferida para criotubos de 1,5 mL (10 a 20 frascos). Em paralelo, 1 mL da mesma suspensão celular foi transferido para uma garrafa de cultura de 25 cm² (T25) e completado com 4 mL de meio (TNM-FH ou SF900™) novo para verificação de contaminação e se as células suportariam o meio de criopreservação no posterior descongelamento.

Os criotubos foram colocados em um container de congelamento, Mr. Frosty™ (Thermo Scientific, Número de catálogo: 5100-0001), para abaixamento da temperatura em uma taxa de 1 °C/min e posto no freezer a -80 °C *overnight*. Por fim, os criotubos foram armazenados em nitrogênio líquido a -196,15 °C.

6.4.2. Descongelamento

As células foram descongeladas rapidamente em banho termostatizado a 36 °C e o volume do criotubo transferido para um *schott* de 100 mL e 14 mL do meio de cultura foram adicionados, gota a gota, para evitar o choque osmótico. O frasco foi então encubado a 28 °C e 120 rpm por cerca de 4-5 dias até atingir a concentração celular de pelo menos $2 \cdot 10^6$ cel/mL para, então, serem repicadas.

6.5. Captura de imagens

As imagens foram feitas através da inserção de uma webcam na ocular do microscópio e capturadas pelo software MiPro (Optika, Italia).

6.6. Cálculo dos parâmetros cinéticos

6.6.1. Taxa específica de crescimento

A μ provém do balanço de massa de células em um cultivo em batelada com a equação

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu \cdot X_v \quad (12)$$

onde, dX_v/dt é a variação de células, μ a taxa específica de crescimento celular e X_v a concentração de células.

Por meio da integração do balanço acima, obtém-se uma equação

$$\ln(X_v) = \mu t \quad (13)$$

Plotando-se os pontos do logaritmo neperiano de X_v versus tempo, obtém-se uma curva de crescimento celular ($\ln(X_v) = f(t)$) que ao ser linearizada ($\ln(X_v) = f(t)$), fornece uma reta durante a fase de crescimento exponencial. A taxa específica máxima de crescimento (μ_{\max}) foi obtida através da derivação dessa reta para a obtenção do coeficiente angular que corresponde à μ_{\max} .

6.6.2. Fatores de conversão

O rendimento de glicose ($Y_{X/Glc}$) e glutamina ($Y_{X/Gln}$) em célula foi obtido através da inclinação da reta da curva de $X = f(\text{concentração de glicose})$ e $X = f(\text{concentração de glutamina})$, respectivamente, no intervalo correspondente à fase exponencial de cada ensaio.

6.6.3. Taxa específica de consumo de oxigênio

Para a determinação da Q_{O_2} foi realizado o método dinâmico de acordo com SCHMIDELL *et al.* (2001). Nesse método, utiliza-se um eletrodo para a leitura da concentração de DO do meio de cultura. Em um dado instante (T_0), interrompe-se o fornecimento de oxigênio de forma a ser desprezível a transferência de oxigênio.

Como observado na Figura 6-1, a concentração de oxigênio começa a diminuir. Após alguns instantes (T_1), retorna-se na condição de aeração inicial. Com isso, a concentração de DO volta a subir até o equilíbrio do valor ajustado para o cultivo.

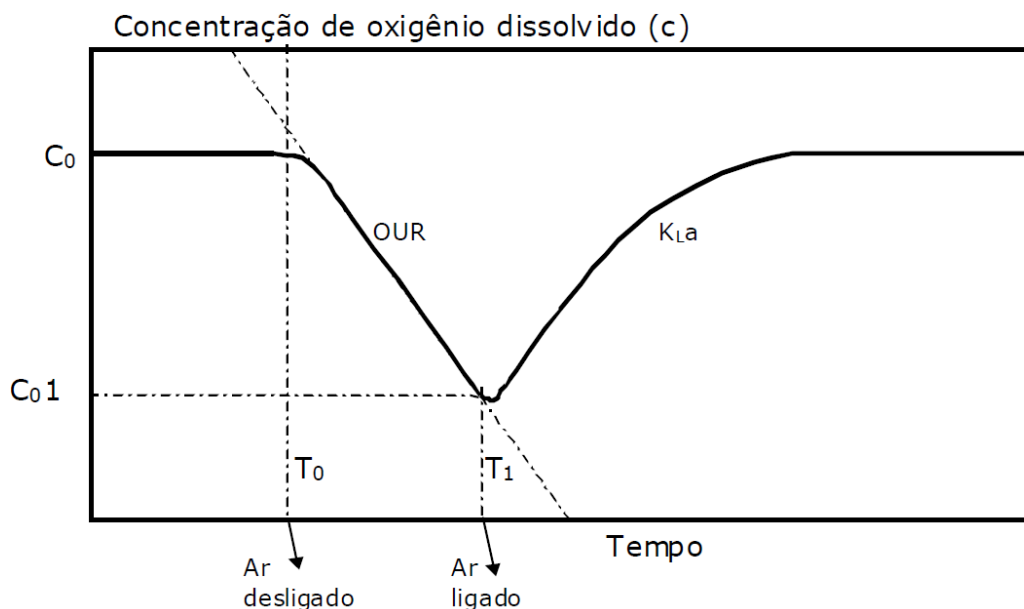


Figura 6-1. Perfil do DO durante o método dinâmico. OUR: taxa instantânea de consumo de oxigênio; K_{La} : coeficiente de transferência de oxigênio; C_0 : concentração de oxigênio no T_0 ; C_{01} : concentração de oxigênio no T_1 . Fonte: (SCHMIDELL *et al.*, 2001)

Para o intervalo sem aeração, tem-se:

$$\frac{dC}{dt} = -Q_{O_2} \cdot Xv \quad (15)$$

onde $\frac{dC}{dt}$ é a OUR; Q_{O_2} é a taxa específica de consumo de oxigênio e X a concentração de células.

Sendo a taxa instantânea de consumo de oxigênio (OUR) constante durante o intervalo sem aeração, têm-se que ela é igual ao coeficiente angular da reta de $C = f(t)$. Dividindo-se o valor de OUR pela concentração celular (Xv) no instante, obtém-se o valor de Q_{O_2} . Assumiu-se que para a temperatura de 28° C a concentração de oxigênio no meio de cultivo na saturação de ar é igual a concentração na água na mesma temperatura, de 7,5 mg/L.

6.7. Infecção em células de diferentes origens

Os variantes virais foram testados em seis sistemas células-meio: GibcoG/TNM-FH, GibcoSF/SF900 II, GibcoSF/SF900 III, UFRN/SF900 II, UFRN/SF900 III e EMB/TNM-FH.

6.7.1. Teste em cultura estática

Células Sf21 foram sedimentadas em garrafas T25 em uma concentração de $2 \cdot 10^6$ cels/garrafa.

Para realizar a infecção, todo o sobrenadante dos frascos T25 foi retirado. Adicionou-se, então, 1 mL do inóculo viral (Ag2D, AgMP2 ou AgMP5) e agitou-se sutilmente a placa a cada 15 min durante uma hora para a adsorção do vírus às células. O controle negativo foi feito adicionando-se 1 mL de meio de cultivo ao invés do inóculo viral. Por fim, adicionou-se 4 mL de meio de cultivo novo. Os frascos T25 foram então incubadas a 28° C.

O crescimento das células e a infecção foram acompanhados através de análise microscópica e coleta de imagens no primeiro dia de infecção e após 5 dias.

6.7.2. Teste em cultura em suspensão

Schotts de 100 mL com 20 mL de cultivo foram inoculados com células UFRN a $3 \cdot 10^5$ cel/mL e 0,5 mL de suspensão do variante viral (Ag2D, AgMP2 ou AgMP5). O controle para cada sistema foi feito adicionando-se 0,5 mL de meio no lugar de 0,5 mL de vírus. Os frascos foram incubados a 120 rpm e a 28 °C.

O acompanhamento da evolução da infecção e formação de poliedros foram feitos através da contagem de células sem poliedros e células com poliedros, utilizando a câmara de Neubauer no dia da infecção, 4 e 5 dias depois da infecção.

6.8. Estudo do efeito da concentração celular inicial (X_0) e da idade do inóculo (IA)

6.8.1. Planejamento experimental composto completo rotacional (DCCR)

Realizou-se um planejamento experimental para a obtenção de um melhor padrão na inoculação dos *schotts* de 100 mL, com um volume de trabalho de 20 mL, a 120 rpm e 28 °C, em meio SF900™ III, com células UFRN. Primeiramente, foi realizado um delineamento composto completo (DCC). Devido aos resultados inconclusivos, decidiu-se extrapolar o intervalo analisado. Foi, então, adicionado os ensaios para se obter um delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis (RODRIGUES; IEMMA, 2014). A combinação entre as duas variáveis – X_0 e IA – para os ensaios do planejamento experimental final obtido (DCCR) estão descritos na Tabela 6-1:

Durante o cultivo de 7 dias dos 11 experimentos, amostrou-se 1 mL para a determinação da concentração de X_v . Com esse dado, calculou-se a μ_{max} e concentração celular máxima (X_{vmax}).

Para os pontos da primeira etapa do planejamento (1, 2, 3, 4, 9, 10 e 11 da Tabela 6-1), o DCC, foi ainda realizada a determinação de glicose, lactato, glutamina e glutamato.

Os resultados dos ensaios 5, 6, 7 e 8 foram usados também no estudo de uma variável por vez (item 6.8.2), ensaios com IA de 24 e 120 horas e X_0 de 0,125 e $20 \cdot 10^6$ cel/mL .

Para a análise estatística, utilizou-se como respostas $X_{v\text{máx}}$ e $\mu_{\text{máx}}$. As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do software Protimiza Experimental Design.

Tabela 6-1. Delineamento experimental composto completo rotacional para a padronização do inóculo celular

Ensaio	IA (codificado)	X_0 (codificado)	IA (horas)	X_0 (Ln (concentração celular inicial - cel/mL))
1	-1	-1	48	Ln(0,25E6)
2	+1	-1	96	Ln(0,25E6)
3	-1	+1	48	Ln(1,0E6)
4	+1	+1	96	Ln(1,0E6)
5	-2	0	24	Ln(0,5E6)
6	+2	0	120	Ln(0,5E6)
7	0	-2	72	Ln(0,12E6)
8	0	+2	72	Ln(2,0E6)
9	0	0	72	Ln(0,5E6)
10	0	0	72	Ln(0,5E6)
11	0	0	72	Ln(0,5E6)

6.8.2. Uma variável por vez “*one-at-time*”

Em duplicata, realizou-se cultivos em *schott* de 100 mL, com 20 mL de volume de trabalho, com células UFRN em meio SF900 III, a 28 °C e 120 rpm, variando a IA e a X_0 .

Na avaliação da IA, fixou-se o X_0 em 0,5E6 cel/mL e foram estudadas as IA de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas.

Para estudar X_0 , fixou-se o IA em 72 horas e foram avaliadas as X_0 de 0,125E6 cel/mL, 0,25E6 cel/mL, 0,5E6 cel/mL, 1,0E6 cel/mL e 2,0E6 cel/mL.

Durante o cultivo dos ensaios, amostrou-se 1 mL para a determinação da X_v . Com esse dado, calculou-se a $\mu_{\text{máx}}$ e $X_{v\text{máx}}$.

Para a análise estatística, realizou-se o teste ANOVA ONE-Way para as respostas $X_{v_{\max}}$ e μ_{\max} e, quando detectadas diferenças entre as médias pela ANOVA, o teste de de Tukey, utilizando o software Origin® (OriginLab, EUA).

6.9. Teste do efeito do número de passagens no metabolismo e morfologia de células Sf21

Em triplicata, realizou-se cultivos em *schott* de 100 mL, com 20 mL de volume de trabalho, com células UFRN e GibcoSF em meio SF900 III, a 28 °C e 120 rpm. X_0 de $0,25 \times 10^6$ cel/mL de um inóculo com 2 dias de idade.

Durante o cultivo dos ensaios por 7 dias, amostrou-se 1 mL para a determinação da concentração de X_v

Ainda foi utilizado o Scepter™ *cell counter* da Millipore para a medida de diâmetro médio e volume médio das células UFRN e GibcoSF, quando essas se encontravam no meio da fase exponencial (ver item 6.12.2).

Para a análise estatística, realizou-se o teste ANOVA ONE-Way para as respostas μ_{\max} e $X_{v_{\max}}$. Quando detectadas diferenças entre as médias pela ANOVA, o teste de Tukey, utilizando o software Origin®.

6.10. Cultivo de células Sf21 em *spinners*

O cultivo foi feito em frascos *spinners* de 250 mL, com células UFRN, com X_0 de $0,25 \times 10^6$ cel/mL de um inóculo com 2 dias de idade em meio SF900™ III.

Para o estudo do crescimento de células Sf21, utilizou-se 100 mL de volume de trabalho e 80 e 100 rpm de agitação.

Durante o cultivo dos ensaios, amostrou-se 1 mL para a determinação da X_v , glicose, lactato, glutamina e glutamato. Com esses dados, calculou-se a μ_{\max} , $X_{v_{\max}}$ e a produtividade em células. Além disso, imagens das células em cultivo foram capturadas para a observação da formação de grumos.

Para a análise estatística, realizou-se o teste ANOVA ONE-Way para as respostas $X_{v_{\max}}$ e μ_{\max} e, quando detectadas diferenças entre as médias pela ANOVA, o teste de de Tukey, utilizando o software Origin®.

6.11. Cultivo em biorreator de 1 L

O cultivo foi feito em biorreator Bioflo 110 de 2 L, com 1 L de volume de trabalho, com células UFRN, com X_0 de $0,5 \cdot 10^6$ cel/mL de um inóculo com IA de 3 dias em meio SF900™ III. Os parâmetros de cultivo utilizados foram: 0,2 vvm (volume de ar/volume de cultivo/minuto), 28 °C, 80 rpm e 50% do oxigênio dissolvido (OD) (saturação com ar). A determinação do Q_{O_2} foi feita pelo método dinâmico (PAMBOUKIAN et al., 2008) e a fração de CO_2 do gás de exaustão foi monitorada através do analisador de CO_2 (modelo Z073101010, Applikon Biotechnology, Holanda)

O Inóculo foi produzido utilizando-se frascos *schotts* de 1 L com 50 mL de volume de trabalho, para evitar limitação por oxigênio. A agitação foi ajustada para 120 rpm e temperatura para 28°C.

Foi realizada a amostragem duas vezes ao dia para quantificação da concentração de células, glicose, lactato, glutamina, glutamato e viabilidade celular. A cada amostragem aplicava-se o método dinâmico para determinação do Q_{O_2} .

Paralelamente, utilizando o mesmo inóculo utilizado para o biorreator, foi realizado um cultivo em frasco *schott* como controle de crescimento. Utilizou-se um frasco de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL, com X_0 igual a $0,5 \cdot 10^6$ cel/mL. A agitação foi ajustada em 120 rpm e a temperatura em 28° C. Durante o cultivo, amostrou-se 1 mL para a determinação da X_v .

Com esses dados, calculou-se a μ_{max} e $X_{v_{máx}}$.

6.12. Metodologia analítica

6.12.1. Determinação da concentração de células viáveis e totais e do biovolume

As quantificação de células viáveis (X_v) e totais (X_t) foi feita baseada no método de exclusão por coloração com azul de tripan descrito por Freshney (2010).

Amostras coletadas foram coradas com 10% de uma solução de azul de tripan 0,4% (Sigma-Aldrich®, número de catálogo: T8154-100mL). 10 μ L foram colocados na câmara de Neubauer e a contagem foi feita em duplicata, contando-se as células presentes nos quatro quadrantes externos e no central. Pelo menos 100 células eram contadas por replicata.

O azul de tripan só penetra nas células com membrana celular comprometida, deixando-as azuladas. Essas células foram consideradas mortas e as células transparentes foram consideradas viáveis.

Para o cálculo da concentração celular utilizou-se a fórmula

$$C = \frac{N}{Q} \times 10^4$$

onde, C é a concentração de células (viáveis ou mortas), N o número de células contadas e Q o número de quadrantes contados. As X_t foram calculadas pela soma das X_v com as células não viáveis (X_m) e a viabilidade obtida pela razão $(X_v / X_t) \times 100\%$.

Ao multiplicar o valor de concentração celular pelo valor do volume médio celular (metodologia descrita no item 6.12.2), obtém-se o valor de biovolume. Quando essa conversão é feita com a concentração máxima de células viáveis ($X_{v_{max}}$), tem-se, então, o valor do biovolume máximo ($biov_{max}$).

6.12.2. Medida do diâmetro e volume das células

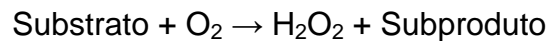
O diâmetro e o volume das células foram determinados utilizando-se o Scepter™ *cell counter* (Merk Millipore, Darmstadt, Alemanha).

O Scepter™ se utiliza do princípio de Coulter baseado na impedância de partículas. Conforme as células fluem através do sensor, a resistência aumenta e, pela lei de Ohm ($V = IR$, onde V = voltagem, I = corrente e R = resistência), esse aumento leva a uma diminuição da corrente, que é registrada por um sensor em picos para cada passagem de célula. Células de tamanho e características iguais apresentam picos de corrente semelhantes e são agrupados em um histograma para serem contabilizadas. O histograma formado fornece, então, valores quantitativos da morfologia: média do diâmetro e do volume da população de células (considerando-se as células esféricas). Pela diferenciação de tamanhos celulares (células não viáveis são detectadas em uma média menor do que as células viáveis) é possível, ainda, analisar a viabilidade.

6.12.3. Determinação da concentração de glicose, lactato, glutamina e glutamato

As amostras coletadas foram centrifugadas a aproximadamente 1000 RCF por 3 minutos e o sobrenadante coletado e armazenado em freezer -20 °C. Depois de descongelado à temperatura ambiente, os sobrenadantes foram analisados por meio do analisador bioquímico YSI 2700 Select (YSI Inc, EUA).

A tecnologia do sensor enzimático do YSI é baseada na aplicação de uma ou mais enzima que catalisam reações com os metabólitos analisados (glicose, lactato, glutamina e glutamato) que produzem peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o qual é oxidado no ânodo de platina que produz uma corrente como sinal.



7. Resultados e discussão

7.1. Relação entre a infectividade do AgMNPV em células Sf21 e sua procedência

7.1.1. Infecção de células Sf21 com AgMNPV em cultivos estáticos

Ao começar os estudos em cultivos estáticos com as células Sf21, percebeu-se que havia uma diferença na infecção do AgMNPV entre as diferentes linhagens de células pertencentes ao grupo de pesquisa. Foram realizados, então, infecções em cultivos dessas linhagens em três meios e a evolução da infecção analisada visualmente (Figura 7-1 a 7-5 e tabela 7-1). Diante disso, buscou-se comparar a infectividade do baculovírus AgMNPV-2D (Ag2D) e seus variantes AgMNPV-MP2 (AgMP2) e AgMNPV-MP5 (AgMP5) em relação às diferentes linhagens de células Sf21.

Tabela 7-1. Resumo dos resultados referentes à análise microscópica das infecções com AgMNPV e seus variantes em cultivos estáticos

Linhagem	Meio	Crescimento após a infecção	Vírus que apresentaram efeitos citopatológicos (hipertrofia celular, estroma virogênico e células com poliedros)
EMB	TNM-FH	Somente no controle	Ag2D e AgMP5*
UFRN	SF900™ II	Somente no controle	Ag2D, AgMP2 e AgMP5
GibcoSF	SF900™ II	Somente no controle	Ag2D, AgMP2 e AgMP5 (em menor intensidade do que nas células UFRN, EMB e GibcoG)
	SF900™ III	Em todos tratamentos	Nenhum
GibcoG	TNM-FH	Somente no controle	Ag2D, AgMP2 e AgMP5

*Não foi realizado infecção com o variante AgMP2

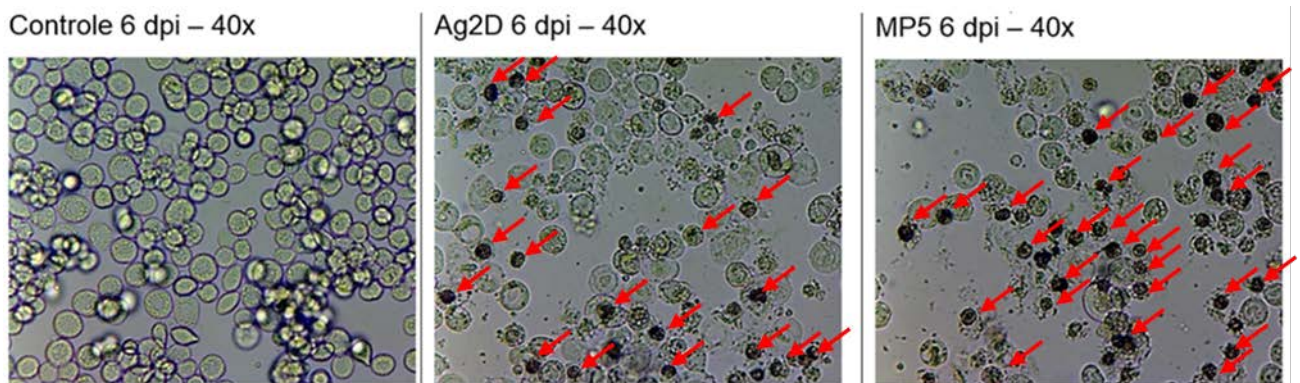
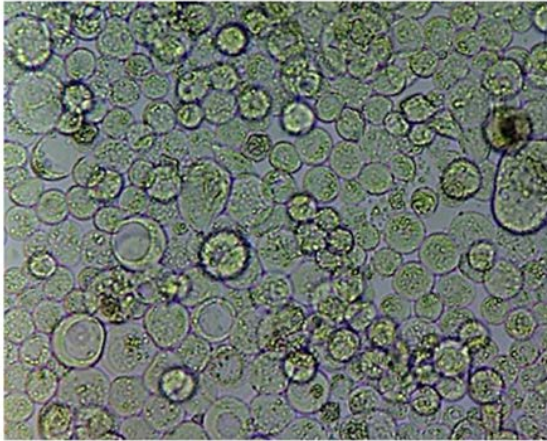
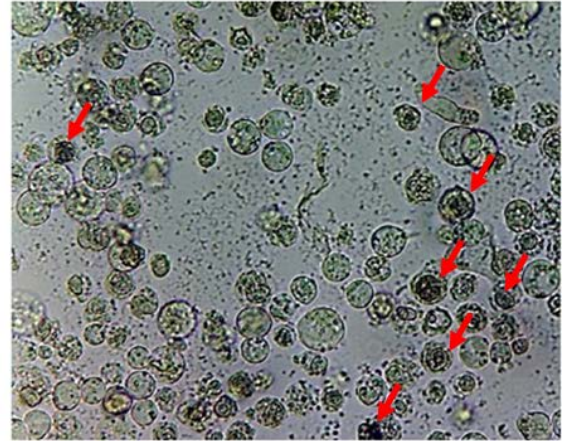


Figura 7-1. Infecção em cultura estática de células Sf21 EMB em meio TNM-FH. Setas em vermelho indicam células com poliedros. dpi=dias pós infecção.

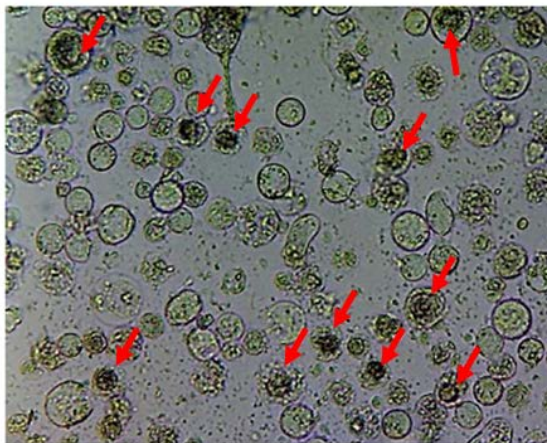
Controle 6 dpi – 10x



Ag2D 6 dpi – 10x



MP2 6 dpi – 10x



MP5 6 dpi – 10x

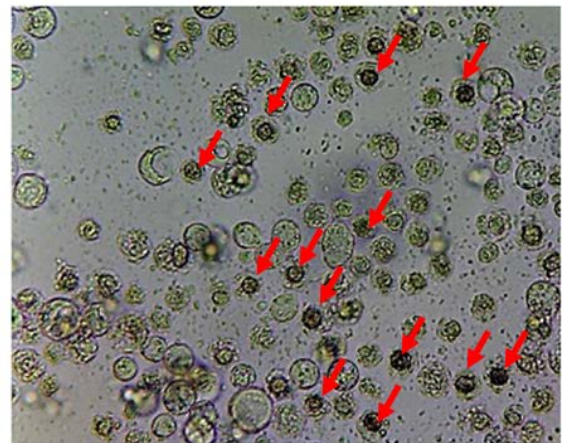
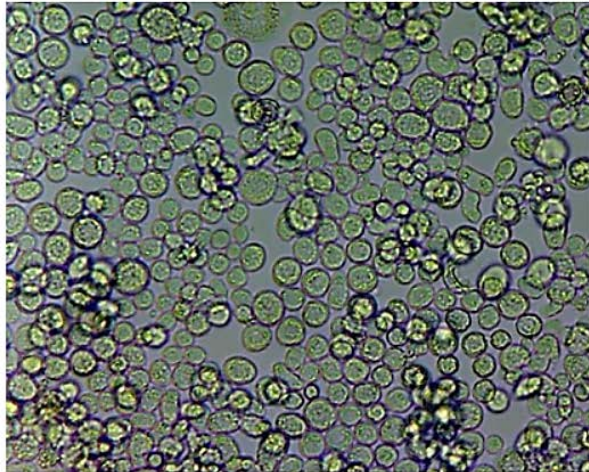


Figura 7-2. Infecção em cultura estática de células Sf21 UFRN em meio SF900 II. Setas em vermelho indicam células com poliedros. dpi=dias pós infecção.

Controle 5 dpi – 10x



Ag2D 5 dpi – 10x



MP2 5 dpi – 10x



MP5 5 dpi – 10x

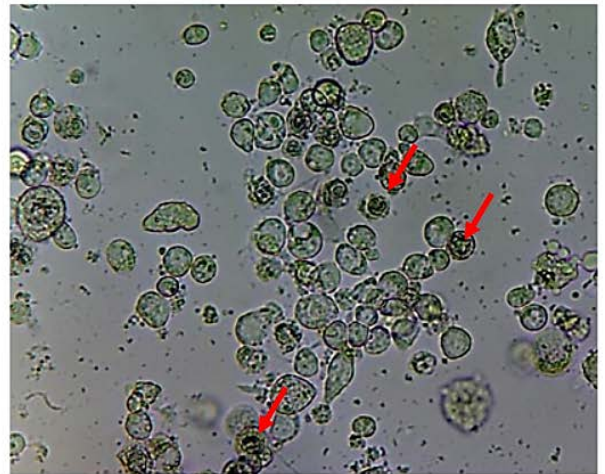
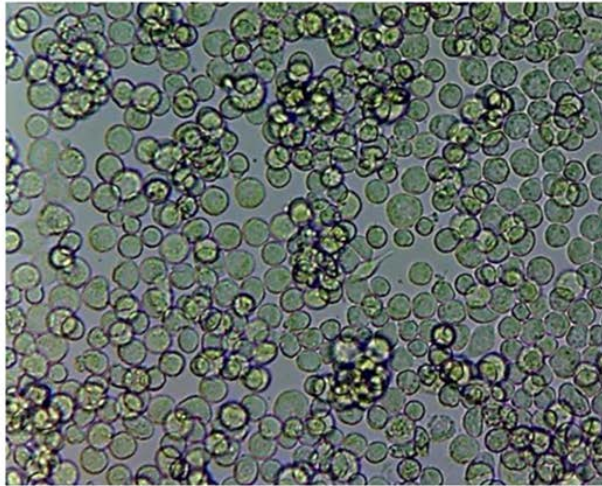
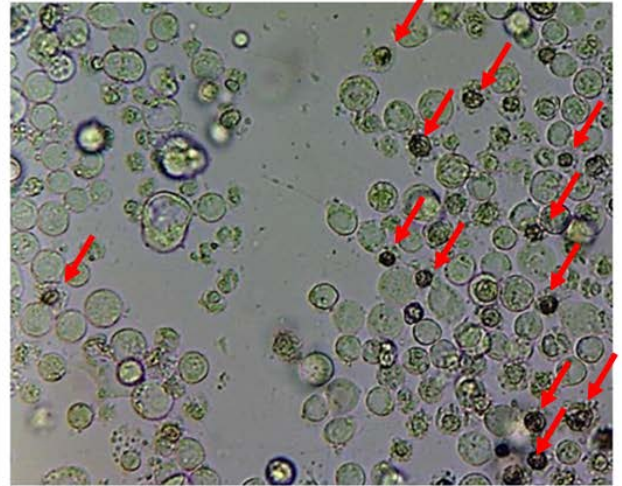


Figura 7-3. Infecção em cultura estática de células Sf21 GibcoSF em meio SF900 II. Setas em vermelho indicam células com poliedros.

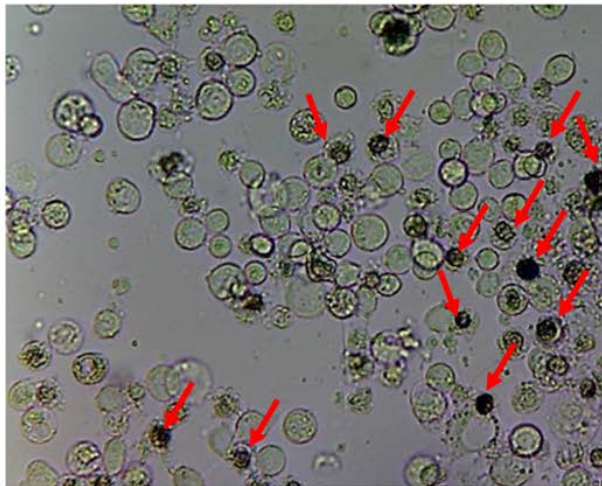
Controle 6 dpi – 40x



Ag2D 6 dpi – 40x



MP2 6 dpi – 40x



MP5 6 dpi – 40x

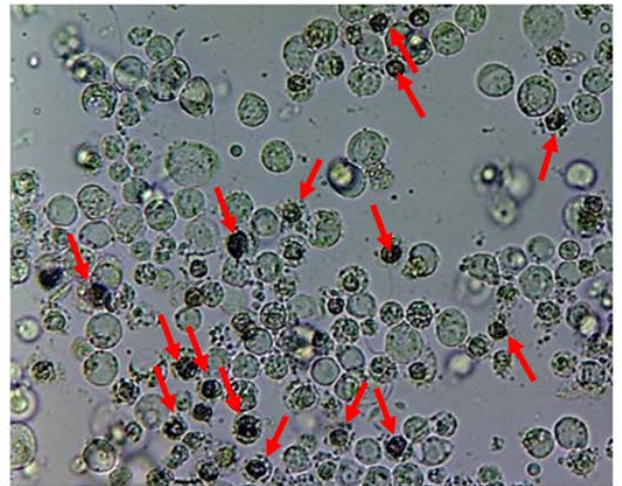
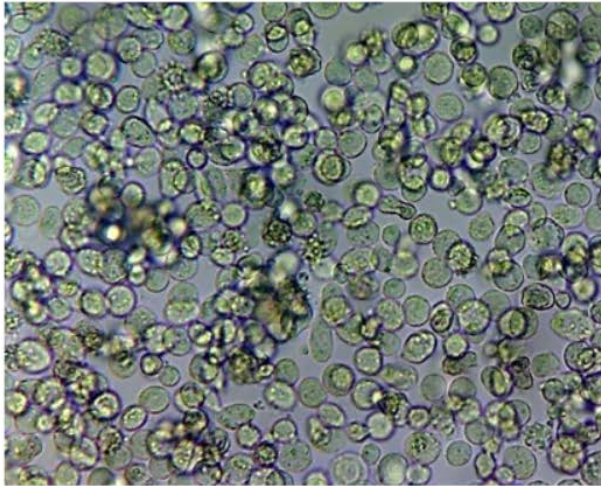
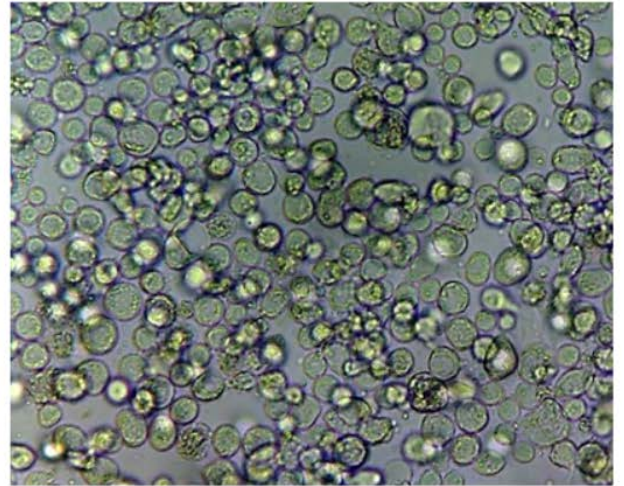


Figura 7-4. Infecção em cultura estática de células Sf21 GibcoG em meio TNM-FH. Setas em vermelho indicam células com poliedros. dpi=dias pós infecção.

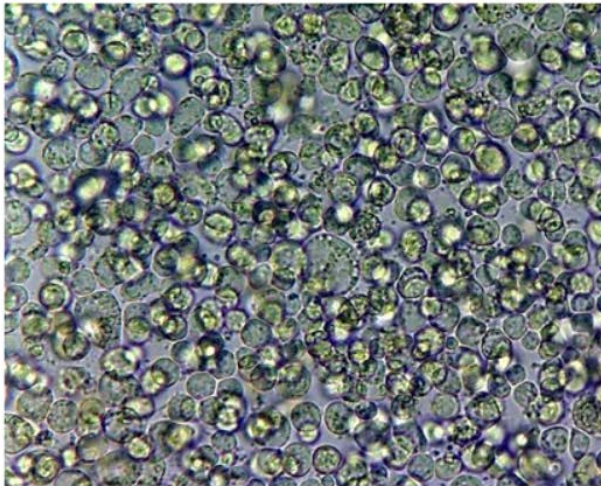
Controle 5 dpi – 40x



Ag2D 5 dpi – 40x



MP2 5 dpi – 40x



MP5 5 dpi – 40x

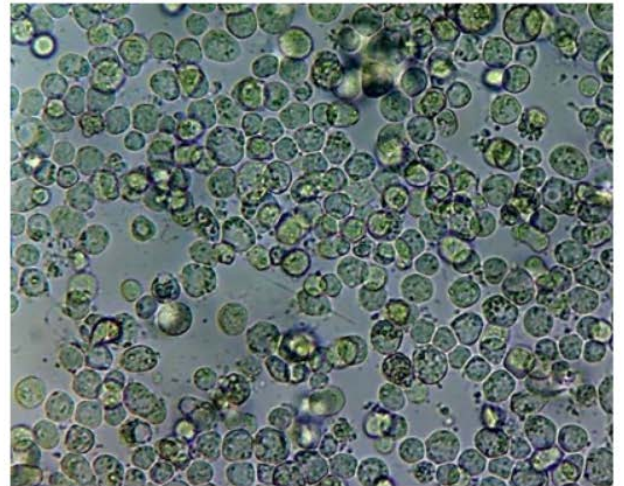


Figura 7-5. Infecção em cultura estática de células Sf21 GibcoSF em meio SF900 III. Setas em vermelho indicam células com poliedros. dpi=dias pós infecção.

As informações obtidas visualmente mostraram que em praticamente todas as linhagens a infecção aconteceu. Somente na linhagem GibcoSF, os efeitos citopatológicos foram pouco observados ou inexistentes, no meio de cultura SF900 III. Esses efeitos são caracterizados pela hipertrofia celular e nuclear e a formação do estroma virogênico. O experimento com o meio SF900™ III foi o que demonstrou menor efeito da infecção viral, com menor número de células com poliedros. Poder-se-ia considerar um efeito negativo do meio em questão, entretanto, nos ensaios em suspensão descritos a seguir, os experimentos com células UFRN tiveram uma maior porcentagem de células com poliedros no meio SF900™ III do que no meio SF900™ II, descartando, desta forma, o efeito negativo do meio SF900™ III na infecção pelo baculovírus. Os três variantes virais apresentaram um padrão de infecção bem semelhante, entretanto, o AgMNPV-2D resultou em uma formação de células com poliedros aparentemente menor do que nos outros dois variantes. Não se pode, porém, relacionar isso a uma melhor ou pior eficiência dos vírus, uma vez que as suspensões virais utilizadas não foram quantificadas quanto à concentração de vírus extracelulares (BVs).

Por meio da observação das imagens coletadas, pode-se identificar características morfológicas relacionadas à infecção pelo baculovírus: grânulos negros aglomerados no núcleo celular hipertrofiado, hipertrofia nuclear e lise celular acentuada. É claro notar uma grande diferença entre as células do controle e as células que foram infectadas com os vírus. As células do ensaio “Controle” continuaram crescendo e preencheram toda a garrafa, enquanto que as células dos ensaios “Ag2D”, “AgMP2” e “AgMP5” não apresentaram crescimento. Isso nos três meios utilizados. A falta de crescimento após a inoculação viral é um indicativo de infecção celular viral. Depois que o vírus chega ao núcleo das células, todo o metabolismo celular é direcionado para a replicação do vírus e a divisão celular é cessada (MICHELOUD *et al.*, 2009; MOSCARDI *et al.*, 2011).

Apesar de os poliedros não terem sido quantificados, visualmente, houve uma maior ocorrência de células com poliedros no meio TNM-FH do que no meio SF900. É evidenciada a melhor qualidade da infecção nas células EMB em relação às outras por meio da quantidade de células com poliedros e da densidade de formação dos mesmos. Pode-se notar que os poliedros formados nas células EMB são em maior número do que aqueles formados nas células UFRN. Como a diferença entre as duas linhagens é somente a adaptação em meios diferentes, é

possível relacionar a qualidade da infecção ao meio de cultura. Pedrini et al. (2006) mostraram em seus trabalhos com o vírus HaSNPV que a atividade biológica do poliedro produzido *in vitro* está intimamente relacionada ao meio que se utilizou.

Nas células infectadas, mas que ainda não apresentaram a formação de poliedros, é possível observar aumento do volume celular, o núcleo hipertrofiado e a formação do estroma virogênico, uma região dentro do núcleo que apresenta uma alta concentração de material genético viral (CASTRO; RIBEIRO; SOUZA, 2006); somente algumas células apresentaram acúmulo de poliedros no núcleo. Esses aspectos de infecção podem ser observados mais evidentemente nas cepas EMB, GibcoG e UFRN, sendo melhores os resultados para EMB e UFRN. Porém as células da GibcoSF apresentaram poucos aspectos morfológicos relacionados a infecção.

Esses resultados são parcialmente contrários àqueles relatados na literatura. Castro, Ribeiro e Souza (2006) realizaram testes em diferentes linhagens celulares (UFL-AG-286, BTI-Tn-5BI-4, TN-368, IPLB-SF21-AE, Sf9, IPLB-LD-625Y e BM-5) e, dentre elas, as células Sf21 apresentaram alta formação de poliedros e de infecção em meio TNM-FH. Os autores mostraram que 70% das células Sf21 apresentaram células com poliedros. Porém, os autores do trabalho utilizaram MOI definido e, por isso, talvez, tenham apresentado resultados diferentes. Além disso, vários trabalhos tem relatado a alta capacidade das células de *Spodoptera frugiperda* em produzir poliedros (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003; SZEWCZYK et al., 2011; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2012; REID; CHAN; OERS, 2013). A contradição ocorre porque as células GibcoSF não tiveram uma formação de poliedros comparada às outras linhagens do estudo e aos dados da literatura para células Sf21.

A relativa baixa de produção de poliedros, em meios SF900, pode ser relacionada a algum estresse celular mais possível de ocorrer nos meios sem SFB, uma vez que esse componente tem propriedades protetoras ao cisalhamento (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012), e, principalmente, à característica nutritiva dos meios. A presença de soro fetal bovino no meio TNM-FH possivelmente possibilitou uma melhor condição para a produção dos poliedros. Entretanto, nenhuma das linhagens estudadas apresentou valores de células com poliedros perto dos 70% relatados.

Tratando-se da origem das células, supõe-se que a cepa GibcoSF tenha sua susceptibilidade à infecção com AgMNPV comprometida de alguma forma. A menor produção de poliedros pelas células GibcoSF (menor que 3 % das células com poliedro) pode ser observada nos cultivos em suspensão também.

7.1.2. Infecção de células Sf21 com AgMNPV em cultivos em suspensão

Na tentativa de elucidar a variação da infectividade do AgMNPV e seus variantes nas diferentes linhagens de Sf21, realizou-se infecções com o AgMNPV e os dois variantes, MP2 e MP5, em cultivos com células Sf21 em frascos *schott* de 100 mL com 20 mL de volume de trabalho. Os cultivos foram realizados com X_0 entre $3,0 \cdot 10^5$ e $7,5 \cdot 10^5$ cel/mL, agitação controlada em 120 rpm e temperatura em 28° C

A Figura 7-6 resume o resultado de infecção nos *schotts* nos diferentes sistemas célula/meio propostos.

Quando analisados os resultados dos sistemas em suspensão, a baixa produção de células com poliedros pela cepa GibcoSF fica evidente, uma vez que a maior porcentagem de células com poliedros relatada nas infecções com essa cepa foi de 3,4%. Já as cepas UFRN, EMB e GibcoG apresentaram as melhores médias entre os três variantes virais 52,8%, 46,1% e 40,4%, respectivamente. Se for levado em consideração o número de passagens que as células de cada cepa se encontram (EMB e UFRN acima de 500 e GibcoG e GibcoSF pouco mais de 20), os resultados são opostos aos descritos por outros autores quando analisada a expressão de proteínas recombinantes. Estudos feitos com células TnB51-4 de baixa passagem e células *High Five*TM de alta passagens, demonstraram que as células com altas passagens produzem até 2,5 vezes menos proteínas recombinantes do que as células “novas” (DONALDSON; SHULER, 1998). No caso do efeito do número de subcultivos na produção de poliedros, não há estudos, até o presente momento, que possam ser utilizados como comparativos para o presente trabalho.

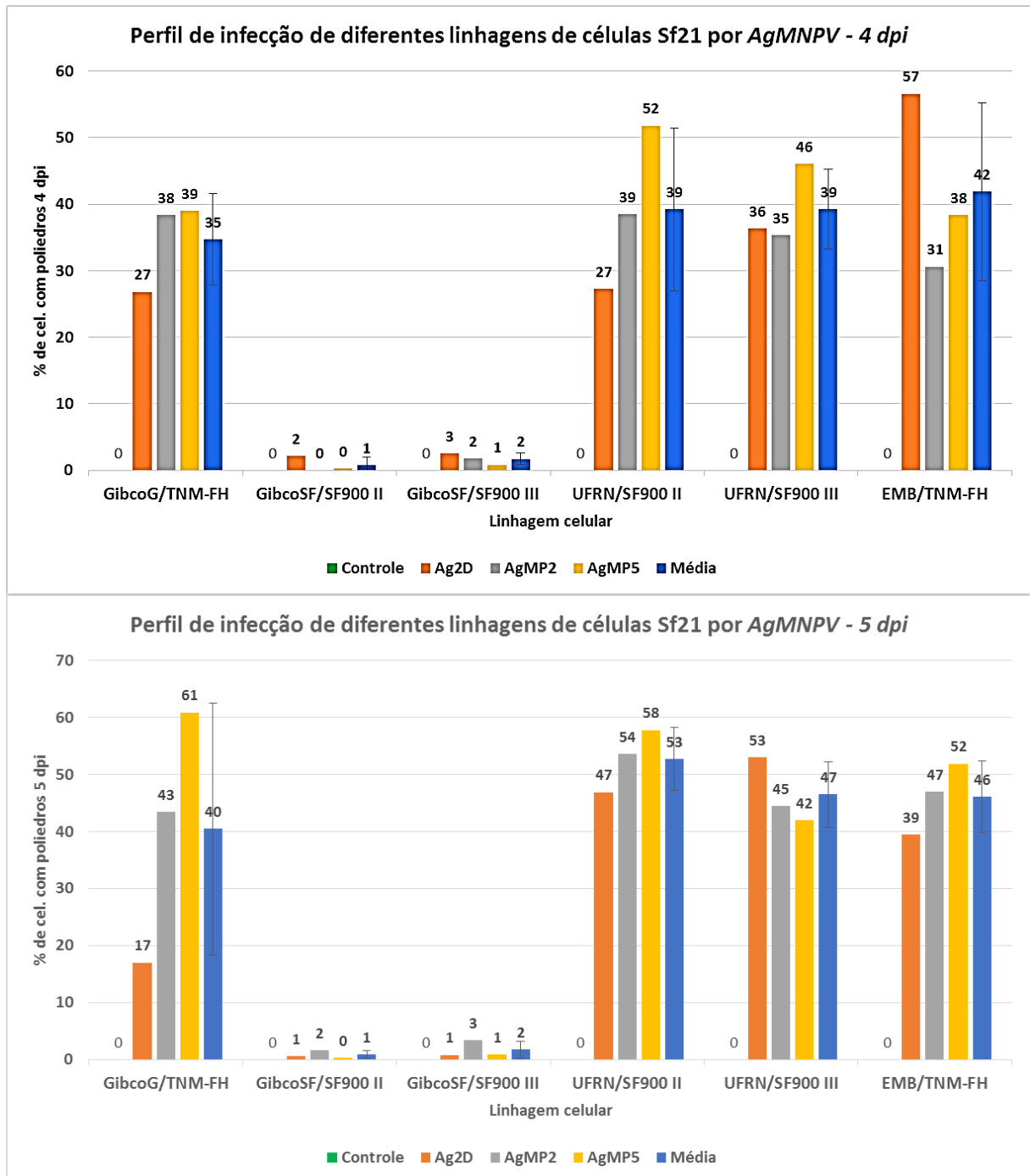


Figura 7-6. Porcentagem de células com poliedros 4 e 5 dias após a infecção com 3 diferentes variantes de AgMNPV, Ag2D, AgMP2 e AgMP5.

É contraditório o fato de células da mesma espécie, mas de diferentes origens, apresentarem perfis de infecção tão diferentes, uma vez que a infecção das células de *Spodoptera frugiperda* pelo AgMNPV é muito bem descrita (CASTRO; RIBEIRO; SOUZA, 2006; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2012; REID; CHAN; OERS, 2013). Isso, talvez, mostre uma variação entre os lotes das células.

Para explicar essa aparente divergência, foram formuladas, para o presente trabalho, duas hipóteses. A primeira relaciona-se com a formação dos BVs. Tem-se que o inóculo viral utilizado, constituído de BVs, foi produzido utilizando-se células EMB. Na síntese dos BVs há a encapsulação do nucleocapsídeo pela membrana celular da célula hospedeira (REID; CHAN; OERS, 2013). Possivelmente, nesse encapsulamento há a incorporação de estruturas da membrana celular que facilitem a infecção quando ela acontece nas mesmas células nas quais o BV foi produzido anteriormente e, por isso, a diferença entre as infecções entre as células provenientes do banco da Life Technologies™ e as células do banco da EMBRAPA. A segunda hipótese se baseia na superfície celular disponível para a infecção. Se for considerado que quanto maior a superfície disponível para contato células-vírus, mais eficiente é infecção, seria lógico esperar diferenças nas infecções entre as linhagens, uma vez que há diferença de tamanho entre as células dos dois bancos que será discutido no item 7.2. Em resumo, as células do banco da EMBRAPA apresentam volume 26 % maior que as células do banco da Life Technologies™. Assim, as células da EMBRAPA teriam mais facilidade de serem infectadas do que as células da Life Technologies™, explicando a diferença na infecção entre esses bancos. Já é conhecido o efeito da concentração celular na produtividade volumétrica de poliedros, quando acima de 3.10^6 cel/mL (BERNAL et al., 2009), e uma das causas dessa limitação é exatamente o contato célula-célula (*cell-to-cell contact inhibition*) que aumenta com o aumento da concentração celular e, com isso, diminui a infecção nas células. Isso mostra que a disponibilidade da superfície de celular é determinante na infecção das células pelos BVs.

7.2. Influência do número de subcultivos no metabolismo e morfologia celular

É muito discutido na literatura a idade das células e seus efeitos na produção de proteínas recombinantes, na morfologia e no metabolismo celular (DONALDSON; SHULER, 1998; PALOMARES; ESTRADA; RAMIREZ, 2006). Diante dessa realidade, buscou-se entender o efeito de longas passagens nas linhas de células Sf21 utilizadas no Laboratório de Células Animais do Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GEnBio) do Departamento de Engenharia Química da POLI-USP. As linhagens escolhidas para o estudo foram as células GibcoSF e UFRN, devido a diferença entre elas em relação ao número de subcultivos (passagens): menor que 20 e maior 500, respectivamente.

Primeiramente buscou-se analisar o crescimento dessas células em meio SF900 III™. A cinética de crescimento das duas linhagens pode ser analisada na Figura 7-7 que evidencia a diferença de crescimento entre elas. As células GibcoSF apresentaram uma fase *lag* com duração de 2 dias. Já as células UFRN não apresentaram essa fase de crescimento, iniciando o cultivo em fase exponencial. Enquanto as células UFRN chegam ao seu $X_{v_{max}}$ de $4,37 \cdot 10^6 \pm 5,58 \cdot 10^5$ cel/mL por volta do 5 dias de cultivo, cessando o crescimento, as células GibcoSF ainda estão em crescimento até o sétimo dia cultivo, tendo alcançado o valor de $9,36 \cdot 10^6 \pm 1,06 \cdot 10^6$ cel/mL, sendo essas diferenças estatisticamente significantes (Tabela 7-2 e Tabela 7-3). O F-valor é uma razão entre os quadrados médios do modelo e os quadrados médios residuais, ou seja, é uma razão entre o que o modelo prevê e seu erro. Quanto maior o F-valor, maior a certeza de se dizer que há diferença entre as médias. Consequentemente, o p-valor torna-se mais significativo (mais próximo de zero) com F-valores maiores. O p-valor mostra qual a probabilidade de se obter um valor igual ao analisado devido ao acaso.

Tabela 7-2. ANOVA par o $X_{v_{max}}$ resultante das diferentes linhagens utilizadas (GibcoSF e UFRN).

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F-valor	p-valor
Modelo	1	3,22E+13	3,22E+13	54,8	0,0018
Erro	4	2,35E+12	5,87E+11		
Total	5	3,45E+13			

Tabela 7-3. Xv_{max} resultante de diferentes linhagens utilizadas (GibcoSF e UFRN)

Tratamento	Média (cel/mL)*	Desvio padrão (cel/mL)
GibcoSF	9,36E6 ^(a)	1,06E6
UFRN	4,73E6 ^(b)	2,40E5

* Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey com intervalo de confiança de 90%

A μ_{max} é outro parâmetro que evidencia as diferenças entre o crescimento das duas linhagens celulares. Para as células com baixo número de passagens, GibcoSF, o valor de μ_{max} foi de $0,87 \pm 0,04 \text{ dia}^{-1}$ em contraste com a μ_{max} de $0,62 \pm 0,01 \text{ dia}^{-1}$ encontrada para as células UFRN (Tabela 7-6 e Tabela 7-7).

Tabela 7-4. ANOVA par o μ_{max} resultante das diferentes linhagens utilizadas (GibcoSF e UFRN).

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F-valor	p-valor
Modelo	1	0,09	0,09	119,04	4,0E-4
Erro	4	0,003	7,67E-4		
Total	5	0,09			

Tabela 7-5. μ_{max} resultante de diferentes linhagens utilizadas (GibcoSF e UFRN)

Tratamento	Média (dia^{-1})*	Desvio padrão (dia^{-1})
GibcoSF	0,87 ^(a)	0,04
UFRN	0,62 ^(b)	0,01

* Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey com intervalo de confiança de 90%

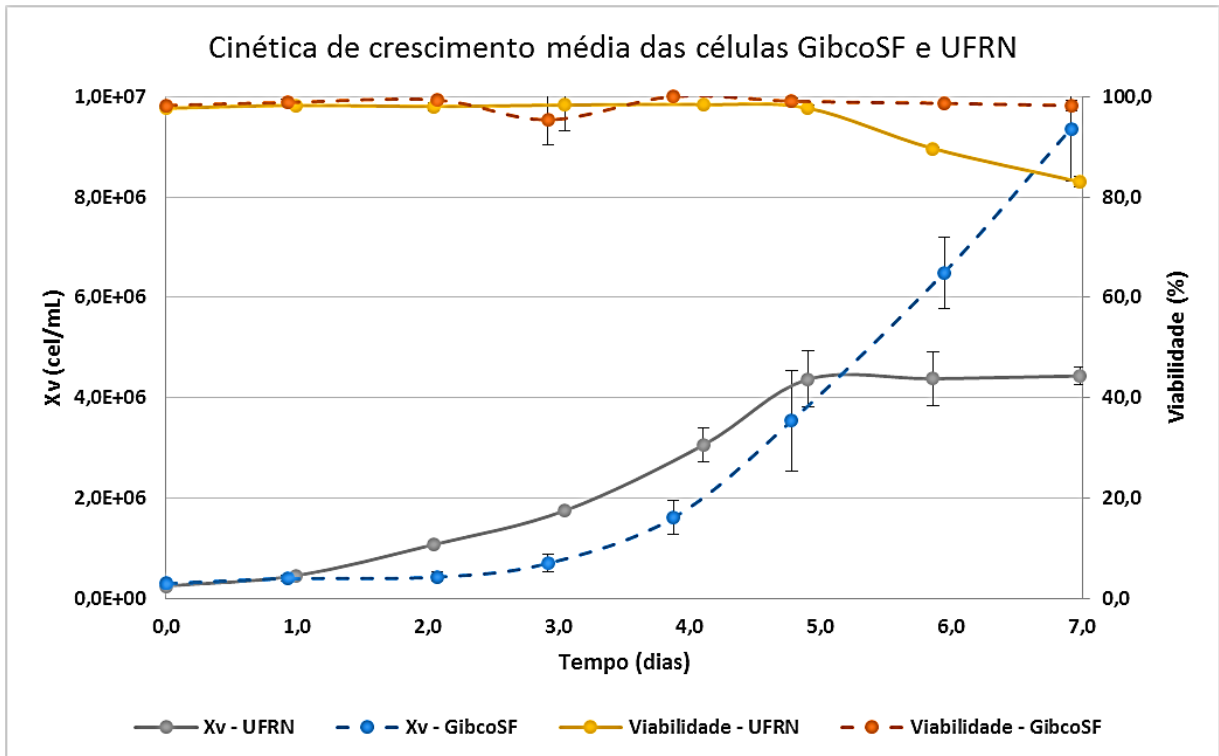


Figura 7-7. Cinética de crescimento de células GibcoSF e UFRN em meio SF900 III.

Não há dados de consumo de nutrientes e de produção de metabólitos para esses cultivos.

Quando analisado o tamanho médio das células é possível notar diferenças significativas (Tabela 7-6, Tabela 7-7, Tabela 7-8 e Tabela 7-9). Tem-se um diâmetro médio para a GibcoSF de $15,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$ e um volume de $1,9 \pm 0,1 \mu\text{L}$. As células UFRN, por sua vez, apresentaram valores de diâmetro e volume médio de $16,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$ e $2,5 \pm 0,1 \mu\text{L}$, respectivamente. Assim, as células UFRN são 10% maiores que as células GibcoSF em relação ao diâmetro celular, mas 26 % maior em relação ao volume. Esses dados se assemelham aos obtidos por Donaldson e Shuler (1998) entre as células BTI-Tn-5B1-4, originárias de *Trichopulsi ni*, de alta e baixas passagens. As células com mais do que 360 subcultivos tiveram uma $X_{v_{\max}}$ de $5,3 \cdot 10^6 \text{ cel/mL}$ enquanto as células com aproximadamente 130 subcultivos alcançaram valores de $X_{v_{\max}}$ de $11,7 \cdot 10^6 \text{ cel/mL}$. Além disso, as células mais subcultivadas tiveram 19-20 μm de diâmetro, enquanto as células com menor número de subcultivos mostraram valores de 15-16 μm .

Tabela 7-6. ANOVA par o diâmetro resultante das diferentes linhagens utilizadas (GibcoSF e UFRN).

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F-valor	p-valor
Modelo	1	4,12	4,12	98,76	5,8E-4
Erro	4	0,17	0,04		
Total	5	4,28			

Tabela 7-7. Diâmetro resultante de diferentes linhagens utilizadas (GibcoSF e UFRN)

Tratamento	Média (μm)*	Desvio padrão (μm)
GibcoSF	15,3 ^(a)	0,2
UFRN	16,9 ^(b)	0,2

* Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey com intervalo de confiança de 90%

Tabela 7-8. ANOVA par o volume resultante das diferentes linhagens utilizadas (GibcoSF e UFRN).

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F-valor	p-valor
Modelo	1	0,67	0,67	94,39	6,28E-4
Erro	4	0,03	0,01		
Total	5	0,70			

Quando normalizado os valores de $X_{v_{\max}}$ para biovolume máximo (biov_{\max}), utilizando os valores de volume médios obtidos (Tabela 7-9), tem-se para as células UFRN um biov_{\max} de $1,20 \cdot 10^7$ pL/mL e para as células GibcoSF $1,74 \cdot 10^7$ pL/mL. Quando analisado apenas os valores de $X_{v_{\max}}$, observava-se uma diferença entre as duas linhagens de 49 % na produtividade em células, ou seja, as células GibcoSF cresceram quase o dobro do que as células UFRN cresceram. Porém, ao normalizar os valores em termos de volume, nota-se que essa diferença é reduzida para 31 %. Entretanto, mesmo considerando o volume produzido e não somente o número de células, ainda é evidente a diferença entre produtividade em células duas linhagens.

Tabela 7-9. Volume resultante de diferentes linhagens utilizadas (GibcoSF e UFRN)

Tratamento	Média (ρL)*	Desvio padrão (ρL)
GibcoSF	1,9 ^(a)	0,1
UFRN	2,5 ^(b)	0,1

* Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey com intervalo de confiança de 90%

De certa forma, é possível notar que as células UFRN são mais comprometidas em termos de crescimento do que as células GibcoSF. Todavia, o fato das células UFRN serem menos eficientes em crescimento celular não impactou na infecção e produção viral (item 7.1). Com isso, para a infecção com baculovírus visando a produção de poliedros e não proteínas recombinantes, observa-se que o número de passagens das células aparenta ter relações contrárias daquelas descritas na literatura. Na produção de proteínas recombinantes, quanto maior o número de subcultivos, menor a produtividade (DONALDSON; SHULER, 1998). Já nos ensaios realizados nesse trabalho com diferentes células Sf21, notou-se que as células com maior número de passagens foram as mais susceptíveis à infecção pelo AgMNPV. No item 7.1, os possíveis motivos para essa diferença na infecção já foram discutidos.

7.3. Estudo da cinética de crescimento das células Sf21 em diferentes sistemas e condições

7.3.1. Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Com o resultado dos testes de infecção em diferentes células, escolheu-se dar continuidade às pesquisas com as células da UFRN cedidas pela Dra. Márcia Pedrini, uma vez que essas células apresentaram porcentagem de células com poliedros maior que 40 % e, somado a isso, adaptação para crescer nos meios SF900™. A escolha pelo meio SF900™ baseou-se na possibilidade de um crescimento celular mais longo e com maior produção de células. As células em TNM-FH chegam ao $X_{v_{max}}$ de aproximadamente $3 \cdot 10^6$ cel/mL em três dias, enquanto que, em SF900™, as células atingem um $X_{v_{max}} > 6 \cdot 10^6$ cel/mL por volta do quarto ou quinto dia de cultivo. Com um maior $X_{v_{max}}$, é possível que se obtenha uma maior produção de poliedros. Além disso, a duração da fase exponencial nas células em SF900™ supera as células em TNM-FH em até 2 dias de diferença (dados não apresentados de experimentos realizados pela aluna de iniciação científica do Laboratório de Células Animais – Departamento de Engenharia Química – USP, Juliana Paiva Guermandi), o que fornece mais opções para estudos de TOI.

Nesse sentido, buscou-se otimizar e padronizar o crescimento das células da cepa UFRN em *schotts* de 100 mL com 20 mL de volume de trabalho, a 28° C, a 120 rpm e em meio SF900™ III para os estudos de cinética celular sem infecção e para

as investigações posteriores de produção de baculovírus. Avaliou-se, então, a influência da idade do inóculo e da concentração celular inicial nos parâmetros μ_{\max} e $X_{v_{\max}}$. Um resumo dos resultados obtidos pode ser visto na Tabela 7-10.

Tabela 7-10. Resumo das respostas do DOE 3^2 para o estudo da influência dos fatores IA e X_0

Ensaio	IA (x_1) codificado	X_0 (x_2) codificado	IA (horas)	X_0 (Ln(concentração de células))	μ_{\max} (dia ⁻¹)	$X_{v_{\max}}$ (cel/mL)
1	-1	-1	48	Ln(0,25E6)	0,74	6,53E+06
2	1	-1	96	Ln(0,25E6)	0,72	3,93E+06
3	-1	1	48	Ln(1,0E6)	0,63	6,74E+06
4	1	1	96	Ln(1,0E6)	0,72	5,81E+06
5	-2	0	24	Ln(0,5E6)	0,59	5,09E+06
6	2	0	120	Ln(0,5E6)	0,39	3,52E+06
7	0	-2	72	Ln(0,12E6)	0,71	4,90E+06
8	0	2	72	Ln(2,0E6)	0,59	6,37E+06
9	0	0	72	Ln(0,5E6)	0,71	6,09E+06
10	0	0	72	Ln(0,5E6)	0,62	4,68E+06
11	0	0	72	Ln(0,5E6)	0,70	5,73E+06

Através do software Protimiza Experimental Design, foi gerado um modelo por meio de regressão linear e foi feita a análise estatística do mesmo utilizando o teste t-student para a verificação da significância dos coeficientes do modelo e da influência das interações principais e da interação de dois níveis (Tabela 7-11 e 7-12). Devido à grande variabilidade inerente aos bioprocessos que envolvem enzimas, micro-organismos e células eucariontes superiores, é comumente considerado significativo os parâmetros com p-valores menores que 10% ($p < 0,10$) (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Tabela 7-11. Coeficientes da regressão para a resposta $X_{v_{\max}}$

Nome	Coeficiente	$X_{v_{\max}}$ (cel/mL)		
		Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	5,72E+06	3,59E+05	15,92	0,00
IA (x_1)	-5,57E+05	2,02E+05	-2,76	0,04
IAxIA(x_1 x_1)	-3,13E+05	1,59E+05	-1,96	0,11
X_0 (x_2)	4,19E+05	2,02E+05	2,07	0,09
X_0 x X_0 (x_2 x_2)	2,01E+04	1,59E+05	0,13	0,90
IAx X_0 (x_1 x_2)	4,18E+05	3,50E+05	1,19	0,29

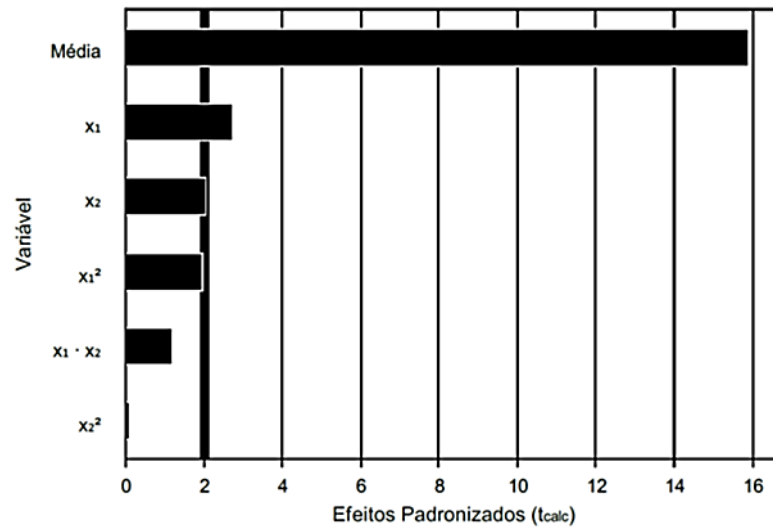


Figura 7-8. Gráfico de pareto para os efeitos padronizados para a resposta $X_{v_{max}}$

Com isso, ao examinar a Tabela 7-11, nota-se que os dois coeficientes lineares e apenas o coeficiente quadrático de IA apresentaram valores estatisticamente significativos para a resposta $X_{v_{max}}$, sendo que o IA teve o maior efeito. Os efeitos significativos podem ser evidenciados, ainda, pelo gráfico de efeitos padronizados (t-calculado (t_{calc})) para a resposta $X_{v_{max}}$ da Figura 7-8, uma vez que somente os efeitos que tem o módulo do t_{calc} maior ou igual ao módulo do t-tabelado (para intervalo de confiança de 0,10 e 5 graus de liberdade, t-tabelado é igual a 2,02) são significativos. Gerou-se, então, a partir desses coeficientes a equação (15):

$$X_{v_{max}} = 5,72 \cdot 10^6 - 0,56 \cdot 10^6 x_1 - 0,31 \cdot 10^6 x_1^2 + 0,42 \cdot 10^6 x_2 + 0,02 \cdot 10^6 x_2^2 + 0,42 \cdot 10^6 x_1 x_2 \quad (15)$$

Porém, como os coeficientes de $X_0 x_0$ e $IA x_0$ não foram significativos, é necessário realizar a reparametrização, para a simplificação do modelo. Assim, obteve os seguintes valores para o modelo reduzido:

$$X_{v_{max}} = 5,72 \cdot 10^6 - 0,56 \cdot 10^6 x_1 - 0,31 \cdot 10^6 x_1^2 + 0,42 \cdot 10^6 x_2 \quad (16)$$

Entretanto, apesar da anova ter mostrado que a regressão é significativa ($p < 0,05$) (Tabela 7-12), o R^2 igual a 72,11 % é relativamente baixo. Com esse valor, tem-se que somente 72,11 % do fenômeno estudado, a resposta $X_{v_{max}}$, é explicado pelo modelo proposto. Mostrando, portanto, uma possível falta de ajuste. Através do gráfico de valores previstos versus valores experimentais (Figura 7-9), é possível

observar que o modelo realmente tem uma previsão de valores comprometida. Porém, ainda se observa uma sutil correlação entre os valores previsto e os valores experimentais.

Tabela 7-12. Anova para o modelo da resposta $X_{v_{max}}$

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F_{cal}	p-valor
Regressão	8,17	3	2,72	6,03	0,02
Resíduos	3,16	7	0,45		
Falta de Ajuste	2,09	5	0,42	0,78	0,65
Erro Puro	1,07	2	0,54		
Total	11,33	10			

$$R^2 = 72,11\%$$

A falta de ajuste descrita pode ter sido causada, em partes, pela retirada dos coeficientes não significativos. Assim, os valores dos resíduos são aumentados o que leva a uma diminuição do R^2 . Entretanto, a hipótese de que a equação não é adequada devido à falta de ajuste deve ser descartada, visto que o p-valor para a falta de ajuste foi maior que 0,10. Além disso, os erros de ajustes e o erro relativo (erro de ajuste/valor experimentalx100) são em sua maioria menor que 10 % (Tabela 7-13). Considerando que quanto menor o erro relativo, melhor o ajuste ao modelo, observa-se uma relação satisfatória entre os dois valores. De qualquer forma, o modelo não é capaz de prever a resposta com muita exatidão. O que pode estar sendo mostrado com esse estudo, na verdade, é a robustez das variáveis estudadas perante a resposta $X_{v_{max}}$.

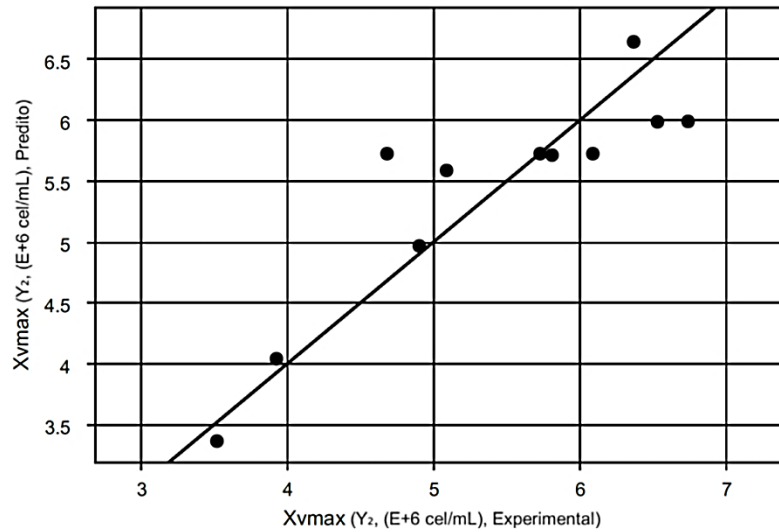


Figura 7-9. Valores preditos vs valores experimentais para o modelo obtido para a resposta Xv_{max}

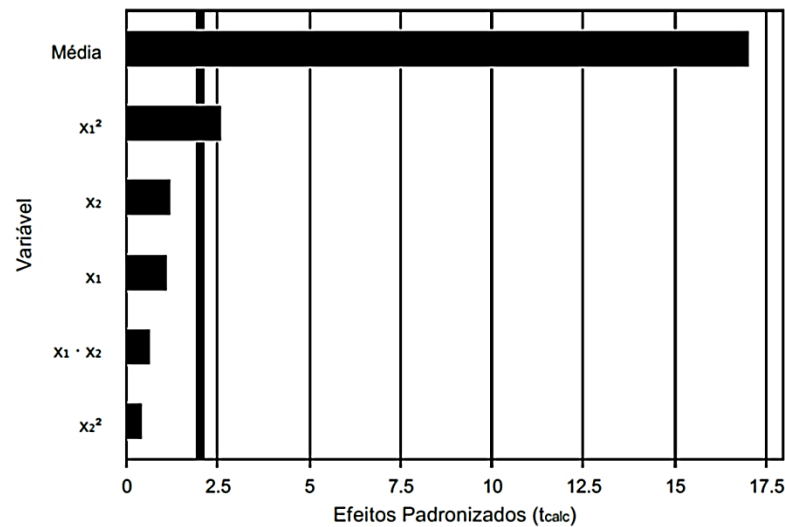
Tabela 7-13. Valores de Xv_{max} e μ_{max} experimentas, previstas pelo modelo, erros de ajustes e erros relativos

Ensaio	Xv_{max} experimental (cel/mL)	Xv_{max} predito (cel/mL)	Erro de ajuste Xv_{max}	Erro relativo Xv_{max} (%)	μ_{max} experimental (dia-1)	μ_{max} predito (dia-1)	Erro de ajuste μ_{max}	Erro relativo μ_{max} (%)
1	6,53E+06	5,57E+06	9,60E+05	14,70	0,74	0,65	0,09	12,72
2	3,93E+06	4,45E+06	-5,20E+05	-13,27	0,72	0,65	0,07	9,29
3	6,74E+06	6,41E+06	3,30E+05	4,89	0,63	0,65	-0,02	-2,89
4	5,81E+06	5,29E+06	5,20E+05	8,95	0,72	0,65	0,07	9,11
5	5,09E+06	5,59E+06	-4,98E+05	-9,76	0,59	0,5	0,09	15,89
6	3,52E+06	3,35E+06	1,65E+05	4,69	0,39	0,5	-0,11	-29,53
7	4,90E+06	4,91E+06	-1,00E+04	-0,20	0,71	0,7	0,01	1,82
8	6,37E+06	6,59E+06	-2,20E+05	-3,45	0,59	0,7	-0,11	-18,34
9	6,09E+06	5,75E+06	3,40E+05	5,58	0,71	0,7	0,01	1,58
10	4,68E+06	5,75E+06	-1,07E+06	-22,86	0,62	0,7	-0,08	-12,93
11	5,73E+06	5,75E+06	-2,00E+04	-0,34	0,70	0,7	-0,00	-0,04

Em relação a resposta μ_{max} , só teve valores significativos o coeficiente quadrático de IA (IAxIA). Ao analisar a Tabela 7-14 e a Figura 7-10, pode-se notar a falta de efeito dos outros coeficientes. Ou seja, para essa variável estudada, apenas a idade do inóculo influencia em seus valores.

Tabela 7-14. Coeficientes da regressão para a resposta μ_{\max}

Nome	μ_{\max} (dia ⁻¹)			
	coeficiente	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	0,71	0,04	17,07	0,00
IA (x_1)	-0,03	0,02	-1,17	0,29
IAxIA(x_1 x_1)	-0,05	0,02	-2,64	0,05
X_0 (x_2)	-0,03	0,02	-1,25	0,27
X_0 x X_0 (x_2 x_2)	-0,01	0,02	-0,47	0,66
IAx X_0 (x_1 x_2)	0,03	0,04	0,68	0,53

Figura 7-10. Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados para a resposta μ_{\max}

Assim, o modelo reduzido obtido para essa resposta pode ser analisado na equação (17), abaixo:

$$\mu_{\max} = 0,70 - 0,05 x_1^2 \quad (17)$$

Tabela 7-15. Anova para o modelo da resposta μ_{\max}

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F_{cal}	p-valor
Regressão	0,05	1,0	0,05	7,46	0,02
Resíduos	0,06	9,0	0,01		
Falta de Ajuste	0,05	7,0	0,01	3,04	0,27
Erro Puro	0,00	2,0	0,00		
Total	0,10	10,0			

$$R^2 = 45,33\%$$

Para essa variável, entretanto, o R^2 foi muito baixo e os valores preditos não apresentaram correlação com os valores apresentado, como mostrado na Figura 7-11. Somado a isso, teve-se muitos valores de erros relativos maiores que 20 %,

evidenciando a falta de ajuste do modelo, mesmo com p-valores da ANOVA para o modelo mostrando significância para o mesmo.

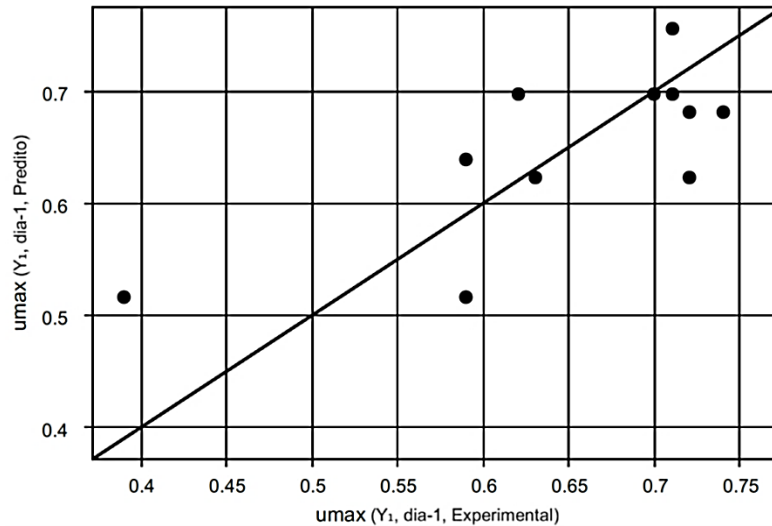


Figura 7-11. Valores preditos vs valores experimentais para o modelo obtido para a resposta μ_{\max}

No geral, a falta de ajuste observada para os modelos pode estar associada também à variabilidade inata dos cultivos celulares. Isso pode ser observado através da variabilidade registrada pelas repetições dos pontos centrais. Além disso, os pontos axiais utilizados (-2 e 2) não são os pontos padronizados (-1,41 e 1,41). Ao utilizar valores diferentes dos pontos axiais propostos, é provável observar uma diminuição dos R^2 . Assim, o modelo descreve, possivelmente, a robustez do método. Ao ver os estudos de uma variável por vez, item 7.3.2, é mais evidente que somente os extremos estudados apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Por isso, talvez, a falta de ajuste dos modelos obtidos. Com isso, tem-se um intervalo de trabalho definido, no qual sabe-se quais valores de $X_{V_{\max}}$ e μ_{\max} são esperados. Assim, pode-se trabalhar dentro do intervalo analisado para IA e X_0 sem correr o risco de associar mudanças no $X_{V_{\max}}$ ou μ_{\max} com mudanças no IA e X_0 , levando a mais certeza a respeito dos cultivos a serem realizados

Ademais, analisando o consumo dos substratos (tabela 7-16) e a formação de produtos (apêndice 1), para os ensaios do DCC, pode-se notar que em nenhum dos ensaios houve a limitação por glicose ou glutamina, uma vez que esses substratos não foram totalmente esgotados, ao contrário, em alguns casos houve a produção de glutamina. A formação de lactato não atingiu, em nenhum dos ensaios, valores

inibitórios (maiores que 1,12 g/L (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2012)); a maior formação de lactato ocorreu no final do ensaio 9 (1,17 g/L) e não foi a responsável pela estagnação do crescimento das células nesse cultivo.

Tabela 7-16. Rendimentos de glicose e glutamina em células do DCC

Ensaio	(IA)	(X₀)	Y_{X/Glc} (cel/g de Glc)	Y_{X/Gln} (cel/g de Gln)
1	-1	-1	3,0.10 ⁹	3,64.10 ⁶
2	+1	-1	4,0.10 ⁹	4,02.10 ⁶
3	-1	+1	2,0.10 ⁹	3,67.10 ⁶
4	+1	+1	2,0.10 ⁹	4,05.10 ⁶
9	0	0	2,0.10 ⁹	3,73.10 ⁶
10	0	0	5,0.10 ⁹	3,73.10 ⁶
11	0	0	4,0.10 ⁹	3,90.10 ⁶

Os valores de $Y_{X/Glc}$ variaram entre $2,0 \cdot 10^9$ e $5,0 \cdot 10^9$ (cel/ g de Glc) e os valores de $Y_{X/Gln}$ entre $3,67 \cdot 10^6$ e $4,05 \cdot 10^6$ (cel/g de Gln). Assumindo o menor dos rendimentos, pode-se dizer que a glicose não seria uma fator limitante até $1,9 \cdot 10^7$ cel/mL, uma vez que o meio utilizado (SF900 IIITM) possui aproximadamente 9,5 g/L de glicose. Em relação a glutamina, com uma concentração por volta de 1,6 g/L no meio de cultura, a limitação só aconteceria após $3,7 \cdot 10^9$ cel/mL. Kwon, Dojima e Park (2003) demonstraram, em seus estudos, valores de $Y_{X/Glc}$ global de $1,9 \cdot 10^9$ (cel/g de Glc) para células Sf9, $0,6 \cdot 10^9$ (cel/g de Glc) para células Sf21 e $0,95 \cdot 10^9$ (cel/g de Glc) para células Tn5B1-4, sendo as duas primeiras células cultivadas em meio SF900II e a última em meio Express Five (Gibco). Esses resultados foram menores que os valores obtidos nos ensaios do DOE para os valores de $Y_{X/glic}$ obtidos para a fase exponencial. A diferença entre os dois trabalhos deve-se, provavelmente, ao fato da literatura citada utilizar valores globais de rendimento enquanto, no presente trabalho, o rendimento foi calculado para fase exponencial. Além disso, os cultivos realizados por esses pesquisadores foram a uma temperatura de 27° C e a concentração celular final alcançada para as células Sf21 foi por volta de $4,0 \cdot 10^6$ cel/mL, abaixo dos valores de $X_{v_{max}}$ registrados no DCC. A menor concentração de células é um reflexo real do menor rendimento obtidos no trabalho citado. Em relação ao $Y_{X/Gln}$, quando comparados os valores do presente estudo com os obtidos por Vieira (2010) com células S2 recombinante em meio SF900II de $30 \cdot 10^9$ (cel/g de gln), são dez vezes menores. Isso mostra a diferença entre metabolismo dessas duas células, Sf21 e S2. Aparentemente, as células S2 são mais eficientes na transformação de glutamina em células do que as células Sf21.

Dando sequência ao planejamento experimental, realizou-se a validação dos três melhores valores para $X_{v_{max}}$ e μ_{max} para o cultivo de Sf21 nas condições descritas acima. Realizou-se testes em triplicata com os ensaios 1 (X_0 : $0,25 \cdot 10^6$ cel/mL; IA: 2 dias), com o ponto central (PC) (X_0 : $0,5 \cdot 10^6$ cel/mL; IA: 3 dias) e com o ensaio 4 (X_0 : $1 \cdot 10^6$ cel/mL; IA: 4 dias) do DOE proposto. Isso foi realizado a fim encontrar a melhor condição para os parâmetros estudados de acordo com os modelos proposto, mesmo que eles demonstraram um certo grau de incerteza. A cinética de cada triplicata pode ser observada na Figura 7-12 e a análise estatística na Tabela 7-17.

Analisando a cinética das três replicatas, há uma diferença no valor de $X_{v_{max}}$ de cada condição e o tempo em que as células alcançam a fase estacionária. O ensaio 1 alcançou o menor valor de $X_{v_{max}}$, $4,73 \cdot 10^6 \pm 2,43 \cdot 10^5$ cel/mL, o PC e o ensaio 4 não apresentando diferenças relevantes com os valores de $5,5 \cdot 10^6 \pm 2,41 \cdot 10^5$ cel/mL e $5,62 \cdot 10^6 \pm 2,02 \cdot 10^5$ cel/mL, respectivamente. Esses valores estão próximos daqueles obtidos por outros autores (SCHMID, 1996), em batelada, em meios com soro ($2-5 \cdot 10^6$ cel/mL), mas muito abaixo dos cultivos em meio SF900™ ($>8 \cdot 10^6$ cel/mL, dados não apresentados). Essa diferença pode ser devido ao número de subcultivos que essas células se encontram (>500). De acordo com Donaldson e Shuler (1998), células com alto número de passagens apresentam menor $X_{v_{max}}$ e maior diâmetro do que as mesmas células em número de passagens menor.

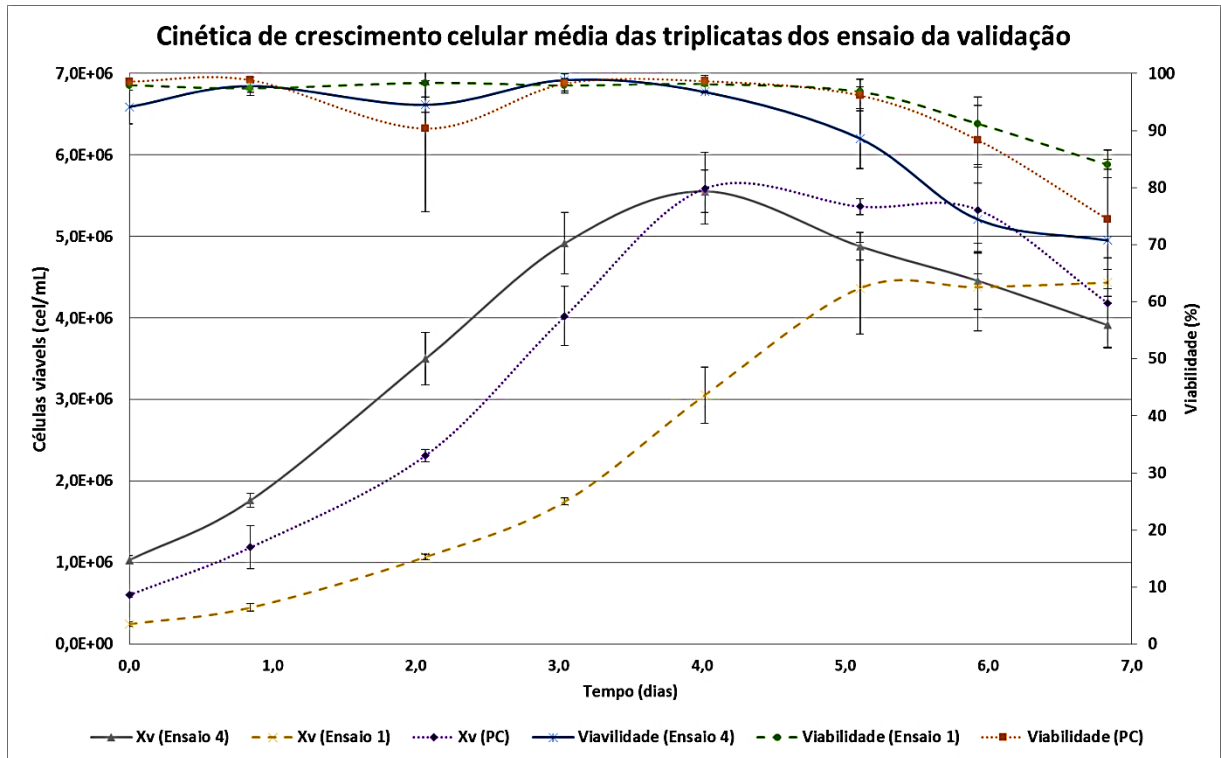


Figura 7-12. Gráfico da concentração celular e viabilidade em função do tempo do ensaio para a validação do cultivo de Sf21 em meio SF900 III

Somente o ensaio 1 entrou na fase estacionária após o 5º dia de cultivo, efeito que pode ser relacionado com o X_0 utilizado nesse experimento, o menor entre os três ensaios. Por sua vez, o PC e o ensaio 4 resultaram em crescimento celular estagnado a partir do 4 dia de cultivo. Após atingirem o $X_{v_{max}}$, não foi possível observar a fase de decaimento no ensaio 1, mas no ensaio PC e 4 essa fase esteve presente. No PC, as células começaram a morrer somente após o dia 5 de cultivo, enquanto que no ensaio 4 as células apresentaram uma diminuição da viabilidade mais brusca a partir do dia 4 de crescimento. A duração do crescimento das células de *Spodoptera frugiperda* em batelada descrita na literatura é muito heterogênea. Há cultivos que param de crescer por volta de 3 dias até mais de 8, isso está muito relacionado com a característica nutricional do meio e com o modo de condução do cultivo (SCHMID, 1996; DOVERSKOG et al., 1997; MARANGA et al., 2004).

Quando os valores de μ_{max} são comparados (Tabela 7-17), pode-se observar uma possível diminuição do mesmo com o aumento dos valores dos parâmetros IA e X_0 . O valor obtido para os ensaios 1, PC e 4 foram, respectivamente, $0,72 \pm 0,07 \text{ dia}^{-1}$, $0,67 \pm 0,03 \text{ dia}^{-1}$ e $0,59 \pm 0,06 \text{ dia}^{-1}$. Os valores de μ_{max} relatados por outros autores são muito diversificados e dependem dos parâmetros do cultivo

(temperatura, meio de cultura, modo de condução, aeração, biorreator, entre outros), mas variam entre 0,39 e 0,83 dia⁻¹ (SCHMID, 1996).

Tabela 7-17. Resumo dos resultados e testes estatísticos para as triplicatas dos pontos 1, 5 e 9.

Ensaio	Média ± Desvio Padrão	F-valor	p-valor
μ_{max}			
(dia⁻¹)			
1	0,72 ± 0,07 ^(a)		
Ponto central	0,67 ± 0,03 ^(a)	4,06	0,08
4	0,59 ± 0,06 ^(a)		
X_{vmax}			
(cel/mL)			
1	4,73.10 ⁶ ± 2,43.10 ⁵ ^(a)		
Ponto central	5,50.10 ⁶ ± 2,41.10 ⁵ ^(b)	13,36	0,01
4	5,62.10 ⁶ ± 2,02.10 ⁵ ^(b)		

*Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey com intervalo de confiança de 90%.

Dos experimentos em triplicata dos ensaios da validação, somente o ensaio 1 (-1, -1) apresentou valores muito diferentes de μ_{max} e X_{vmax} daqueles obtidos nas mesmas condições durante o DoE proposto para a padronização do inóculo (Tabela 7-18).

Tabela 7-18. Comparativo entre os valores de X_{vmax} e μ_{max} obtidos durante o DoE e na validação

Ensaio	DoE		Validação	
	X _{vmax} (cel/mL)	μ _{max} (dia ⁻¹)	X _{vmax} (cel/mL)	μ _{max} (dia ⁻¹)
1	6,53.10 ⁶	0,75	4,73.10 ⁶	0,72
PC	5,50.10 ⁶	0,68	5,50.10 ⁶	0,67 ^(a)
4	5,81.10 ⁶	0,72	5,62.10 ⁶	0,59 ^(a)

A análise ANOVA One-Way mostra diferenças consideráveis para a resposta X_{vmax} e μ_{max} para o intervalo de confiança de 90%. Com esses resultados, pode-se ver que não há variações significativas entre o intervalo de IA de 72 h até 96 h e entre o intervalo de X₀ de 0,5 a 1,0.10⁶ cel/mL.

7.3.2. Uma variável por vez

Com o intuito de entender melhor o efeito de IA e X_0 no cultivo celular e completar os resultados obtidos no DCCR, realizou-se estudo dessas variáveis isoladamente, conforme descrito no item 6.8.2.

7.3.2.1. Concentração celular inicial (X_0)

Sabe-se que a X_0 influencia nos parâmetros de crescimento celular e de produção de anticorpos monoclonais e outras proteínas recombinantes. Ozturk e Palsson (1990) mostraram que a concentração celular inicial afeta em 20 % a taxa de crescimento específica de hibridomas. Somado a isso, a X_0 influencia diretamente os parâmetros cinéticos de crescimento das células (KIOUKIA et al., 1995; ZHANG; ENDEN; MERCHUK, 2005). Diante disso, buscou-se entender qual o efeito dessa variável em relação ao $X_{V_{max}}$ e a μ_{max} .

As cinéticas de crescimento celular das diferentes X_0 utilizadas podem ser observadas na Figura 7-13, abaixo.

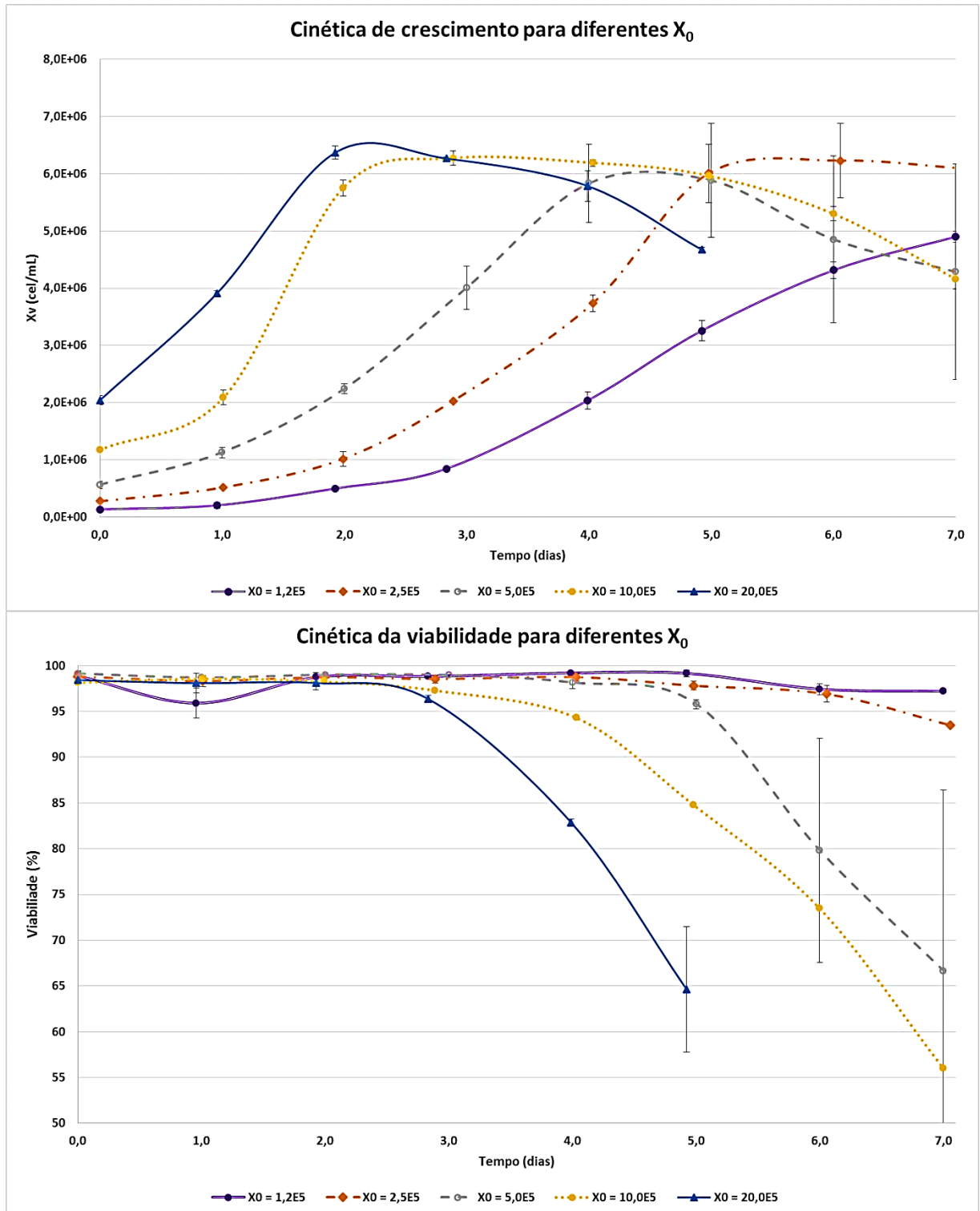


Figura 7-13. Gráfico da cinética de crescimento de células Sf21 para diferentes X_0

Analisando a cinética de crescimento, fica evidente que quanto maior a quantidade de células utilizadas inicialmente, mais rápido se chega ao $X_{v_{max}}$ e mais cedo aparece a fase de morte celular. Apesar dos diferentes valores de X_0 usados, não se observou a presença da fase lag em nenhum dos cultivos. Não foi possível

observar grandes diferenças em relação ao $X_{v_{max}}$ obtido nesses ensaios, com exceção da menor concentração celular utilizada, $1,2 \cdot 10^5$ cel/mL. A explicação para a baixa concentração celular obtida nessa condição, possivelmente, é o tempo de cultivo. Como o crescimento ainda não havia chegado em seu pico, aparentemente, com apenas 7 dias de cultivo, seriam necessários mais dias para que se alcançasse valores mais próximo das outras cinéticas, apesar de o crescimento já ter desacelerado por volta do sétimo dia de cultivo.

Os testes estatísticos confirmaram a não influência do X_0 no $X_{v_{max}}$, como pode ser visto na Tabela 7-19, onde a variação entre os tratamentos não é maior do que a variação dentro do próprio tratamento ($p > 0,10$).

Tabela 7-19. ANOVA para o $X_{v_{max}}$ resultante de diferentes X_0 utilizadas

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F-valor	p-valor
Modelo	4	2,99E+12	7,47E+11	3,19	0,12
Erro	5	1,17E+12	2,34E+11		
Total	9	4,16E+12			

É contraditório o fato de se começar com mais células e chegar ao mesmo valor máximo de X_v . Esperava-se que quanto maior a X_0 , maior seria o $X_{v_{max}}$, de acordo com a definição de rendimento de nutriente em célula (CASTILHO et al., 2008). Como não se centrifugou o inóculo celular utilizado em cada cultivo, pode ser que ao aumentar a concentração celular inicial, levou-se proporcionalmente meio condicionado para o novo cultivo e, assim, menos nutrientes para as células poderem ter um rendimento maior. A Tabela 7-20 evidencia essa diferença na proporção de inóculo/volume de cultivo.

Tabela 7-20. Porcentagem do inóculo em relação ao volume de cultivo para diferentes X_0 e sua influência no $X_{v_{max}}$ e ΔX_v

X_0 (cel/mL)	% Inóculo (v/v)	X_0 (cel/mL)	$X_{v_{max}}$ (cel/mL)	ΔX_v^* (cel/mL)
$1,2 \cdot 10^5$	4,1	$1,35 \cdot 10^5$	$4,90 \cdot 10^6$	$4,76 \cdot 10^6$
$2,5 \cdot 10^5$	8,2	$2,78 \cdot 10^5$	$6,23 \cdot 10^6$	$5,95 \cdot 10^6$
$5,0 \cdot 10^5$	16,4	$5,63 \cdot 10^5$	$5,88 \cdot 10^6$	$5,32 \cdot 10^6$
$10,0 \cdot 10^5$	32,8	$1,17 \cdot 10^6$	$6,27 \cdot 10^6$	$5,10 \cdot 10^6$
$20,0 \cdot 10^5$	65,6	$2,04 \cdot 10^6$	$6,37 \cdot 10^6$	$4,33 \cdot 10^6$

$$*\Delta X_v = X_{v_{max}} - X_0$$

Outra hipótese que possa explicar esse fenômeno seria a diminuição do rendimento de conversão de substrato em célula com o aumento da X_0 . Isso, porém, não pode ser confirmado somente com os dados de cinética celular. Zhang, Enden e Merchuk (2005) evidenciaram em seus estudos que em cultivos com 19,2 % de meio condicionado a concentração celular máxima obtida com células Sf21 foi de $1,08 \cdot 10^6$ cel/mL enquanto que em meio fresco foi alcançando um valor de $1,31 \cdot 10^6$ cel/mL. Além disso, a taxa de crescimento específica foi 30% maior nos cultivos com meio completamente novo. Isso indica possíveis efeitos inibitórios no crescimento devido a presença do meio condicionado, provavelmente, por causa de componentes citotóxicos gerados durante o crescimento celular e que são carregados com o meio condicionado. O mesmo foi relatado por trabalhos feitos por Kioukia et al. (1995). Nesses estudos, mostrou-se que quanto maior a proporção de meio condicionado, menor foi o crescimento de células Sf9, reduzindo bruscamente o valor de $X_{v_{max}}$ para proporções de inóculo acima de 50 %. Ao relacionar o ΔX_v do presente estudo (Tabela 7-20) com a porcentagem de inóculo, é possível notar uma queda significativa de produção de células com o aumento da porcentagem de inóculo, o que corrobora a hipótese de inibição ou limitação causada pelo meio condicionado.

Ainda nessa pesquisa, foi constatado que quanto o menor valor de X_0 , maior a duração da fase *lag*, porém maior o valor de $X_{v_{max}}$. Para observar esse efeito, entretanto, os cultivos foram realizados com meio completamente fresco. Contestasse aqui, então, a necessidade dessas células em relação aos fatores de crescimento autócrinos. Esses fatores são sintetizados e secretados pelas células e servem como estímulos autoproliferativos quando se ligam a receptores da célula produtora. Quanto maior o número de células, maior a chance desses fatores se ligarem aos seus respectivos receptores de forma satisfatória.

A Figura 7-14z traz a influência do X_0 no μ_{max} . Para essa resposta, tem-se uma variação pouco significativa para o intervalo de $1,2 \cdot 10^5$ até $5,0 \cdot 10^5$ cel/mL. A ANOVA (Tabela 7-21) mostra que há diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, a única diferença realmente estatisticamente importante ocorreu entre os valores de $10,0 \cdot 10^5$ e $20,0 \cdot 10^5$ cel/mL, sendo que o maior valor de μ_{max} foi obtido com $10,0 \cdot 10^5$ cel/mL, $0,80 \text{ dia}^{-1}$, e o menor com $20,0 \cdot 10^5$ cel/mL, $0,59 \text{ dia}^{-1}$, de acordo com o teste de Tukey realizado para os tratamentos (Tabela 7-22).

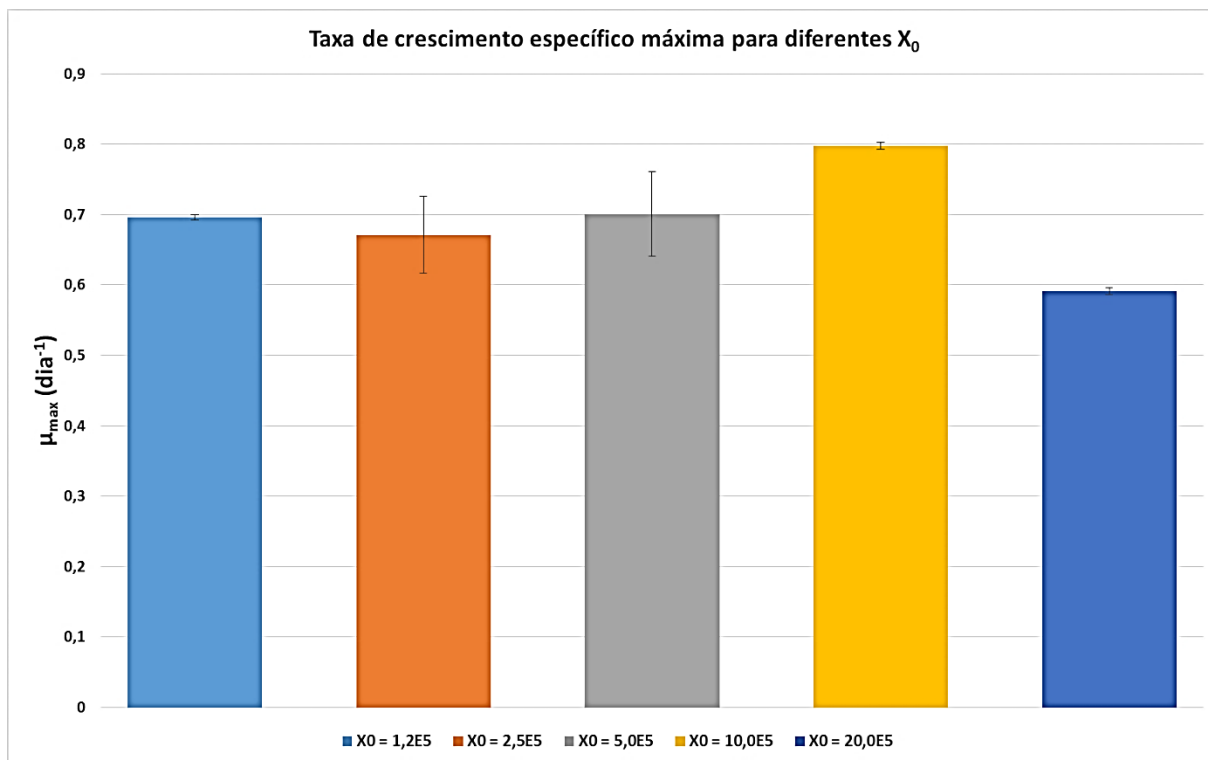


Figura 7-14. Taxa de crescimento específica máxima para diferentes X₀ utilizados

Tabela 7-21. ANOVA para o μ_{max} resultante de diferentes X₀ utilizados

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F-valor	p-valor
Modelo	4	0,04	0,01	7,28	0,026
Erro	5	0,01	0,001		
Total	9	0,05			

Tabela 7-22. μ_{max} resultante de diferentes X₀ utilizados

Tratamento	Média (dia ⁻¹)*	Desvio padrão (dia ⁻¹)
X ₀ 1,2e5	0,71 ^{(a) (b) (c)}	0,03
X ₀ 2,5e5	0,67 ^{(a) (b) (c)}	0,06
X ₀ 5,0e5	0,70 ^{(a) (b) (c)}	0,06
X ₀ 10,0e5	0,80 ^{(b) (a)}	0,01
X ₀ 20,0e5	0,59 ^{(c) (a)}	0,01

* Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey com intervalo de confiança de 90%

Assim, pode-se dizer que, no geral, não há diferença entre o intervalo de 1,2.10⁵ até 20,0.10⁵ cel/mL, uma vez que o valor obtido em 10,0.10⁵ cel/mL não foi alto suficiente para diferir dos valores obtidos com menor X₀ utilizado. E o inverso

ocorreu com o tratamento de $20,0 \cdot 10^5$ cel/mL. Por isso, talvez, a falta de ajuste do modelo empírico obtido no item 7.3.1.

Apesar de não ser constatado diferenças estatisticamente significativas entre alguns tratamentos, algumas considerações podem ser feitas a respeito das tendências descritas no experimento, se comparadas com a literatura. Ozturk e Palsson (1990) mostraram em cultivos estático com hibridomas que para concentrações celulares iniciais de 10^3 , 10^4 e 10^5 cel/mL não houve variações muito expressivas na taxa de crescimento específica ($0,43-0,50 \text{ dia}^{-1}$). Os menores valores de taxa de crescimento também foram obtidos com alta concentração celular inicial, 10^5 cel/mL. Dados muito próximo daqueles obtidos no presente estudo para células Sf21. A $X_{V_{\max}}$ dos cultivos, entretanto, aumentou de acordo com o aumento de X_0 em até 50 % nos estudos de Ozturk e Palsson (1990), contrapondo os resultados para as células Sf21. Porém, deve-se levar em consideração que o sistema de cultivo empregado para os hibridomas foi diferente do utilizado para as células Sf21 (estático e suspensão, respectivamente). Com isso, não houve saturação do meio de cultura com meio condicionado ao se utilizar X_0 altos, nos cultivos de hibridoma, uma vez que nos subcultivos realizados pelos autores foi descartado o sobrenadante e utilizado meio totalmente fresco para o cultivo subsequente. Já nos cultivos em suspensão com células Sf21 pode ter ocorrido o comprometimento nutricional do meio ou acúmulo de substâncias inibitórias ao se utilizar X_0 diferentes.

7.3.2.2. Idade do inóculo (IA)

Por definirem o estado fisiológico inicial das células, a qualidade do inóculo celular tem impacto significativo no crescimento da cultura a ser estabelecida subsequentemente. Assim, analisou-se o efeito da IA nos cultivos de células Sf21 em meio SF900III. As cinéticas de crescimento para diferentes IA podem ser analisadas na Figura 7-15.

Observando as cinéticas de crescimentos, nota-se que, apesar das diferentes IA utilizadas, não se observou a fase *lag* em nenhuma das condições. Todos os cultivos atingiram a $X_{V_{\max}}$ por volta do quarto dia. A fase de morte foi intensa somente no ensaio com IA de 96 h. Nos demais ensaios a queda do número de células viáveis no final do cultivo foi mais sucinta. Somente para as IA de 120 e 144 h a viabilidade celular inicial foi relativamente baixa, por volta de 90%. Reflexo da

idade dos cultivos utilizados como inóculo. Todos os outros tratamentos tiveram a viabilidade celular inicial muito próxima de 100 %. Os ensaios com IA de 120 e 144 h apresentaram uma melhora na viabilidade celular, chegando a valores acima de 95 %, mostrando uma recuperação da qualidade das células durante o cultivo.

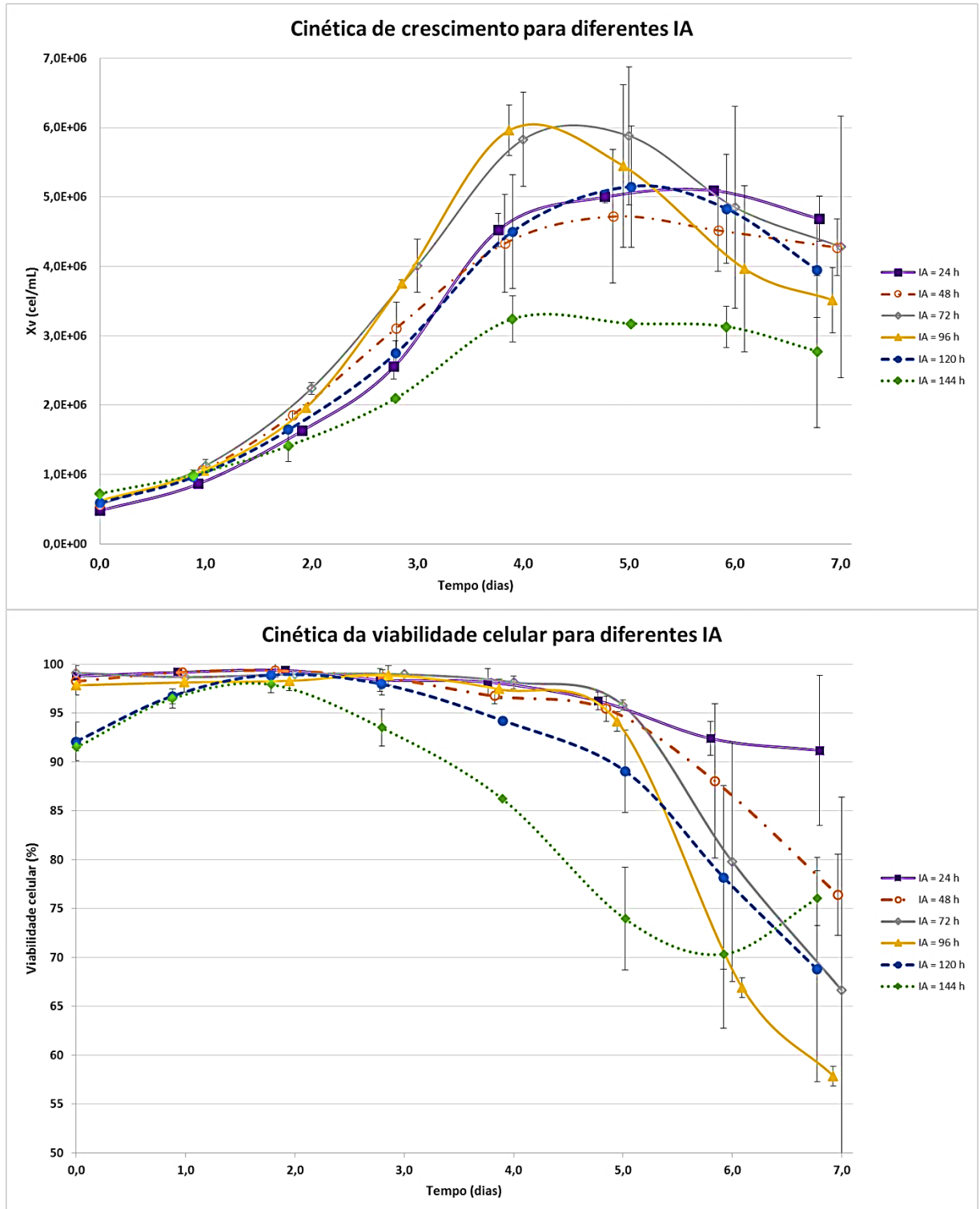


Figura 7-15. Cinética de crescimento celular de células Sf21 para diferentes IA.

Os melhores crescimentos ocorreram com a IA de 72 e 96 h, $X_{v_{max}}$ de $5,97 \cdot 10^6$ e $5,99 \cdot 10^6$ cel/mL, respectivamente. O mais comprometido foi o cultivo com IA de 144 h, com $X_{v_{max}}$ igual a $3,52 \cdot 10^6$ cel/mL. Os crescimentos com IA de 24, 48 e 120 foram muito similares entre si e com resultados medianos em relação aos outros tratamentos, com $X_{v_{max}}$ de $5,09 \cdot 10^6$, $4,75 \cdot 10^6$ e $5,21 \cdot 10^6$ cel/mL, respectivamente.

Ao realizar os testes estatísticos para o $X_{v_{max}}$, confirma-se a diferença entre os tratamentos (tabela 7-22). Mas a diferença significativa ocorreu apenas entre a IA de 144 h e as IA de 96 e 72 h. A variação entre os outros tratamentos, de acordo com o teste de Tukey, refere-se apenas a variação intrínseca ao método (Tabela 7-24).

Tabela 7-23. ANOVA para o $X_{v_{max}}$ resultante de diferentes IA utilizadas

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F-valor	p-valor
Modelo	5	8,38E+12	1,68E+12	5,52	0,03
Erro	6	1,82E+12	3,03E+11		
Total	11	1,02E+13			

Tabela 7-24. $X_{v_{max}}$ resultante de diferentes IA utilizadas

Tratamento	Média (cel/mL)*	Desvio padrão (cel/mL)
IA 24 h	$5,09E+06^{(a) (b)}$	$5,30E+04$
IA 48 h	$4,75E+06^{(a) (b)}$	$9,16E+05$
IA 72 h	$5,97E+06^{(a)}$	$1,20E+05$
IA 96 h	$5,99E+06^{(a)}$	$3,61E+05$
IA 120 h	$5,21E+06^{(a) (b)}$	$2,26E+05$
IA 144 h	$3,52E+06^{(b)}$	$4,95E+04$

* Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey com intervalo de confiança de 90%

Tratando-se da μ_{max} , pode-se observar na Figura 7-16, pouca variação nesse parâmetro até o IA de 96 h, com valores entre 0,59 a 0,70 dia⁻¹. Com inóculos mais velhos, porém, notou-se o decréscimo da μ_{max} , sendo o menor valor observado para o IA de 144 h, com 0,39 dia⁻¹.

As diferenças podem ser confirmadas através da ANOVA realizada (Tabela 7-25). Entretanto, as diferenças significativas, de acordo com o teste de Tukey, ocorreram apenas entre a IA de 144 h e os demais tratamentos e entre a IA de 72 e a IA de 120 h (Tabela 7-26).

Considerando que os tratamentos podem ser classificados referentes à fase de crescimento que o inóculo se encontrava, pode-se então definir as seguintes condições de IA: fase exponencial inicial (24 h), meio da fase exponencial (48 h), fase exponencial tardia (96 h), fase estacionária (120 h) e fase de morte (144). Assim sendo, apesar de não terem sido constatadas nenhuma diferença estatisticamente significativa, pode-se realizar algumas observações sobre as tendências descritas nos ensaios com base nos relatos da literatura. Kioukia *et al.* (1995) mostraram resultados muito próximos dos obtidos na presente pesquisa. Os autores, porém, realizaram cultivos de Sf9 em meio TC100 com diferentes qualidades de inóculos. Os pesquisadores mostraram que com inóculo em fase exponencial tardia a μ_{\max} é menor do que nos cultivos que utilizaram inóculos na fase exponencial inicial (0,57 e 0,67, respectivamente). Mas o oposto foi observado para a variável $X_{v_{\max}}$: cultivos com inóculo na fase exponencial tardia alcançaram $2,37 \cdot 10^6$ cel/mL enquanto que os ensaios com inóculo na fase exponencial inicial alcançaram $1,9 \cdot 10^6$ cel/mL. O menor valor desses parâmetros cinéticos foi observado para os inóculos na fase estacionária, $X_{v_{\max}}$ igual a $1,06 \cdot 10^6$ cel/mL e μ_{\max} igual a $0,43 \text{ dia}^{-1}$. Os autores explicam que na fase exponencial inicial as células estão em sua maioria na fase G1 e na fase S, fases de intenso metabolismo celular. Consequentemente, células nessa fase do ciclo celular conseguem se replicar mais rapidamente. A fase G2, para as células de inseto, é a fase de descanso celular, na qual a maioria das células se encontram em situações de exaurimento nutricional, condição característica das fases estacionária e exponencial tardia. Assim, cultivos iniciados com inóculos nessas situações levariam a um crescimento mais lento.

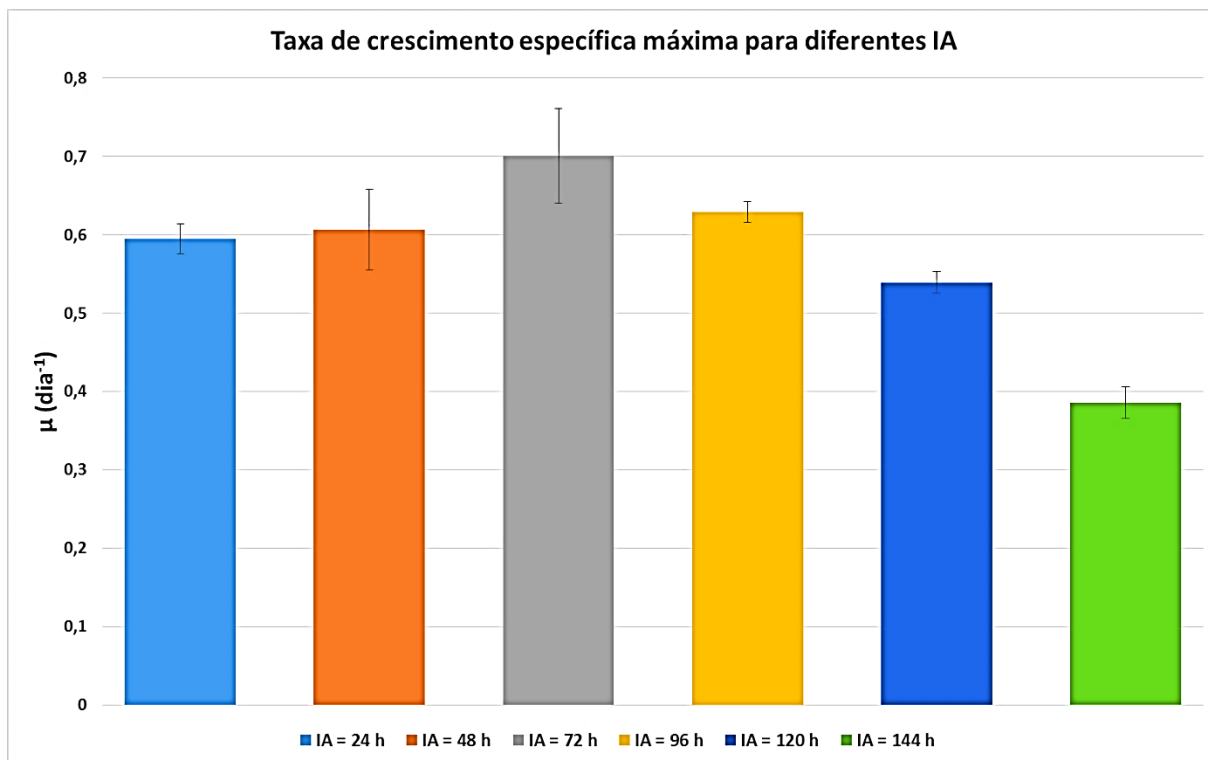


Figura 7-16. Taxa de crescimento específica máxima para diferentes IA

Nos trabalhos de Zhang, Enden e Merchuk (2005), apesar dos autores alegarem certa vantagem em se utilizar inóculos provenientes do meio da fase exponencial, não se pode observar diferença significativa em relação ao $X_{v_{max}}$ obtido com cultivos a partir de inóculos em fase exponencial tardia ou no meio da fase exponencial ($1,23 \cdot 10^6$ e $1,31 \cdot 10^6$ cel/mL). O comportamento das culturas descrita pelos autores também se assemelha muito aos descritos nessa pesquisa. Apesar de ambos cultivos com inóculo no meio da fase exponencial e inóculo na fase exponencial tardia terem alcançado valores de $X_{v_{max}}$ estatisticamente iguais, a fase de morte das células provenientes dos inóculos da fase exponencial tardia descreve uma queda muito mais acentuada do que a observada nas culturas com inóculo proveniente do meio da fase exponencial.

Tabela 7-25. ANOVA para o μ_{max} resultante de diferentes IA utilizadas

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F-valor	p-valor
Modelo	5	0,11	0,02	13,14	0,003
Erro	6	0,01	0,002		
Total	11	0,12			

Tabela 7-26. μ_{\max} resultante de diferentes IA utilizadas

Tratamento	Média (dia^{-1})*	Desvio padrão (dia^{-1})
IA 24 h	0,59 ^{(a) (b)}	0,02
IA 48 h	0,61 ^{(a) (b)}	0,05
IA 72 h	0,70 ^(a)	0,06
IA 96 h	0,63 ^{(a) (b)}	0,01
IA 120 h	0,55 ^(b)	0,07
IA 144 h	0,39 ^(c)	0,02

* Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey com intervalo de confiança de 90%

7.4. Sistemas para aumento de escala

Na busca por escalonamento, foram propostos outros sistemas de cultivos com diferentes volumes, sistemas de transferência de oxigênio e agitação.

Diante disso, iniciou-se com cultivos em *spinner* para tentar buscar uma continuidade dos cultivos em *schotts* até o biorreator. Ao ser identificado no DCCR várias possíveis combinações de IA e X_0 que resultam em mesmo valores de $X_{v_{\max}}$ e μ_{\max} , utilizou-se outros critérios para escolher a combinação de cultivo. Por se tratar de um ponto que possibilita repetições mais rápidas (IA com 2 dias) e ainda não demanda altos volumes de inóculo celular para o cultivo, nessa etapa, escolheu-se o ensaio 1 (IA: 48h; X_0 : $0,25 \cdot 10^6$).

Nesse sistema, objetivou-se os estudos de agitação e seus efeitos no crescimento celular, além do efeito da mudança de cisalhamento em relação ao cultivo em frascos *schotts*. Assim, foram analisados cultivos em *spinner* com agitação em 80 e 100 rpm. As cinéticas de crescimento das células Sf21 com as configurações então descritas podem ser observadas na Figura 7-17.

O crescimento das células nesse sistema foi muito diferente do ensaio 1, PC e do ensaio 4. As células cessaram o crescimento já no terceiro dia de cultivo e o $X_{v_{\max}}$ obtido foi drasticamente menor do que o obtido em qualquer uma das triplicatas ($1,94 \cdot 10^6 \pm 3,54 \cdot 10^4$ cel/mL em 80 rpm e $2,02 \cdot 10^6 \pm 1,98 \cdot 10^5$ cel/mL em 100 rpm). Reuveny *et al.* (1993) fizeram experimentos em *spinner* e relataram uma grande diferença entre o $X_{v_{\max}}$ obtido nos *spinners* e o dos *schotts* ($1,5 \cdot 10^6$ céls/mL no *spinner* e $5,5 \cdot 10^6$ cels/mL nos *schotts*), similar às diferenças encontradas nesse trabalho.

Os valores de μ_{\max} em 80 rpm foram maiores do que os obtidos em *schotts*, $0,851 \pm 0,008 \text{ dia}^{-1}$, dentro dos valores descritos na literatura (SCHMID, 1996) e

maiores do que os valores descritos por Almeida *et al.* (2010) de $0,718 \text{ dia}^{-1}$. Já os valores de μ_{max} em 100 rpm, $0,732 \pm 0,012 \text{ dia}^{-1}$, não apresentaram diferenças consideráveis com os cultivos em *schotts* (Tabela 7-27).

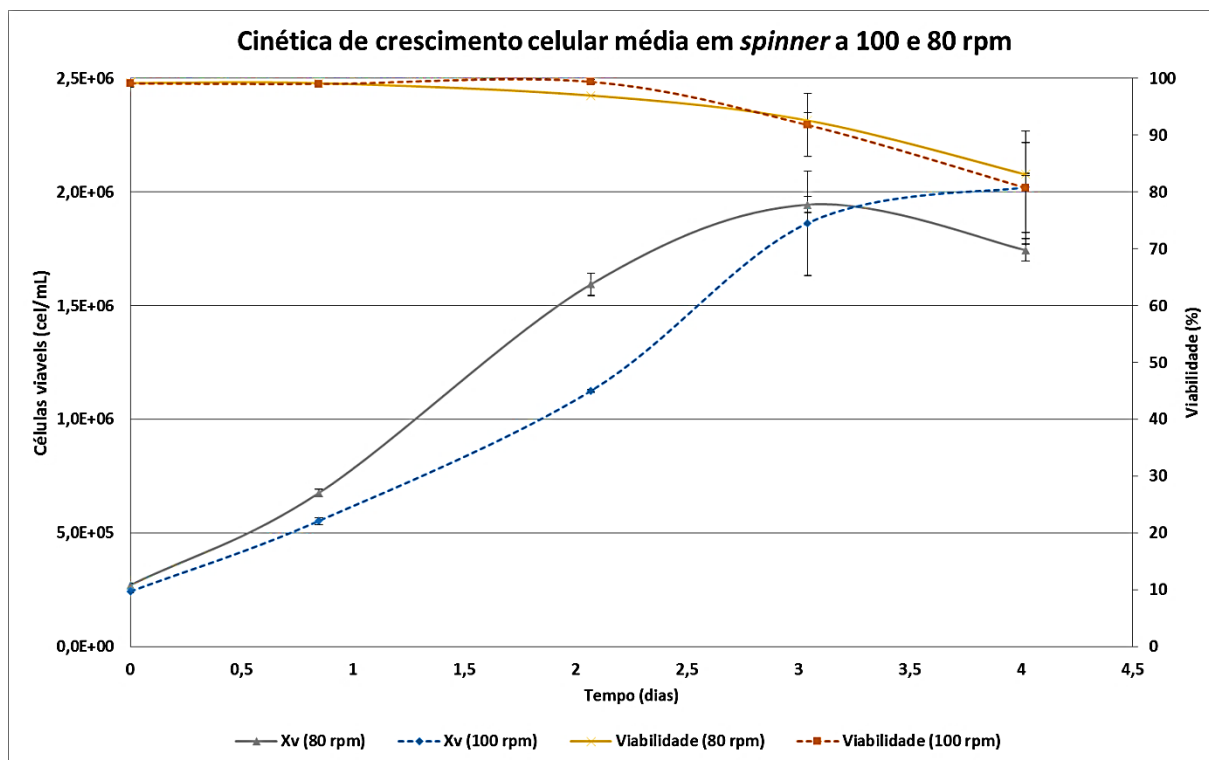


Figura 7-17. Gráfico do crescimento celular de células Sf21 em spinner com agitação de 80 rpm e 100 rpm

Tabela 7-27. Resumo dos resultados e testes estatísticos para os cultivos em spinner.

Ensaio	Média ± Desvio Padrão	Valor de F	p-valor
μ_{max}	(dia^{-1})		
80 rpm	$0,851 \pm 0,008^{(a)}$	138,161	0,01
100 rpm	$0,732 \pm 0,012^{(b)}$		
Xv_{max}	(cel. viável/mL)		
80 rpm	$1,94 \cdot 10^6 \pm 3,54 \cdot 10^4^{(a)}$	0,28	0,65
100 rpm	$2,02 \cdot 10^6 \pm 1,98 \cdot 10^5^{(a)}$		

*Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

O baixo crescimento nos *spinners* pode ser explicado pela formação de uma grande quantidade de grumos (Figura 7-18) ou pela limitação de O_2 que nos *schotts* não é observado. Testes realizados por uma antiga aluna de iniciação científica do Laboratório de Células Animais, Marina Dela Libera Pedro, constataram que em

schotts o coeficiente de transferência de oxigênio pode chegar a valores de $19,3 \text{ h}^{-1}$ quando em 120 rpm e com 20% do volume do frasco como volume de trabalho, enquanto que em *spinners* esse valor cai para $5,1 \text{ h}^{-1}$. Pode ser também que as células não estavam adequadamente adaptadas ao cultivo em suspensão em *spinners* o que levou a formação dos grumos (RHIEL; MITCHELL-LOGEAN; MURHAMMER, 1997) ou eles se formaram como resultado do estresse causado pela baixa oxigenação do sistema.

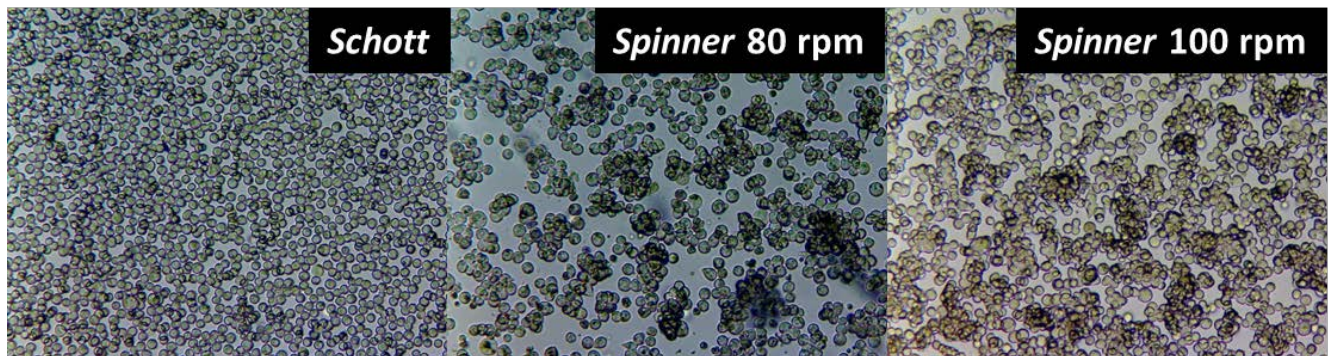


Figura 7-18. Comparação da formação de grumos nos *schotts* e nos *spinners*.

Por isso, descartou-se a possibilidade de se produzir os inóculos celulares para cultivo em biorreator por meio de *spinners*. Como o volume necessário de inóculo para um cultivo com X_0 de $5,0 \cdot 10^5 \text{ cel/mL}$, partindo de uma cultura com concentração celular de $2,5\text{-}3,5 \cdot 10^6 \text{ cel/mL}$, é próximo aos 200 mL, seriam necessários 10 cultivos em frascos *schotts* de 100 mL, com 20 mL em cada. Para evitar esse número de cultivos, realizou-se, então, a produção dos inóculos em frascos *schotts* de 1 L com 50 mL de trabalho. Para ter um melhor acompanhamento dos efeitos do crescimento no biorreator, com o mesmo inóculo utilizado para o cultivo no biorreator, realizou-se em paralelo um cultivo em *schott* de 100 mL, com 20 mL de volume útil, temperatura controlada em 28° C e agitação em 120 rpm. Foram retiradas amostras diárias do cultivo em *schott* para as mesmas determinações realizada para as amostras retiradas do biorreator: X_v , viabilidade, concentração de glicose, lactato, glutamina e glutamato. Com isso se espera poder identificar algum problema de inóculo ou meio nos ensaios em reator, pois também apareceriam no ensaio em paralelo no *schott*.

Os cultivos no biorreator e no frasco *schott* podem ser analisados na Figura 7-19, abaixo.

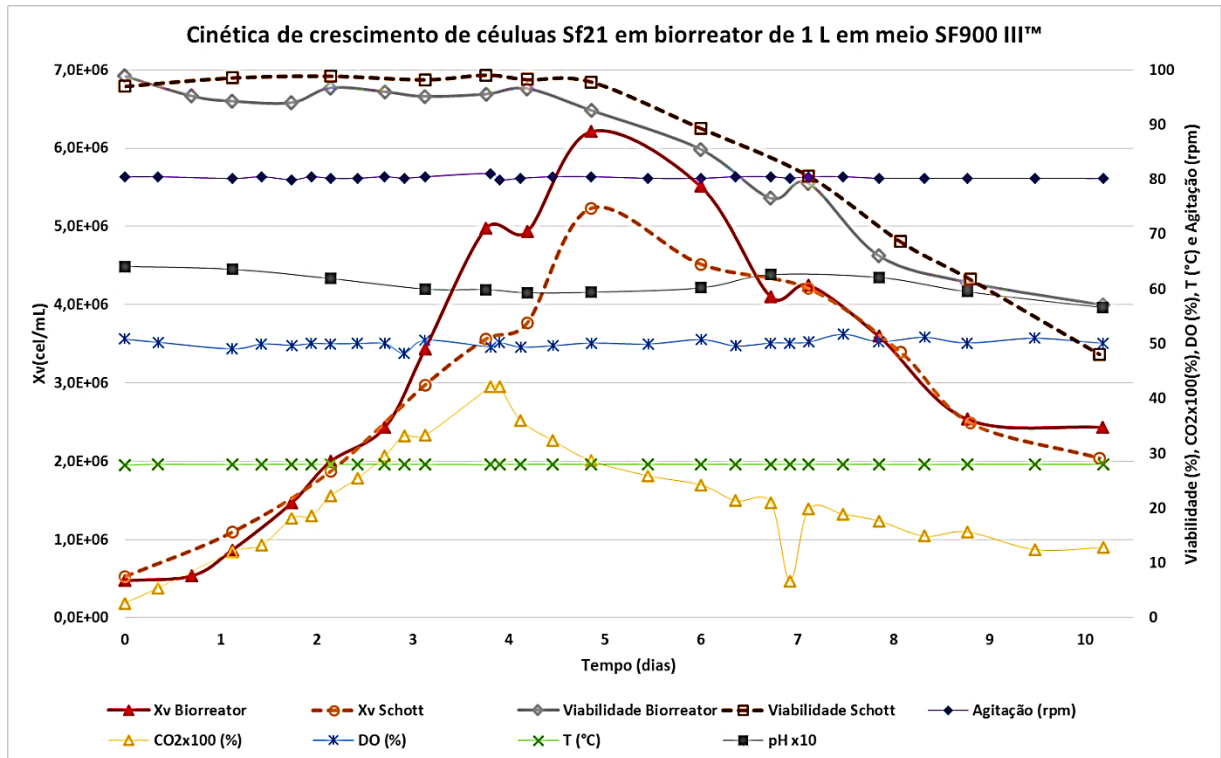


Figura 7-19. Gráfico de crescimento celular de células Sf21 em biorreator de 1 L em meio SF900 III. CO_2 é a fração molar de CO_2 no gás de exaustão

Observando o crescimento no biorreator, nota-se um perfil muito semelhante ao obtido no *schott* controle. A $X_{v_{max}}$ foi observada no quinto dia de cultivo e a queda de viabilidade apareceu após o 5 dia de processo em ambos cultivos. No cultivo em biorreator, porém, há uma pequena fase *lag* de aproximadamente 1 dia, a qual não foi observada no cultivo em *schott*. Essa fase é esperada, uma vez que o inóculo foi cultivado em um sistema de cultivo diferente do ambiente do biorreator em termos de forças hidrodinâmicas – frascos agitados. Com isso, foi notada a necessidade de um período para as células se adaptarem a esse novo ambiente antes da proliferação celular. Ainda é possível observar que a porcentagem de CO_2 no gás de exaustão do biorreator aumenta simultaneamente com o crescimento celular, apresentando o mesmo perfil que a cinética de crescimento celular. Convém salientar que a medida de gás carbônico na exaustão é conveniente para monitorar a respiração, pois o oxigênio oscila muito, em função do controlador de oxigênio dissolvido atuar abrindo e fechando intermitentemente solenoides de ar, O_2 e N_2 . A maior concentração de CO_2 aconteceu no quarto dia de cultivo, diminuído continuamente após esse dia. Possivelmente, algum fator limitante refletiu na respiração celular e, conseqüentemente, reduziu a produção de CO_2 . Essa queda na

produção de CO_2 coincide com o fim da fase de crescimento exponencial, mas uma evidência da queda da respiração estar associada a alguma limitação nutricional.

Ao se calcular os parâmetros cinéticos é possível observar algumas diferenças mais evidentes. A $X_{v_{\max}}$ alcançado no biorreator foi de $6,21 \cdot 10^6$ cel/mL enquanto no cultivo em frasco agitado a $X_{v_{\max}}$ foi de $5,23 \cdot 10^6$ cel/mL. Em relação a μ_{\max} , no biorreator o crescimento ocorreu em uma taxa específica de $0,70 \text{ dia}^{-1}$ e no frasco *schott* a $0,55 \text{ dia}^{-1}$. Almeida (2010) obteve uma $X_{v_{\max}}$ de $4,21 \cdot 10^6$ cel/mL para cultivo de células Sf21 UFRN em meio SF900 IITM e $X_{v_{\max}}$ de $6,0 \cdot 10^6$ cel/mL no mesmo meio, mas com suplementação do meio com aminoácidos, lipídios, *Yestolate* e glicose, em cultivos em Erlenmeyer.

A Figura 7-20 mostra o consumo dos nutrientes e a produção dos metabólitos no cultivo em biorreator. Pode-se notar que o consumo da glicose e da glutamina acompanharam o crescimento celular. A glutamina foi praticamente exaurida por volta do quarto dia de cultivo. O esgotamento da glutamina coincide com a interrupção do crescimento celular. Isso indicaria uma limitação ao crescimento celular por falta de glutamina. Mesmo com a síntese de glutamina que ocorreu após o sexto dia de cultivo, a qual forneceu concentrações de até 0,4 g/L, não foi observado o reestabelecimento do crescimento celular. A glicose só chegou a concentrações abaixo de 1 g/L após o oitavo dia de cultivo.

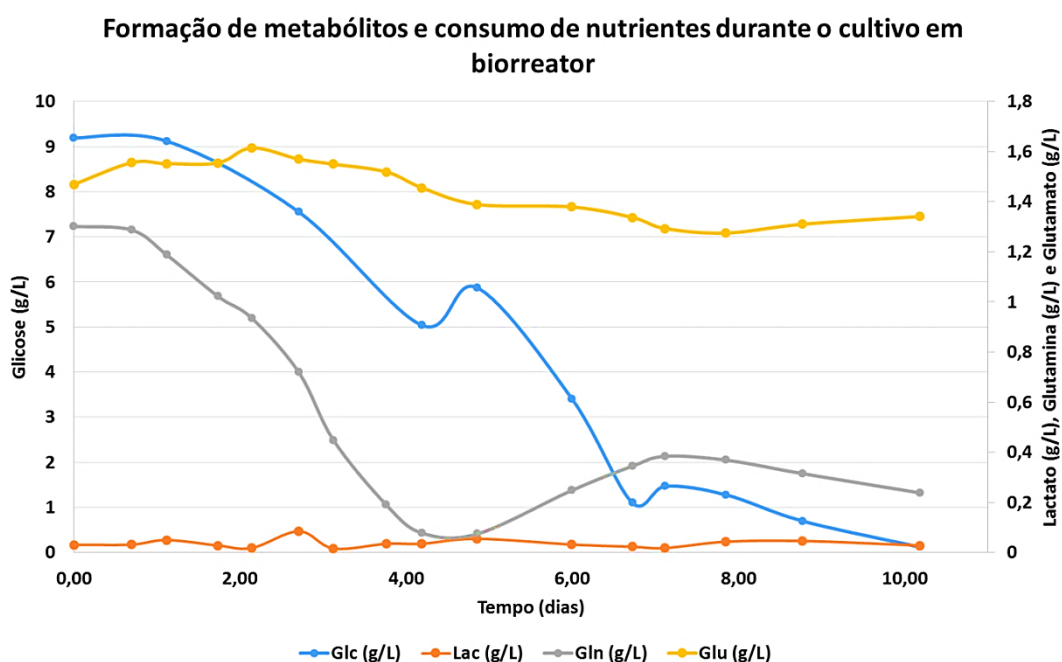


Figura 7-20. Formação de metabólitos e consumo de nutrientes no cultivo em biorreator com células Sf21 UFRN

Quando comparado o consumo de nutrientes e a formação de metabólitos nos dois sistemas – biorreator e frasco agitado – observa-se algumas diferenças. A mais evidente é a formação de lactato. Enquanto que no biorreator a formação de lactato não ultrapassou 0,2 g/L, no *schott* foi observado a produção de até 1,24 g/L. Isso deve estar relacionado à diferença entre o fornecimento de oxigênio nos dois cultivos. Enquanto no biorreator a DO é controlada em 50 %, no *schott* a troca gasosa é mais limitada e, talvez, não tenha mantido as condições ideais de oxigenação e, assim, levado a formação mais acentuada de lactato. Reuveny et al. (1993) mostraram em diferentes sistemas de cultivos (*spinner*, *schott* e biorreator) a formação de lactato por células Sf9. Conforme aumentou-se o volume de trabalho nos frascos *spinner* foi observado um aumento nas concentrações de lactato. Acrescendo o volume de trabalho de 100 mL para 125 mL, as células Sf9 quase dobraram a produção de lactato de 0,45 g/L para 0,85 g/L. Nos cultivos com 10 mL em *schott* e no biorreator com oxigênio dissolvido controlado em 50% da saturação com ar, porém, a concentração de lactato não ultrapassou 0,03 g/L. Ou seja, ao comprometer ainda mais a troca gasosa nos *spinner* por ter aumentado o volume de trabalho, foi possível observar o efeito de limitação de oxigênio nesse sistema de cultivo, gerando o acúmulo de lactato, o qual pode ser comparado ao resultado desse trabalho.

Coincidentemente, o pico de concentração de lactato ocorre no mesmo momento que é observado o $X_{v_{max}}$. Há uma possibilidade dessa concentração de lactato ter interferido no crescimento celular no *schott* e, por isso, ter sido observado uma concentração menor do que a alcançada no biorreator. Essa concentração ultrapassa os valores inibitórios para células Bm-5. Já para células Sf9, a concentração de 1,12 g/L de lactato não foi suficiente para impactar no crescimento celular (DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2005).

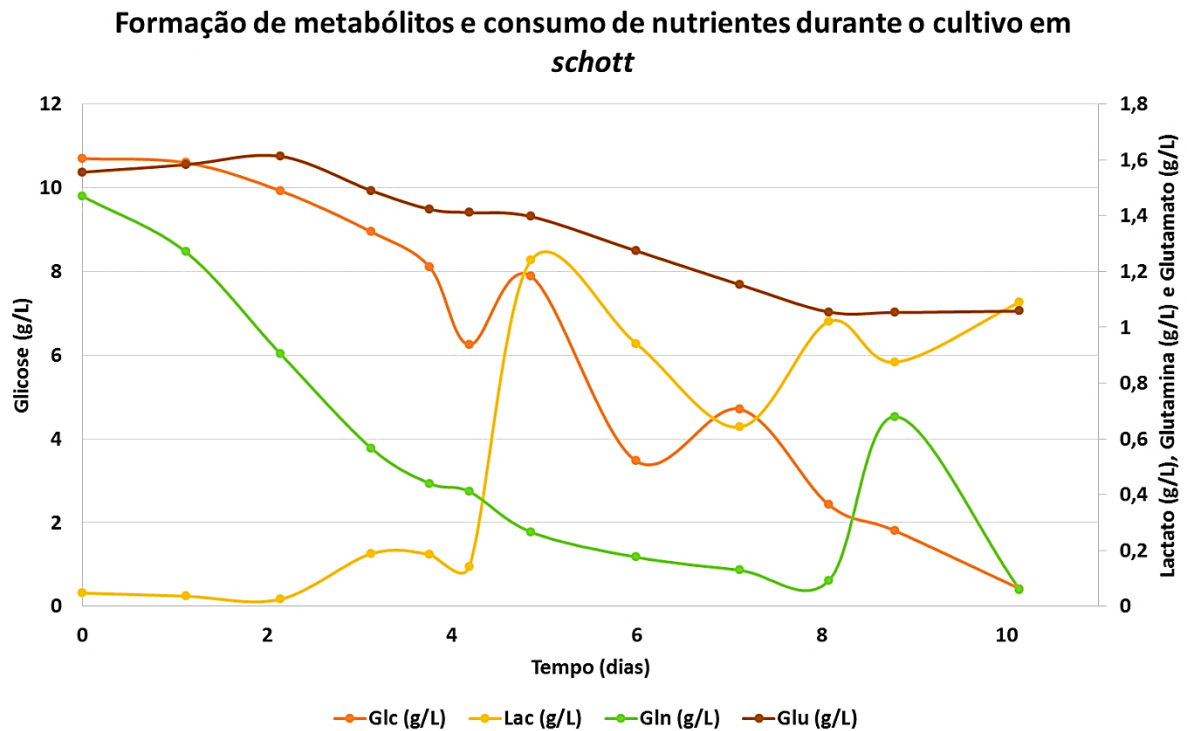


Figura 7-21. Formação de metabólitos e consumo de nutrientes no cultivo em frascos agitados do tipo *schott* com células Sf21 UFRN

Quando comparado os valores de rendimento de glicose em células ($Y_{x/Glc}$) e de glutamina em célula ($Y_{x/Gln}$), não é possível observar nenhuma diferença em relação a $Y_{x/Gln}$. Em ambos cultivos, para a fase exponencial, foi observado um $Y_{x/Gln}$ igual a $3,0 \cdot 10^9$ cel/g de Gln, muito próximo dos valores relatados no item 7.3.1 de $2,31$ a $4,01 \cdot 10^9$ cel/g de Gln. Para os valores de $Y_{x/Glc}$, porém, notou-se que no cultivo em biorreator o rendimento foi quase o dobro do encontrado no cultivo em *schott* ($1,0 \cdot 10^9$ cel/g de Glc e $6,81 \cdot 10^8$ cel/g de Glc, respectivamente). Todavia, os valores de $Y_{x/Glc}$ obtidos nesses dois cultivos foram menores do que os descritos no item 7.3.1 (entre 2 e $5 \cdot 10^9$ cel/g de Glc). Os valores de $Y_{x/Glc}$ serem mais baixos no cultivo em *schott* condiz com a diferença de formação de lactato entre os cultivos. Quando o piruvato é reduzido a lactato ao invés de continuar pelo ciclo do ácido tricarboxílico, a produção energética em termos de ATP obtido pela catabolização da glicose é diminuída. Assim, ao se produzir mais lactato, tem-se menor disponibilidade energética para a produção de biomassa.

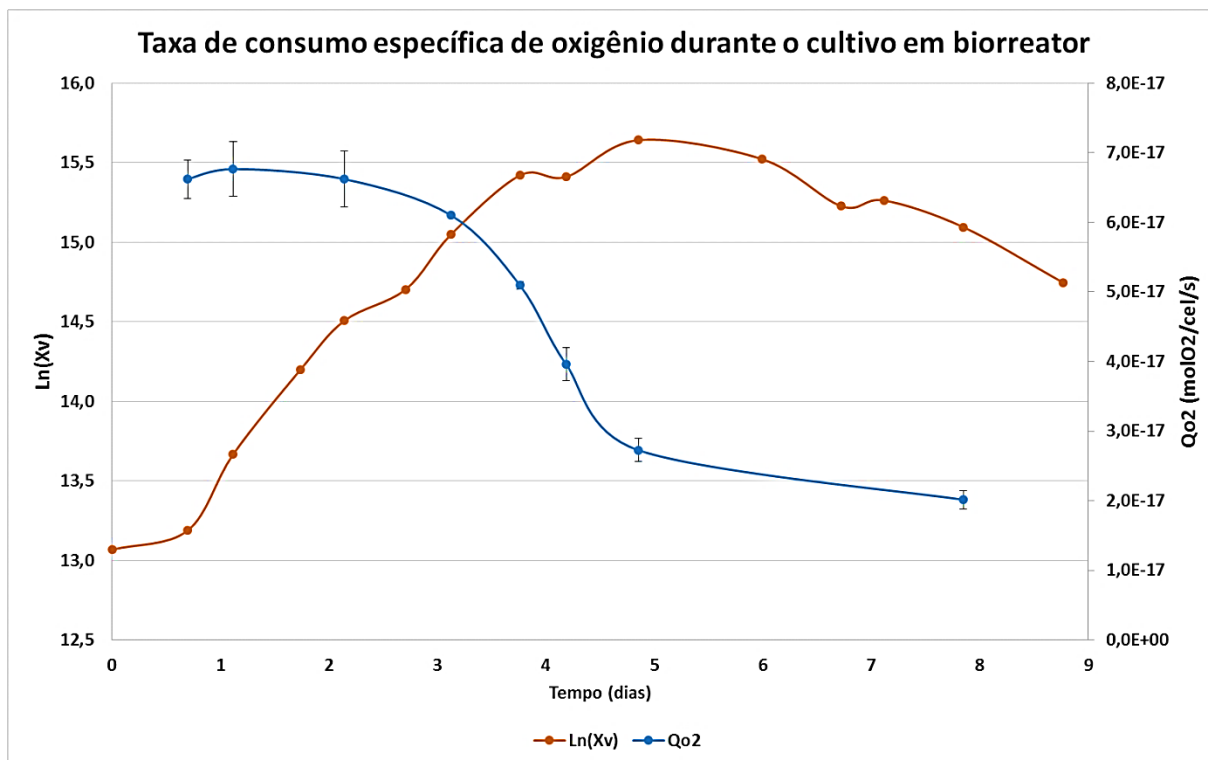


Figura 7-22. Taxa de consumo específica durante o cultivo de células Sf21 UFRN em biorreator

Foi realizado no cultivo em biorreator a determinação de Q_{O_2} (Figura 7-22). O perfil de Q_{O_2} observado nesse cultivo é muito semelhante ao obtido por Pamboukian et al. (2008). Os pesquisadores realizaram cultivos em biorreator com células de inseto (Sf9 e S2) parentais e recombinantes em meio SF900II. Nesses cultivos, também é possível notar valores relativamente constantes durante a fase exponencial (dia 1 ao dia 4, para o presente estudo) e uma queda acentuada da Q_{O_2} com o início da fase estacionária. O valor obtido de Q_{O_2} de $67,3 \pm 3,6 \cdot 10^{-18}$ molO₂/cel/s para a fase exponencial no cultivo com células Sf21 aproximou-se muito dos valores para células Sf9 de $74,4 \cdot 10^{-18}$ molO₂/cel/s obtidos pelos autores citados anteriormente. A diferença entre esses dois valores pode ser atribuída, além da diferença entre as células, aos métodos utilizados para a determinação da taxa. Enquanto nesse trabalho foi aplicado o método dinâmico (SCHMIDELL et al., 2001) para a determinação da Q_{O_2} , Pamboukian et al. (2008) utilizaram o balanço da fase líquida descrito por Kamen et al. (1996).

8. Conclusões

Ao analisar os resultados das infecções nos diferentes sistemas células-procedência-meio, pode-se concluir que existe uma variação na infectividade do AgMNPV e seus variantes nas linhagens de Sf21. As linhagens EMB, GibcoG e UFRN são candidatas mais adequadas para a produção de biopesticida, uma vez que apresentaram acima de 40 % das células infectadas com poliedros. As células GibcoSF, por sua vez, não são apropriadas para a produção de AgMNPV devido a porcentagem menor do que 2 % de células produtoras de poliedros inviabilizar a produção nessas células. Isso refuta a hipótese de que não há variação na infecção de diferentes linhagens de células Sf21 pelo AgMNPV.

As células Sf21 com maior número de passagens possuem diâmetro e volume maior do que as células Sf21 com menor número de subcultivos. Sendo o volume 26 % maior e o diâmetro 10%. A concentração celular máxima é menor nas células com maior número de subcultivos. As células UFRN alcançaram apenas 49 % da concentração celular máxima registrada para as células GibcoSF. Com esses dados, é possível corroborar a suposição de que células com altos números de subcultivos apresentam alterações morfológicas e de crescimento.

De acordo com o delineamento composto central rotacional proposto, apesar da comprometida previsão do modelo empírico gerado, foi possível constatar que a concentração celular inicial e a idade do inóculo, no intervalo analisado, tem efeito sobre a concentração celular máxima, mas somente a idade do inóculo tem efeito sobre a taxa de crescimento específico. Sendo o melhor resultado obtido para as combinações de 72 horas de idade de inóculo e $0,5 \cdot 10^6$ cel/mL de concentração celular inicial e para 96 horas de idade de inóculo e concentração celular inicial de $1,0 \cdot 10^6$ cel/mL, ambos cultivos com concentração celular máxima acima de $5,50 \cdot 10^6$ cel/mL e taxa de crescimento específica máxima entre $0,59 - 0,67 \text{ dia}^{-1}$, o que implica em uma vantagem operacional para o pesquisador.

Quando analisado o efeito da concentração celular inicial isoladamente, observou-se um possível efeito inibitório devido ao volume de inóculo utilizado. A taxa de crescimento específica máxima e a concentração celular máxima não apresentaram variações significativas entre os tratamentos, apenas entre a concentração celular máxima de $1,0 \cdot 10^6$ cel/mL e a concentração celular de $2,0 \cdot 10^6$ cel/mL em relação a taxa de crescimento específica máxima, sendo o menor valor

obtido para $2,0 \cdot 10^6$ cel/mL de $0,59 \text{ dia}^{-1}$. Assim, não há evidências de que as células de inseto sejam estimuladas por fatores de crescimento autócrinos tanto quanto as células de mamíferos.

Ao estudar o efeito da idade do inóculo separadamente, foram observados os melhores crescimentos, com maior concentração celular máxima e maior taxa de crescimento específica máxima, para as idades de inóculo de 72 horas e 96 horas. Com inóculo de 72 horas alcançou-se uma concentração celular máxima de $5,97 \cdot 10^6$ cel/mL e uma taxa de crescimento específica máxima de $0,70 \text{ dia}^{-1}$. Valores muito próximo dos obtidos com inóculo de 96 horas de idade, $5,99 \cdot 10^6$ cel/mL de concentração celular máxima e $0,63 \text{ dia}^{-1}$ de taxa de crescimento específica máxima, evidenciando a importância da qualidade fisiológica durante os subcultivos. Para o caso das células Sf21, a melhor fase para se cultivar as células é no meio da fase exponencial ou no final dessa fase. Ao realizar a passagem das células antes dessas fases ou após, pode-se levar à diminuição da concentração celular máxima e da taxa de crescimento específica máxima.

O crescimento das células em *spinner* foi comprometido pela formação de grumos. A taxa de crescimento específico máxima em 80 rpm foi maior do que em 100 rpm, $0,85$ e $0,73 \text{ dia}^{-1}$, respectivamente. Entretanto, esse sistema não é adequado devido à baixa concentração celular máxima alcançada, aproximadamente $2,0 \cdot 10^6$ cel/mL, em consequência provavelmente da limitação por oxigênio e/ou formação de grumos.

O cultivo em biorreator alcançou concentração celular máxima e taxa de crescimento específica máxima maiores do que no *schott* controle. Enquanto no *schott* controle a concentração celular máxima foi de $5,23 \cdot 10^6$ cel/mL, no biorreator foi alcançado um valor de $6,21 \cdot 10^6$ cel/mL. A taxa de crescimento específica máxima no biorreator foi de $0,70 \text{ dia}^{-1}$ e no *schott* controle igual a $0,55 \text{ dia}^{-1}$. O rendimento de glutamina em células não diferiu nos dois sistemas, sendo igual a $3,0 \cdot 10^9$ cel/g de glutamina, mas o rendimento de glicose em células foi quase o dobro no biorreator, $1,0 \cdot 10^9$ cel/g de glicose em comparação aos $6,8 \cdot 10^8$ cel/g de glicose registrados no cultivo em *schott*. Além disso, a formação de lactato em biorreator foi praticamente nula quando comparada com as concentrações registradas nos cultivos em *schott*. Há indícios de que o crescimento foi prejudicado pela falta de glutamina no cultivo em biorreator. Esses dados indicam um sistema possivelmente melhor para o

crescimento das células, provavelmente, devido aos controles e monitoramentos dos parâmetros de cultivos.

9. Referências bibliográficas

- AGATHOS, S. N. Insect cell bioreactors. **Cytotechnology**, v. 20, n. 1-3, p. 173–89, jan. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22358482>>.
- AGATHOS, S. N. Insect Cell Culture. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, p. 212–223, 2010.
- ALMEIDA, A. F. De. **Estratégias de produção in vitro de bioinseticida viral: influências do isolado, da cinética e do modo de operação**. 2010. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010.
- ALMEIDA, A. F. De; MACEDO, G. R. De; CHEE LOONG CHAN, L.; PEDRINI, M. R. da S. Kinetic Analysis of in vitro Production of Wild-Type Spodoptera frugiperda Nucleopolyhedrovirus. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 285–291, 2010.
- BERNAL, V.; CARINHAS, N.; YOKOMIZO, A. Y.; CARRONDO, M. J. T.; ALVES, P. M. Cell density effect in the baculovirus-insect cells system: A quantitative analysis of energetic metabolism. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 1, p. 162–180, 2009.
- BETENBAUGH, M. J.; AILOR, E.; WHITELEY, E. M.; HSU, T.-A. Insect Cells and Larvae, Gene Expression Systems. In: **Encyclopedia of Bioprocess Technology**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- BHATIA, R.; JESIONOWSKI, G.; FERRANCE, J.; ATAAL, M. M. Insect cell physiology. **Cytotechnology**, v. 24, p. 1–9, 1997.
- BISHOP, D. H. Biopesticides. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 307–311, jun. 1994. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0958166994900345>>.
- BONNING, B. C.; HAMMOCK, B. D. DEVELOPMENT OF RECOMBINANT BACULOVIRUSES FOR INSECT CONTROL. **Annual Reviews of Entomology**, n. 31, p. 191–210, 1996.
- BRAUNAGEL, S. C.; COX, V.; SUMMERS, M. D. Baculovirus data suggest a common but multifaceted pathway for sorting proteins to the inner nuclear membrane. **Journal of virology**, v. 83, n. 3, p. 1280–1288, 2009.
- CASTILHO, L. R.; MORAIS, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. 1st. ed. New York, NY: Taylor & Francis Group, 2008.
- CASTRO, M. E. B.; RIBEIRO, Z. M. a.; SOUZA, M. L. Infectivity of Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus to different insect cell lines: Morphology, viral production, and protein synthesis. **Biological Control**, v. 36, n. 3, p. 299–304, mar. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1049964405002677>>. Acesso em: 26 jul. 2014.
- CHANG, J. H.; CHOI, J. Y.; JIN, B. R.; ROH, J. Y.; OLSZEWSKI, J. a.; SEO, S. J.; O'REILLY, D. R.; JE, Y. H. An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain Bacillus thuringiensis insect toxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 84, n. 1, p. 30–37, 2003.
- CHISTI, Y. Animal-cell damage in sparged bioreactors. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 10, p. 420–432, 2000.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Review Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v. 56, n. April, p. 651–676, 2000.

CRUZ, H. J.; FREITAS, C. M.; ALVES, P. M.; MOREIRA, J. L.; CARRONDO, M. J. T. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1-2, p. 43–52, 2000.

DE CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L. De; SIHLER, W.; RODRIGUES, J. C. M.; RIBEIRO, B. M. Biologia molecular de baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 1733–1761, 1999.

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. 506–12, jun. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7764890>>.

DONALDSON, M. S.; SHULER, M. L. Effects of long-term passaging of BTI-Tn5B1-4 insect cells on growth and recombinant protein production. **Biotechnology progress**, v. 14, n. 4, p. 543–7, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9694673>>.

DOVERSKOG, M.; HAN, L.; HÄGGSTRÖM, L. Cystine/cysteine metabolism in cultured Sf9 cells: influence of cell physiology on biosynthesis, amino acid uptake and growth. **Cytotechnology**, v. 26, n. 2, p. 91–102, mar. 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3466683&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DOVERSKOG, M.; LJUNGGREN, J.; OHMAN, L.; HÄGGSTRÖM, L. Physiology of cultured animal cells. **Journal of biotechnology**, v. 59, n. 1-2, p. 103–15, 17 dez. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9487719>>.

DREWS, M.; PAALME, T.; VILU, R. The growth and nutrient utilization of the insect cell line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in batch and continuous culture. **Journal of Biotechnology**, v. 40, n. 3, p. 187–198, jun. 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016816569500045R>>.

DRUGMAND, J.-C.; SCHNEIDER, Y.-J.; AGATHOS, S. N. Environmental Effects of Lactate on High-FiveTM Insect Cell Metabolism. In: GÓDIA, F.; FUSSENEGGER, M. (Ed.). **Animal Cell Technology Meets Genomics SE - 14**. ESACT Proceedings. [s.l.] Springer Netherlands, 2005. 2p. 91–94.

DRUGMAND, J.-C.; SCHNEIDER, Y.-J.; AGATHOS, S. N. Insect cells as factories for biomanufacturing. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 5, p. 1140–57, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983546>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

ELVIRA, S.; GORRÍA, N.; MUÑOZ, D.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. A Simplified Low-Cost Diet for Rearing *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and Its Effect on *S. exigua* Nucleopolyhedrovirus Production. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 1, p. 17–24, 1 fev. 2010. Disponível em: <<http://jee.oxfordjournals.org/content/103/1/17.abstract>>.

EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2004**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/index.htm>>. Acesso em: 17 out. 2015.

FERRANCE, J. P.; GOEL, A.; ATAAL, M. M. Utilization of glucose and amino acids in insect cell cultures: Quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 6, p. 697–707, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/bit.260420604>>.

Flublok Homepage. Disponível em: <<http://www.flublok.com/>>. Acesso em: 26 jul. 2014.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 6th. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.

FROY, O.; ZILBERBERG, N.; CHEJANOVSKY, N.; ANGLISTER, J.; LORET, E.; SHAANAN, B.; GORDON, D.; GUREVITZ, M. Scorpion neurotoxins: structure / function relationships and application in agriculture †. **Journal of Biological Chemistry**, v. 474, n. July 1999, p. 472–474, 2000.

GERBAL, M.; FOURNIER, P.; BARRY, P.; MARILLER, M.; ODIER, F.; DEVAUCHELLE, G.; DUONOR-CERUTTI, M. Adaptation of an Insect Cell Line of *Spodoptera Frugiperda* to Grow at 37 Degree C: Characterization of an Endodiploid Clone. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 36, n. 2, p. 117–124, fev. 2000. Disponível em: <<http://search.proquest.com/docview/17498210?accountid=14643>>.

GIORIA, V. V.; JÄGER, V.; CLAUS, J. D. Growth, metabolism and baculovirus production in suspension cultures of an *Anticarsia gemmatalis* cell line. **Cytotechnology**, v. 52, n. 2, p. 113–24, out. 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3449420&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 31 jan. 2014.

GLARE, T.; CARADUS, J.; GELERNTER, W.; JACKSON, T.; KEYHANI, N.; KÖHL, J.; MARRONE, P.; MORIN, L.; STEWART, A. Have biopesticides come of age? **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 250–8, maio 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22336383>>. Acesso em: 27 jan. 2014.

GRACE, T. D. C. Establishment of a Line of Cells from the Silkworm *Bombyx mori*. **Nature**, v. 216, n. 5115, p. 613, 11 nov. 1967. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/216613a0>>.

GRANADOS, R. R.; GUOXUN, L.; DERKSEN, A. C. G.; MCKENNA, K. A. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, n. 3, p. 260–266, nov. 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201194904006>>. Acesso em: 26 jul. 2014.

HALLIWELL, B. Oxidative stress in cell culture: An under-appreciated problem? **FEBS Letters**, v. 540, n. 1-3, p. 3–6, 2003.

HALLIWELL, B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: Avoiding pitfalls. **Biomedical journal**, v. 37, n. 3, p. 99–105, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24923566>>.

HARRISON, R.; HOOVER, K. **Baculoviruses and other occluded insect viruses**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2012.

HASSELL, T.; GLEAVE, S.; BUTLER, M. Growth inhibition in animal cell culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 29–41, 1991.

HENSLER, W.; AGATHOS, S. Evaluation of monitoring approaches and effects of

culture conditions on recombinant protein production in baculovirus-infected insect cells. In: BUCKLAND, B.; AUNINS, J.; BIBILA, T.; HU, W.-S.; ROBINSON, D.; ZHOU, W. (Ed.). **Cell Culture Engineering IV SE - 20**. Current Applications of Cell Culture Engineering. [s.l.] Springer Netherlands, 1995. 1p. 177–186.

HUANG, H.; WANG, M.; DENG, F.; WANG, H.; HU, Z. ORF85 of HearNPV encodes the per os infectivity factor 4 (PIF4) and is essential for the formation of the PIF complex. **Virology**, v. 427, n. 2, p. 217–223, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.01.022>>.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y.-J.; AGATHOS, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 1–20, jul. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12733003>>. Acesso em: 23 jan. 2014.

KAMEN, a a; BÉDARD, C.; TOM, R.; PERRET, S.; JARDIN, B. On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures. **Biotechnology and bioengineering**, v. 50, n. 1, p. 36–48, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18626897>>.

KING, A. M. Q. .; ADAMS, M. J. .; CARSTENS, E. B. .; LEFKOWITZ, E. . **Virus taxonomy**. [s.l.] Elsevier, 2012.

KIOUKIA, N.; NIENOW, a W.; EMERY, a N.; AL-RUBEAI, M. Physiological and environmental factors affecting the growth of insect cells and infection with baculovirus. **Journal of biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 243–51, 31 jan. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7765874>>.

KNUDSON, D. L.; TINSLEY, T. W. Replication of a Nuclear Polyhedrosis Virus in a Continuous Cell Culture of *Spodoptera frugiperda* : Purification , Assay of Infectivity , and Growth Replication of a Nuclear Polyhedrosis Virus in a Continuous Cell Culture of *Spodoptera frugiperda* : Purifi. **Journal of Virology**, v. 14, n. 4, p. 934–944, 1974.

KWON, M.; DOJIMA, T.; PARK, E. Comparative Characterization of Growth and Recombinant Protein Production among Three Insect Cell Lines with Four Kinds of Serum Free Media. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, n. 2, p. 142–146, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF02940270>>.

LENG, P.; ZHANG, Z.; PAN, G.; ZHAO, M. Applications and development trends in biopesticides. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 86, p. 19864–19873, 30 dez. 2011. Disponível em: <[http://www.academicjournals.org/AJB/abstracts/abs2011/30Dec Special Review/Leng et al.htm](http://www.academicjournals.org/AJB/abstracts/abs2011/30Dec%20Special%20Review/Leng%20et%20al.htm)>. Acesso em: 27 jan. 2014.

LYNN, D. Methods for the Development of Cell Lines from Insects. **Journal of tissue culture methods**, v. 12, n. 1, p. 23–29, 1989. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF01578004>>.

MARANGA, L.; CUNHA, A.; CLEMENTE, J.; CRUZ, P.; CARRONDO, M. J. T. Scale-up of virus-like particles production: effects of sparging, agitation and bioreactor scale on cell growth, infection kinetics and productivity. **Journal of Biotechnology**, v. 107, n. 1, p. 55–64, jan. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165603002542>>. Acesso em: 31 jan. 2014.

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.

MCINTOSH, A. H.; IGNOFFO, C. M. Characterization of five cell lines established from species of *Heliothis*. **Appl. Entomol. Zool**, v. 18, n. 2, p. 262–269, 1983.

MEGHROUS, J.; KHRAMTSOV, N.; BUCKLAND, B. C.; COX, M. M. J.; PALOMARES, L. a.; SRIVASTAVA, I. K. Dissolved carbon dioxide determines the productivity of a recombinant hemagglutinin component of an influenza vaccine produced by insect cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 9999, n. xxx, p. n/a–n/a, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bit.25634>>.

MENESES-ACOSTA, a; MENDONÇA, R.; MERCHANT, H.; COVARRUBIAS, L.; RAMÍREZ, O. Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures. **Biotechnology and bioengineering**, v. 72, n. 4, p. 441–57, 20 fev. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11180064>>.

MICHELOUD, G. a; GIORIA, V. V; EBERHARDT, I.; VISNOVSKY, G.; CLAUS, J. D. Production of the *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus in serum-free suspension cultures of the saUFL-AG-286 cell line in stirred reactor and airlift reactor. **Journal of virological methods**, v. 178, n. 1-2, p. 106–16, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21906626>>. Acesso em: 31 jan. 2014.

MICHELOUD, G. a; GIORIA, V. V; PÉREZ, G.; CLAUS, J. D. Production of occlusion bodies of *Anticarsia gemmatalis* 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. 258–66, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733196>>. Acesso em: 31 jan. 2014.

Monsanto | **Biotecnologia.** Disponível em: <<http://www.monsanto.com/global/br/produtos/pages/biotecnologia.aspx>>. Acesso em: 28 jul. 2014.

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

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L. De; ELITA, M.; CASTRO, B. De; MOSCARDI, M. L.; SZEWCZYK, B. Baculovirus Pesticides: Present State and Future Perspectives. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. (Ed.). **Microbes and Microbial Technology**. New York, NY: Springer New York, 2011. p. 415–445.

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.

ÖHMAN, L.; LJUNGGREN, J.; HÄGGSTRÖM, L. Induction of a Metabolic Switch in Insect Cells by Substrate-Limited Fed Batch Cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 6, p. 1006–1013, 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF00166917>>.

OZTURK, S. S.; PALSSON, B. O. Effect of initial cell density on hybridoma growth, metabolism, and monoclonal antibody production. **Journal of biotechnology**, v. 16, n. 3-4, p. 259–278, 1990.

OZTURK, S. S.; RILEY, M. R.; PALSSON, B. O. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. **Biotechnology and bioengineering**, v. 39, n. 4, p. 418–431, 1992.

PALOMARES, L.; ESTRADA, S.; RAMIREZ, O. Principles and Applications of the

Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System. In: OZTURK, S.; HU, W.-S. (Ed.). **Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies**. New York, USA: CRC Press, 2006. p. 627–692.

PALOMARES, L.; 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, jan. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22358933>>.

PAMBOUKIAN, M. M.; JORGE, S. A. C.; SANTOS, M. G.; YOKOMIZO, A. Y.; PEREIRA, C. A.; TONSO, A. Insect cells respiratory activity in bioreactor. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 37–44, 2008.

PEDRINI, M. R. S.; CHRISTIAN, P.; NIELSEN, L. K.; REID, S.; CHAN, L. C. L. Importance of virus-medium interactions on the biological activity of wild-type Heliothine nucleopolyhedroviruses propagated via suspension insect cell cultures. **Journal of virological methods**, v. 136, n. 1-2, p. 267–72, set. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16716412>>. Acesso em: 6 fev. 2014.

RANGEL, J. C.; ZIMBRES, B. de Q. C.; SIHLER, W.; SOUZA, M. L. De. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: Seleção e análise da estabilidade de variantes MP (Many Polyhedra) do baculovírus Anticarsia gemmatalis MNPV**. Boletim de Pesquisa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia N. 263, 17p.

REID, S.; CHAN, L.; OERS, M. van. Production of Entomopathogenic Viruses. In: **Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens**. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. p. 1–46.

REUVENY, S.; KIM, Y. J.; KEMP, C. W.; SHILOACH, J. Effect of Temperature and Oxygen on Cell Growth and Recombinant Protein Production in Insect Cell Cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 619–623, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF00182800>>.

REZENDE, S. H. M. . **Caracterização molecular de mutantes gerados pela passagem serial do baculovirus anticarsia gemmatalis mnpv em cultura de células**. 2008. Universidade de Brasília, 2008.

RHIEL, M.; MITCHELL-LOGEAN, C. M.; MURHAMMER, D. W. Comparison of Trichoplusia ni BTI-Tn-5B1-4 (high five) and Spodoptera frugiperda Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. **Biotechnology and bioengineering**, v. 55, n. 6, p. 909–20, 20 set. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18636600>>.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos & otimização de processos**. 3a. ed. Campinas-SP: Cárita, 2014.

SCHMID, G. Insect cell cultivation: growth and kinetics. **Cytotechnology**, v. 20, n. 1-3, p. 43–56, jan. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22358473>>.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial volume 2: engenharia bioquímica**. 1^a. ed. São Paulo, SP: Edgard Blücher LTDA, 2001.

SIEBURTH, P.; MARUNIAK, J. Growth Characteristics of a Continuous Cell Line from the Velvetbean caterpillar, *Anticarsia Gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 24, n. 3, p. 195–198, 1988. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF02623546>>.

SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. **Insecticides – basic and other applications**.

Rijeka, Croatia: INTECH, 2012.

SOUZA, M. L. De; MOSCARDI, F. Baculovirus para o controle de pragas. **Biotecnologia Ciência E Desenvolvimento**, v. 24, p. 22–29, 2002.

SUGIURA, T.; AMANN, E. Properties of two insect cell lines useful for the baculovirus expression system in serum-free culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, n. 4, p. 494–499, 20 ago. 1996. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960820\)51:4<494::AID-BIT13>3.0.CO](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960820)51:4<494::AID-BIT13>3.0.CO)>.

SUMMERS, M.; STATION, T. A. E.; SMITH, G. E. **A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures**. [s.l.] Texas A & M University, Texas Agricultural Experiment Station, 1987.

SUN, X.; WANG, H.; SUN, X.; CHEN, X.; PENG, C.; PAN, D.; JEHLE, J. a.; VAN DER WERF, W.; VLAK, J. M.; HU, Z. Biological activity and field efficacy of a genetically modified *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus expressing an insect-selective toxin from a chimeric promoter. **Biological Control**, v. 29, n. 1, p. 124–137, 2004.

SZEWCZYK, B.; HOYOS-CARVAJAL, L.; PALUSZEK, M.; SKRZECZ, I.; LOBO DE SOUZA, M. Baculoviruses-- re-emerging biopesticides. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 2, p. 143–60, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16257169>>. Acesso em: 27 jan. 2014.

SZEWCZYK, B.; RABALSKI, L.; KROL, E.; SIHLER, W.; SOUZA, M. L. De. Baculovirus biopesticides - a safe alternative to chemical protection of plants. **Journal of Biopesticides**, v. 2, n. 2, p. 209–216, 2009.

SZEWCZYK, B.; SOUZA, M. L. De; CASTRO, M. E. B. De; MOSCARDI, M. L.; MOSCARDI, F. Baculovirus Biopesticides. In: STOYTCHIEVA, M. (Ed.). **Pesticides - Formulations, Effects, Fate**. Rijeka, Croatia: INTECH, 2011. p. 24–36.

TAKAHASHI, M.; KONO, Y.; MATSUSHITA, K.; MITSUHASHI, J. Production of Ethanol by Cultured Insect Cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 31, n. 11, p. 876–879, 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF02634573>>.

VAUGHN, J. L.; GOODWIN, R. H.; TOMPKINS, G. J.; MCCAWLEY, A.; AL, V. E. T. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera noctuidae). **In Vitro**, v. 13, n. 4, p. 0–4, 1977.

VIEIRA, P. B. **Cultura de células de *Drosophila melanogaster* (S2) em processo contínuo** São Paulo, SP, 2010. .

WASHBURN, J. O.; CHAN, E. Y.; VOLKMAN, L. E.; AUMILLER, J. J.; JARVIS, D. L. Early synthesis of budded virus envelope fusion protein GP64 enhances *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus virulence in orally infected *Heliothis virescens*. **Journal of virology**, v. 77, n. 1, p. 280–290, 2003.

ZHANG, J.; KALOGERAKIS, N.; BEHIE, L. a. Optimization of the physicochemical parameters for the culture of *Bombyx mori* insect cells used in recombinant protein production. **Journal of biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 249–258, 1994.

ZHANG, Y. H.; ENDEN, G.; MERCHUK, J. C. Insect cells–Baculovirus system: Factors affecting growth and low MOI infection. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 1, p. 8–16, dez. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X05001877>>. Acesso em: 31 jan. 2014.

10. Apêndice

10.1. Cinética de crescimento dos cultivos do Delineamento Composto Central (DCC)

O DCC foi um planejamento elaborado primeiramente para se ter uma visão geral do processo. Em muitos casos, somente os pontos de um DCC são suficientes para se identificar os efeitos das variáveis estudadas. Quando isso não é observado, é aconselhável a adição dos pontos axiais. Através desses pontos adicionais, tem-se um intervalo de análise das variáveis maior e, assim, maior chance de identificar os efeitos dos parâmetros estudados (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Desta forma, nas figuras 10.1-10.7, estão descritos os cultivos obtidos durante a execução do DCC, o qual, após adição dos 4 pontos axiais, foi transformado no DCCR analisado e discutido nessa dissertação. Por isso, resolveu-se nomear os pontos centrais (ensaios 7, 8 e 9) do DCC com a mesma numeração dos pontos centrais apresentados no DCCR sequencial (ensaios 9, 10 e 11).

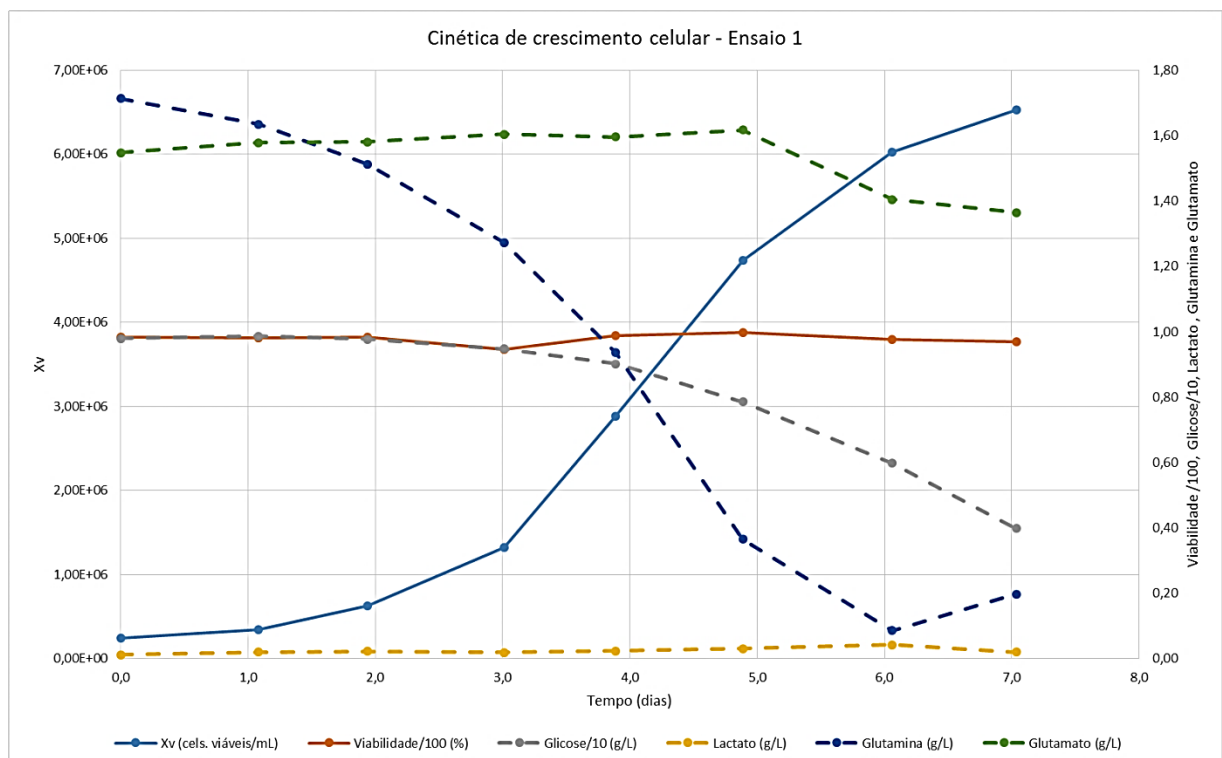


Figura 10.1. Cinética de crescimento, consumo de nutrientes e produção de metabólitos do ensaio 1 do DCC.

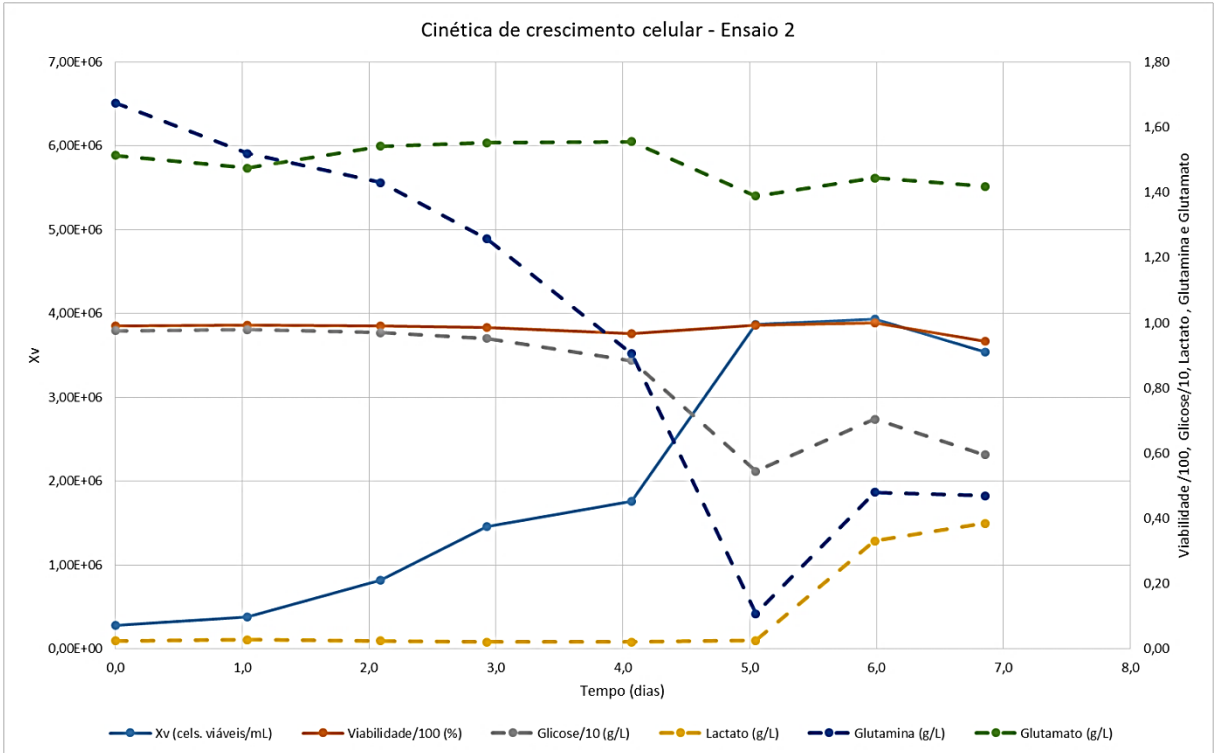


Figura 10.2. Cinética de crescimento, consumo de nutrientes e produção de metabólitos do ensaio 2 do DCC.

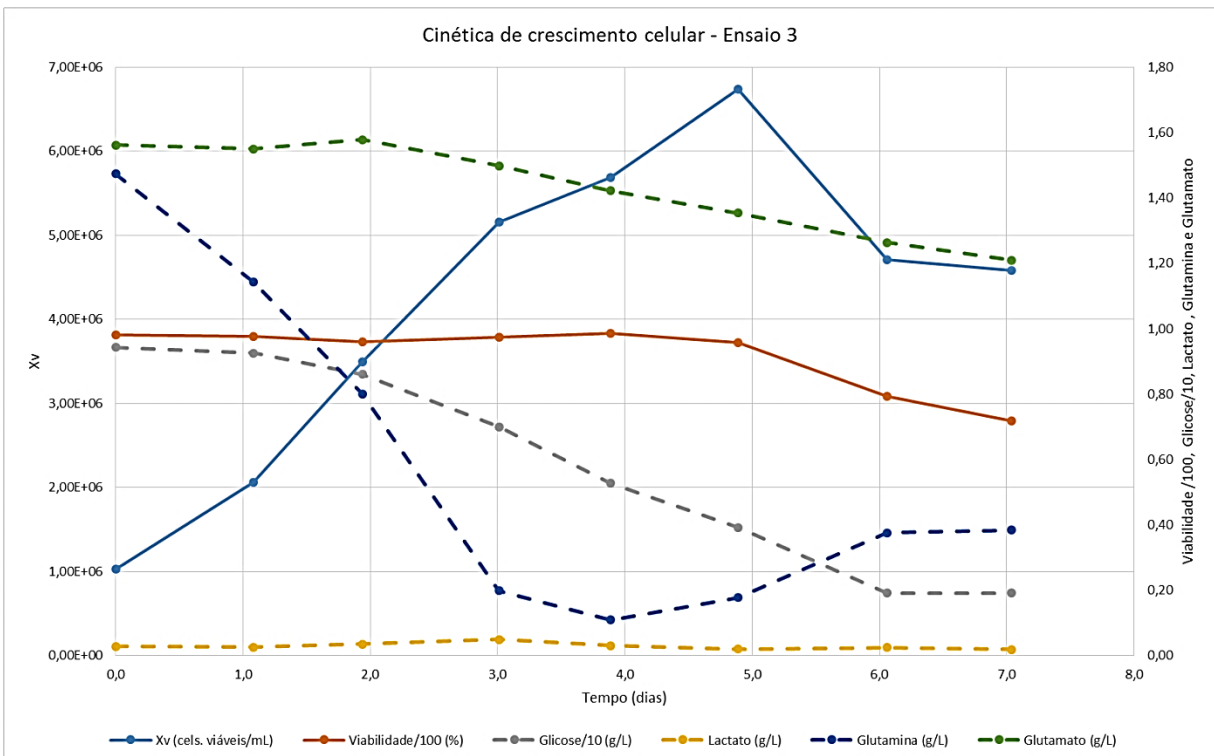


Figura 10.3. Cinética de crescimento, consumo de nutrientes e produção de metabólitos do ensaio 3 do DCC.

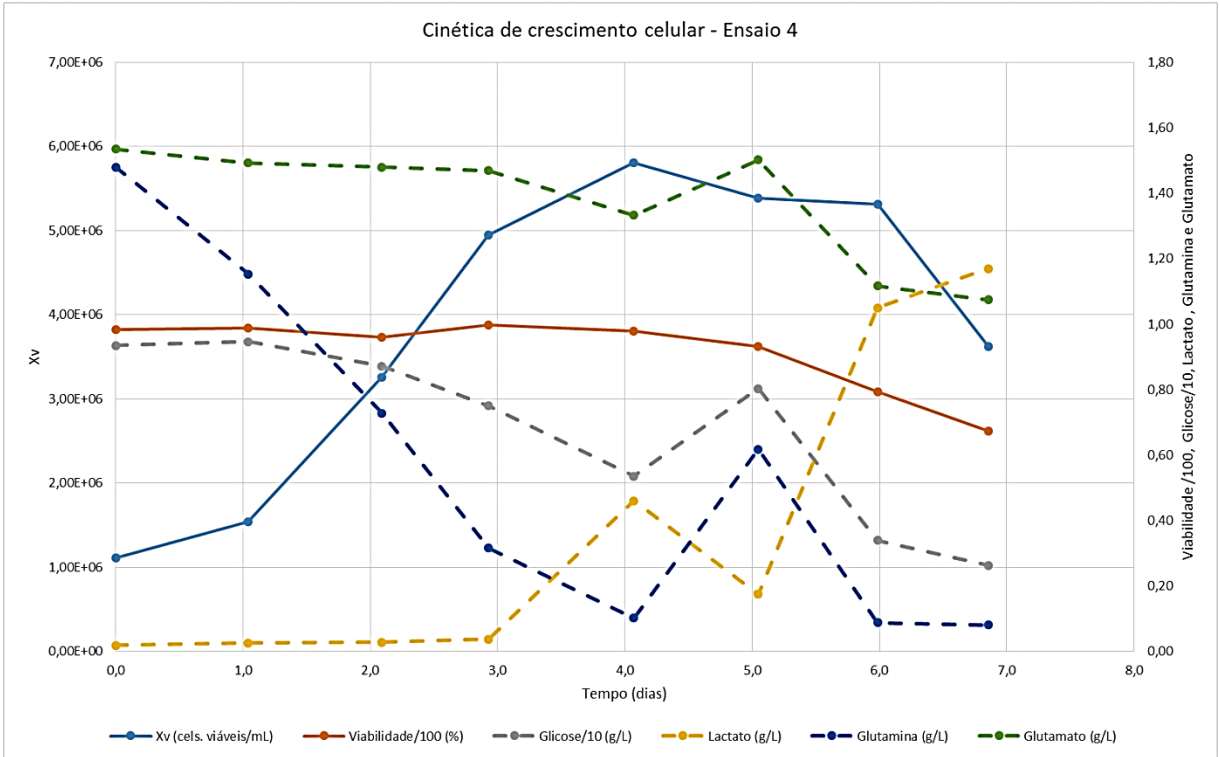


Figura 10.4. Cinética de crescimento, consumo de nutrientes e produção de metabólitos do ensaio 4 do DCC.

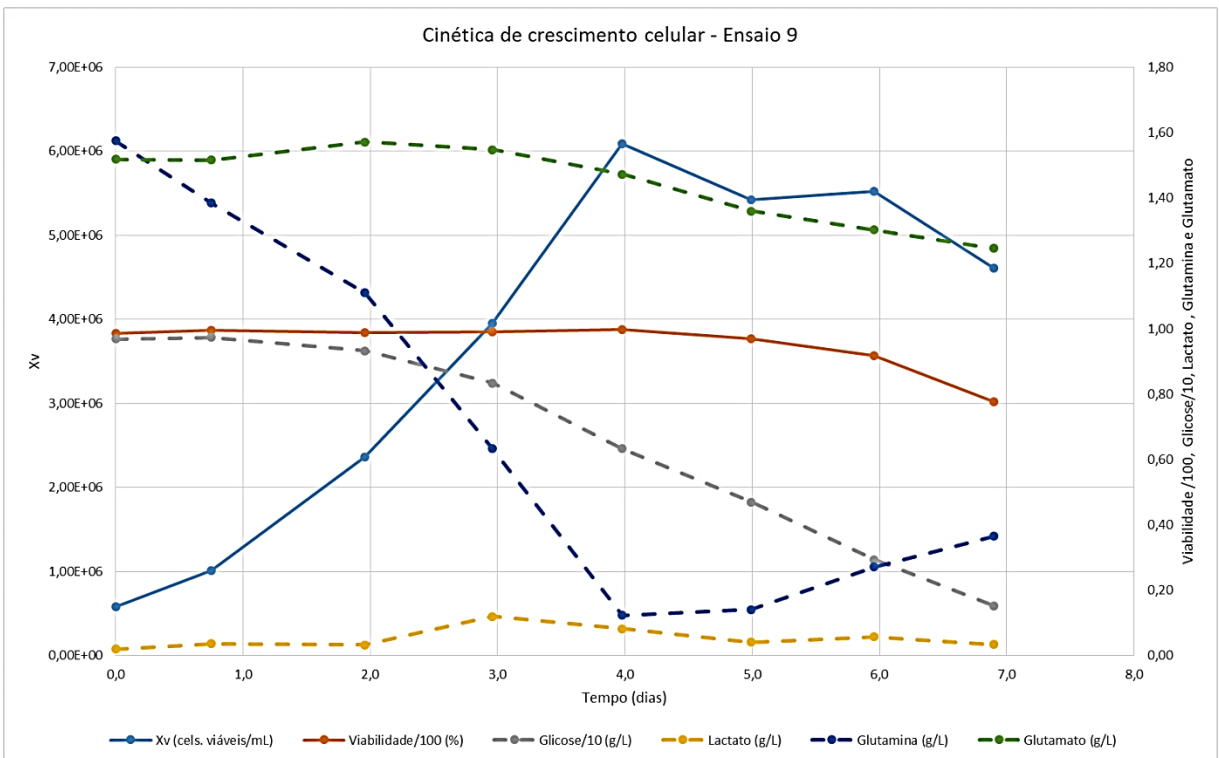


Figura 10.5. Cinética de crescimento, consumo de nutrientes e produção de metabólitos do ensaio 9 do DCC.

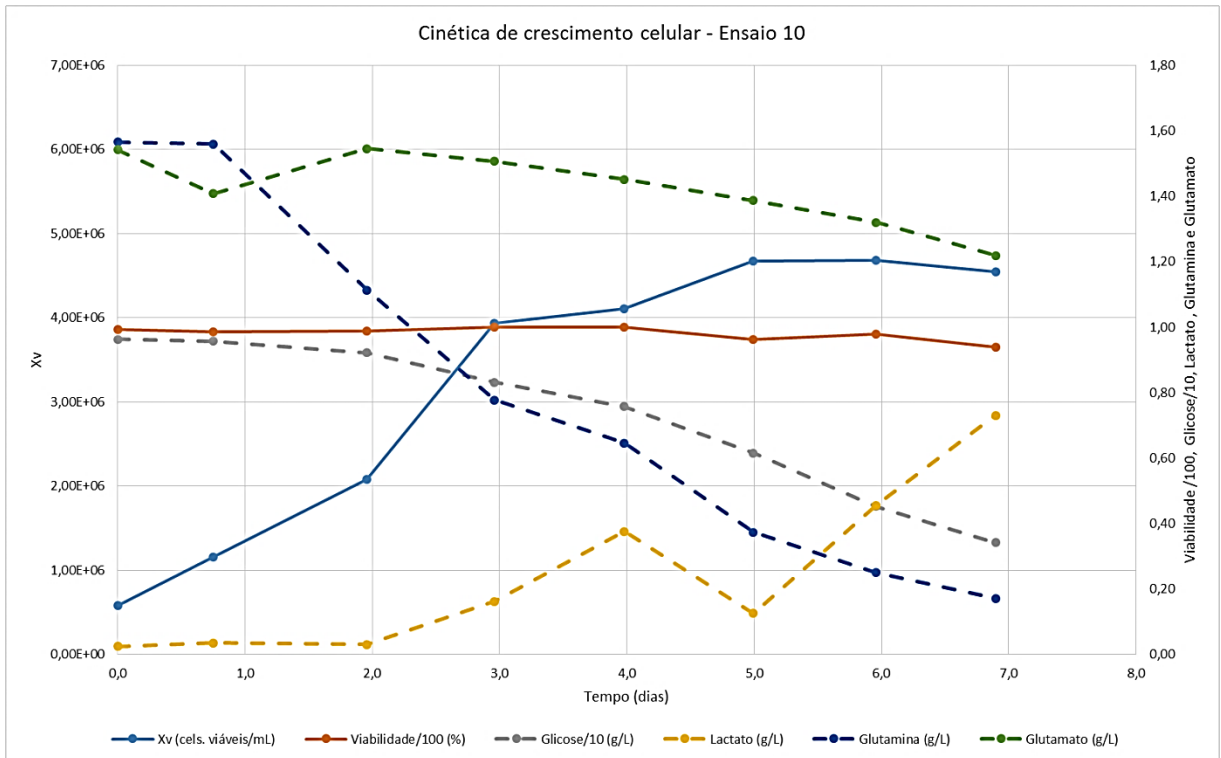


Figura 10.6. Cinética de crescimento, consumo de nutrientes e produção de metabólitos do ensaio 10 do DCC.

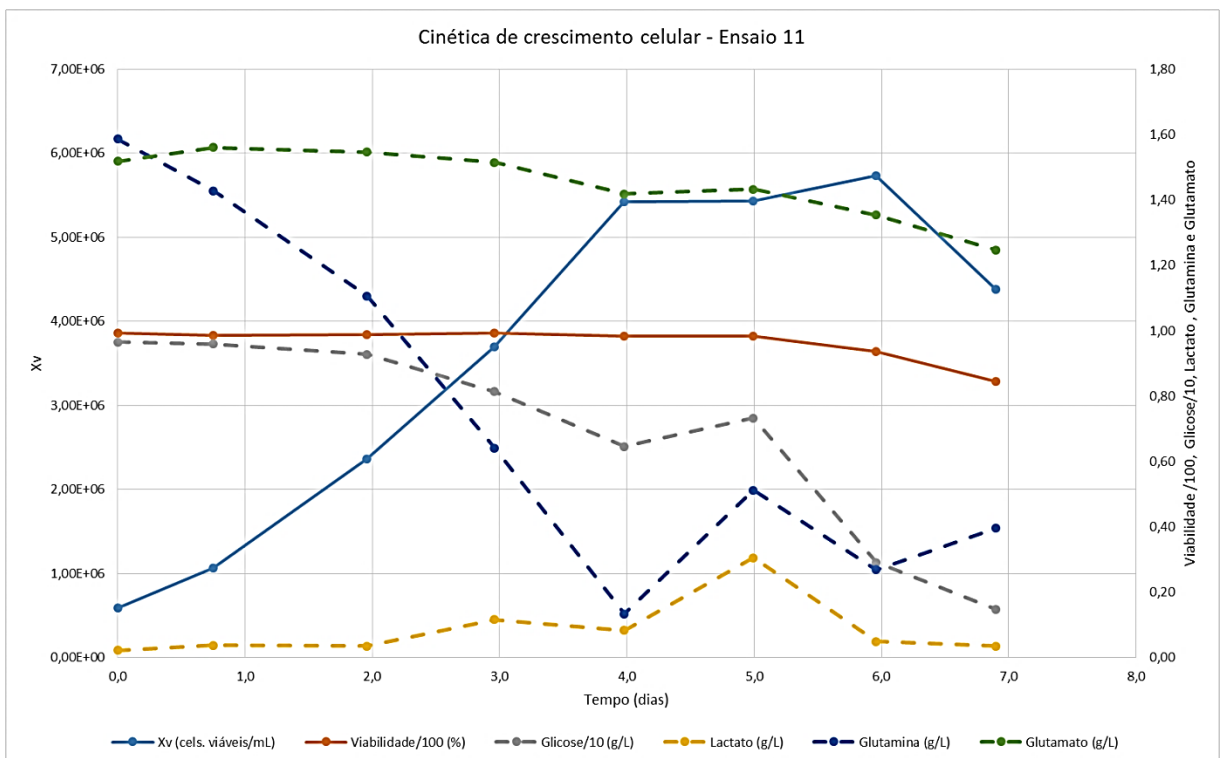


Figura 10.7. Cinética de crescimento, consumo de nutrientes e produção de metabólitos do ensaio 11 do DCC.