ALDO TONSO

**MONITORAMENTO DE CULTIVOS
DE CÉLULAS ANIMAIS EM BIORREATOR**

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Livre-Docente, junto ao Departamento
de Engenharia Química, na especialidade
"Engenharia Bioquímica"

**CONSULTA
FT-3068**

**São Paulo
Julho de 2011**

OK

ALDO TONSO

**MONITORAMENTO DE CULTIVOS
DE CÉLULAS ANIMAIS EM BIORREATOR**

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Livre-Docente, junto ao Departamento
de Engenharia Química, na especialidade
"Engenharia Bioquímica"

São Paulo
Julho de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Tonso, Aldo

**Monitoramento de cultivos de células animais em biorreator
/ A. Tonso. -- São Paulo, 2011.
110 p.**

**Tese (Livre-Docência) - Escola Politécnica da Universidade
de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.**

**1. Fermentação (Processos) 2. Células (Cultura; Monitora -
mento) 3. Biologia animal 4. Reatores bioquímicos I. Universi-
dade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Enge-
nharia Química II. t.**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROCURADORIA GERAL

PG. P. 00746/2012

GFCM/lmhv

Autos USP nº 92.1.543.3.2

Interessado: ALDO TONSO

Assunto: Expedição de Título.

Tema: Concurso para a expedição de título de livre-docência —
Inexistência de irregularidades procedimentais que obstem seja
expedido.

PARECER

Examinados os autos nº 11.1.2054.3.8 de "concurso de livre-docente", em particular as informações de fls. 83/85, e os autos nº 92.1.543.3.2, conclui-se que o procedimento de concurso não apresenta irregularidades que obstem se ratifique a homologação do relatório final da comissão julgadora e se acolha a proposta de expedição do título.

Encaminhem-se os autos ao Gabinete do Magnífico Reitor.

Procuradoria Geral, 20 de março de 2012

GUSTAVO FERRAZ DE CAMPOS MONACO

Procurador Geral

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROCURADORIA GERAL

Aprovo o parecer da Procuradoria Geral, ratifico a homologação do relatório final da comissão julgadora e acolho a proposta de expedição do título de livre-docente em favor de ALDO TONSO.

Encaminhem-se os autos ao Departamento de Recursos Humanos, da Coordenadoria de Administração Geral, para que se tomem as providências subseqüentes.

Gabinete do Reitor, 23 de março de 2012.

Assinatura manuscrita de João Grandino Rodas.

JOÃO GRANDINO RODAS
Reitor da Universidade de São Paulo

Dedico esta tese à minha família, que sempre esteve ao meu lado.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. Introdução	1
2. Monitoramento e controle de bioprocessos	3
2.1. Conceitos básicos	3
2.2. Características particulares de cultivos celulares	5
2.3. Principais variáveis de processo	6
2.3.1. Temperatura	6
2.3.2. pH	7
2.3.3. Outras Variáveis de Interesse	8
2.4. Estratégias de controle	10
2.4.1. Controle Tradicional	10
2.4.2. Modos Avançados de Controle	12
3. Monitoramento da biomassa	13
3.1. Influência do tempo na determinação da viabilidade de células animais pelo método com azul de tripan	16
3.2. Efeito da osmolalidade em cultivos de hibridoma em perfusão	24
3.3. Análise de imagens	34
3.4. Acompanhamento de fermentação usando espectroscopia de Infravermelho Próximo (Near Infrared - NIR)	44
4. Monitoramento da respiração celular	52
4.1. Oxigênio dissolvido	52
4.2. Novo método dinâmico para biorreator com transferência de oxigênio através de difusão por membrana de silicone	56
4.3. Atividade respiratória de diferentes células de insetos cultivadas em biorreatores	69
4.4. Metodologia de cálculo de Ccrit em células animais	84
4.5. Estimativa da concentração celular através da atuação do controlador de oxigênio dissolvido em cultivo de células de inseto	91
4.6. Comparação entre sistemas de análise de gases	100
5. Conclusões	103
Referências Bibliográficas	105

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho é fruto de uma combinação de esforços de muitas pessoas e agradecer a todos nominalmente poderia ser injusto e demasiadamente extenso. Porém não poderia deixar de mencionar particularmente os meus alunos de pós-graduação e iniciação científica, cujos esforços com alguma ajuda minha resultaram no conhecimento apresentado em seguida, seja na forma de dados experimentais, seja como análise desses e sua comparação com a literatura. Dessa forma, agradeço particularmente ao doutor Thaigo Olitta Basso, aos mestres Marilena Martins Pamboukian, Fabiano Henrique Marques, Paula Bruzadelle Vieira e aos engenheiros Heloisa Gurgel Neves, Isabela Rupp Kavanagh e Luiz Fernando Castelhana.

Além deles, claro, há muitos a agradecer, mesmo que não tenham feito parte direta dos resultados apresentados, pois o prazer de trabalhar em grupo, com pessoas interessantes e interessadas, é que motiva a continuar trabalhando, em especial numa atividade na qual há muita dedicação não diretamente recompensada.

Dessa forma, agradeço:

- aos meus outros alunos, que mesmo que eu não tenha incluído seus resultados, são sempre presentes, em especial Bruno, Daniella e Gustavo.
- aos meus colegas de LEB, Andreas, Pedro, Beatriz e mais recentemente Adriano.
- aos meus colegas do Butantan, em particular ao Carlos Augusto, Soraia e Renato.
- aos meus colegas do IPT, muito em especial à Beth.
- a Carmen (com quem tantos sentimentos troco), Pedro e Bruno, que se fazem cada vez mais a razão de viver.

Também agradeço aos demais colegas de trabalho na Poli e nas outras instituições por onde ando, aos amigos, pai e irmão, que juntos tornam a vida um prazer.

Pelo apoio financeiro aos projetos e bolsas de estudo, agradeço à Fapesp e ao CNPq.

RESUMO

Os processos biotecnológicos com células animais tem despertado interesse crescente devido à sua capacidade de sintetizar moléculas complexas de altíssimo valor agregado, mesmo exigindo condições especiais de cultivo. Torna-se portanto fundamental o correto monitoramento de tais processos, para se manter seus parâmetros dentro de limites desejados.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de metodologias que permitam o melhor monitoramento de cultivos de células animais, de modo a contribuir com tais processos e eventualmente aumentar sua produtividade. Após uma introdução sobre o tema, são apresentados trabalhos com foco na determinação das variáveis relacionadas à célula, como concentração, viabilidade e tamanho, e à respiração, como velocidade específica de respiração e concentração crítica de oxigênio dissolvido.

Pode-se concluir que houve um avanço na metodologia de monitoramento de cultivos celulares, com destaque para variabilidade da medida de viabilidade celular de células de inseto pelo método de exclusão com azul de Tripán; influência da osmolalidade no diâmetro médio das células de hibridoma; classificação morfológica de fungos por análise de imagens; uso da técnica NIR para estimativa da concentração celular; nova metodologia para medida da velocidade global de consumo de oxigênio; medida da velocidade de respiração de diferentes células de inseto; avaliação de Ccrit por um método simples e possibilidade de estimar a concentração celular através do sistema de controle de oxigênio dissolvido.

O trabalho demonstra a importância de se efetuar um adequado monitoramento do processo para garantir a correta operação, em especial de cultivos com células animais.

ABSTRACT

Animal cell cultures are widely used for the production of recombinant and therapeutic proteins because of their ability to perform extensive post-translational modifications, even requiring special conditions of cultivation. It is therefore particularly essential to monitor such process, in order to keep parameters within desired limits.

The objective of this study was to develop methodologies that allow better monitoring of animal cell cultures in order to contribute to these processes and eventually increase productivity. After an introduction on the subject, some works are presented focused on determining the variables related to the cell, such as concentration, viability and size, and respiration, such as specific respiration rate and critical concentration of dissolved oxygen.

It can be concluded that there was an advance in methodology for monitoring cell culture, especially measurement of cellular viability of insect cells by the method of exclusion with trypan blue; influence of osmolality in hybridoma cells average diameter; classification fungi by morphological image analysis; cell concentration estimate using the NIR technique; new methodology to measure the overall rate of oxygen consumption; measurement of respiration rate of different insect cells; Ccrit assessment by a simple method and possibility to estimate cell concentration through the dissolved oxygen control system.

The work demonstrates the importance of making an appropriate monitoring of bioprocess, especially in animal cell culture.

1. INTRODUÇÃO

O texto desta tese de Livre-Docência representa uma sistematização de trabalhos realizados em torno da temática geral de monitoramento de cultivos com células animais.

O texto é composto essencialmente de três capítulos específicos, acompanhados por esta introdução, conclusões e referências bibliográficas. Os resultados apresentados foram gerados em sua maioria por alunos de iniciação científica, mestrado ou doutorado, acrescidos de alguns dados novos. Cada capítulo tenta sintetizar o conhecimento gerado em uma parte de uma área que pode ser chamada de monitoramento de bioprocessos.

O primeiro destes capítulos, tem como objetivo introduzir o tema de monitoramento e controle de bioprocessos, com ênfase em cultivos com células animais, sendo uma adaptação do capítulo do livro Tecnologia do Cultivo de Células Animais - De Biofármacos à Terapia Gênica, editado por Castilho, Moraes e Augusto. Nele são apresentados alguns conceitos básicos, como medidas *on-line*, as principais variáveis de interesse nos bioprocessos e uma simplificada visão das formas de controle dessas variáveis num biorreator.

No capítulo 3, abordam-se em particular as células e as diversas formas de estimativa da concentração celular (X) ou de outras variáveis relacionadas com a biomassa. Nele estão apresentados alguns trabalhos relacionados à estimativa *on-line* ou *off-line* da concentração de células, sua viabilidade e distribuição de diâmetro, lembrando que a biomassa é a variável mais importante na análise de um bioprocessos, considerando que todas as outras dependem dela para terem suas velocidades específicas calculadas. Há alguns trabalhos que usaram micro-organismos, particularmente o desenvolvimento para automatizar a classificação de fungos filamentosos através da técnica de análise de imagens, e a tentativa de se estimar valores de concentração celular e de metabólitos através do espectro obtido por uma sonda NIR (infravermelho próximo), com vistas ao monitoramento *on-line* dessas variáveis, trabalho este ainda em desenvolvimento. Por outro lado, fruto de problemas enfrentados com a medida da viabilidade de células de inseto através do método de exclusão por azul de tripan, foi desenvolvido um trabalho de sistematização desta medida e sua comparação com outras células. Ainda neste capítulo há uma análise da influência da variação da osmolalidade do meio de cultura de células de hibridoma sobre diversos parâmetros, inclusive o diâmetro médio das células.

Por fim, no capítulo 4, apresenta-se uma variável de particular interesse no acompanhamento de um bioprocessos, a respiração celular, cuja estimativa em tempo real

frequentemente é de difícil aquisição, mesmo tendo-se dados de oxigênio dissolvido (OD). Nesse sentido, ao longo dos últimos anos, foram realizados trabalhos para desenvolver metodologias de medida do consumo total de oxigênio (OUR), da velocidade específica de respiração (Q_{O_2} , o quanto cada célula está respirando) e da concentração crítica de OD (C_{crit}). Há uma proposição de um novo método dinâmico de medida de OUR, aplicável a cultivos de células animais, onde a velocidade de respiração é significativamente mais baixa em comparação a cultivos microbianos. Usando essa característica, é apresentada também uma forma simples de se estimar a C_{crit} , variável esta mencionada com frequência em livros textos, porém de difícil quantificação, com exceção da realização de diversos ensaios com concentração de oxigênio dissolvido controlado. Por fim, usando-se um sistema automático de controle de OD, é apresentada uma metodologia de estimativa em tempo real da concentração de células, válido para a fase exponencial de crescimento, na qual Q_{O_2} é constante.

2. MONITORAMENTO E CONTROLE DE BIOPROCESSOS

Cultivos de células animais podem ser considerados, em muitos aspectos, como processos análogos a cultivos de microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, apresentando uma série de características comuns, como por exemplo as principais variáveis a serem monitoradas e controladas. No entanto, em função de suas características particulares, necessitam às vezes de estratégias diferenciadas. O presente capítulo apresenta os conceitos básicos de monitoramento e controle de bioprocessos, dando ênfase às particularidades dos cultivos com células animais. Será apresentada, inicialmente, uma visão geral do que significa monitorar e controlar processos, uma descrição das principais variáveis envolvidas e, por fim, as estratégias de controle mais empregadas.

Convém observar que o desenvolvimento da eletrônica e da informática tem em muito colaborado no aperfeiçoamento de sistemas de monitoramento e controle de processos. Em particular, nos bioprocessos e ainda nos cultivos celulares, há ainda alguns entraves a esse aperfeiçoamento, fruto de características próprias desses processos, como a dificuldade de estimativa em tempo real da concentração celular. Vários textos básicos podem ser citados como complementação desse capítulo, dos quais se destacam: Kilburn (1991); Schügerl (1991); Sonnleitner (2000); Tonso (2000); Schügerl (2001) e Barral e Pereiralima (2001).

2.1 Monitoramento e Controle: Conceitos Básicos

Qualquer processo, seja ele industrial ou de laboratório, apresenta uma série de variáveis importantes, que representam seu estado. No caso de cultivos celulares, podemos citar as variáveis relativas ao ambiente ao qual as células estão expostas, como a temperatura, o pH, as concentrações de oxigênio dissolvido, de nutrientes do meio de cultivo e de metabólitos, assim como aquelas relativas às células em si, como sua concentração, tamanho médio ou ainda a concentração de determinada enzima intracelular. Idealmente, deseja-se ter em mãos o maior número possível de informações para se entender melhor o que está ocorrendo e com isso poder tomar decisões no decorrer do processo. Nesse ponto, torna-se importante definir alguns conceitos relativos ao monitoramento e controle de processos.

O primeiro se refere a quando a informação está disponível. Como exemplo, tem-se que a concentração de glutamina em determinado instante do cultivo foi de 0,23 g/L, obtida através de uma corrida cromatográfica realizada uma semana depois do término do cultivo. Tal informação é considerada *off-line* e pode ser usada ao se estudar a influência desse

substrato no crescimento celular ou síntese de um produto. No entanto, se tal informação for disponível instantaneamente, ela pode eventualmente ser utilizada por um sistema automatizado que reponha uma quantidade de meio de cultura em um processo descontínuo-alimentado (fed-batch), de modo que não haja falta de glutamina no meio. Nesse caso, diz-se que a variável concentração de glutamina está sendo monitorada em "tempo real", também chamada *on-line* ou *real-time*.

Outro conceito importante é se a informação adquirida advém do local do processo, ou se uma amostra é retirada e analisada em outro lugar. Por exemplo, no estudo do grau de agregação de um cultivo de células, se uma amostra é retirada do cultivo, ela passa por diversas manipulações antes de sua análise (como por exemplo diluições com pipetadores automáticos), sendo possível que a agregação observada não corresponda àquela presente no cultivo. Nesses casos, o ideal seria ser possível observar as células através de um microscópio inserido dentro de biorreator, o que seria chamado *in situ*, ou seja, no próprio local.

Com relação ao monitoramento, há dois motivos básicos para se desejar ter informações de um processo:

- a) Melhor conhecimento do processo em si, como parte de uma pesquisa ou na busca de causa-efeito. Por exemplo, quando o pH esteve abaixo de certo valor, o crescimento das células foi prejudicado. Esse conhecimento também é fundamental na elaboração de um modelo que represente adequadamente o processo em estudo;
- b) Utilização de determinada informação, em tempo real, como subsídio para a tomada de alguma ação de controle. Por exemplo, com base na concentração de oxigênio dissolvido em determinado instante, pode-se atuar na vazão de aeração, para se evitar limitações à respiração celular.

Por outro lado, controle se refere às ações tomadas no processo. Um fluxograma de uma malha de controle típica é mostrado na Figura 2.1, utilizando como exemplo o controle da temperatura de um biorreator.

Figura 2.1 - Fluxograma de uma malha de controle típica, com indicação dos elementos de um controle de temperatura. Nela, um valor de temperatura desejado (*set-point*) é comparado com o valor medido pelo termômetro (sensor) e, com base no erro, é gerado pelo controlador um sinal para a resistência elétrica (atuador), que irá aquecer o biorreator (processo).

Como se pode observar, chega nessa malha de controle uma informação do processo (valor da temperatura medido pelo sensor), o que a configura como malha fechada. É o caso da maior parte dos controladores instalados nos biorreatores. Caso as decisões do controlador não levassem em conta nenhuma informação monitorada do processo, se diria que o controle está operando em malha aberta. Exemplo de malha aberta é um processo descontínuo alimentado, onde se deseja manter a concentração de determinado nutriente dentro de certos níveis, mas a vazão da bomba de alimentação de nutriente é fixada *a priori*. Como não há informações do processo, esse sistema de controle não é capaz de responder a flutuações no comportamento das células em crescimento.

2.2 Características Particulares de Cultivos Celulares

Os cultivos com células animais, sejam elas de mamíferos ou de insetos, apresentam características próprias em relação a cultivos microbianos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos). Dentre as características que mais interferem nas metodologias de monitoramento e controle do processo, destacam-se:

- a) Crescimento lento, apresentando velocidades específicas de crescimento da ordem de 10 a 20 vezes menores que células microbianas, o que estimula o desenvolvimento de biorreatores com reciclo de células, onde muitas vezes é necessária a estimativa em tempo real da concentração celular ou de nutrientes. Cultivos mais longos (da ordem de vários dias) requerem sensores (como por exemplo de pH e oxigênio dissolvido) mais robustos ou

sistemas de troca de eletrodos durante o processo. Além disso, qualquer contaminação tem um efeito maior no processo, exigindo maior garantia da esterilidade;

- b) Necessidade de suportes para as células, nos casos de linhagens dependentes de ancoramento, o que representa uma forte limitação à estimativa da concentração de células;
- c) Fragilidade mecânica, devido à ausência de parede celular e decorrente das células originalmente estarem adaptadas às estruturas de tecidos, que lhes dão suporte mecânico. Como consequência dessa fragilidade, foram desenvolvidos sistemas alternativos de transferência de oxigênio, como o livre de bolhas. Tal sistema requer estratégia própria de monitoramento e controle das variáveis envolvidas com a transferência de oxigênio;
- d) Controle de pH pela manipulação do sistema tamponante gás carbônico-bicarbonato de sódio, que também altera o sistema de controle de gases.

2.3. Principais Variáveis de Processo

2.3.1 Temperatura

Qualquer que seja a escala do cultivo (frascos T, *Schott*, *Spinner* ou biorreator), a temperatura do meio de cultivo com o qual as células estão em contato é sempre uma variável de estado fundamental, pois interfere em todo o processo de crescimento e produção. No entanto, trata-se de uma variável de processo facilmente monitorável e controlável. Nos cultivos em menor escala, normalmente o frasco é colocado em uma estufa com controle termostaticado, onde o valor medido de um termômetro envia sinal para ligar ou não o aquecimento (controle *on-off*). Nos biorreatores, há alguns sistemas equivalentes, conforme será visto a seguir. Em geral, no entanto, utiliza-se um sensor de temperatura tipo termistor (*Resistance Temperature Detector* ou RTD), cuja resistência elétrica varia conforme a temperatura do seu sensor de platina (Pt100), sendo tipicamente 100 Ω a 0 °C e 123 Ω a 60 °C.

Os sistemas de controle da temperatura mais comuns em cultivos celulares são os seguintes:

- a) Manta térmica envolvendo o biorreator, cuja resistência elétrica pode ser ligada ou desligada, aquecendo o sistema. Nesse caso, a temperatura mínima de cultivo é limitada pela temperatura do local de instalação do reator, o que pode gerar um problema em cultivos de células de inseto (temperaturas em torno de 28 °C) em instalações sem ar condicionado;

- b) Encamisamento por água com um sensor de temperatura, o qual envia um sinal para o controlador que atua ligando a resistência elétrica em contato com o circuito fechado de água (aquecer) ou acionando uma válvula solenóide que permite a entrada de água da rede, mais fria que a do circuito (resfriar). Nesse caso, a temperatura mínima de cultivo é limitada pela temperatura da água da rede. Em caso da temperatura da água da rede não ser suficientemente baixa, pode-se utilizar um sistema de banho termostatizado refrigerado substituindo o circuito do biorreator;
- c) Encamisamento por água com dois sensores de temperatura: na água da camisa e no meio de cultivo. Nesse caso, diferentemente do anterior, o controle é feito em cascata, onde o controlador da temperatura do meio (mestre) atua enviando um valor de *set-point* para o controlador da temperatura da água da camisa (escravo) (vide item 2.4.1.c).

Tipicamente, busca-se manter a temperatura de um processo controlado no valor que resulte em maior velocidade de crescimento ou de produção. Às vezes, no entanto, é possível se optar por uma temperatura diferente, que tenha como consequência uma melhor qualidade do produto ou uma velocidade de respiração compatível com o sistema de transferência de oxigênio (Chuppa *et al.*, 1996). Em cultivos descontínuos, pode-se optar por dois valores de temperatura controlada, um para a fase de crescimento e outro para a fase de produção, na qual a divisão celular é interrompida pela baixa temperatura (Fox *et al.*, 2004).

2.3.2 pH

Com relação aos sistemas de controle de pH em cultivos celulares, pode-se classificá-los basicamente em quatro tipos:

- a) Meio de cultura naturalmente tamponado, para processos em frascos que admitem alguma variação do pH durante o cultivo, nos quais normalmente não se utilizam eletrodos de pH;
- b) Meio de cultura tamponado com bicarbonato de sódio e gás carbônico. Nesse caso, o frasco é mantido em estufa com controle da fração de gás carbônico na sua atmosfera, e a concentração de H^+ e o pH se manterão constantes dentro de uma faixa aceitável, graças ao equilíbrio: $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$;
- c) Adição controlada de CO_2 no gás aspergido ao biorreator, tendo como base o sinal de um eletrodo de pH mergulhado no meio de cultivo;

d) Adição controlada de soluções de álcalis (como hidróxido de sódio) e/ou ácidos (como ácido clorídrico) ao biorreator, tendo como base o sinal de um eletrodo de pH mergulhado no meio de cultivo.

Os eletrodos de pH mais utilizados em cultivos celulares são eletroquímicos do tipo prata/cloreto de prata, com gel interno (que permite ser esterilizado quando todo o biorreator é submetido a uma autoclave) ou combinados (que durante esterilização pode ser submetido à pressão interna maior que a exterior para compensar à pressurização na ponta do eletrodo e evitar a contaminação com meio de cultura). (Schügerl, 1991).

Em cultivos de longa duração (várias semanas), no intuito de se permitir calibração, conserto ou reposição de eletrodos, podem-se utilizar suportes retráteis (*retractable housing*) para eletrodos como o de pH e oxigênio dissolvido. Através do uso de uma câmara interna, o eletrodo pode ser retirado do contato com o meio de cultivo e então recalibrado, consertado ou substituído. Após sua re-inserção na câmara, é esterilizado com vapor direto e posteriormente volta a entrar em contato com o meio de cultivo, sem risco de contaminações (Sonnleitner, 2000).

Por outro lado, cada vez mais se vê na literatura trabalhos sobre pH intracelular, cujas técnicas mais comuns de medida são citometria de fluxo com indicadores de fluorescência dependentes de pH (Ozkan e Mutharasan, 2002) e ressonância magnética nuclear. Há vários trabalhos relacionando seus valores com o comportamento da célula, como metabolismo, apoptose e velocidade específica de crescimento (Cherlet e Marc, 1998). Tais medidas *off-line* ajudam a representar o estado fisiológico das células, não podendo ainda ser utilizadas em sistemas de controle.

2.3.3 Outras Variáveis de Interesse

Além da temperatura e pH, as variáveis de processo mais importantes do ponto de vista de monitoramento e controle de um cultivo celular são concentração de biomassa e de oxigênio dissolvido, que serão vistas respectivamente nos capítulos 3 e 4. Também merecem destaque também:

a) Pressão parcial de gás carbônico dissolvido ($p\text{CO}_2$), por se tratar de um composto presente no meio de cultivo que pode inibir o crescimento das células. Em cultivos com frascos T ou *Schott*, é comum mantê-los em estufas nas quais a concentração de gás carbônico na atmosfera é controlada. Tal controle é realizado através de sensor de gás carbônico na fase

gasosa (por espectrofotometria de infravermelho ou condutividade térmica) e atuação numa válvula que libera gás carbônico na estufa. Através da presença de bicarbonato na formulação do meio de cultura, pode-se assim manter o pH do cultivo controlado. No entanto, em biorreatores, a concentração de gás carbônico dissolvido não costuma ser controlada. Como em valor muito pequeno ou muito grande pode ocorrer inibição ao crescimento, é desejável que esteja com valor na faixa de 40 e 200 mmHg, dependendo evidentemente da linhagem celular. Já existem no mercado sensores próprios para pCO_2 , esterilizáveis e que podem ser inseridos em qualquer porta de biorreatores, como por exemplo o InPro5000, com princípio de funcionamento semelhante a de um eletrodo de pH (Mettler-Toledo, 2011). Há também na literatura outros sensores de pCO_2 (Pattison *et al.*, 2000);

b) Metabólitos em tempo-real, através de técnicas como *FIA* (*Flow Injection Analysis*), que permitem dosagem em linha de glicose e outros substratos ou produtos das células. Nesse processo, uma pequena vazão de meio de cultivo é continuamente bombeada para um sistema composto por um filtro tangencial (para a separação das células), bombas injetoras e detectores (Reinecke e Stephanopoulos, 2000). Outra possibilidade é o acoplamento de equipamentos de medida *off-line* a sistemas de amostragem automatizados (Figura 2.2), permitindo o uso da informação da concentração do metabólito em um sistema de controle (por exemplo, da vazão de alimentação de meio de cultura fresco) (Konstantinov *et al.*, 1996; Ozturk *et al.*, 1997). Com base na medida de substratos *on-line* e na taxa específica de consumo, é possível a estimativa da concentração de células, inclusive imobilizadas em microcarregadores (Ducommun *et al.*, 2001).

Figura 2.2 - Esquema de um sistema de controle da vazão de alimentação com medida em *real time* (tempo real) da concentração de glicose (adaptado de Ozturk et al., 1997).

2.4 Estratégias de Controle

2.4.1 Controle Tradicional

Há várias formas de se realizar o controle de uma variável de processo. Entre elas, merecem destaque:

- Controlador *on-off*, no qual a atuação só pode assumir duas formas (ligado ou desligado). Esse tipo de controlador é utilizado, por exemplo, no controle da temperatura de estufas, nas quais há um sensor de temperatura que, caso indique um valor abaixo do desejado, faz com que uma resistência elétrica seja energizada, aquecendo o interior dela.

Nessa situação, não é possível se tomar uma ação maior ou menor, isto é, ou se aquece ou não se aquece;

b) Controlador modulado por largura de pulso (*Pulse-Width Modulation* ou PWM). Neste tipo de controle, apesar da atuação final ser também tipo *on-off*, o tempo que o atuador permanece no estado ligado dentro de um determinado ciclo pode ser ajustado continuamente, permitindo atuações de diferentes intensidades. Frequentemente o controle do pH nos biorreatores utiliza essa estratégia. Quanto maior a diferença entre o pH desejado e o medido, maior a parcela do ciclo (normalmente de alguns segundos) em que a bomba de base ou ácido fica acionada, significando maior atuação ao longo de alguns ciclos. Esse mecanismo evita que a ação de controle ultrapasse exageradamente o *set-point* (chamado de *overshoot*). Também operam desta forma alguns sistemas de controle do oxigênio dissolvido através da mistura de diferentes gases pela abertura e fechamento de válvulas solenóides;

c) Controlador em cascata, composto por uma malha mestre e uma malha escravo. É usado quando se deseja um controle mais rígido de uma variável de processo como por exemplo a temperatura do meio de cultura. Trata-se de uma configuração na qual a atuação do controlador da temperatura do processo (mestre) resume-se na prática ao envio do *set-point* para o controlador da temperatura da camisa (malha escravo), que por sua vez executará o controle desta variável (Figura 2.3);

d) Controlador P-I-D, ou Proporcional-Integral-Derivativo. Trata-se do sistema mais comum na indústria e que melhor consegue manter determinada variável controlada. Baseia-se no princípio que a ação deve ser tomada não apenas tendo-se em vista o quanto afastado se está do valor desejado (erro), mas também da soma de erros do passado (integral do erro) e de com que velocidade se aproxima deste valor (derivada do erro). Matematicamente ele pode ser expresso conforme:

$$\text{atuação} = P.\text{erro} + I. \int \text{erro}.dt + D. \frac{d \text{erro}}{dt}$$

onde atuação é a saída do controlador (a grandeza que irá para o atuador, conforme Figura 2.1), erro é a diferença entre o valor desejado (*set-point*) e o medido pelo sensor, *t* é o tempo e *P*, *I* e *D* são constantes que precisam ser ajustadas para cada sistema. Esse processo de ajuste das constantes, isto é, de busca dos valores numéricos que façam o controlador operar melhor, é chamado de sintonia do controlador P-I-D. Existem algumas formas de se executar a sintonia de um controlador, porém o procedimento mais comum é chamado Ziegler-Nichols.

No caso de ser necessário sintonizar o controlador de determinado processo, sugere-se consultar um livro texto de controle de processos (Seborg *et al.*, 2003).

Figura 2.3 - Esquema de um controle em cascata. Nele o sistema atuador do controlador escravo (aquecedor elétrico) mantém controlada a temperatura da água da camisa, num valor determinado pelo controlador mestre.

2.4.2 Modos Avançados de Controle

Para os processos químicos (sem seres vivos) foram desenvolvidos vários modos avançados de controle, alguns dos quais podem ter aplicação nos bioprocessos e em especial, nos cultivos de células animais. Destacam-se:

- Controle adaptativo.** Quando a dinâmica de um processo varia muito no seu decorrer, a definição de algumas constantes, como os valores de P, I e D, pode não se adequar para todo o cultivo, ficando o controlador sintonizado, por exemplo, no início do cultivo, mas não no final. Nessa situação, a variável de controle pode passar a oscilar muito, o que pode interferir no processo. Para esses casos, foram desenvolvidos algoritmos que buscam dados do processo capazes de executar uma sintonia durante o cultivo. Tais sistemas são chamados de controles adaptativos;
- Controle baseado em redes neurais.** Semelhantemente à modelagem conhecida como lógica difusa (*fuzzy logic*), as redes neurais utilizam uma série de dados prévios para com isso serem capazes de executar simulações do processo com alto grau de acerto, sem no entanto utilizarem modelos matemáticos formais (Chen e Rollins, 2000). Para tanto, é necessária a definição de quais são as entradas, as saídas e quantas camadas de "neurônios" serão utilizadas, o que depende do número de variáveis e dados disponíveis.

3. MONITORAMENTO DA BIOMASSA

Em todo bioprocesso, o acompanhamento da concentração de biomassa é fundamental, pois normalmente se deseja maximizar o crescimento. Além disso, a análise do consumo de substratos ou a síntese dos produtos não tem sentido se não se conhece a quantidade de células responsáveis por tal variação. É por esse motivo que se costuma utilizar velocidades específicas, como a de formação de produção.

$$\mu_P = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt}$$

onde μ_P é a velocidade específica de síntese de um dado produto, t é o tempo, X é a concentração celular e P é a concentração de produto.

Enquanto nos cultivos microbianos é comum se expressar a concentração celular como a massa seca de células por volume, nos cultivos de células animais é mais usado o número de células por volume (por exemplo, $1,3 \times 10^6$ células/mL). Para sua determinação *off-line*, são utilizadas normalmente lâminas graduadas vistas ao microscópio, como hemacitômetros e câmaras de Neubauer. Nelas, a espessura entre a lâmina e a lamínula é fixa e conhecida (tipicamente 0,1 mm) e há demarcações pela lâmina que permitem a contagem do número de células em determinada área, que multiplicada pela espessura, determina um volume. Com o auxílio de corantes (como o azul de *Trypan*), é possível ainda a determinação da viabilidade celular. Nesse caso, ela é expressa como a percentagem de células viáveis, ou seja, que mantêm a membrana intacta e não permitem a entrada do corante e, portanto, não ficam coradas (para detalhes sobre a metodologia de contagem sugere-se a leitura de um livro-texto como Freshney (2005)).

Apesar da contagem em hemacitômetro ser o método mais comum de determinação da concentração celular, ela não permite que se tome alguma ação no processo durante o cultivo, pois é tipicamente uma medida *off-line*. Nos casos em que se deseja a estimativa da biomassa em tempo real, costuma-se utilizar uma medida indireta, como a densidade óptica, ou turbidez. Pode-se correlacionar a absorbância medida por um sensor inserido no biorreator com a concentração de células (Wu *et al.*, 1995; Olsson e Nielsen, 1997; Konstantinov *et al.*, 1994). Diversos sensores estão comercialmente disponíveis para essa função, destacando-se aqueles que medem luz refletida (Aquasant AS81/44 e Metler FSC402) e luz transmitida (ASR Laser Turbidimeter). Sensores ópticos estão sendo usados para monitoramento de outras grandezas, inclusive em pequenos biorreatores (Kostov *et al.*, 2001).

Outras formas de estimativa on-line da concentração celular são:

- a) Inserção de um microscópio diretamente no meio de cultivo, utilizando-se um *software* de análise de imagens para estimar a concentração e tamanho das células de cada imagem adquirida (Joeris *et al.*, 2002; Gueza *et al.*, 2004);
- b) Medida da capacitância do meio de cultivo, que se relaciona com a concentração de células viáveis, pois cada célula com membrana intacta se comporta como um pequeno capacitor elétrico (Dowd *et al.*, 2003);
- c) Medida de fluorescência do meio, considerando-se constante o conteúdo, por célula, de substâncias fluoróforas como o NAD(P)H.

Além da estimativa da concentração celular, outros parâmetros relacionados à biomassa podem ser obtidos, porém, até o presente momento, se limitam a medidas *off-line*. Entre eles, pode-se citar:

- a) Distribuição do tamanho das células, baseado no contador Coulter (Beckman Coulter, Estados Unidos) ou equipamentos semelhantes como o Casy TTC (Schärfe System GmbH, Alemanha), no qual um fluxo de uma suspensão de células bastante diluído passa por um capilar com dois eletrodos. Cada célula que percorre o capilar causa uma perturbação na corrente elétrica, cuja intensidade é medida. Dessa forma, pode-se não só contar células por volume, como estimar a distribuição de tamanho, graças a uma calibração prévia que indica um diâmetro de célula para cada intensidade da perturbação elétrica (Seewöster e Lehmann, 1997). Além disso, a análise digital de imagens em equipamentos como o Cedex-Innovatis também permite a determinação da distribuição de tamanhos de células *off-line*;
- b) Citometria de fluxo, método através do qual é possível se contar quais células apresentam determinada característica (Davey e Kell, 1996; Brezinsky *et al.*, 2003). O método conhecido por FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) pode ser considerado uma variante da citometria de fluxo, no qual além de se contabilizar cada célula com determinada característica (fluorescente), pode-se separá-la das demais, criando sub-populações com características semelhantes (Figura 3.1) (Herzenberg *et al.*, 2000).

A)

B)

Figura 3.1 - Exemplo de análise de células de inseto que expressam a proteína fluorescente verde (GFP), obtida por aparelho de citometria de fluxo tipo FACS. A) a ordenada mostra a dispersão lateral de luz de cada célula (*Side Scatter Count*, ou SSC, que avalia a granulosidade intracelular (partículas e organelas intracelulares)) enquanto que a abscissa indica a dispersão frontal (*Frontal Scatter Count*, ou FSC), que avalia o volume (tamanho) celular. Como cada célula se posiciona em parte da dispersão, é possível se quantificar suas subpopulações. B) o histograma mostra a distribuição do número de células para cada intensidade de luz dispersa, permitindo-se definir limites e determinar parcelas da população (figura gentilmente cedida por Mariza A. Gerdulo dos Santos).

A seguir são apresentados alguns trabalhos desenvolvidos com enfoque na estimativa da concentração celular, seja de modo *on-line* ou *off-line*. Inicialmente há uma sistematização da medida da viabilidade de células de inseto através do método de exclusão por azul de tripan e sua comparação com outras células, fruto de problemas enfrentados com essa medida particularmente se demora-se um pouco mais entre a preparação da lâmina e sua contagem. Em seguida, há um trabalho que estuda a influência da variação da osmolalidade do meio de cultura de células de hibridoma sobre diversos parâmetros, inclusive o diâmetro médio das células. Para essa medida, é utilizado um aparelho *off-line* chamado Casy, que utiliza o mesmo princípio do Coulter Counter, e são feitas medidas *on-line* com um aparelho desenvolvido inicialmente para acompanhar o aumento do tamanho das partículas em processos de cristalização e polimerização. Por fim, são apresentados dois trabalhos que utilizam micro-organismos, um usando técnicas de análise de imagens e outro espectroscopia de infravermelho próximo.

3.1 INFLUÊNCIA DO TEMPO NA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS ANIMAIS PELO MÉTODO COM AZUL DE TRIPAN

Isabela Rupp Kavanagh, Paula Bruzadelle Vieira e Aldo Tonso
Universidade de São Paulo – Depto. de Engenharia Química

Como visto anteriormente, em cultivos com células animais costuma-se quantificar a concentração celular por contagem, ao invés da determinação da massa seca. Aproveitando-se que se faz uma visualização das células ao microscópio, costuma-se adicionar um corante (azul de Tripán) que permite a determinação da viabilidade celular.

Resumo

Um método convencional para a determinação da viabilidade celular é a utilização de azul de Tripán. Este método é bastante utilizado, porém há indícios de que as medidas com células de inseto sejam mais imprecisas que com células de mamífero. Nesse sentido, procedeu-se um estudo da influência do intervalo de tempo entre cada etapa do processo de medida da viabilidade, a saber: colocação da amostra em eppendorf, adição de corante e montagem da câmara e sua colocação sob a luz do microscópio. Realizaram-se ensaios com células de mamífero CHO e de insetos S2 e Sf9. Os resultados mostram que a queda na viabilidade das células CHO é desprezível e pequena nas células Sf9, porém expressiva nas células S2, em especial após as células serem montadas na câmara.

INTRODUÇÃO

A tecnologia de cultivos de células animais, entre as quais as de mamíferos ou de insetos, vem sendo utilizada há muito tempo, especialmente na produção de vacinas humanas e veterinárias, no entanto é mais recente seu emprego na indústria farmacêutica para a produção de proteínas terapêuticas (Tonso, 2000). Essas células cultivadas em laboratório possuem exigências diferentes daquelas encontradas quando integradas a um organismo vivo. Tais exigências, fundamentais para a sobrevivência celular, também diferem de célula para célula, conforme a espécie animal que a originou, os tecidos de origem ou o grau de adaptação destas células em cultura. Em geral, os processos de cultivo celular podem ser divididos em dois grupos, de acordo com o tipo de célula utilizado, o de células aderentes ou em suspensão (Pinto, 2007).

As células de inseto ou de mamífero, em geral, são cultivadas em garrafas T, frascos Schott ou em Spinners. Células de insetos, geralmente, são cultivadas em suspensão. Em vista disto, não necessitam de suporte sólido, desenvolvendo-se livremente no meio de cultura. As células são mantidas através de repiques sucessivos, pela retirada do meio saturado por metabólicos e desprovido de nutrientes, e a subsequente adição de meio fresco (Batista, 2007).

Destacam-se também entre os fatores que influenciam o cultivo celular a temperatura, o pH, a pressão osmótica, a agitação, e a concentração de oxigênio dissolvido (Mitsuhashi, 1989). A combinação de fatores variados determina o sucesso do cultivo *in vitro* das células, tanto de mamíferos quanto de insetos.

Células de mamíferos apresentam uma temperatura ótima para o desenvolvimento celular em torno de 37°C, enquanto que células de insetos desenvolvem-se na faixa de 27 a 29°C, dependendo da linhagem (Batista, 2007).

Para este trabalho serão utilizadas células de inseto e de mamífero. As células de inseto utilizadas são as linhagens S2 e Sf9 cultivadas em suspensão e a linhagem de células de mamífero é a CHO (Chinese Hamster Ovary), aderente.

Normalmente, a determinação da concentração celular é realizada utilizando uma câmara de Neubauer (hemacitômetro), sendo as células contadas com a ajuda de um microscópio óptico. O método usualmente empregado para a determinação da viabilidade celular é o de exclusão por corante azul de Tripan. Neste método as células mortas absorvem o corante devido a falhas em sua membrana, as quais se tornam azuladas diferenciando-se das células viáveis (Butler, 2004). Porém, há indícios de que algumas células, com o passar do tempo, se deterioram e tornam-se suscetível a este corante, prejudicando a determinação correta da viabilidade celular (Freshney, 1994). Em trabalhos recentes com células S2, verificou-se dificuldade para a determinação da viabilidade celular desta linhagem (Yokomizo *et al.*, 2007; Pamboukian *et al.*, 2008).

Com o objetivo de confirmar essas hipóteses, neste trabalho estudou-se o efeito do tempo na determinação da viabilidade celular por exclusão com azul de Tripan sobre células animais, em diferentes condições de medida. Para isto, diversos parâmetros foram analisados e comparados entre si, como o efeito da adição do corante, o tempo para a contagem e a ação da luz do microscópio sobre as células.

MATERIAL E MÉTODOS

Todas as análises foram realizadas no LCA (Laboratório de Células Animais, Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP), numa temperatura ambiente controlada em 23°C. As amostras das células foram retiradas dos Schotts ou garrafas T.

- Meios de cultura

Utilizaram-se meios previamente estabelecidos para cada linhagem de celular. O meio SF-900II (Invitrogen) sem soro foi utilizado para o cultivo das linhagens de células de inseto S2 e Sf9. O α -MEM com 10% de soro fetal bovino foi usado para o crescimento dos clones aderentes da CHO recombinante.

- Linhagens celulares

Foi utilizada a célula S2MtGPV-H(Mc7), transfectada no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan a partir da linhagem S2 (*Drosophila melanogaster*) para a expressão da glicoproteína GPV do vírus da raiva, utilizando um promotor indutível de metalotioneína.

A linhagem de células de inseto Sf9 é procedente de células de ovário da *Spodoptera frugiperda* (uma mariposa da ordem Lepidoptera), tendo sido compradas da GIBCO.

A linhagem celular CHO dependente de ancoragem foi geneticamente modificada no Centro de Biologia Molecular do IPEN-CNEN/SP. Essa célula expressa a prolactina humana (hPRL), que é um hormônio protéico primariamente secretado pela hipófise anterior. Este hormônio é mais bem conhecido por sua estimulação da lactação, crescimento e desenvolvimento da glândula mamária.

- Cultivos celulares

Para realização dos experimentos envolvendo a viabilidade celular, foram necessários cultivos destas células. Para as células de inseto estes cultivos foram realizados em garrafas T ou cultivos em Schott, ambos a temperatura de 28°C. Nos cultivos em Schott as células foram agitadas num frequência de agitação de 100rpm.

O cultivo das células de mamíferos (CHO) foi realizado apenas em garrafas T, instaladas em uma estufa incubadora com 5% de CO₂ numa temperatura de 37°C (modelo 5410, NAPCO, EUA).

- Determinação da viabilidade celular

O procedimento tradicional é iniciado retirando-se uma amostra contendo 90 μ L e adicionando 10 μ L de azul de Tripan (0,4%, Sigma), em seguida é necessária uma homogeneização da mistura e 10 μ L serão depositados cuidadosamente entre a lâminula e o hemacitômetro (Figura 1). Com a ajuda do microscópio, determinou-se o número de células e a sua viabilidade celular. As análises foram feitas em duplicata, em cada um foram contados 4 quadrantes (8 quadrantes/câmara). O número de células por quadrante variou entre 20-40.

Figura 1 - Esquema de uso de um hemacitômetro, indicando a forma de distribuição da amostra na lâmina (A) e visualização superior do gradeamento da lâmina (B), indicando um quadrado de 3mm x 3mm dividido em 9 quadrados menores com 1mm², equivalendo ao volume de 0,1mm³ cada.

O método utilizado para a retirada da amostra de células aderidas é um pouco mais complexo que os da células em suspensão. Primeiramente, há a necessidade de um tratamento enzimático, que geralmente é realizado com tripsina (0,25%, Cultilab). Esta enzima age permitindo o desprendimento das células aderentes nos frascos de cultivo e desagrega células entre si através de sua ação proteolítica sobre proteínas intercelulares e, ainda, altera a estabilidade das membranas. Para neutralizar a ação da tripsina, adiciona-se 5 mL de meio de cultura no frasco (a mesma quantidade de tripsina adicionada na garrafa T). Depois toda a solução é centrifugada e o sobrenadante é descartado. Por fim, o sedimentado é ressuspensionado em meio de cultivo e é feita a contagem celular com azul Tripan como descrito anteriormente (Rodas *et al.*, 2005).

Para células de inseto (suspensão), basta retirar uma amostra e fazer a contagem celular com a adição do corante.

Para estudar a ação do tempo na determinação da viabilidade estimada pelo método de exclusão do corante azul de Tripan nos cultivos celulares, o procedimento tradicional será dividido em três etapas, e em cada caso, uma etapa será retida por diferentes intervalos de tempo, permitindo a análise da influência de cada etapa. Todos estes seguiram o mesmo conjunto de intervalos de tempo de espera: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos.

1) Análise do tempo sobre células dentro do eppendorf

Para análise de comparação, foi retirada uma amostra de uma cultura celular e colocada em um eppendorf sem a adição do corante. O azul de Tripan foi adicionado apenas na hora da contagem, ou seja, imediatamente antes de colocar a amostra na câmara de Neubauer nos diferentes períodos de tempo. Assim, pode-se avaliar a sua viabilidade não pela influência do corante, mas sim pelo fato da amostra permanecer num eppendorf por um período de tempo numa temperatura que não é a ideal para as células.

2) Análise do tempo de ação do azul de Tripan nas células dentro do eppendorf

Para analisar o tempo de ação do azul de Tripan, foi retirada uma amostra de uma cultura celular e colocada em um eppendorf e imediatamente adicionou-se o corante. Colocou-se na Câmara de Neubauer para contagem após o intervalo de tempo em estudo. Assim, pode-se observar se houve alterações de viabilidade celular durante estes períodos de tempo da ação do azul de Tripan sobre as células dentro do eppendorf. A diferença do primeiro procedimento é que nesta análise as células permanecem com o corante dentro do eppendorf.

3) Análise do tempo na câmara de Neubauer sob a ação da luz do microscópio

Para analisar se o fato das células estarem em uma câmara montada e sob a ação da luz do microscópio altera a medida da viabilidade celular, foi retirada uma amostra da cultura celular e adicionado o azul de Tripan. Colocou-se na Câmara de Neubauer e fez-se a primeira contagem imediatamente. Deixou-se a câmara de Neubauer no microscópio com a luz incidindo sobre a amostra de células e fez-se a contagem nos diferentes tempos. Assim, foi possível analisar as contagens e verificar se houve alterações na viabilidade celular na cultura analisada.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As análises realizadas com as células S2 (Figura 2) mostraram que as células dentro do eppendorf sem a adição do azul de Tripan, praticamente, não perdem sua viabilidade, indicando que a eventual falta de oxigênio em 60 minutos e a temperatura ambiente exercem

pouca influência na viabilidade. Com a adição do corante, as células dentro do eppendorf apresentam queda na viabilidade celular em 1 hora (de 87% a 68%). Isso indica que a perda de viabilidade nesse caso pode ser pela influência do azul de Tripan.

No entanto, a situação mais crítica foi com as células sobre a câmara de Neubauer com ação da luz do microscópio. Nesta condição as células perdem intensamente a sua viabilidade, podendo isso ser observado num intervalo curto de tempo.

Figura 2: Análise da viabilidade das células S2

Os testes com as células Sf9 (Figura 3) mostraram que, principalmente em duas situações, há uma perda da viabilidade celular ao longo do tempo. A maior influência do azul de Tripan foi na câmara sobre a luz do microscópio (de 90% a 68%). Observa-se também uma perda de viabilidade no teste das células no eppendorf com adição do corante (de 90% a 74%). Na análise das células no eppendorf sem o corante esta perda de viabilidade é desprezível.

Figura 3: Análise da viabilidade das células Sf9.

A viabilidade das células CHO, praticamente, não é alterada nos resultados de todas as análises realizadas. Estas células não sofreram a influência do azul de Tripán, como mostrado na Figura 4

Figura 4 Análise da viabilidade das células CHO.

Os resultados apresentados comprovam uma impressão subjetiva de diversos pesquisadores que relataram dificuldade de estimativa da viabilidade de células S2 de inseto, quando previamente acostumados a trabalhar com células de mamífero. A medida da viabilidade das células CHO praticamente não sofreu alterações com o tempo, enquanto que

com células Sf9, observou-se uma queda. No entanto, com as células S2 a viabilidade cai sistematicamente, devido tanto à ação do corante, como ao fato das células estarem na câmara montada. Algumas hipóteses levantadas para a explicação desse segundo fato são: falta de oxigênio disponível para as células na câmara ou eventual ressecamento das células sob a luz do microscópio.

CONCLUSÕES

O método de determinação da viabilidade celular por exclusão de azul de Tripan pode fornecer resultados imprecisos, dependendo da linhagem celular cultivada. Os resultados mostram que a queda com o tempo na viabilidade das células CHO é desprezível e pequena nas células Sf9, porém expressiva nas células S2, em especial após as células serem montadas na câmara.

3.2 EFEITO DA OSMOLALIDADE EM CULTIVOS DE HIBRIDOMA EM PERFUSÃO

Aldo Tonso¹, Willibaldo Schmidell¹, Ricaredo Matanguihan², Konstantin Konstantinov²

¹Depto. Eng. Química, USP, ²Bayer Corp., Berkeley, EUA

RESUMO

Neste trabalho foi estudado o efeito da osmolalidade no crescimento de um hibridoma murino (A10G10) e na produção de anticorpo monoclonal. Osmolalidade é uma variável importante no cultivo de células animais, embora normalmente não otimizada. Ensaios preliminares em garrafas roller indicaram que betaína tem a capacidade de proteger as células contra stress hiperosmótico. Um cultivo de longa duração (90 dias) em perfusão com alta concentração celular (em torno de 20 milhões de células por mL) foi utilizado para estudar o efeito em regime contínuo, empregando betaína como osmo-protetor. A osmolalidade foi variada de 320 a 470 mmol/kg, através da adição de NaCl ao meio. Em meio com maior osmolalidade, as células aumentaram de tamanho e de velocidades específicas de produção, respiração e consumo de glicose, baseadas em número de células. No entanto, quando os parâmetros específicos foram calculados tendo como base o volume celular total, tais variações não foram tão significativas. Variações no tamanho das células foram monitoradas on-line através de uma sonda de varredura a laser, chamada Lasentec FBRM, e comparadas com medidas off-line.

INTRODUÇÃO

Cultivos em perfusão com células animais têm sido intensamente empregados na síntese de proteínas de alto valor agregado, em especial anticorpos monoclonais por hibridomas, tornando possível produção de até kilogramas de anticorpo purificado (Lindl, 1995).

Konstantinov (1996) salienta a importância do conhecimento do estado fisiológico da célula como forma de garantir maior eficiência do processo e consequentemente rendimento do produto. Desta forma, tornam-se ainda mais valiosas as informações do processo em tempo real, que permitam não só sua melhor compreensão, como atuação nele (Konstantinov et al., 1994).

Dentre as variáveis de processo a serem estudadas, a osmolalidade (a molalidade de uma substância não iônica que apresenta a mesma pressão osmótica) tem grande influência no

processo, porém na maioria das vezes não é monitorada e muito menos otimizada (Lin et al., 1999; Cherlet e Marc, 1999). A osmolalidade tem influência em diversos parâmetros no crescimento de hibridoma, inclusive no tamanho da célula (Ozturk e Pallson, 1991). O monitoramento do tamanho celular neste tipo de processo passa a ter especial importância, pois em cultivos de células animais costuma-se parametrizar as velocidades específicas de consumo e produção através da concentração celular expressa em número de células por volume de meio de cultura. Dessa forma, células maiores podem estar gerando velocidades superiores pelo simples fato de se estar trabalhando com maior volume celular, e não devido a outro fator.

No presente trabalho, além de analisar o efeito direto da osmolalidade no cultivo de um hibridoma e produção de um anticorpo, tem-se o objetivo de estabelecer uma base de cálculo representativa, para análise dos resultados em meios hiperosmóticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Célula e meio de cultura

Utilizou-se um hibridoma murino (linhagem A10G10), obtido da fusão de um mieloma com um linfócito capaz de exprimir o IgG anti-TNF (fator de necrose tumoral), desenvolvido na Bayer Corp. (Berkeley, CA, EUA) (patente Miles, 1993).

O meio de cultura utilizado foi baseado na mistura em partes iguais dos meios DMEM e F12, usualmente utilizada em cultivos de células (Butler, 1991), com 22mM de glicose e 9mM de glutamina. A osmolalidade desejada foi obtida com a simples adição de NaCl ao meio padrão, cuja osmolalidade é 290mmol/kg. Aos meios com osmolalidade superior a 400mmol/kg foi adicionado 15mM de betaína.

Ensaio em garrafas roller

Utilizou-se garrafas com 300mL de meio, inoculadas com 0,5E6 células/mL, subcultivadas várias vezes a cada 48 horas.

Sistema de fermentação

Foi utilizado um biorreator de 15L (volume útil de 12L) da Applikon (Holanda), acoplado a uma unidade de controle digital DCU (B.Braun, Alemanha). Para monitoramento da densidade ótica, empregou-se um turbidímetro da Aquasant (Suíça) instalado num suporte retrátil (Matanguihan et al., 1999).

Atingida a concentração celular desejada (20E6 células/mL), manteve-se o sistema em perfusão (cultivo contínuo com retenção e recirculação externa de células), controlando-se a

concentração celular (estimada a partir da densidade ótica) através do acionamento automático de uma bomba de purga.

Oxigênio era transferido ao meio de cultura por difusão através de uma tubulação de silicone (livre de bolhas) e a concentração de oxigênio dissolvido era controlada pela variação da pressão de oxigênio puro nesta tubulação.

Condições de operação: frequência de agitação = 80rpm, temperatura = 37°C, pH = 6,80, oxigênio dissolvido = 50% da saturação com ar, vazão específica de alimentação = 10dia⁻¹ e vazão de recirculação 86L/dia.

Análises

Concentração celular viável (X) e total era determinada por contagem no hemacitômetro, através da técnica de coloração com azul de tripan. A concentração do anticorpo murino IgG anti-TNF foi determinada por método nefelométrico (medida de turbidez após reação específica antígeno-anticorpo). A concentração de glicose foi determinada utilizando YSI 2700 (Yellow Springs Instruments, Ohio), enquanto que para osmolalidade utilizava-se um osmômetro de pressão de vapor, modelo 5500 (Wescor, Utah). Determinava-se o diâmetro e volume celular médios através do equipamento Casy TTC (Schärfe System, Alemanha), cujo princípio de funcionamento é semelhante ao contador Coulter (Coulter, 1956). Utilizou-se o aparelho Lasentec FBRM (Lasentec, Washington) para estimativa on-line da concentração celular e distribuição de tamanho, através da análise da intensidade e duração da reflexão provocada pelas células ao serem iluminadas por um feixe rotativo de luz laser (Tonso et al., 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio em garrafas roller

Com o intuito de determinar valores máximos de osmolalidade para utilização no biorreator, assim como de analisar a eficiência da adição de betaína (15mM) como osmo-protetor para as células, realizou-se uma série de ensaios em garrafas roller. Conforme se observa na Figura 1, o valor máximo da velocidade específica de produção do anticorpo foi atingido com osmolalidade de 420mmol/kg, sem a adição de betaína, porém com crescimento baixo. Com base nesses resultados, optou-se pela adição de betaína em meios com osmolalidade superior a 400mmol/kg e fixou-se um limite para a osmolalidade no biorreator, de 470mmol/kg.

Figura 1: Concentração celular viável após 48h de subcultivo (X) e velocidade específica de produção de anti-TNF (μ_P) (médias após várias passagens) em função da osmolalidade do meio, com e sem a adição de betaina, nos cultivos em garrafas roller

Ensaio em Biorreator

Um ensaio em biorreator com 90 dias de duração foi realizado para estudar o efeito da osmolalidade em cultivo contínuo. Na Figura 2 observa-se que, após a fase de aumento de concentração celular (cerca de 10 dias), esta foi controlada em torno de 20E6 células/mL, e estudou-se o comportamento em fases com diferentes osmolalidades. Iniciando-se com a osmolalidade do soro sanguíneo (em torno de 320mmol/kg), elevou-se em etapas a osmolalidade até atingir o valor de 470mmol/kg, baseados nos ensaios em garrafas roller. Em seguida, retornou-se a 320mmol/kg. Em cada fase (barras verticais), a média dos valores foi calculada desprezando-se os primeiros pontos (transientes). A viabilidade celular esteve durante todo o ensaio em torno de 90%.

Figura 2: Concentração celular viável (X), viabilidade celular (viab) e osmolalidade do meio de cultura (osm) ao longo do cultivo em biorreator

A velocidade específica de crescimento (μ) foi calculada para cada dia e as médias de cada fase do cultivo são apresentadas na Figura 3, juntamente com a velocidade específica de consumo de glicose (μ_{Glic}). Para cada fase, foram também calculados os desvios padrão dos valores, apresentados no gráficos como barra de erros. Observa-se que a velocidade específica de crescimento não variou significativamente com a osmolalidade, enquanto que a velocidade específica de consumo de glicose aumentou nas fases de maior osmolalidade, indicando um maior gasto de energia como reação ao stress hiperosmótico.

Figura 3: Velocidade específica (por número de células) de crescimento (μ) e de consumo de glicose (μ_{Glic}) em função da osmolalidade do meio

Como forma de se estimar a atividade respiratória, monitorou-se a pressão do oxigênio na tubulação de silicone, tanto na entrada como na saída. Tendo em vista que a transferência de oxigênio ao meio de cultivo é resultado da difusão do oxigênio pela membrana de silicone (Lee et al., 1990) e, considerando-se que a fração de oxigênio na saída é quase igual a da entrada (isto é, oxigênio puro), a força motriz passa a ser proporcional à diferença entre a pressão parcial do oxigênio na membrana de silicone e a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura. Esta simplificação é válida enquanto o coeficiente de transferência de oxigênio se mantiver constante. Como se utilizou oxigênio pressurizado (cerca de 2,5 atm), esta diferença praticamente independe da concentração de oxigênio dissolvido, e a transferência é aproximadamente proporcional à pressão média do oxigênio na tubulação de silicone. Como todo oxigênio transferido é consumido (regime quase estacionário), variações na velocidade de consumo de oxigênio podem ser estimadas através de variações na pressão média na tubulação de silicone.

Figura 4: Pressão média na tubulação de silicone (Pm) e concentração de produto (P) em função da osmolalidade do meio (Obs: UA=unidade arbitrária)

A Figura 4 apresenta a pressão média nas várias fases do ensaio, onde se observa que com o aumento da osmolalidade, a pressão aumentou. Tendo em vista a pequena variação da concentração celular média, isto indica uma maior velocidade específica de respiração como consequência do aumento da osmolalidade. Pode-se observar ainda que ao se passar da fase com osmolalidade de 470mmol/kg para 320mmol/kg, a pressão média caiu de 1,84 para 1,45atm, muito acima do valor registrado anteriormente para osmolalidade de 320mmol/kg (0,86atm), indicando que ao longo de 71 dias de cultivo a tubulação de silicone foi se obstruindo, diminuindo o coeficiente de transferência e exigindo uma maior pressão para garantir o mesmo suprimento de oxigênio às células.

A Figura 4 apresenta ainda o título do anticorpo monoclonal, indicando uma maior concentração em função de um aumento da osmolalidade. Calculou-se ainda a velocidade específica de produção (μ_P), que será apresentada à frente.

Além de parâmetros diretamente ligados ao metabolismo, acompanhou-se durante o ensaio o tamanho das células, através do levantamento da distribuição de diâmetro e volume celular. A Figura 5 mostra que existe uma nítida relação entre a osmolalidade e o tamanho celular. Exposta a um meio hiperosmótico, a reação da célula nas primeiras horas é a redução de seu diâmetro, devido à perda de solvente (água) para o meio. No entanto, em cultivo contínuo, as células se adaptam a esta situação, tendo como consequência um aumento do diâmetro em relação ao meio de menor osmolalidade, devido a um mecanismo ainda não conhecido, como relatado por Ozturk e Palsson (1991).

Figura 5: Diâmetro e volume médios da célula em função da osmolaridade do meio

Para o levantamento de dados de tamanho celular, foi utilizado Casy TTC, cuja metodologia de uso exige um pré-tratamento da amostra que inclui diluição de cerca de 2500 vezes. Como algumas linhagens celulares apresentam dentro do biorreator um elevado grau de agregação, esta manipulação da amostra pode conduzir a resultados não representativos das reais condições do processo, conduzindo a conclusões errôneas.

Idealmente, busca-se uma forma de estimar o tamanho das células através de uma sonda inserida diretamente no fermentador.

Neste trabalho foi desenvolvido o emprego da sonda Lasentec FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement), até então utilizada basicamente no monitoramento de processos de cristalização e polimerização (Dijkstra *et al.*, 1996). Jeffers e colaboradores utilizaram um modelo semelhante (M400LF) desta sonda para quantificação de concentração de células de plantas em suspensão (Jeffersk *et al.*, 2003).

Figure 6 - Diagrama esquemático da sonda Lasentec FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement).

Figura 7 - Perfil em função do tempo da estimativa de concentração celular por diferentes metodologias em ensaio com células BHK produtoras de fator VIII de coagulação.

A Figura 7 apresenta os resultados preliminares obtidos pela sonda Lasentec inserida no biorreator, em comparação com resultados off-line do Casy, indicando uma satisfatória correlação entre ambas.

Figura 8: Comprimento médio das cordas medidas on-line pelo Lasentec FBRM em função do diâmetro médio medido off-line pelo Casy TTC

Com base nos valores de volume celular, ou biovolume, recalculou-se a velocidade específica de produção (μ_P), utilizando como denominador não a concentração de células (quantidade de células/volume de meio), mas em seu lugar o biovolume (volume de células/volume de meio). Os valores obtidos ($\mu_{P[\text{biovol}]}$) são apresentados na Figura 9, juntamente aos valores de μ_P , em função da osmolalidade. Enquanto que μ_P claramente aumenta com o aumento da osmolalidade, tal tendência não se observa com $\mu_{P[\text{biovol}]}$. Pode-se explicar este fato considerando que o aumento de μ_P com o aumento da osmolalidade é ilusório, pois há maior produção por células maiores, mas por unidade de volume de célula (e indiretamente por unidade de massa celular) a produção se mantém a mesma em alta osmolalidade.

Cálculos semelhantes com a velocidade específica de consumo de glicose apresentam a mesma conclusão.

Tal análise reforça a importância de se poder estimar o tamanho das células in-situ e em tempo real, especialmente em processos que possam provocar variações significativas no biovolume.

Figura 9 Velocidades específicas de produção calculada com base no número de células (μ_P) e com base no biovolume ($\mu_{P[\text{biovol}]}$) em função da osmolalidade do meio (Obs: UA=unidade arbitrária)

CONCLUSÕES

O presente trabalho apresenta os principais efeitos no cultivo de um hibridoma, quando submetido a variações na osmolalidade do meio de cultivo. Além do aumento no consumo de glicose e provável aumento na velocidade de respiração, o aumento da osmolalidade gerou aumento na produção do anticorpo monoclonal antiTNF e aumento nas dimensões físicas da

célula (diâmetro e volume). Calculando-se a velocidade de produção em função do volume celular, ao invés da tradicional concentração (expressa em quantidade de células por volume de meio), observa-se que não há clara relação entre osmolalidade e produção. Tal fato deve ser levado em conta no desenvolvimento de um processo e sua implementação na indústria. Essa análise reforça a importância de se contar com sólidas ferramentas de monitoramento do processo.

3.3 Análise de imagens

A análise de imagens é uma técnica que permite a obtenção de várias quantificações a partir do processamento de uma imagem adquirida, por exemplo, por um microscópio. Aplicada à ciência, consistiu, durante muito tempo, simplesmente na observação de algumas fotos e imagens vistas através de um microscópio sendo, geralmente, utilizada para contagens e medições simples, pois só essas eram permitidas, dada a simplicidade do método. A conexão do microscópio ao computador permitiu a expansão do uso da análise de imagens, viabilizando novos recursos, tanto de transformação quanto de medição da imagem, a partir de sua digitalização. A análise digital de imagens tem os mesmos objetivos da análise visual de imagens (obter alguma informação a partir de uma imagem de microscópio), somando-se o fato que o computador torna a digital bem mais rápida, ampla (novos parâmetros de medida passam a ser permitidos) e com maior precisão que a visual. Portanto, a nova análise de imagens é de grande eficiência e utilidade dentro do monitoramento de bioprocessos, pois permite uma amostragem maior e de valores mais precisos, levando a estatísticas mais confiáveis.

O trabalho a seguir desenvolveu uma rotina para classificação automática de fungos filamentosos em suas principais apresentações morfológicas: hifas, clumps ou pellets. Apesar de não se tratar de células animais, a ferramenta tem grande potencial de aplicação com esses seres, principalmente na estimativa da distribuição de diâmetros celulares, ao se considerar cada célula uma esfera.

AUTOMAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ATRAVÉS DE UM SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGENS

Heloisa G. Neves; Daniela G. Pereira; Beatriz V. Kilikian; Aldo Tonso
Laboratório de Engenharia Bioquímica, DEQ/Escola Politécnica da USP

RESUMO

De acordo com vários trabalhos, a morfologia de fungos filamentosos é fator determinante na produção de metabólitos, sendo por isso sua classificação de suma importância. Para tornar essa análise mais rápida e reprodutível, foi desenvolvida uma macro dentro de um software de

análise de imagens, possibilitando uma classificação automática, de acordo com parâmetros de medida previamente definidos, que fazem boa distinção entre as três classes: hifas, clumps e pellets. Na macro desenvolvida, cabe ao operador somente entrar com os dados do ensaio e fazer a distinção entre as hifas e impurezas da lâmina, sendo o resto da análise feita pelo computador. Isso torna o programa, além de rápido, imparcial e utilizável por operadores com pouco conhecimento de análise digital de imagens ou morfologia de fungos. O programa desenvolvido foi testado e o erro de classificação apresentado por ele foi satisfatório (6%).

INTRODUÇÃO

Diferentes morfologias de fungos filamentosos são produzidas em processos fermentativos em meio líquido: hifas (filamentos dispersos), *clumps* (pequenos aglomerados) e *pellets* (aglomerados maiores e mais densos), conforme mostra a Figura 1 (Packer; Thomas, 1990). A importância de se classificar essas formas de crescimento do microrganismo decorre do fato da morfologia do fungo estar diretamente relacionada à sua capacidade de produzir compostos de interesse industrial (Wongwicharn *et al.*, 1999; Pamboukian *et al.*, 1998).

No desenvolvimento do processo de cultivo de *Monascus* para a produção de corante para a indústria alimentícia, a importância de se classificar a morfologia dos microorganismos deve-se também ao fato de que, quando na forma de pellet, existe uma dificuldade de penetração de nutrientes e gases à parte mais interna do micélio e, nessas condições, o *Monascus purpureus* produz também uma substância anticolesterolêmica.

Figura 1: Classes morfológicas de fungos

Para se classificar a morfologia do *Monascus*, é necessário que se desenvolva um método prático e confiável, de modo a se relacionar as condições de fermentação (composição e pH do meio, oxigenação e frequência de agitação) à morfologia do fungo e produção do pigmento vermelho.

A análise de imagens consiste tradicionalmente apenas na observação visual diretamente ao microscópio ou através de fotos, sendo que poucas medidas podem ser efetuadas. Com a utilização de um computador acoplado ao microscópio e um programa específico para análise de imagens, pode-se automatizar a classificação dos fungos (objetos das imagens) em suas diferentes morfologias e em seguida se obter uma série de medidas (parâmetros) úteis na análise de um processo. Desta forma, além de uma classificação meramente qualitativa, pode-se executar uma baseada em parâmetros quantitativos.

O objetivo do presente trabalho é a busca de uma maior automação do processo de análise de imagens, facilitando a classificação morfológica do cultivo de *Monascus*.

METODOLOGIA

Cultivos em biorreator

Os ensaios com *Monascus purpureus* foram realizados em meio semi-sintético a base de glicose (10 g/L) em biorreator Bioflo III (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) com 4 L de volume útil. Em todos os cultivos, a temperatura foi mantida constante a 30 °C, o pH em 5,0 $\pm$ 0,3, e a frequência de agitação foi ajustada em 500 e 700 rpm. A vazão de aeração (tipicamente 4 L/min) e sua composição foram controladas por fluxômetros de massa.

Preparo da lâmina

Uma pequena amostra do caldo fermentativo é coletada e diluída, de modo a evitar a sobreposição de fungos na lâmina. Dessa amostra diluída, 40 μ L são espalhados pela lâmina e, em seguida, secados e fixados ao fogo. A lâmina já seca é corada com uma solução de azul de metileno (3 g/L em álcool), por 10 minutos, sendo então o excesso de corante retirado com água corrente. Após secagem, a lâmina está pronta para ser analisada.

Analisador de imagens

O equipamento utilizado é composto por um microscópio óptico DM/LS (Leica, Wetzlar, Alemanha) acoplado através de uma câmera de vídeo DXC-950P (Sony, Tokio, Japão) a um

analisador de imagens Q500MC (Leica, Londres, Grã-Bretanha), composto por um computador PC Q550IW e o software de análise de imagens QWin500, com a ferramenta Quips para desenvolvimento das macros.

Etapas básicas da análise de imagens

A análise de imagens consiste em alguns passos básicos (Chermant, 2001), conforme pode ser acompanhado pela Figura 2:

2.1. Preparação e aquisição da imagem:

As lâminas com os microorganismos que darão origem à imagem a ser analisada devem ter um método uniforme de preparação, pois, quanto mais uniforme for este, mais fácil será o desenvolvimento da rotina de análise de imagens, tendo em vista que essa é melhor quando mais reprodutiva.

Através da câmera de vídeo, a imagem é digitalizada no computador, em tons de cinza. Também seria possível trabalhar com a imagem colorida, mas não é necessário, pois a imagem colorida nos levaria aos mesmos resultados, ocupando muito mais memória para o seu armazenamento. Uma vez que a imagem foi digitalizada, o computador passa a identificar cada ponto (pixel) da imagem por sua posição e tom de cinza. A imagem já está formada como um todo, mas os objetos (no nosso caso, microorganismos) ainda não estão identificados.

2.2. Tratamento da imagem cinza:

O objetivo dessa etapa da análise de imagens é aumentar o contraste entre o fundo e o objeto a ser analisado (o microorganismo) o que facilitará a posterior identificação do objeto. Para isso, o programa utilizado, Leica Qwin, dispõe de uma série de ferramentas de transformação da imagem cinza dentro do menu *Image* que trabalham das seguintes formas:

A. corrigindo imagens através de erosões e/ou dilatações (acréscimo ou retirada de valor dos pontos que contornam os objetos da mesma), de modo a eliminar interferências, pequenas sujeiras ou falhas na aquisição;

B. Editando a imagem, seja somando ou removendo detalhes, através da inserção de regiões com formato (geométrico) e tom de cinza pré-definidos, sendo o tamanho e a posição definidos com o mouse;

- C. Trabalhando com as transformações existentes no programa para algumas modificações específicas na imagem, como transformações, ênfases e preenchimento de detalhes, suavização da imagem ou a produção do gradiente morfológico;
- D. Modificando o valor de cada pixel através de uma função previamente escolhida (inversão, raiz quadrada, logarítmica ou outra escolhida ou definida pelo usuário);
- E. Expandindo o histograma de níveis de cinza, de modo a aumentar o contraste da imagem toda. Esse histograma apresenta a distribuição do número de pontos para cada tom de cinza, e a sua expansão normaliza os pontos, de modo que os mais claros da imagem recebam o valor 255 (branco) e os mais escuros, o valor zero (preto). O restante do histograma é “espalhado”, de modo que a normalização valha para ele todo;
- F. Calculando numericamente através de matrizes, nas quais o valor do pixel central é determinado pelo valor dos seus vizinhos, e o resultado será normalizado para se obter um valor entre 0 e 255 (valor de tom de cinza);
- G. Somando ou subtraindo os valores dos pixels de imagens diferentes, o pegando o máximo (ou mínimo) entre eles. Note que o computador trabalha com cada pixel.

2.3. Binarização da imagem

Binarização é a escolha dos limites (máximo e mínimo) de detecção da imagem, de acordo com o histograma dos níveis de cinza, identificando cada pixel que estiver dentro desses limites. O computador passa a reconhecer a existência de diferentes objetos. Dessa forma passamos a ter a imagem binária sobre a imagem cinza (como uma máscara), sendo que as duas imagens são sempre trabalhadas independentemente.

2.4. Tratamento da imagem binária

Assim como a imagem cinza, a imagem binária também pode ser transformada, para ser preparada para a medição. Essas transformações são bem mais simples que as da imagem cinza, uma vez que só trabalham com o aceite – ou não – de cada ponto reconhecido pelo computador (pixel).

Existem ferramentas para correção (erosão/dilatação), edição manual (acrescentar linhas, unir/cortar objetos, escolher alguns dos objetos), ferramentas de lógica binária, que copia e/ou combina imagens binárias. Dessa forma consegue-se que a imagem binária final contenha apenas os objetos a ser medidos.

2.5. Cálculo dos parâmetros de cada objeto da imagem

Baseado numa calibração prévia da imagem, em que é atribuído um comprimento em micrometros à largura de cada pixel, o computador é capaz de fornecer medidas de cada objeto da imagem binária (área, perímetro, maior e menor comprimento e número de pontas são alguns dos parâmetros medidos), fatores de forma e cálculos entre diferentes parâmetros são alguns dos valores fornecidos, que geralmente são os resultados finais do trabalho de análise de imagens.

Figura 2: Etapas da análise de imagens: **A** - imagem cinza adquirida pelo microscópio; **B** - homogeneização do fundo; **C** - binarização da imagem (rosa pertence aos objetos de interesse e branco não); **D** - classificação dos objetos segundo cores (verde: *pellet*; vermelho: *clump*; azul: hifa).

Estudo de caso: Monascus sp.

A rotina desenvolvida e trabalhada deveria classificar e medir todos os objetos (fungos filamentosos) presentes em cada imagem (campo visual oriundo do microscópio) em uma de suas três classes morfológicas: *pellets*, *clumps*, ou hifas. Para isso, precisou-se criar um padrão de separação, baseado na forma como o computador reconhece a imagem: através de formas e tamanhos, e não se baseando em experiências anteriores, como faz o ser humano.

Como o computador trabalha com alguns parâmetros pré-definidos de medições, criou-se uma rotina de programação em que um operador classificava visualmente cada um dos objetos e estes eram medidos pelo computador. Depois de classificados cerca de 1500 objetos (número bom para uma estatística mais confiável), verificou-se que os parâmetros área, razão de área por área convexa e razão de área por comprimento eram os que mais diferenciavam as classes

uma da outra. Com base nisso, foi desenvolvida uma macro-rotina em que o computador passou a ser capaz de distinguir as classes uma das outras, além de realizar todas as medições possíveis nos objetos. As vantagens de se ter uma rotina o mais automatizado possível é que, além de ser mais rápida, ela se torna mais imparcial, uma vez que diminui as tomadas de decisão que eram feitas pelo operador passam a serem feitas pelo computador e este classifica os objetos (fungos) de cada imagem, independente de quem está a operar o programa.

Escolha dos parâmetros para classificação

A forma com a qual o computador pode classificar os objetos é bem diferente do processo humano, que, baseado em experiências anteriores, reconhece formas e significados em imagens com pontos coloridos. O computador processa os pontos, agrupa-os em objetos e calcula, para cada objeto, valores numéricos ou parâmetros, tais como área, perímetro e comprimento. Portanto, para permitir a classificação automática, é necessário se determinar quais os parâmetros melhor representam as diferenças entre as três classes morfológicas: hifas, *clumps* e *pellets*.

Para a obtenção de dados estatísticos confiáveis, foi desenvolvida uma rotina (ou macro), através da qual o computador repete uma série de ações previamente executadas e gravadas, na forma de um pequeno programa. Nessa rotina, um operador com experiência na distinção das classes morfológicas, classifica visualmente os objetos da imagem, cujos dados (parâmetros fornecidos) são arquivados. Após a análise de cerca de 1500 imagens, chegou-se aos parâmetros área, a razão da área pela área convexa e a razão da área pelo maior comprimento como os mais indicados para a classificação dos objetos, conforme se vê nas Figuras 3, 4 e 5, respectivamente:

Figura 3: Frequência encontrada nas 3 classes morfológicas em função da área do objeto

Figura 4: Frequência encontrada nas 3 classes morfológicas em função da reação área por área convexa do objeto

Figura 5: Frequência encontrada nas 3 classes morfológicas em função da relação área por maior comprimento do objeto

A partir destes dados, verificou-se que a área diferenciava bem as diferentes classes, mas o uso de outros parâmetros faria uma distinção ainda mais precisa das classes: a razão da área pela área convexa seria, então, o parâmetro de distinção entre *clumps* e *pellets* e a razão da área pelo maior comprimento, entre *clumps* e hifas.

O programa desenvolvido

Os programas de análise de imagens, em geral, possuem a mesma base, citada acima, sendo que cada um possui outras particularidades. O programa utilizado (Leica Qwin), possui uma grande gama de ferramentas. Uma importante é o Quips, que permite que sejam criadas rotinas de programação, em que o computador repete uma sequência de funções previamente gravadas em forma de uma macro-rotina (programa pra repetição de funções).

Um dos objetivos desse projeto foi descobrir, dentre as ferramentas existentes, quais seriam as mais úteis no desenvolvimento da rotina desejada: desde a aquisição da imagem, passando

pelas transformações nas imagens cinza e binária e pela forma mais adequada de se fazer medições, até o armazenamento dos dados.

A partir dos dados obtidos, foi possível o desenvolvimento de um programa definitivo, mais complexo e automatizado. A principal vantagem apresentada por este se dá em sua automação, aumentando sensivelmente o poder de decisão do computador, de modo que passam a ser poucas as interações do operador. Dessa forma, a classificação se torna menos subjetiva e menos dependente de um operador que conheça a morfologia da espécie.

O programa realiza as seguintes funções, para uma série de 100 imagens:

1. Adquire ou abre a imagem a ser analisada (o operador escolhe)
2. Faz transformações na imagem adquirida, de modo a aumentar o contraste entre o microorganismo e o fundo, e a eliminar interferências e sujeiras.
3. Binariza a imagem, discriminando os objetos (fungos)
4. Calcula os parâmetros de cada objeto detectado, conforme pode ser observado na Tabela 1. No caso de hifas, o programa faz uma pausa e pede ao operador para selecionar as hifas, de modo que possíveis sujeiras na lâmina não venham a ser confundidas com pequenos fungos, o que alteraria o resultado final.
5. Envia os resultados das medições a um arquivo do tipo *.dif, que pode ser aberto pelo Excel. Cada série de imagens e arquivos do Excel correspondente é guardada com o mesmo nome, com as imagens são numeradas sequencialmente.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Como resultado da análise dos parâmetros para cada classe morfológica, chegou-se aos seguintes valores, com área (A) [μm^2], área/área convexa (A/A) adimensional e área/comprimento (A/C) [μm]:

- Hifas: $600 < (A) < 9000$ e $0 < (A/C) < 38$;
- *Clumps*: $(7000 < (A) < 9000 \text{ e } 38 < (A/C) < 300)$ ou $(9000 < (A) < 120000)$ ou $(120000 < (A) < 180000 \text{ e } 0 < (A/A) < 0.63)$;
- *Pellets*: $(120000 < (A) < 180000 \text{ e } 0.63 < (A/A) < 1)$ ou $(A) > 180000$.

Para testarmos o programa desenvolvido, criou-se uma sequência de 50 campos visuais, com apenas um objeto em cada campo, e uma macro especial, em que diferentes operadores, com experiência na classificação morfológica de fungos, classificavam cada microorganismo como H, C ou P (*clump*, hifa ou *pellet*, respectivamente).

Após feita a classificação desses 50 objetos por operadores, utilizou-se o programa desenvolvido para fazer a mesma classificação, sendo que o computador marca *H*, *C*, *P* ou *N*, sendo *N* caso os parâmetros do objeto não se encaixem em nenhuma das classes definidas.

Na versão final do programa desenvolvido, o erro do computador em relação aos operadores foi de apenas 6 %, bem menor que o erro da primeira versão com classificação automática do programa (34 %)., que inclusive não era capaz de classificar um expressivo número de objetos (24 %).

Tabela 1: Parâmetros dos objetos da Figura 2 classificados pelo sistema automatizado

Objeto	Classe	Área (μm^2)	Comprimento (μm)	Área Comp. (μm)	Área Convexa (μm^2)	Área Área Conv.
1	Hifa	994	66.5	14.9	2610	0.617
2	Hifa	909	83.2	10.9	2569	0.595
3	Hifa	4669	185.3	25.2	15931	0.541
4	Hifa	1033	97.4	10.6	3213	0.567
5	Clump	43757	879.1	49.8	258103	0.412
6	Pellet	242937	955.2	254.3	494018	0.701

CONCLUSÕES

Neste trabalho, desenvolveu-se uma rotina automatizada de análise de imagens capaz de classificar morfológicamente o microorganismo com erro de apenas 6% em relação a uma classificação visual. Com essa rotina, a classificação se torna mais rápida e imparcial, além de deixar de ser apenas qualitativa e passar a ser quantitativa, uma vez que cada objeto é classificado e medido.

3.4 ACOMPANHAMENTO DE FERMENTAÇÃO USANDO ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NEAR INFRARED - NIR)

Luiz Fernando Castelhana¹, Patricia Araujo Pantoja¹, Dennis Chicoma Lara¹,
Reinaldo Giudici¹, Aldo Tonso¹

¹Departamento de Engenharia Química – Escola Politécnica – Universidade de São Paulo (EP/USP)
Caixa postal: 61548 – CEP: 05424-970 – São Paulo – SP – E-mail: luiz.castel@gmail.com

RESUMO

A complexidade e dificuldades no controle e monitoramento de bioprocessos, tais como a fermentação alcoólica, são bem conhecidas. A espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) é aplicada na biotecnologia e também em outras áreas industriais por sua simplicidade e eficiência. O uso do NIR permite a análise imediata e detalhada sem a necessidade de prévio tratamento das amostras. O presente trabalho segue a viabilidade do monitoramento de fermentação alcoólica (via off-line) em anarobiose restrita utilizando-se S. cerevisiae comercial. Os componentes do meio reacional monitorado foram: biomassa, glicose, etanol e glicerol. O modelo de calibração e validação foram construídos seguindo métodos quimiométricos baseados em PCA e PLS (Análise de Componentes Principais e Mínimos Quadrados Parciais) através do software próprio equipamento (Quant-OPUS), os coeficientes de correlação atingidos foram satisfatórios superiores a 0,94. Os resultados alcançados são totalmente favoráveis e reafirmam a técnica NIR como técnica eficiente no monitoramento da fermentação alcoólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUÇÃO

A espectroscopia na região de infravermelho (IR) vem possibilitando um grande desenvolvimento em indústrias farmacêuticas e alimentícias (Borin, 2003) e é utilizada atualmente com sucesso para o monitoramento em linha em processos de polimerização (Lara, 2005) e na indústria do petróleo (Pantoja, 2006). Seu princípio baseia-se na incidência de um fóton com energia semelhante à correspondente vibração característica da região espectral no infravermelho sobre um composto cujas moléculas possam alterar seu estado vibracional “absorvendo” a radiação correspondente à diferença de energia de seus estados fundamental e excitado.

A espectroscopia NIR apresenta atualmente um grande crescimento nos diversos laboratórios de pesquisa, tanto nas indústrias quanto no meio acadêmico, onde seus espectros contêm uma ampla quantidade de informação química sobre os compostos analisados. A complexidade de um processo de fermentação alcoólica, fazem que os espectros sejam apresentados em forma de bandas largas, sobrepostas e com presença de ombros, indicando que, apesar de ser “ricos” em informação, não são uma medida que determine de forma direta as variáveis de interesse, tais como concentrações de: biomassa, glicose, etanol e glicerol, portanto, o uso de modelos de calibração faz da espectroscopia NIR uma importante técnica para fins analíticos. Mais detalhes sobre o desenvolvimento da técnica NIR através do tempo podem ser encontrados em (Siesler *et al*, 2002).

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se de um espectrofotômetro (modelo NIR-IFS 28/N) de infravermelho na faixa do infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR), o equipamento está dotado de uma célula para análise *off-line* e de conexões para uso de fibra óptica. A velocidade de varredura é de aproximadamente 4 espectros/s. As informações coletadas são enviadas a um microprocessador controlado por um banco óptico com um controlador de velocidade digital, sistema de diagnóstico e verificador de sistemas avançados. O software OPUS (3.1) – OPUS® Bruker Optik GmbH 1997-2000 foi utilizado para a interpretação e comparação dos espectros obtidos, e principalmente para aplicação dos métodos numéricos PCA e PLS combinados (análise por componentes principais e mínimos quadrados parciais) para o tratamento e ajustes dos dados ao modelo de calibração desejado.

A linhagem de *S. cerevisiae* comercial (origem KRAFT-Industria alimentícia) foi cultivada sob regime de batelada em biorreator BIOFLO III New Brunswick (Edison, NJ), com volume útil de 4,5 L, sob as seguintes condições: em meio de levedura (extrato de levedura = 1 g/L, KH_2PO_4 = 2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = 1,5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 0,5 g/L e glicose = 30 g/L). A temperatura foi mantida em 30°C e as condições de cultivo foram estabelecidas de forma a se obter um ambiente de aerobiose restrita (frequência de agitação de 700 r.p.m. e sem aeração). O inóculo foi preparado com a partir de 0,1g da levedura liofilizada em um erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio YPD (2 g de peptona, 1 g de glicose e 2 g de extrato de levedura). Após 12 horas de cultivo, todo o volume do inóculo foi transferido para o biorreator.

Métodos analíticos: massa seca – foram feitas utilizando-se de um volume de 10 mL das amostras retiradas, filtradas por uma membrana porosa e depois seca em microondas por 15 minutos (em potência de 20% da máxima); glicose – foi utilizado kit enzimático, o método utilizado foi o de glicose-oxidase, implantado em um equipamento Technicon Auto-Analyser II, foi empregado um conjunto de reagentes Merck (Glucose Enzymatique Color Liquid). O princípio deste método é baseado em técnicas colorimétricas, sendo descrito por Barham; Trinder (1972). Os metabólitos extra-celulares - 3 mL de amostra foram imediatamente filtrado por pressão positiva em filtros Millex e o filtrado utilizado nas determinações. Etanol e glicerol foram separados numa coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H BioRad (Hercules, CA) a 60°C, utilizando-se H₂SO₄ 8 mM como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min. Etanol e glicerol foram detectados num refratômetro diferencial Waters 410 (Millipore, Milford, MA).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O processo escolhido para o projeto foi a fermentação alcoólica com anarobiose restrita, com a análise de componentes básicos do meio reacional como glicose, biomassa, álcool e glicerol. O projeto foi subdividido em quatro partes: (1) testes de bancada (*off-line*) iniciais para a identificação espectral e compreensão de como a técnica atua sobre componentes puros presentes no bioprocessos, (2) ensaios em fermentadores com medidas *off-line* para calibração e validação dos modelos matemáticos necessários e (3) a fase final na qual foi implementado um modelo de calibração, que após sua validação (4) foi utilizado para prever as concentrações de biomassa, glicose, álcool e glicerol em um ensaio de fermentação.

Os testes iniciais (1) referem-se às possíveis dificuldades da instalação da sonda em um biorreator industrial, como posição em relação a parede, material da parede, volume reacional, posição em relação ao fundo e à superfície do volume reacional, velocidade de rotação. O resultado de todos estes testes foi totalmente favorável à aplicação da técnica NIR em um biorreator industrial. Além dos fatores de influência, os testes iniciais também abrangeram fatores de repetibilidade, diferentes fundos para referência do NIR (foram testados solventes orgânicos, inorgânicos e o próprio ar), complexidade do meio (foram testados meios sintéticos, meios naturais como melaço de cana), sensibilidade e limitações da sonda (faixas de aplicação) e calibrações através de soluções preparadas monocomponentes. Todos os testes de bancada tiveram resultados satisfatórios direto, ou foram contornados através de pré-

tratamento dos dados coletados (aqui principalmente, os clássicos desvios, presença/eliminação de ruído e deslocamentos da linha base do NIR).

A figura 1 mostra os espectros dos compostos puros (biomassa) a diferentes concentrações. Pode-se observar que o NIR é capaz de discriminar espectralmente (através de variações na absorbância e mudanças das bandas espectrais) as diferentes concentrações dos compostos, característica importante para a construção dos modelos matemáticos.

Figura1: Espectros obtidos com soluções preparadas com diferentes concentrações de biomassa

Os ensaios de fermentação (2), para a calibração e desenvolvimento do método a ser implementado para o monitoramento do bioprocesso em estudo, fez-se nove ensaios em reator com volume útil de 4,5 L, partindo da concentração de glicose de 30 g/L, os ensaios tiveram duração de 8 horas, as amostras foram retiradas de uma em uma hora até que a fase log de crescimento celular para biomassa fosse atingida (aproximadamente 3 horas), após esse instante, foram retiradas amostras de meia em meia hora. Os espectros foram feitos “off-line”, ou seja, depois de retirada a amostra, inseriu-se a sonda, tomando os devidos cuidados para que as medidas não carregassem erros experimentais. Para cada amostra foram feitos ao menos 3 espectros a fim de se verificar a repetibilidade das medidas e minimizar a propagação de erros, nos casos em que os 3 primeiros espectros não apresentaram um grau de semelhança aceitável, mais espectros foram retirados. A tabela 1 apresenta alguns dados sobre os ensaios realizados:

Tabela 1 – Dados dos ensaios de fermentação com as faixas de concentração obtidas para glicose e biomassa e o número de amostras retiradas

Ensaio	Concentração Glicose (g/L)	Concentração Biomassa (g/L)	Amostras retiradas
1*	30	0,80 - 2,27	-
2	29,72 - 10,28	1,65 - 2,67	9

3	33,60 - 21,94	0,97 - 1,51	7
4	33,52 - 13,26	1,17 - 2,45	14
5**	35,56 - 18,80	0,86 - 2,05	14
6	30,41 - 18,18	1,12 - 2,40	8
7	39,01 - 15,53	0,87 - 1,91	9
8	33,40 - 16,70	1,09 - 2,28	11
9	34,07 - 21,37	1,24 - 2,17	7

* experimento descartado

** experimento utilizado para validação

O modelo de calibração (3) foi feito aplicando os métodos de PLS e PCA combinados, através do software OPUS. Foram testados diversos tipos de pré-tratamentos dos espectros, o pretratamento de normalização vetorial e a faixa espectral foi escolhida com base nas observações dos espectros retirados nos testes preliminares e também utilizando o recurso de otimização disponíveis no software, os resultados obtidos a partir dos modelos criados estão reunidos na tabela 2.

Tabela 2 – Dados dos modelos de calibração divididos por componente com suas respectivas faixas espectrais, número de componentes principais, coeficientes de correlação e erro médio.

Modelo	Faixa NIR [cm ⁻¹]	Componentes		RMSEC
		Principais	R ²	V
Biomassa	4198 - 8001	6	95.40	0,127
Glicose	4288-5451 e 6097-7424	8	94.44	1,92
Etanol	4244 - 5224	5	99.73	0,129
Glicerol	4499-4900 e 7199-7600	2	99.40	0,0285

A validação do método de calibração foi feito através da validação interna e cruzada.

Nota-se que os coeficientes de correlação foram superiores a 0,94 para todos os componentes analisados, os erros médios foram relativamente pequenos. O número de componentes principais foi determinado por apresentar o menor erro, como demonstram as figuras 2 e 3 (para a biomassa e glicose, respectivamente).

Figura 2: Análise de erro médio x número de componentes principais para a biomassa

Figura 3: Análise de erro médio x número de componentes principais para a glicose.

Os modelos de calibração para os componentes estudados são apresentados nas figuras 4, 5, 6 e 7. O modelo é construído com base no valor analítico de cada variável em g/L e confrontando os valores preditos.

Figura 4: Modelo de calibração criado para biomassa

Figura 5: Modelo de calibração criado para glicose.

Figura 6: Modelo de calibração criado para etanol.

Figura 7: Modelo de calibração criado para glicerol.

As figuras 6 e 7 não apresentam a totalidade das amostras retiradas, devido a problemas que tivemos com as amostras coletadas e com os métodos analíticos adotados durante os experimentos e tratamento dos dados. Os dados corretamente analisados foram insuficientes para a construção de um modelo de calibração confiável, é possível porém observar a

tendência do modelo e da validação do mesmo em relação aos componentes estudados. Estudos estão sendo realizados pelo grupo de pesquisa e serão publicados em breve com um modelo de calibração e sistema de validação mais robusto.

A validação do método (4) foi feita, utilizando o experimento de número 5, o qual não foi incluído no modelo de calibração (validação externa). Os coeficientes de validação alcançados foram de 0,997 para glicose, 0,913 para a biomassa. As validações para o álcool e glicerol atingiram índices também maior que 0,95, porém os mesmo não serão mais detalhadamente explorados neste trabalho devido às insuficiências citadas anteriormente. As figuras 8 e 9 mostram os resultados obtidos na validação da biomassa e glicose.

Figura 8: Validação da biomassa com o ensaio #5.

Figura 9: Validação da glicose com o ensaio #5.

CONCLUSÕES

A técnica NIR se demonstrou sensível e eficiente no acompanhamento da fermentação alcoólica em anaerobiose restrita com *S. cerevisiae* comercial, foram acompanhados quatro componentes do meio de cultura – biomassa, glicose, álcool e glicerol, modelos de calibração foram construídos utilizando diferentes faixas do espectro NIR. Embora os espectros não sejam muito expressivos para cada um dos componentes, o uso de técnicas multi-variáveis permitiu a predição das concentrações dos componentes estudados sobre os dados experimentais. O grupo de pesquisa continua trabalhando na otimização dos modelos e na expansão da linha de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos Thiago Olitta Basso pelo apoio à execução dos experimentos e ao Pibic/CNPq apoio financeiro.

4. MONITORAMENTO DA RESPIRAÇÃO CELULAR

4.1 Oxigênio dissolvido

Talvez a variável de estado mais importante para estudo de seu processo de controle é a concentração de oxigênio dissolvido à qual a célula está submetida. Tendo em vista a baixíssima solubilidade do oxigênio na água e nos meios de cultura em geral, da ordem de 6 a 8 mg/L nas temperaturas de cultivos celulares, torna-se claro que se trata de um nutriente que terá de ser continuamente fornecido ao meio de cultura e que será consumido simultaneamente à fonte de carbono nos cultivos aeróbios, como os de células animais (Henzler e Kauling, 1993).

Há vários sistemas de transferência de oxigênio, porém alguns são mais utilizados em cultivos celulares em tanques agitados: aspersão direta, micro-aspersão e difusão por membranas. Apesar da velocidade específica de respiração das células animais ser consideravelmente menor que a de células microbianas, há que se contornar sua sensibilidade ao estresse mecânico causado pela agitação e pela ruptura das bolhas de gases.

Atualmente, o eletrodo de oxigênio dissolvido mais comum é o polarográfico, que utiliza método eletroquímico, através da reação de redução do oxigênio molecular no eletrodo de platina (cátodo) gerando elétrons para a oxidação da prata no eletrodo prata/cloreto de prata (ânodo). Nesse tipo de sensor, é necessária a imposição de uma voltagem externa e a corrente resultante será medida e convertida na concentração de oxigênio dissolvido (Figura 4.1). Outro tipo comum é o galvânico, no qual a reação de oxidação no ânodo é capaz de gerar uma voltagem espontaneamente ($\text{Pb} \rightarrow \text{Pb}^{+2} + 2 \text{e}^-$) (Johnson *et al.*, 2000).

Figura 4.1 - Esquema de um eletrodo polarográfico de oxigênio dissolvido. O cátodo, onde ocorre a semi-reação com O_2 ($O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^-$), está em contato com a membrana, que permite a passagem do oxigênio dissolvido do meio externo, a ser medido. No ânodo, ocorre a oxidação da prata ($Ag + Cl^- \rightarrow AgCl + e^-$).

Mais recentemente, outros eletrodos foram desenvolvidos, podendo-se destacar aquele que utiliza a supressão de fluorescência que o oxigênio causa sobre compostos de rutênio, entre outros (O'Neal *et al.*, 2004).

As estratégias de controle da concentração de oxigênio dissolvido estão associadas ao termo de transferência de oxigênio da equação de balanço de massa:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_s - C) - Q_{O_2} \cdot X$$

onde C é a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo, t é o tempo, $k_L a$ é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, C_s é a concentração de oxigênio em equilíbrio com o gás (saturação), Q_{O_2} é a velocidade específica de respiração e X a concentração celular (para maiores esclarecimentos sobre essa equação, sugere-se consultar um livro-texto de Engenharia Bioquímica, como por exemplo de Schmidell (2001)).

Tipicamente, pode-se alterar a transferência de oxigênio atuando-se na frequência de agitação do impelidor ou na vazão de aeração ou micro-aeração, alterando-se como consequência o termo $k_L a$ da Equação 2.1. O controlador de oxigênio dissolvido estabelece novos valores de *set-point* para o motor da agitação ou para o controlador mássico de vazão. Como desvantagem desse método de controle, interfere-se no estresse mecânico provocado por valores elevados de agitação ou aeração, o que pode ser particularmente crítico nos cultivos com células animais.

Para se evitar o problema acima em um estudo da influência do oxigênio dissolvido num processo, pode-se utilizar um sistema de transferência de oxigênio com a mistura de dois gases, por exemplo, oxigênio e ar ou nitrogênio e ar (Figura 4.2). Dessa forma, consegue-se manter constantes a agitação e a vazão total de gás aspergido no reator e, consequentemente, o $k_L a$ e o estresse causado à célula. O valor da concentração de oxigênio dissolvido é controlado pela atuação na relação das vazões dos dois gases, que altera o valor de C_S e portanto da transferência.

Alternativamente, pode-se utilizar uma membrana de material de grande difusividade ao oxigênio (normalmente mangueiras de silicone, ou ainda de material microporoso ou polipropileno), evitando-se a formação de bolhas, chamado *bubble-free system*. Nessa situação, a transferência não mais é regulada pela vazão gasosa ou pela agitação, mas sim pela pressão interna à membrana e pela composição do gás em seu interior, que alteram a pressão parcial do gás oxigênio e assim C_S (Qi *et al.*, 2003).

Figura 4.2 - Esquema do controle de oxigênio dissolvido pela alteração da fração de oxigênio no gás aspergido. Sua vazão total Q_T é mantida constante e corresponde à soma dos dois gases controlados Q_1 e Q_2 .

Uma vantagem adicional de se ter um cultivo com um sistema de controle do oxigênio dissolvido é a possibilidade de se ter uma estimativa em tempo real da velocidade de respiração das células. Como se observa pela Equação 4.1, se C é constante, o termo da transferência $k_L a \cdot (C_S - C)$ equivale ao de consumo $Q_{O_2} \cdot X$. Sabendo-se a cada instante o valor da atuação do controlador e, portanto, podendo-se calcular a velocidade de transferência, obtém-se diretamente o consumo (Kamen et al., 1996). Há vários trabalhos na literatura abordando o uso de medidas da respiração, como forma de se estimar a concentração celular on-line, considerando-se que, em fase de crescimento, cada célula consome uma quantidade praticamente constante de oxigênio (Yoon e Konstantinov, 1994; Jorjani e Ozturk, 1999; Ruffieux et al., 1998).

Como visto anteriormente, as principais variáveis envolvidas com a respiração celular são: OUR (velocidade total de consumo de oxigênio), Q_{O_2} (velocidade específica de respiração) e C_{crit} (concentração crítica de oxigênio dissolvido).

A seguir, são apresentados alguns trabalhos em que se desenvolveram metodologias no sentido de melhor quantificar essas variáveis, seguidos por um trabalho no qual a concentração celular é estimada com base no sinal que o controlador de oxigênio dissolvido envia para o sistema atuador, válido para períodos em que Q_{O_2} é relativamente constante, o que costuma ocorrer durante a fase exponencial de crescimento.

4.2 NOVO MÉTODO DINÂMICO PARA BIORREATOR COM TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO ATRAVÉS DE DIFUSÃO POR MEMBRANA DE SILICONE

Marilena Martins Pamboukian¹, Carlos Augusto Pereira²; Elisabeth de Fatima Pires Augusto³; Aldo Tonso¹

¹ Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica, USP

² Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan

³ Laboratório de Biotecnologia Industrial, Instituto de Pesquisas Tecnológicas - IPT

RESUMO

Neste trabalho é apresentado um método de execução da anulação da transferência de oxigênio para a medida da OUR (oxygen uptake rate) em biorreator com transferência de oxigênio através de difusão por membrana de silicone. O método consiste em se manter controlada, durante a realização do Método Dinâmico, a fração de oxigênio do gás na membrana de silicone e na cabeça do reator, de modo que não haja força motriz para a transferência de oxigênio de ou para o meio de cultura. Este método foi utilizado em ensaios com células de inseto *Drosophila melanogaster* transfectada mostrando a diferença entre as medidas efetuadas. Durante esses ensaios foi possível observar uma sensível diferença entre a velocidade específica de respiração calculada pelo método tradicional, interrompendo a circulação de gases, e a metodologia proposta. As OURs calculadas no ensaio com a célula S2AcGPV através do Método Dinâmico Tradicional foram em média cerca de 17% das OURs calculadas através do novo Método Proposto. Já no ensaio com a célula S2MtEGFP as OURs medidas através do Método Dinâmico Tradicional chegou a ser 6% das OURs calculadas através do Método Proposto. Pela comparação com o Balanço na Fase Líquida (BFL) que são os mais confiáveis, pois utiliza a variação da pressão parcial de oxigênio através da mudança na fração mássica de oxigênio no gás de aeração, calculado diretamente da atuação do controlador MRU do fluxômetro, têm-se indicado que o Método Dinâmico proposto apresenta os melhores resultados. Portanto, existe uma transferência de oxigênio para a cultura, vindo da cabeça do reator e também da própria membrana durante a execução do Método Dinâmico tradicional em biorreatores com transferência de oxigênio através da difusão por membrana de silicone. E para que esse problema seja solucionado foi proposto, neste trabalho, um método para a completa anulação dessa transferência, que consiste em manter a mesma concentração de oxigênio tanto na cultura como na cabeça do reator e no interior da membrana.

INTRODUÇÃO

Com relação ao cultivo, existe uma grande similaridade entre células animais, bactérias, leveduras e fungos, apesar das células animais originarem-se de tecidos superiores. Porém, em relação às características, as células animais são bem distintas dos microrganismos: crescimento mais lento, maior fragilidade celular e necessidades nutricionais mais complexas. Em cultivos celulares podemos considerar o oxigênio como um nutriente do meio de cultura, onde a dificuldade está no fornecimento de oxigênio em vista de sua baixa solubilidade, necessitando ser constantemente fornecido. A solubilidade do oxigênio em água é de 7,00 mg/L a 29°C e 700 mmHg segundo a U.S. Geological Survey, (2011).

Dois grandes problemas aparecem quando se trata de cultivo de células de inseto em suspensão: a fragilidade das células e o suprimento de oxigênio, daí a necessidade de estudo do tipo de sistema de aeração: superficial, aspersão, micro-aspersão ou por difusão em membrana de silicone. Para que se tenha o mínimo possível de cisalhamento, a aeração através da difusão por membrana de silicone é a mais indicada para células animais em suspensão, uma vez que o oxigênio se difunde através da membrana para o meio sem ocasionar danos, pois introduz mínimas forças de cisalhamento. Estas membranas são feitas de materiais como teflon ou silicone, que têm uma alta permeabilidade a oxigênio e gás carbônico, levando a uma alta velocidade de transferência entre a membrana e o meio de cultura no biorreator. A tubulação tem um pequeno diâmetro e vários metros de tubo podem ser instalados no reator, resultando em uma grande superfície de troca de gases entre o tubo e o reator (Qi *et al.*, 2003). O sistema de transferência de oxigênio por difusão em membranas de silicone propicia, com grande vantagem sobre a aspersão direta, um ambiente livre de bolhas, que em muitos casos causam danos às células animais (Tonso, 2000).

Durante a execução do Método Dinâmico em biorreatores com difusão por membrana de silicone, observou-se que poderiam existir algumas transferências gasosas indesejáveis ao processo. Assim, neste trabalho, propõe-se uma nova maneira de execução do Método Dinâmico para que se possa anular ao máximo qualquer transferência gasosa. Este novo Método é comparado no mesmo ensaio com o Método Tradicional, mostrando que a OUR medida no Método Tradicional é cerca de 17% de uma OUR no Método Proposto. Portanto, durante a execução do Método Dinâmico Tradicional existe uma grande transferência gasosa no interior do biorreator, mesmo tendo-se interrompido o fornecimento de gás e desligado a agitação.

Material e métodos

Células e meio de cultura

Foram realizados três experimentos empregando três linhagens celulares derivadas da *Drosophila melanogaster* – S2 (Invitrogen, USA): (Ensaio 1) células S2AcGPV transfectadas segundo Yokomizo *et al.* (2007) que expressam constitutivamente a glicoproteína G do vírus da raiva (RVGP); (Ensaio 2) linhagem S2MtEGFP transfectadas por Santos *et al.* (2007) e que expressa a proteína EGFP (enhanced green fluorescent protein) após indução com sulfato de cobre e (Ensaio 3) células S2AcHBsAgHy, que expressam constitutivamente o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) (Jorge *et al.*, 2008).

Os cultivos foram realizados com em meio de cultura livre de soro fetal bovino SF900 II® (Invitrogen, USA), em biorreator de bancada (sistema descrito abaixo), em processo operado em modo descontínuo, inoculado com 5.10^5 cel/mL.

No ensaio 2, foi adicionado com 2,5 dias 700µM de sulfato de cobre como indutor e no ensaio 3 adicionou-se 5mM de butirato de sódio com 5 dias visando aumento a expressão protéica.

Em intervalos de tempo regulares eram retidas amostras para determinação da concentração celular e da viabilidade. Ao longo do experimento foram também realizadas várias medidas de consumo de oxigênio pelos métodos dinâmico e pelo método proposto.

Descrição do Sistema

Os ensaios foram realizados em biorreator Discovery 100 (Inceltech, França) de bancada de 2L de volume total e volume de trabalho de 1L, com temperatura controlada em 28°C e a agitação em 100 rpm.

O fornecimento de oxigênio deu-se através de membrana de silicone com as seguintes características: tubo de silicone Silastic (Dow Corning Corporation, USA) de diâmetro interno de 2 mm, diâmetro externo de 3,2 mm e comprimento de 8,30 m, perfazendo uma área de troca de 0,17 m².

Para o controle de oxigênio dissolvido em 40 % da saturação em ar, foi utilizado um sensor polarográfico InPro 6110 (Mettler Toledo, Switzerland) e dois controladores mássicos de vazão (MFC) 5850EM (Brooks Instruments, Holand) que permitiam a composição do gás de entrada, variando-se portanto CS. O sistema de controle comandava a vazão de O₂ que era adicionada à linha de N₂. A vazão total de gases era mantida constante pelo segundo MFC. Dessa forma, mantinha-se a concentração de oxigênio dissolvido bem controlada em 40% da saturação com ar.

Na configuração proposta, a transferência de oxigênio varia com a pressão parcial de oxigênio (pO_2) no interior do tubo de silicone, que depende da pressão total no interior da membrana (P) e da fração mássica de oxigênio no gás de aeração (yO_2).

A pressão total do sistema é aproximadamente igual à média logarítmica da pressão na entrada do tubo de silicone e da pressão medida na saída do tubo (Qi *et al.*, 2003). A pressão na saída do tubo é regulada por uma válvula 10BP Back Pressure Regulator (Fairchild, USA), que pode ser regulada de 0,03 a 2,0 bar (Figura 1).

Figura 1 – Esquema da configuração do sistema de transferência de oxigênio (1) controlador de fluxo mássico de oxigênio (2) controlador de fluxo mássico da mistura gasosa (3) sistema de controle (4) válvula na cabeça do biorreator (5) sonda de oxigênio dissolvido (6) válvula de exaustão (back pressure regulator) (7) membrana de silicone para difusão de oxigênio

Medida da Concentração de Células Viáveis

A concentração de células viáveis e totais foi determinada com o emprego de um hemacitômetro, usando-se o método de exclusão de azul de tripan para estimar a viabilidade celular.

Medidas de Consumo de Oxigênio

Foram aplicadas três metodologias para a medida da velocidade de consumo de oxigênio (OUR), sendo uma delas o método proposto neste trabalho. Com base nelas e na concentração celular de cada amostra, foi calculada a velocidade específica de consumo de oxigênio (Q_{O_2}).

Determinação através do Método Dinâmico Tradicional (TDM)

Ao longo do cultivo foram realizadas medidas de OUR utilizando o método dinâmico tradicional, que consiste das seguintes etapas: a) interrupção da vazão de gás de entrada do sistema; b) acompanhamento da queda do percentual de oxigênio dissolvido pelo eletrodo de oxigênio dissolvido instalado no biorreator e c) re-introdução da corrente gasosa no sistema nas mesmas condições praticadas no instante inicial da medida.

Determinação contínua de OUR por Stationary Liquid Phase Balance (SLPB)

Uma vez que a vazão do gás de entrada e a pressão média na membrana foram mantidas constante ao longo dos ensaios realizados, o valor de k_La desse sistema é aproximadamente constante. Dessa forma, é possível calcular a OUR pelo balanço de oxigênio na fase líquida utilizando a estratégia descrita por Kamen *et al.* (1996) no cultivo de células de inseto, a qual se baseia que a concentração de oxigênio dissolvido é constante e a equação do balanço de oxigênio dissolvido fica:

$$OUR = k_La \cdot (C_s - C)$$

Considerando k_La e H constantes ao longo de todo o cultivo e conhecidos os valores de C (medido pelo eletrodo) e de C_s (calculados a partir dos MFC), a OUR pode ser calculada em tempo real.

A determinação do valor característico de k_La para o sistema empregado foi realizado em água, sem a presença de células, nas mesmas condições de transferência praticadas nos experimentos: geometria do biorreator, vazão de alimentação e pressão média na membrana. A metodologia utilizada nessa determinação de k_La foi a descrita por Bartolomew *et al.* (1950). Obteve-se em média o valor de $1,18 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$.

Determinação pelo Método Dinâmico Proposto (PDM), com anulação da força motriz da transferência de oxigênio

Esta metodologia aplica o princípio do método dinâmico descrito acima, mas utiliza uma outra forma de promover a anulação da transferência. Ao invés de zerar a vazão (e permitir a transferência a partir do gás rico em oxigênio que permanece na membrana), passa-se um gás com a composição igual à do meio líquido, buscando $C_s=C$, logo anulando a força motriz da

transferência durante a medida da OUR. Para tanto, o sistema de controle envia a cada instante ao MFC sinal para que controle a vazão de O_2 de tal forma que a mistura gasosa tenha a composição desejada $C_S=C$. Para garantir que não haja transferência superficial, a válvula 4 é aberta, fazendo fluir simultaneamente esse mesmo gás na cabeça do reator.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi feito um ensaio com as células S2AcGPV transfectadas segundo Yokomizo *et al.* (2007) e que expressam constitutivamente a proteína GPV. Este ensaio foi realizado em meio de cultura SF900 II e foi controlado a 40% de OD com sobrepressão na membrana de silicone de 0,5 bar. E transcorreu com os controles com desempenho satisfatório. No Gráfico 1 podem ser observados todos os controles. Nota-se que os picos descendentes em OD e ação são devidos ao Novo Método Dinâmico. A concentração celular inicial foi de $0,50 \cdot 10^6$ cel/mL, chegando a $26,60 \cdot 10^6$ cel/mL no 8º dia de cultivo. OUR, k_{La} e Q_{O_2} foram medidos em catorze instantes do ensaio conforme o Método Dinâmico e também com a anulação completa da transferência e apresentados na Tabela 1.

Gráfico 1 – Temperatura, OD, ação do controlador de OD e concentração de células viáveis do Ensaio com as células S2AcGPV em função do tempo.

Tabela 1 – Medidas de OUR, k_{La} e Q_{O_2} do Ensaio com as células S2AcGPV					
t (dias)	X (10^6 cel/mL)	OUR ($mmolO_2.L^{-1}.h^{-1}$)	k_{La} (h^{-1})	Q_{O_2} ($10^{-18} molO_2.cel^{-1}.s^{-1}$)	Método Dinâmico utilizado
2,87	0,94	0,01	0,12	3,67	Tradicional
3,79	2,41	0,07	0,30	7,85	Método Proposto
4,19	4,16	0,07	0,22	4,45	Tradicional
4,79	7,68	0,43	0,91	15,18	Método Proposto
5,20	10,68	0,08	0,14	2,10	Tradicional
5,95	15,60	0,90	1,37	16,04	Método Proposto
6,29	19,60	0,07	0,09	0,99	Tradicional
6,77	22,35	1,03	1,36	12,46	Método Proposto
7,23	24,86	0,92	1,24	10,23	Método Proposto
7,79	26,60	0,05	0,06	0,49	Tradicional
8,25	24,72	0,96	1,46	10,78	Método Proposto
8,91	22,40	0,14	0,19	1,72	Tradicional a partir 80%OD
9,20	19,30	0,95	1,37	13,71	Método Proposto
10,02	14,50	0,67	1,09	12,73	Método Proposto a partir 80%OD

Observa-se que o Q_{O_2} obtido pelo Método Dinâmico Tradicional foi sempre menor que o encontrado através da proposta da completa anulação da transferência. Também a OUR foi menor no Método Dinâmico Tradicional, o que mostra que, mesmo despressurizando a linha, desligando a agitação e cortando o fornecimento de oxigênio, ainda existe uma transferência

de oxigênio para a cultura, vindo da cabeça do reator e também da própria membrana. Como descrito a medida feita por BFL é a mais confiável, pois utiliza a variação da pressão parcial de oxigênio através da mudança na fração mássica de oxigênio no gás de aeração. Portanto, na comparação com o BFL, Gráfico 2, essas evidências se confirmam. E ainda, o k_{La} encontrado com o Método Proposto é muito mais próximo ao k_{La} fixo do sistema do que no Método Tradicional.

Gráfico 2 – Medidas de OUR por Método Dinâmico Tradicional e Balanço da Fase Líquida do Ensaio com S2AcGPV em função do tempo.

No Gráfico 2 observam-se as medidas da OUR e no Gráfico 3 observam-se as medidas de Q_{O_2} estimadas através do Balanço na Fase Líquida (BFL). Pode-se observar que os valores encontrados para a OUR e Q_{O_2} através do Método Dinâmico Tradicional estão bem distantes aos verificados pelo Balanço na Fase Líquida, isto mostra que os valores encontrados através do Método Dinâmico Tradicional estão super dimensionados, enquanto os valores encontrados através do Método Dinâmico Proposto estão muito próximos aos obtidos através do Balanço na Fase Líquida.

Gráfico 3 – Medidas de Q_{O_2} por Método Dinâmico Tradicional e Balanço da Fase Líquida do Ensaio com S2acGPV em função do tempo.

Posteriormente, foi feito um ensaio com a linhagem das células S2MtEGFP, obtida por Santos (2006) e que expressa a proteína EGFP após indução com sulfato de cobre ($700\mu M$). Este ensaio foi realizado em meio de cultura SF900 II e foi controlado a 40% de OD com sobrepressão na membrana de silicone de 0,5 bar. Este ensaio transcorreu com os controles com desempenho satisfatório. No Gráfico 2 podem ser observados todos os controles. A concentração celular inicial foi de $0,56 \cdot 10^6$ cel/mL, chegando a $17,80 \cdot 10^6$ cel/mL no 8º dia de cultivo.

Gráfico 4 – Temperatura, OD, ação do controlador de OD e concentração de células viáveis do Ensaio com as células S2MtEGFP em função do tempo.

OUR, k_{La} e Q_{O_2} foram medidos em oito instantes do ensaio conforme o Método Dinâmico e também com a anulação completa da transferência e apresentados na Tabela 2.

Observa-se, mais uma vez, que o Q_{O_2} obtido pelo Método Dinâmico Tradicional foi sempre menor que o encontrado através da proposta da completa anulação da transferência. Também o k_{La} e a OUR foram menores no Método Dinâmico Tradicional, o que confirma que, mesmo despressurizando a linha e cortando o fornecimento de oxigênio, ainda existe uma transferência de oxigênio para a cultura, vindo da cabeça do reator e também da própria membrana.

Tabela 2 – Medidas de OUR, k_{La} e Q_{O_2} do Ensaio com as células S2MtEGFP					
t (dias)	X (10^6 cel/mL)	OUR ($\text{mmolO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	k_{La} (h^{-1})	Q_{O_2} ($10^{-18} \text{ molO}_2 \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Método Dinâmico utilizado
2,20	3,36	0,31	1,17	25,75	Método Proposto
2,87	4,90	0,35	1,02	20,00	Método Proposto
3,25	6,00	0,39	1,01	18,01	Método Proposto
		Indução logo após a medida acima			
4,13	8,46	0,03	0,08	0,92	Tradicional
4,68	10,15	0,48	0,82	13,00	Método Proposto
5,34	13,80	0,16	0,70	3,20	Método Proposto
5,89	17,80	0,03	0,07	0,42	Tradicional
6,73	12,78	0,19	0,56	4,22	Método Proposto

Observando-se o Gráfico 5, nota-se que os valores encontrados da OUR pelo Método Dinâmico Tradicional estão bem distantes da curva estimada da OUR pelo BFL, enquanto os valores encontrados pelo Método Dinâmico Proposto estão mais coincidentes com o estimado pelo BFL. O mesmo acontece no Gráfico 6 com os valores do Q_{O_2} .

O Q_{O_2} atingiu seu ponto máximo no início do cultivo decaindo depois disso. Como a célula S2MtEGFP foi induzida após a 3ª medida é possível que a indução, ou melhor, a expressão da EGFP, tenha tido influência tanto na velocidade específica de respiração celular como no crescimento. Se for observada atentamente a curva de crescimento, percebe-se uma mudança na inclinação da curva após a indução. O que indica que a indução alterou o comportamento da célula.

Gráfico 5 – Medidas de OUR por Método Dinâmico Tradicional e Balanço da Fase Líquida do Ensaio com as células S2MtEGFP em função do tempo.

Gráfico 6 – Medidas de Q_{O_2} por Método Dinâmico Tradicional e Balanço da Fase Líquida do Ensaio com as células S2MtEGFP em função do tempo.

Observa-se, mais uma vez, que o Q_{O_2} obtido pelo Método Dinâmico Tradicional foi sempre menor que o encontrado através da proposta da completa anulação da transferência. Também o $k_L a$ e a OUR foram menores no Método Dinâmico Tradicional, o que confirma que, mesmo desligando a agitação, despressurizando a linha e cortando o fornecimento de oxigênio, ainda existe uma transferência de oxigênio para a cultura, vindo da cabeça do reator e também da própria membrana.

Portanto, o Método Dinâmico, quando executado em biorreatores com transferência de oxigênio através da difusão por membrana de silicone, apresenta uma transferência de oxigênio que deve ser anulada mantendo-se a mesma concentração de oxigênio tanto na cultura como na cabeça do reator e no interior da membrana. No Gráfico 7, observa-se a grande diferença das curvas apresentadas no Método Dinâmico Tradicional e no Método Dinâmico Proposto, vistos quase na mesma concentração celular, isso é decorrente de que no caso do Método Dinâmico Tradicional, mesmo com a interrupção da aeração, ainda existe uma transferência de oxigênio dentro do reator, e quando essa transferência é completamente anulada a curva torna-se mais acentuada, o que indica o real consumo de oxigênio pelas células.

Gráfico 7 – Comparação entre uma medida de OUR no Método Dinâmico Tradicional e no Proposto, feitas quase na mesma concentração celular.

CONCLUSÕES

Este trabalho comparou uma nova metodologia para a medida da velocidade específica de consumo de O_2 com dois métodos tradicionais (Dinâmico e SLPB). O método proposto baseia-se na capacidade de eliminar completamente a transferência de oxigênio durante a realização do teste, de forma que a variação da concentração de oxigênio pode ser inequivocamente associada ao consumo da espécie química pela população celular. Essa habilidade de anular completamente a transferência é de suma relevância em sistemas nos quais a transferência de O_2 se dá através de membrana ou em sistemas com baixa transferência, situações típicas de cultivos com células animais, mas também de alguns sistemas microbianos caracterizados por baixo consumo de O_2 .

Os dados apresentados indicam que a aplicação do método Proposto resulta em valores de velocidade específica de respiração significativamente mais elevados que aqueles obtidos pelo método Dinâmico. Este último pode incorrer em erro de até 20 vezes quando comparado com o método SLPB. A metodologia proposta apresenta ainda a vantagem de não sofrer perturbações em função das alterações de composição ou de reologia do meio de cultura, como ocorre no método SLPB que admite valores de coeficiente volumétrico global constantes ao longo de todo o cultivo.

4.3 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA DE DIFERENTES CÉLULAS DE INSETOS CULTIVADAS EM BIORREATORES

Marilena Martins Pamboukian¹; Carlos Augusto Pereira²; Aldo Tonso¹

¹ Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica, USP, São Paulo, Brasil

² Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

RESUMO

Neste trabalho são apresentadas as principais variáveis envolvidas na respiração e na transferência de oxigênio em cultivos com células de insetos *Spodoptera frugiperda* (Sf9) não infectadas (utilizadas na produção de bioinseticida baculovírus) e células de *Drosophila melanogaster* (S2) selvagem e *Drosophila melanogaster* (S2) transfectadas (utilizadas na expressão de proteínas heterólogas como a glicoproteína G do vírus da raiva e a proteína verde fluorescente EGFP). O sistema de transferência de oxigênio mostrou-se capaz de controlar o oxigênio dissolvido (OD) em 40% da saturação com ar, permitindo ainda calcular a velocidade específica de respiração. E, através dos valores encontrados da atividade respiratória de cada linhagem celular pode-se dizer que as células selvagens e transfectadas são diferentes entre si.

INTRODUÇÃO

Culturas de células de animais em grande escala têm sido largamente utilizadas pelos laboratórios de investigação básica e indústrias para a obtenção de uma grande variedade de produtos destinados à investigação, diagnósticos, uso terapêutico e também controle biológico na agricultura. Um grande esforço vem sendo despendido para se desenvolver metodologias que possam permitir culturas celulares em alta densidade e que levem à produção de grandes quantidades de um determinado produto. Assim, tecnologias para a preparação de produtos virais, tais como antígenos e vacinas em culturas celulares, bem como proteínas com fins terapêuticos e diagnósticos vêm sendo desenvolvidas, há alguns anos, com bastante sucesso. Diferentes sistemas de culturas, principalmente em suspensão, têm-se mostrado de grande eficiência para a preparação de produtos virais. Os sistemas em suspensão caracterizam-se

pelas células crescerem livremente no meio de cultura, sem a necessidade de suporte para o crescimento e mantidas por sistemas adequados de agitação e em ambiente favorável.

As células animais são estritamente aeróbicas necessitando, portanto, de suprimento de oxigênio constantemente. Porém, elas possuem uma grande sensibilidade ao estresse causado pelo sistema de transferência de O_2 , seja ele decorrente do sistema de agitação mecânica ou do sistema de aeração, o que é pior nos sistemas com células de insetos, pois estas são ainda mais sensíveis.

Para o cultivo dessas células é fundamental que os sistemas sejam bem dimensionados no que tange a tipo de meio de cultura, temperatura de trabalho e condições de agitação e aeração, pois é necessária uma transferência de oxigênio eficiente e otimizada para que o sistema possa vir a ser utilizado em escala industrial.

A contínua transferência de oxigênio ao cultivo celular é importante, pois o oxigênio é consumido para a oxidação da glicose, porém sua solubilidade em água é baixa, tornando-se muitas vezes um fator limitante ao aumento de escala. Portanto, o estudo da intensidade de respiração (velocidade específica e consumo total de oxigênio) e da otimização das condições de cultivo em biorreator serve para nortear outros estudos relacionados à utilização de células de insetos. Recentemente, Goudar e colaboradores (Goudar *et al.*, 2011) fizeram um estudo sobre Q_{O_2} , incluindo uma extensa lista de valores típicos para diferentes linhagens de células de mamíferos.

O objetivo geral deste trabalho é investigar a atividade respiratória e a transferência de oxigênio durante o crescimento de diferentes linhagens de células de inseto como *Spodoptera frugiperda* (Sf9), *Drosophila melanogaster* (S2) selvagem e transfectada para a expressão de GPV e EGFP.

MATERIAL E MÉTODOS

1. LINHAGEM DE CÉLULAS E MEIO DE CULTURA

Primeiramente, foram utilizadas células Sf9 (isoladas do ovário de pupa da borboleta *Spodoptera frugiperda*) de linhagem originalmente obtida da ATCC 1711 (ICB – USP), estando durante ensaio na passagem 98. Esta célula foi descongelada do banco de células congeladas na passagem 85 em meio isento de soro SF900 II (Gibco, Grand Island, NY) com adição de 10% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (Merck). Em seguida, as células foram mantidas em Schott em meio de cultura SF900 II isento de soro fetal bovino. Posteriormente,

foram utilizadas células S2 selvagens (Invitrogen, obtidas a partir de células isoladas de uma cultura primária de embriões de *Drosophila melanogaster* em estágios tardios de desenvolvimento) com passagens 57 e 65; células S2 transfectadas com os vetores pAcGPV e pCoHygro (S2AcGPV) construídas por Yokomizo *et al.* (2007) que expressam constitutivamente a glicoproteína G do vírus da raiva; células S2 transfectada com o vetor pMtEGFP (S2MtEGFP), na passagem 77, construídas por Santos (2006) que expressam a proteína EGFP após a indução com sulfato de cobre (700 μ M), todas no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan.

Durante essa manutenção todas as células foram mantidas em frascos tipo *Schott* (100 mL de volume total e 10 mL de cultura de células) em incubador rotativo, 100 min⁻¹ e a 28°C, sendo realizados repiques (1:4 v/v) a cada 4/5 dias para a manutenção das células em fase exponencial e alta viabilidade.

2. BIORREATOR E INSTRUMENTAÇÃO ASSOCIADA

Para a execução dos ensaios foi utilizado o biorreator Inceltech Discovery 100 (Inceltech, França), com dorna de volume total de 2L e volume de trabalho de 1L e sistema de controle M.R.U. (Inceltech, França) conforme a Figura 1. Esse sistema conta com controle de temperatura (sensor Pt100, aquecimento por manta externa envolvendo a dorna e resfriamento por abertura de válvula para a passagem de água fria em uma termo-chicana); controle de pH (sonda Mettler Toledo, atuação por acionamento de bomba peristáltica); controle da agitação (sensor de rotação e atuação por motor acoplado a mecanismo de transmissão magnética) e controle do oxigênio dissolvido (sonda polarográfica Mettler Toledo com atuação por tempo de abertura de válvula e fluxo controlado por rotâmetro). Foram utilizados os sistemas originais para o controle da temperatura e frequência de agitação, mantidas constantes em 28°C e 100 rpm em todos os ensaios. O pH foi apenas monitorado, não sendo utilizada nenhuma intervenção. No caso do controle de oxigênio dissolvido, o sistema original foi substituído por um sistema de atuação de dois fluxômetros. O eletrodo de oxigênio foi calibrado em água saturada por ar na temperatura de 28°C. O biorreator está conectado a um microcomputador, onde através do software Bioac (Inceltech, França) é feito o registro dos dados. O software permite ainda a programação remota do M.R.U. através do computador.

Figura 1 – Foto do biorreator e seus equipamentos

2.1. Sistema de Transferência de Oxigênio

Foi utilizado um par de controladores mássicos de vazão (fluxômetros), modelo 5850EM, da Brooks Instruments (Holand, NL), para a modulação da vazão de gases para transferência de oxigênio. Um fluxômetro (1) possui vazão entre 0 e 50 mL/min e o outro (2) entre 0 e 200 mL/min. Esses fluxômetros são controlados pelo módulo de controle 0152 também da Brooks Instruments, que conta com entrada para controle externo, com faixa para o sinal de entrada entre 1 e 5V, sendo um sinal de 1V para atuação igual a zero e um sinal de 5V para atuação igual a 100%. Desta forma, a atuação do controlador M.R.U. no fluxômetro tem a resolução de 40 pontos (4V da faixa de entrada do fluxômetro dividido pela resolução de 0,1V da saída analógica do M.R.U.).

Como convenção foi utilizada o termo fluxômetro 1 para designar o fluxômetro que recebe o sinal de atuação enviado pelo M.R.U. e fluxômetro 2 para o fluxômetro com vazão fixa. Assim, o fluxômetro 1 será sempre o responsável pelo aumento da transferência de oxigênio (atuação positiva). Conforme a Figura 2, foi utilizada uma configuração com dois fluxômetros instalados em série, sendo que o fluxômetro 1 (0 a 50 mL/min) controla a vazão de oxigênio puro e o fluxômetro 2 controla a vazão total de aeração em um valor fixo de 52 mL/min. A modulação do controle é feita pela variação de composição do gás de aeração, sendo que para atuação igual a zero, a composição do gás de aeração total seria de 52 mL/min de nitrogênio.

Figura 2 – Esquema da configuração do sistema de transferência de oxigênio
(Adaptado de Marques, 2005)

A transferência de oxigênio foi realizada através de tubo de silicone (Medicone, 200 Multiplast, Brasil) com diâmetro interno de 3 mm, diâmetro externo de 5 mm e comprimento de 4,20 m, com superfície em contato com o meio de cultura de aproximadamente $0,13 \text{ m}^2$ para o ensaio com as células Sf9. A partir do ensaio com as células S2 p.57 foi trocada a membrana, utilizando então uma membrana de silicone (Silastic RX 50, Laboratory Tubing, Dow Corning Corporation, USA) com diâmetro interno de 2 mm, diâmetro externo de 3,2 mm e comprimento de 8,30 m, com superfície em contato com o meio de cultura de aproximadamente $0,17 \text{ m}^2$.

3. PROTOCOLO DE INOCULAÇÃO DO BIORREATOR

O pré-inóculo do reator das células Sf9 foi feito a partir de 30 mL de cultura celular proveniente de três frascos *Schotts* de 100 mL (10 mL de cultura cada e concentração celular de aproximadamente $5,0 \times 10^6$ cel viáveis/mL) e 170 mL de meio fresco, totalizando 200 mL. Ou seja, tem-se um pré-inóculo com concentração celular inicial de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ cel/mL. A cultura é agitada a 100 min^{-1} (turbina parcialmente imersa na cultura) com temperatura controlada a 28°C e o oxigênio dissolvido é monitorado (não havendo nenhuma renovação de ar no reator). Entre 36 e 48 horas (quando a concentração de oxigênio dissolvido chega perto de 20%) a concentração celular é de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ cel/mL, quando o volume de trabalho é completado, com meio fresco, para 1000 mL. Obtendo-se assim, uma concentração inicial de aproximadamente 5×10^5 cel/mL. Este sistema de inóculo adaptado de Marques (2005) apresenta como vantagem a não realização de amostragem periódica para a determinação do momento de início do ensaio. Isto é possível, pois a concentração de

oxigênio na fase líquida reflete o consumo global da cultura até aquele momento. Outra vantagem deste protocolo é o fato das células já estarem adaptadas ao ambiente do biorreator no início do ensaio.

Já o inóculo das células de S2 selvagem ou transfectada foi feito em três frascos *Schotts* de 250 mL com 25 mL de cultura cada e cultivado até atingir a concentração celular de aproximadamente $7,0 \times 10^6$ cel viáveis/mL. Estes 75 mL de cultura foram transferidos para o reator acrescidos de 925 mL de meio fresco, chegando a um inóculo com concentração celular inicial de aproximadamente $5,0 \times 10^5$ cel/mL. A cultura é agitada a 100 min^{-1} com temperatura controlada a 28°C e o oxigênio dissolvido é controlado a 40% da saturação com ar atmosférico. Este inóculo terá uma fase inicial de adaptação ao reator antes de começar efetivamente a crescer.

A diferença de preparação do inoculo no reator entre as células sf9 e S2 é devido ao fato das células S2 sem agitação, por um longo período, se depositarem no fundo do reator.

4. MEDIDA DE DENSIDADE CELULAR

A medida de densidade celular foi realizada utilizando um hemacitômetro (câmara de Neubauer) e as células foram contadas com a ajuda de um microscópio óptico. A diferenciação entre as células viáveis e não viáveis foi feita através da adição do corante Azul de Tripán com concentração de 0,3 M (Merck). A célula que apresentou sua membrana rompida foi invadida pelo corante, sendo considerada não viável. Foram contados 24 campos para cada amostra, ou seja, 3 lâminas, sendo considerado uma concentração celular a média de 4 campos, resultando em 6 valores de concentração por amostra. Os erros foram calculados para um intervalo de confiança de 95% (teste t).

5. MEDIDAS DE CONSUMO E TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO

5.1 Determinação de k_La , OUR e Q_{O_2} pelo Balanço na Fase Líquida (BFL)

Dada a característica do sistema de transferência de oxigênio utilizado neste trabalho, que é o k_La fixo, foi possível calcular a OUR pelo balanço de oxigênio na fase líquida utilizando a estratégia descrita por Kamem *et al.* (1996) no cultivo de células de inseto. Foi utilizado, em seu trabalho, um sistema em que foi mantida uma vazão constante e, para a modulação do controle de oxigênio, foi $OUR = k_La.(C_s - C)$ variada a pressão parcial de oxigênio através da mudança na fração mássica de oxigênio no gás de aeração, sendo esta regulação

obtida pelo uso de um par de fluxômetros mássicos que dosavam a proporção entre os gases O_2 e N_2 . Assim como no presente trabalho, com C mantido controlado ($dC/dt = 0$) o balanço de oxigênio na fase líquida pode ser dado por:

$$OUR = k_L a. (C_s - C)$$

Considerando $k_L a$ constante no cultivo e conhecido, C conhecido (medido pelo eletrodo) e C_s função da atuação necessária para o controle manter o set-point, a OUR pode ser calculado em tempo real, assim como a velocidade específica de respiração (Q_{O_2}) que é dada por:

$$Q_{O_2} = \frac{OUR}{X}$$

5.2 Cálculo de velocidade específica de crescimento

A velocidade específica de crescimento celular, μ_x , foi calculada segundo o método geométrico de cálculo de derivadas proposto por Le Duy e Zajic (1973) com as equações deste método implementadas em planilha de cálculo Microsoft Excel por Gombert (2001). No artigo original foi descrito uma sub-rotina em Fortran que posteriormente foi atualizada para a planilha Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em ensaio foi realizado com célula *Spodoptera frugiperda* Sf9 na passagem 98 sem infecção viral. O oxigênio dissolvido (OD) foi controlado a 40% e a sobrepressão na membrana de silicone foi mantida a 0,4 bar até o 7º dia e aumentada para 1 bar a partir de então. Esse aumento foi necessário, pois o fornecimento de oxigênio estava chegando ao limite (limitado pela ação do fluxômetro) podendo tornar-se um fator limitante. A agitação foi mantida a 100 rpm, a temperatura controlada a 28°C.

No Gráfico 1, observam-se as principais variáveis deste ensaio. A agitação, temperatura e oxigênio dissolvido foram bem controlados. Apenas no início do ensaio houve um pequeno problema com o manômetro do cilindro de oxigênio.

Como o fluxômetro de oxigênio é de 50 mL/min e como cada unidade da ação corresponde a 1,25 mL/min de vazão de gás, logo a ação máxima possível para esse fluxômetro é de 40%. Pode-se observar, no Gráfico 1, que a atuação da ação, que por volta do 7º dia estava quase no seu limite. Assim, para evitar problemas de limitação pelo oxigênio, a sobrepressão foi aumentada para 1 bar e após pequena oscilação o OD voltou a ser bem controlado.

A partir de um inóculo de $0,22 \cdot 10^6$ cel/mL, as células cresceram exponencialmente até uma concentração celular máxima de $10,70 \cdot 10^6$ cel/mL aproximadamente no 8º dia. A viabilidade esteve por volta de 97% até o 8º dia decaindo daí em diante. A máxima velocidade específica de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) foi de $0,70 \text{ dia}^{-1}$ verificada até o 6º dia (Gráfico 2).

No Gráfico 3, observa-se a medida da OUR e Q_{O_2} estimada através do Balanço na Fase Líquida (BFL), onde tem-se que a máxima OUR alcançada foi de $1,43 \text{ mmolO}_2/\text{L.h}$ verificada durante a fase exponencial, enquanto o máximo Q_{O_2} alcançado foi de $10,64 \cdot 10^{-17} \text{ molO}_2/\text{cel.s}$ durante a fase lag decaindo posteriormente para $7,44 \cdot 10^{-17} \text{ molO}_2/\text{cel.s}$ durante a fase exponencial.

Gráfico 3 – Medidas de OUR e Q_{O_2} pelo Balanço da Fase Líquida do Ensaio com as células Sf9 em função do tempo.

Posteriormente realizou-se um ensaio com células S2 selvagens na passagem 57 em meio de cultura SF900 II isento de soro fetal bovino e foi controlado a 40% de OD com sobrepressão na membrana de silicone de 0,5 bar durante todo o ensaio. Este ensaio transcorreu bem, porém não houve condições de uso de refrigeração do cultivo, assim a temperatura sofreu algumas

oscilações, chegando a 35°C, como observado no Gráfico 4. A concentração celular inicial foi de $0,24 \cdot 10^6$ cel/mL, chegando a $44,80 \cdot 10^6$ cel/mL no 8º dia.

No Gráfico 5, observa-se que a máxima velocidade específica de crescimento celular ($\mu_{\max}$) foi de $1,03 \text{ dia}^{-1}$ verificado no início do cultivo. Nota-se também, que a velocidade específica de crescimento celular foi afetada com os aumentos da temperatura, pois até o segundo dia a velocidade específica de crescimento celular foi $1,03 \text{ dia}^{-1}$, mas depois dos grandes aumentos de temperatura a velocidade específica de crescimento decaiu para $0,34 \text{ dia}^{-1}$.

OUR e Q_{O_2} foram medidos através do Balanço na Fase Líquida (Gráfico 6) onde tem-se que a máxima OUR alcançada foi de $1,13 \text{ mmolO}_2/\text{L.h}$ verificada durante a fase exponencial, enquanto o máximo Q_{O_2} alcançado foi de $24,75 \cdot 10^{-18} \text{ molO}_2/\text{cel.s}$ durante a fase lag decaindo posteriormente para $11,90 \cdot 10^{-18} \text{ molO}_2/\text{cel.s}$ durante a fase exponencial.

Gráfico 6 – Medidas de OUR e Q_{O_2} pelo Balanço da Fase Líquida do Ensaio com as células S2 p.57 em função do tempo.

Portanto, observa-se que o maior Q_{O_2} foi verificado no início do ensaio, justamente quando houve um grande aumento da temperatura. Nos instantes de aumento de temperatura houve também um aumento da ação. A fase exponencial, muito curta, verificada no início do cultivo foi interrompida a partir do primeiro grande aumento da temperatura. A curva de crescimento a partir do dia 2, quando sofreu essa interrupção, torna-se praticamente uma reta. Esse efeito pode ter sido causado pela alta temperatura ou até pelo aumento de oxigênio no gás de aeração, como pode ser notado devido ao aumento da ação. Depois que a temperatura retoma os 28°C, a ação volta a ter o comportamento esperado, aumentando conforme cresce a população e decrescendo com a queda da viabilidade celular.

Em seguida foi realizado com células S2 selvagem na passagem 65 em meio de cultura SF900 II e foi controlado a 40% de OD com sobrepressão na membrana de silicone de 0,5 bar. Este ensaio transcorreu muito bem, com os controles com um desempenho satisfatório. Quanto ao número da passagem, não existem diferenças na fisiologia das células entre os ensaios na passagem 57 e 65, pois são passagens muito próximas. Porém, sempre que possível, deve-se saber qual a passagem em que as células se encontram, pois podem existir modificações após muitas passagens e também, sabendo-se a passagem, servirá de modelo para comparação para outros pesquisadores. Este ensaio com célula S2 selvagem foi repetido, pois o anterior (S2 p.57) teve problemas com a temperatura elevada. Assim, com um ensaio com correto controle, pode-se ver também a influência da temperatura no crescimento das células.

No Gráfico 7 podem ser observados todos os controles. Pode-se observar que a ação máxima solicitada foi por volta de 24%, o que mostra que o fornecimento máximo de oxigênio não ultrapassou 30 mL/min.

Gráfico 7 – Temperatura, OD, ação do controlador de OD e concentração de células viáveis do Ensaio com as células S2 p.65 em função do tempo. As setas representam as tomadas de medidas através do Método Dinâmico.

A concentração celular inicial foi de $0,98.10^6$ cel/mL, chegando a $51,20.10^6$ cel/mL no 4º dia de cultivo. Comparando-se com o Ensaio com S2 p.57, este ensaio foi feito em um tempo mais curto devido a concentração inicial do inoculo ser maior e também devido ao fato de ter existido uma fase exponencial e não um crescimento linear como no Ensaio S2 p.57.

Gráfico 8 – Viabilidade celular e velocidade específica de crescimento celular do Ensaio com as células S2 p.65 em função do tempo.

No Gráfico 8, observa-se que a máxima velocidade específica de crescimento celular ($\mu_{\max}$) foi de $1,07 \text{ dia}^{-1}$ verificado até o 3º dia de cultivo. O comportamento da velocidade específica de crescimento celular foi diferente que no Ensaio da passagem 57, atingindo seu valor máximo próximo do ponto de crescimento celular máximo, no final da fase exponencial.

Gráfico 9 – Medidas de OUR e Q_{O_2} pelo Balanço da Fase Líquida do Ensaio com as células S2 p.65 em função do tempo.

OUR e Q_{O_2} foram medidos através do Balanço na Fase Líquida (Gráfico 9) onde tem-se que a máxima OUR alcançada foi de $0,98 \text{ mmol O}_2/\text{L.h}$ verificada após a fase exponencial, enquanto o máximo Q_{O_2} alcançado foi de $28,62 \cdot 10^{-18} \text{ mol O}_2/\text{cel.s}$ durante a fase lag decaindo posteriormente para $7,42 \cdot 10^{-18} \text{ mol O}_2/\text{cel.s}$ durante a fase exponencial.

Comparativamente, nota-se a influência da alta temperatura na velocidade específica de respiração. Há altas temperaturas (acima de 30°C) o Q_{O_2} é 60% maior no Ensaio da passagem 57 que no Ensaio da passagem 65.

Após o trabalho e dados colhidos com as células S2 selvagens procedeu-se ao ensaio com células recombinantes. Foi feito, então, o ensaio com as células S2AcGPV transfectadas segundo Yokomizo *et al.* (2007), no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan. Este ensaio foi realizado em meio de cultura SF900 II e foi controlado a 40% de OD com sobrepressão na membrana de silicone de 0,5 bar. Este ensaio transcorreu com os controles com desempenho satisfatório.

No Gráfico 10 podem ser observados todos os controles. Nota-se, mais uma vez, que os picos descendentes em OD e ação são devidos ao Método Dinâmico. A concentração celular inicial

Gráfico 10 – Temperatura, OD, ação do controlador de OD e concentração de células viáveis do ensaio com células S2AcGPV em função do tempo.

Gráfico 11 – Viabilidade celular e velocidade específica de crescimento celular do Ensaio com as células S2AcGPV em função do tempo.

foi de $0,50 \cdot 10^6$ cel/mL, chegando a $26,60 \cdot 10^6$ cel/mL no 8º dia de cultivo.

No Gráfico 11, observa-se que a máxima velocidade específica de crescimento celular ($\mu_{\max}$) foi de $1,26 \text{ dia}^{-1}$ verificado em torno do 5º dia de cultivo.

OUR e Q_{O_2} foram medidos através do Balanço da Fase Líquida (Gráfico 12) onde tem-se que a máxima OUR alcançada foi de $0,87 \text{ mmolO}_2/\text{L.h}$ verificada no final da fase exponencial, enquanto o máximo Q_{O_2} alcançado foi de $58,45 \cdot 10^{-18} \text{ molO}_2/\text{cel.s}$ durante a fase lag decaindo posteriormente para $13,71 \cdot 10^{-18} \text{ molO}_2/\text{cel.s}$ durante a fase exponencial.

Gráfico 12 – Medidas de OUR e Q_{O_2} pelo Balanço da Fase Líquida do Ensaio com as células S2AcGPV em função do tempo.

Gráfico 13 – Temperatura, OD, ação do controlador de OD e concentração de células viáveis do Ensaio com as células S2MtEGFP em função do tempo.

Gráfico 14 – Viabilidade celular e velocidade específica de crescimento celular do Ensaio com as células S2MtEGFP em função do tempo.

Posteriormente procedeu ao ensaio com a linhagem das células S2MtEGFP foi obtida por Santos (2006) no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan. Este ensaio foi realizado em meio de cultura SF900 II e foi controlado a 40% de OD com sobrepressão na membrana de silicone de 0,5 bar. Este ensaio transcorreu com os controles com desempenho satisfatório. No Gráfico 13 podem ser observados todos os controles. A concentração celular inicial foi de $0,56.10^6$ cel/mL, chegando a $17,80.10^6$ cel/mL no 8º dia de cultivo.

No Gráfico 14, observa-se que a máxima velocidade específica de crescimento celular ($\mu_{\max}$) foi de $0,68 \text{ dia}^{-1}$ verificada até a indução, decaindo após isso para um $\mu_{\max}$ de $0,38 \text{ dia}^{-1}$.

OUR, k_{La} e Q_{O_2} foram medidos através do Balanço da Fase Líquida (Gráfico 15) onde tem-se que a máxima OUR alcançada foi de $0,69 \text{ mmolO}_2/\text{L.h}$ verificada no final da fase exponencial, enquanto o máximo Q_{O_2} alcançado foi de $31,00.10^{-18} \text{ molO}_2/\text{cel.s}$ durante a fase lag decaindo posteriormente para $18,84.10^{-18} \text{ molO}_2/\text{cel.s}$ durante a fase exponencial.

Gráfico 15 – Medidas de OUR e Q_{O_2} pelo Balanço da Fase Líquida do Ensaio com as células S2MtEGFP em função do tempo.

Comparando-se o ensaio da célula Sf9 com os demais ensaios com as células S2 selvagens e transfectadas, observa-se que a Sf9 tem uma velocidade específica de respiração maior que as demais e que o Q_{O_2} gira em torno de $7,47.10^{-17} \text{ mol O}_2/(\text{cel.s})$. Segundo Kioukia *et al.* (1995) a velocidade específica da Sf9 está entre $3,5$ e $9,9.10^{-17} \text{ mol O}_2/(\text{cel.s})$ e segundo Marques (2005) em torno de $6,06.10^{-17} \text{ mol O}_2/(\text{cel.s})$ conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Quadro comparativo entre ensaios com Sf9

	Dados de Sf9 (Ensaio 1)	Dados de Sf9 - Marques (2005)
X_{inicial} (cel/mL)	$0,22 \cdot 10^6$	$0,65 \cdot 10^6$
$X_{\text{máx}}$ (cel/mL)	$10,70 \cdot 10^6$	$8,80 \cdot 10^6$
$OUR_{\text{máx}}$ (mmolO ₂ /(L.h))	1,43	1,22
$Q_{O_2 \text{ máx}}$ (mol O ₂ /(cel.s))	$74,4 \cdot 10^{-18}$	$60,6 \cdot 10^{-18}$
$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)	0,70	0,65

Já as linhagens selvagens de S2 tem uma velocidade específica de respiração durante a fase de crescimento exponencial de $15,18 \cdot 10^{-18}$ mol O₂/(cel.s) e as transfectadas de $13,71 \cdot 10^{-18}$ mol O₂/(cel.s) (S2AcGPV) e $18,84 \cdot 10^{-18}$ mol O₂/(cel.s) (S2MtEGFP).

Outro fator que ficou evidenciado, através dos ensaios, foi o problema que a alta temperatura do cultivo pode provocar, chegando a mostrar-se como um fator inibitório. A influência da temperatura no crescimento celular já havia sido notada por Chuppa *et al.* (1997).

E, finalmente, através dos valores encontrados da atividade respiratória de cada linhagem celular pode-se dizer que as células selvagens e transfectadas são diferentes entre si.

Os valores máximos encontrados são apresentados na Tabela 2:

Tabela 2 – Máximos valores encontrados nos Ensaios através do Balanço na Fase Líquida (BFL)

Célula	X (cel/mL)	OUR_{max} (mmolO ₂ /L.h)	Q_{O_2} fase exponencial (10^{-18} molO ₂ /cel.s)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)
Sf9	$10,7 \cdot 10^6$	1,43	74,40	0,70
S2 pas. 57	$44,8 \cdot 10^6$	1,13	11,90	0,34
S2 pas. 65	$51,2 \cdot 10^6$	0,98	7,42	1,07
S2AcGPV	$26,6 \cdot 10^6$	0,87	13,71	1,26
S2MtEGFP	$17,80 \cdot 10^6$	0,69	18,84	0,38

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados mostram que a velocidade de respiração de células de inseto varia bastante entre linhagens (Sf9 e S2) e construções (selvagens ou recombinantes). Essas conclusões são fundamentais na hora de se projetar sistemas em maior escala, de modo a se evitar que o sistema de transferência de oxigênio limite o crescimento celular.

4.4 METODOLOGIA DE CÁLCULO DE CCRIT EM CÉLULAS ANIMAIS

Marilena Martins Pamboukian¹; Carlos Augusto Pereira²; Aldo Tonso¹

¹ Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica, USP, São Paulo

² Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, São Paulo

RESUMO

Uma das informações mais importantes para o dimensionamento de um sistema de aeração em um cultivo de células animais é o conhecimento de qual é a mínima concentração de oxigênio dissolvido na qual a velocidade específica de respiração se mantém máxima. Para tanto, implementou-se neste trabalho um método de cálculo prático dessa concentração mínima (C_{crit}), baseado na alteração da velocidade específica de respiração (Q_{O_2}). Células de inseto de *Drosophila melanogaster* S2 selvagem e transfectadas foram cultivadas em biorreator para determinação de C_{crit} , obtendo-se valores entre 5% e 12% da saturação com ar.

INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas para a ampliação de escala de um bioprocessos com células animais advém das baixas concentrações celulares e de produtos normalmente resultantes desses cultivos. Assim, a meta é a obtenção de concentrações celulares elevadas com um sistema de transferência de oxigênio otimizada para que haja suprimento contínuo de oxigênio, porém equacionando o problema de suscetibilidade das células às tensões de cisalhamento.

Para tanto é importante o conhecimento da mínima concentração de oxigênio onde a velocidade específica de respiração é constante e máxima. Isso significa que o dimensionamento de um sistema de agitação e aeração, caso tenha como objetivo permitir a máxima velocidade específica de respiração (situação muito frequente) deve buscar a manutenção da concentração de oxigênio dissolvido acima da concentração crítica, a fim de que o oxigênio não seja limitante.

O Q_{O_2} (velocidade específica de respiração) para uma dada linhagem depende das condições de cultivo e estado fisiológico da célula. A curva de Q_{O_2} como função de C (concentração de oxigênio no líquido) apresenta uma saturação, ou seja, a partir de certa concentração de

oxigênio dissolvido, Q_{O_2} é relativamente constante e máximo, e em valores menores que esta concentração, Q_{O_2} começa a diminuir. Esta concentração é chamada de concentração crítica (C_{crit}). As concentrações críticas para células de inseto costumam ser menores que 10% da saturação com ar (AGATHOS, 1996). Estes valores são característicos de células que crescem isoladamente (SCHMIDELL, 2001).

A Figura 1 ilustra a variação de Q_{O_2} com a concentração de oxigênio dissolvido no meio. Nessa figura observa-se que acima de uma dada concentração de oxigênio dissolvido, definida como concentração crítica (C_{crit}), o valor de Q_{O_2} é constante e máximo. Isso significa que o dimensionamento de um sistema de agitação e aeração, caso se tenha o objetivo de permitir a máxima velocidade específica de respiração (o que é frequente), deve-se buscar a manutenção da concentração de oxigênio dissolvido acima da concentração crítica, a fim de que o oxigênio não seja limitante.

Figura 1 – Representação esquemática da variação de Q_{O_2} com C
(Adaptado de SCHMIDELL, 2001)

O valor de C_{crit} é costumeiramente apresentado em porcentagem da saturação com ar, valor este que pode ser lido diretamente do eletrodo de oxigênio. Normalmente o C_{crit} é encontrado após vários experimentos com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido (OD) verificando-se qual a menor concentração frente à maior velocidade específica de respiração. Este trabalho propõe-se a estudar uma maneira prática, embasada na teoria, de se obter essa concentração de oxigênio (C_{crit}) sem a necessidade da realização de vários experimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. BIORREATOR

Para a execução dos ensaios foi utilizado o biorreator Discovery (Inceltech, França) com dorna de volume total de 2L e volume de trabalho de 1L e sistema de controle de temperatura, monitoramento de pH, controle da agitação e controle do oxigênio dissolvido (OD). O

controle da temperatura e frequência de agitação foram mantidos constantes em 28°C e 100 rpm em todos os experimentos. O pH foi apenas monitorado, não sendo utilizada nenhuma intervenção. Esse biorreator está conectado a um microcomputador, onde através de seu software é feito o registro dos dados. A transferência de oxigênio foi realizada através de um tubo de silicone localizado dentro do biorreator e OD foi mantido constante em 40% da saturação com ar, com exceção dos períodos de medida de C_{crit} .

2. DETERMINAÇÃO DO C_{crit}

Um novo método para determinação de C_{crit} foi implantado neste trabalho. Ele consiste na interrupção de fornecimento de oxigênio tempo suficiente para que o Q_{O_2} (velocidade específica de respiração) diminua de seu valor máximo. Ou seja, a concentração de oxigênio dissolvido diminui devido à respiração celular até que a velocidade específica de respiração Q_{O_2} seja alterada (SCHMIDELL, 2001).

Durante os cultivos em que se mantém a concentração de oxigênio elevada para que este não se torne um fator limitante, o Q_{O_2} é máximo.

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_s - C) - Q_{O_2} \cdot X \quad (1)$$

Se a transferência ($k_L a (C_s - C)$) é anulada, temos a equação (2). Assim, quando C diminui abaixo de C_{crit} , Q_{O_2} diminui. Dessa forma, a curva $C=f(t)$ muda sua inclinação, pois a partir deste instante a equação (2) não pode ser integrada para a equação (3) porque Q_{O_2} não é constante.

$$\frac{dC}{dt} = -Q_{O_2} \cdot X \quad (2)$$

$$(C - C_0) = Q_{O_2} \cdot X(t - t_0) \quad (3)$$

Nesse ponto, pode-se considerar a concentração como C_{crit} , conforme a Figura 2.

Figura 2 – Representação esquemática do efeito da diminuição de oxigênio dissolvido na velocidade de respiração

Portanto, com a aplicação deste método, é possível verificar a faixa em que se encontra o C_{crit} . Há também a possibilidade de se estar, com este método, alterando a população causando morte ou seleção, porém como o objetivo deste trabalho é o estudo da atividade respiratória, correu-se este risco. Mas, em comparação com os dados obtidos pelos outros colegas do grupo de estudo em relação ao crescimento e produção, não foi verificada nenhuma alteração. Talvez isso indique não haver um problema real de alteração na população, mesmo porque essa oscilação do oxigênio dissolvido é rápida, retornando ao patamar de controle após a verificação do C_{crit} .

3. CULTURA CELULAR

Os experimentos foram realizados com células de *Drosophila melanogaster* selvagem e transfectadas para a expressão da glicoproteína da raiva (S2AcGPV) (YOKOMIZO *et al.*, 2007), da proteína bioluminescente verde da água viva *Aqueorea victoria* (S2MtEGFP) (SANTOS *et al.*, 2007) e da proteína do vírus da hepatite B (S2AcHBsAg) (JORGE *et al.*, 2008) em meio SF900 com controle de temperatura a 28°C, agitação de 100 rpm e oxigênio dissolvido de 40%.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 3 apresentamos um gráfico característico do comportamento das culturas dessas células em biorreator de tanque agitado com aeração através de difusão de oxigênio por mangueiras de silicone.

Figura 3 – Gráfico característico da cultura celular de células S2 de *Drosophila melanogaster*

4. CÁLCULO DO C_{CRIT}

Segundo a teoria acima exposta, foi implementado um método experimental de cálculo de C_{crit} . Conforme pode ser visto na Figura 4, quando se interrompe a transferência de oxigênio, C decai quase como uma reta mudando sua inclinação quando a célula é obrigada a sair de sua velocidade específica máxima de respiração, obtendo-se, assim, o C_{crit} .

Para isto, utilizou-se a célula de *Drosophila melanogaster* selvagem, calculando-se o valor de C_{crit} como em torno de 10% da saturação com ar. As medidas foram feitas em três pontos diferentes do cultivo e em todas às vezes a curva mudou sua inclinação praticamente no mesmo ponto.

Figura 4 – Cálculo do C_{crit} em três diferentes pontos do cultivo de células de S2 selvagem sendo: $C_{crit 1}$ em 3,3 dias com $33,0 \cdot 10^6$ cel/mL ; $C_{crit 2}$ em 4,3 dias com $45,8 \cdot 10^6$ cel/mL e $C_{crit 3}$ em 6 dias com $29,0 \cdot 10^6$ cel/mL.

Na Figura 5 tem-se a cultura com as células S2AcGPV, onde o C_{crit} também ficou em torno de 10% da saturação com ar. Neste experimento, na medida do $C_{crit 3}$, elevou-se o controle do oxigênio dissolvido para 80% e mesmo assim a curva apresentada é muito semelhante às anteriormente calculadas, isso demonstra que indefere qual o nível de oxigênio dissolvido mantido durante os experimentos.

Figura 5 – Cálculo do C_{crit} em três diferentes pontos do cultivo com células S2AcGPV sendo: C_{crit} 1 em 6,3 dias com $19,60 \cdot 10^6$ cel/mL; C_{crit} 2 em 7,2 dias com $24,86 \cdot 10^6$ cel/mL e C_{crit} 3 em 8,9 dias com $22,35 \cdot 10^6$ cel/mL.

Na Figura 6 tem-se a cultura com as células S2MtEGFP, onde C_{crit} ficou em torno de 5% da saturação com ar. Neste experimento foi necessária a indução da célula para que a mesma expresse a proteína pretendida, o que aconteceu após a medida do C_{crit} 1. Assim, nota-se que o valor de C_{crit} não se alterou pela indução. Realmente, a velocidade específica de respiração também não se alterou pela indução.

Figura 6 – Cálculo do $C_{critico}$ em quatro diferentes pontos do cultivo com células S2MtEGFP sendo: C_{crit} 1 em 3,3 dias com $6 \cdot 10^6$ cel/mL; C_{crit} 2 em 4,7 dias com $10,15 \cdot 10^6$ cel/mL; C_{crit} 3 em 5,3 dias com $13,8 \cdot 10^6$ cel/mL e C_{crit} 4 em 6,7 dias com $12,78 \cdot 10^6$ cel/mL.

Por último, foi realizado o experimento com as células S2AcHBsAg onde o C_{crit} ficou em torno de 12% da saturação do ar, conforme Figura 7.

Fica evidenciado assim que, através de algumas amostragens durante um experimento, quando se anula temporariamente a transferência de oxigênio, este método nos informa qual o valor

onde a velocidade específica de respiração sai de seu máximo, balizando qual o valor crítico da concentração de oxigênio dissolvido na cultura celular.

Este método pode ser aplicado para qualquer cultura com células animais com qualquer tipo de transferência de oxigênio, já que as células animais possuem uma respiração mais lenta que os microrganismos, utilizando assim um tempo maior para decaimento da concentração de oxigênio dissolvido em cultura, tempo esse suficiente para se averiguar o valor de C_{crit} .

Figura 7 – Cálculo do C_{crit} em cinco diferentes pontos do cultivo com células S2AcHBsAg sendo:

$C_{crit 1}$ em 7 dias com $4,13 \cdot 10^6$ cel/mL; $C_{crit 2}$ em 8 dias com $6,60 \cdot 10^6$ cel/mL; $C_{crit 3}$ em 8,9 dias com $10,40 \cdot 10^6$ cel/mL; $C_{crit 4}$ em 10,9 dias com $16,60 \cdot 10^6$ cel/mL e $C_{crit 5}$ em 9,9 dias com $14,20 \cdot 10^6$ cel/mL.

CONCLUSÕES

O método implementado neste trabalho para avaliação de C_{crit} , através da análise da inclinação da concentração de oxigênio dissolvido ao se eliminar a transferência de oxigênio se mostrou adequado, tendo-se obtido os seguintes valores:

Valores de C_{crit} obtidos	
Linagem	C_{crit}
S2 (selvagem)	Em torno de 10%
S2AcGPV2	Em torno de 10%
S2MtEGFP	Em torno de 5%
S2AcHBsAgHy	Em torno de 12%

4.5. ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DA ATUAÇÃO DO CONTROLADOR DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO EM CULTIVO DE CÉLULAS DE INSETO

Fabiano Henrique Marques¹, Carlos Augusto Pereira² e Aldo Tonso¹

¹Universidade São Paulo – Escola Politécnica – Depto. de Engenharia Química
Av. Prof. Luciano Gualberto, trav. 3, 380, CEP 05508-900 – Cid. Universitária – São Paulo – SP

²Instituto Butantan – Laboratório de Imunologia Viral
Av. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900 – Butantã – São Paulo – SP
E-mail: atonso@usp.br

RESUMO

Nos cultivos de células de insetos a transferência de oxigênio deve ser uma preocupação constante. No presente trabalho utilizou-se um sistema automático de controle da concentração de oxigênio dissolvido (OD), no qual a vazão total da mistura de ar e oxigênio é mantida constante, e as vazões de cada gás são controladas atuando-se portanto na fração molar de oxigênio na mistura de gases fornecida ao biorreator. Com base nos valores dessa atuação, foi possível se estimar em tempo real (on-line) a velocidade de consumo de oxigênio (OUR) e compará-la com resultados obtidos pelo método dinâmico. Além disso, a velocidade específica de respiração (QO₂) foi utilizada para estimar também em tempo real a concentração celular durante a fase de crescimento. A comparação com medidas off-line através de hemacitômetro mostrou que o método é suficientemente preciso e permite a atuação automática no processo.

INTRODUÇÃO

O crescente uso de células animais em aplicações comerciais, como na produção de biofármacos e a produção de proteínas heterólogas por células de inseto utilizando como vetor um baculovírus, tem motivado a pesquisa em monitoramento e controle dessas culturas. Os parâmetros comumente monitorados no cultivo de células de inseto são aqueles que geralmente estão disponíveis nos sistemas de biorreatores mais comuns, como temperatura, pH e oxigênio dissolvido. Além destes parâmetros, consumo de substrato, produção de metabólitos, concentração celular, viabilidade celular e progresso da infecção podem ser monitorados.

A medida de concentração e viabilidade celular é em geral realizada de modo *off-line*, utilizando normalmente hemacitômetros ou contadores tipo Coulter. A amostragem e contagem das células é um trabalho de difícil automatização, sendo intensivo em trabalho. Desta forma, diversos trabalhos buscaram o desenvolvimento de medidas *on-line* de concentração celular.

Entre estas tentativas está o uso de sensores de densidade ótica (DO) *in situ*, onde pode ser estabelecida uma relação entre densidade ótica medida e concentração celular (BÉDART et al., 1994). Esta técnica é limitada à fase de crescimento, pois durante a fase de infecção com baculovírus, a presença de debris celular, e mudanças no tamanho das células levam a uma medida de concentração celular sobreestimada.

Um sistema mais complexo, como o utilizado por Akhnoukh et al. (1996), que consiste de um biorreator com diversas medidas *on-line* como DO para estimar a concentração celular, fluorescência *in situ* para a determinação da viabilidade celular e progresso da infecção, e sistema de injeção em fluxo para análises de metabólitos, apresenta-se como uma ferramenta muito poderosa para o monitoramento de culturas de células de inseto. Mas devido à sofisticação do sistema, ele é pouco acessível, tornando-se uma realidade distante para a maior parte dos laboratórios e indústrias.

Uma alternativa para o monitoramento do crescimento da cultura e seu estado fisiológico é o acompanhamento da velocidade de consumo de oxigênio (OUR). Uma vez que o quanto as células estão respirando está relacionado a seu estado fisiológico e, para uma dada fase do crescimento a velocidade específica de respiração é aproximadamente constante, a OUR pode ser correlacionada com a concentração celular em boa parte do cultivo (WANG et al., 1994).

A estimativa do OUR pode ser feita pelo método dinâmico de forma pontual e também pode ser feita em tempo real sem a necessidade de alterações nos valores de oxigênio dissolvido. Comumente esta medida em tempo real é feita por meio de um balanço de oxigênio na fase gasosa, onde o total de oxigênio fornecido a cultura é conhecido, e é medido tanto o O₂ quanto o CO₂ na saída do reator, fornecendo dados para o cálculo do consumo de oxigênio.

Uma estratégia alternativa ao balanço de oxigênio na fase gasosa é o balanço de oxigênio na fase líquida. Esta estratégia foi utilizada por Kamen et al. (1996) no cultivo de células de inseto. Eles utilizaram um sistema em que foi mantida uma vazão de aeração constante e, para a modulação do controle de oxigênio, foi variada a pressão parcial de

oxigênio através da mudança na fração mássica de oxigênio no gás de aeração, sendo esta regulação obtida pelo uso de um par de fluxômetros mássicos que dosavam a proporção entre os gases O₂ e N₂. Assim como no presente trabalho, com C mantida controlada, o balanço de oxigênio na fase líquida dado por:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_s - C) - OUR \quad (1)$$

onde C é a concentração de oxigênio dissolvido, k_La é constante de transferência mássica, e C_s é a concentração de oxigênio no gás de aeração, pode ser escrito como:

$$OUR = k_L a (C_s - C) \quad (2)$$

Considerando k_La constante no cultivo e conhecido (pode ser estimado pelo método dinâmico pontualmente no próprio cultivo ou mensurado anteriormente), sendo C conhecido (medido pelo eletrodo), e C_s função da atuação necessária para o controle manter o set-point, OUR pode ser calculada em tempo real. Este dado pode ser utilizado para estimar a concentração celular relacionando OUR com um valor velocidade específica de consumo de oxigênio (Q_{O2}) esperado para a fase da cultura, ou pode ser utilizado para acompanhar alterações na Q_{O2} através da relação entre OUR e concentração celular medida *off-line*.

MATERIAL E MÉTODOS

Células, Meio de Cultura e Baculovírus.

Foram utilizadas células Sf9 (ATCC 1711), estando durante os ensaios entre a passagem 90 e 120. Para formação de banco de células foram congeladas conforme Marques (2005). Para os ensaios, as células foram descongeladas e mantidas em frascos tipo *Schott* (100 mL de volume total e 13 mL de cultura de células) em incubador rotativo, 150 min⁻¹ e a 29 °C, sendo realizados repiques (1:4 v/v) a cada 3 dias para a manutenção das células em fase exponencial e alta viabilidade. Foi utilizado para a manutenção de células e nos ensaios o meio de cultura isento de soro SF900 II (Gibco). Para a infecção com vírus AgNPV conforme descrito em Marques (2005).

Condições de cultivo

O inóculo do biorreator foi feito a partir de 30 mL de cultura proveniente de 3 frascos *Schott* (10 mL de cultura cada e concentração celular de aproximadamente 5x10⁶ células.mL⁻¹) e 170 mL de meio fresco, totalizando 200 mL. Este volume foi transferido ao biorreator e agitado a 110 min⁻¹ sem aspersão. Quando a concentração celular atinge

aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células.mL⁻¹ são transferidos 800 mL de meio fresco, obtendo-se uma concentração celular de aproximadamente 5×10^5 células.mL⁻¹ no início do ensaio.

Concentração celular:

Para a contagem de células foi utilizado um hemacitômetro, com a adição do corante Azul de Tripán (Merck) para a determinação de viabilidade celular. A amostra foi diluída em tampão PBS (Gibco, NY) de forma a se obter entre 50 e 80 células por campo de contagem. Os erros foram calculados para um intervalo de confiança de 95% (teste t).

Biorreator e Instrumentação associada:

O biorreator utilizado foi o Inceltech Discovery 100 (Inceltech, França), com dorna de volume total 2 L e volume de trabalho 1 L e sistema de controle M.R.U. (Inceltech, França). Este sistema conta com controles de: temperatura, pH, agitação, e oxigênio dissolvido (sonda polarográfica Mettler Toledo). Foram utilizados os sistemas originais para o controle de temperatura e frequência de agitação, mantidas constantes em 29°C e 110 rpm, respectivamente, por todos os ensaios. O pH foi apenas monitorado, não sendo realizada nenhuma intervenção. Para o controle de oxigênio dissolvido foi substituído o sistema de atuação por tempo de abertura de válvula por dois fluxômetros conforme descrito no item a seguir. O biorreator está conectado a um microcomputador, onde através do software Bioac (Inceltech, França) é feito o registro dos dados.

Sistema de transferência de Oxigênio

Para a modulação da vazão de gases para a transferência de oxigênio foi utilizado um par de controladores mássicos de vazão (fluxômetros), modelo E0152S, da Brooks Instruments (Holanda). Como convenção, utilizamos o termo fluxômetro 1 para designar a fluxômetro que recebe o sinal de atuação enviado pelo M.R.U e fluxômetro 2 o fluxômetro com vazão fixa estipulada pelo operador. Desta forma, sempre o fluxômetro 1 será responsável pela atuação positiva (aumento da transferência de oxigênio). Foi utilizada uma configuração com dois fluxômetros instalados em série, sendo que o fluxômetro 1 (máx 50 mL/min) controla a vazão de oxigênio puro, grau médico, e o fluxômetro 2 controla a vazão total de aeração em um valor fixo de 52 mL/min. O diagrama do sistema de transferência de

oxigênio pode ser vista na Figura 1. A modulação do controle é feita pela variação de composição do gás de aeração. A transferência de oxigênio é realizada através de um tubo de silicone com diâmetro interno de 2mm, diâmetro externo de 3,2 mm e comprimento aproximado de 3 m. O k_La deste sistema é fixo, dependente da área superficial da membrana de silicone. A transferência de oxigênio nesta configuração varia com a pressão parcial de oxigênio no interior do tubo de silicone. A pressão parcial de oxigênio (C_s) é modulada pela pressão total no interior da membrana e pela fração de O_2 no gás de aeração (X_{O_2}) segundo as equações:

$$V_1 = act.1,25mL.min^{-1} = V_{g1}$$

$$V_2 = 52mL.min^{-1}$$

$$V_{g2} = 52mL.min^{-1} - (act.1,25mL.min^{-1})$$

$$X_{O_2} = \left(\frac{X_{O_2 1} \cdot V_{g1} + X_{O_2 2} \cdot V_{g2}}{V_2} \right)$$

$$C_s = X_{O_2} \cdot P$$

Onde: V_1 é a vazão do fluxômetro 1 (em função da atuação), V_{g1} é a vazão do gás 1 (oxigênio), act é a atuação, V_{g2} é vazão do gás 2 (nitrogênio), V_2 é vazão total limitada de forma fixa pelo fluxômetro 2, $X_{O_2 1}$ é a fração de oxigênio no gás 1, $X_{O_2 2}$ é a fração de oxigênio no gás 2 e P é a pressão total média no interior da membrana. A pressão na saída do tubo é regulada por uma válvula 10BP Back Pressure Regulator (Fairchild, Winston-Salen, N.C.).

Figura 1: Diagrama da configuração do sistema de transferência de oxigênio

Medidas de Consumo e Transferência de Oxigênio

Para as medidas de consumo e transferência de oxigênio foram utilizadas as leituras de tensão de oxigênio dissolvido medidas pelo eletrodo e os dados registrados de atuação. O eletrodo de oxigênio foi calibrado em água saturada por ar na temperatura de 29 °C, resultando que cada 1% de leitura equivale a 0,00239 mmol de oxigênio/L (calculado a partir do valor tabelado para a concentração de saturação do oxigênio em água a 29 °C e 700 mmHg) (U.S. GEOLOGICAL SURVEY, 2011).

Determinação de k_La , OUR e Q_{O_2} pelo método dinâmico (MD):

A determinação da OUR, k_La e Q_{O_2} foi feita utilizando o método dinâmico, que consiste em interromper a transferência de oxigênio para a cultura resultando que toda variação no valor de OD é proveniente do consumo de oxigênio pelas células. O valor de OUR (mmol.h^{-1}) obtido foi utilizado para o cálculo do k_La do sistema. A velocidade específica de respiração foi calculada pela divisão da OUR pela concentração de células viáveis presentes no reator. Este valor foi expresso em mol de oxigênio por segundo por célula.

Determinação contínua de OUR por Balanço na Fase Líquida (BFL):

Dada a característica do sistema de transferência de oxigênio utilizado neste trabalho, que é o k_La fixo, foi possível calcular a OUR pelo balanço de oxigênio na fase líquida utilizando a mesma estratégia descrita em Kamen et al. (1996). Esta estratégia permitiu o cálculo de um valor de OUR a cada minuto, que é a taxa de amostragem dos valores de atuação e OD.

Concentração celular estimada através dos valores de OUR:

Tomando-se um valor médio de Q_{O_2} para a célula, válido para determinado período, e dividindo o valor de OUR pelo Q_{O_2} , pode-se obter uma estimativa da concentração celular. Esta estimativa pode ser calculada para cada medida de OUR calculada pelo método BFL, resultando em um perfil contínuo da concentração celular estimada.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para a realização deste trabalho foram realizados 3 ensaios com o oxigênio dissolvido controlado em 80% (E1), 5% (E2) e 40% (E3). Para ilustrar são apresentados nas figuras 2 e 3 gráficos de um ensaio típico, o ensaio E1. Na figura 2 pode-se observar as curvas de

concentração celular, OD e de atuação do sistema de controle de OD. O sistema de controle do oxigênio dissolvido apresentou um bom desempenho, sendo sempre observado um valor próximo ao *set-point* com exceção dos momentos onde foram realizadas medidas de OUR pelo MD. Na figura 3 podemos observar o perfil de OUR calculado por BFL e observar sua concordância com os resultados obtidos pelo MD, indicando a confiabilidade do método. Pode-se observar também o perfil de Q_{O_2} ao longo do tempo.

Figura 2: Oxigênio dissolvido, atuação do controle de OD e células viáveis ao longo do ensaio E1.

Figura 3: OUR calculada pelo MD, OUR calculada pelo BFL, Q_{O_2} calculada pelo MD e Q_{O_2} calculada pelo BFL ao longo do ensaio E1. Instante da infecção indicado com seta.

A principal vantagem, porém, de se utilizar um sistema com relação conhecida entre atuação e transferência de oxigênio é a possibilidade de calcular em tempo real e com exatidão a OUR do cultivo através do Balanço de Oxigênio na Fase Líquida (BFL). Este dado pode ser diretamente relacionado à biomassa pela sua relação com a Q_{O_2} , permitindo estimar a concentração de células presentes na cultura.

Esta estimativa foi feita tanto por um valor de Q_{O_2} média de 3 ensaios ($7,68 \cdot 10^{-17} \text{ mol.cel}^{-1} \text{ s}^{-1}$), curva identificada como CEL_BFL1 e também utilizando o valor de Q_{O_2} do próprio ensaio (curva CEL_BFL2). Na Fig. 4 podemos ver as curvas de concentração celular obtidas por contagem e estimada por BFL para os ensaios E1. O erro médio deste método é apresentado na Tabela 1.

Figura 4: Comparação entre a concentração celular por contagem e estimadas por Balanço de oxigênio da fase líquida ao longo do ensaio E1.

CEL_BFL1 é a estimativa feita utilizando o valor médio de Q_{O_2} dos cinco ensaios.

CEL_BFL2 é a estimativa utilizando o valor de Q_{O_2} do próprio ensaio.

A precisão da estimativa de células é ligeiramente maior utilizando o valor de Q_{O_2} do próprio ensaio (erro 2). Mas mesmo utilizando um dado médio, obtemos uma estimativa razoável. Desta forma, a concentração celular poderia ser estimada em tempo real com uma boa exatidão e poderia ser melhorada pela correção com uma contagem de células em hemacitômetro, levando uma exatidão mínima de 90%. Tal processo de estimativa permitiria ações de controle em tempo real, corrigida após as amostragens *off-line*.

Tabela 1 Erros médios da estimativa de concentração celular por BFL

Ensaio	QO ₂ (média)	Erro1	Erro 2
E1	8,05E-17	7,1%	6,0%
E2	7,75E-17	6,8%	6,7%
E3	7,25E-17	10,8%	9,9%

Erro 1: Média aritmética do módulo da diferença entre concentração celular obtida por contagem e a estimada por CEL_BFL1.

Erro 2: Média aritmética do módulo da diferença entre concentração celular obtida por contagem e a estimada por CEL_BFL2

Se durante a fase de crescimento o BFL pode ser utilizado para estimar a concentração celular sem a necessidade de realização de amostragens, após a fase de crescimento a BFL pode ser utilizada para o acompanhamento da variação da QO₂. Assim, diferentes intervenções no processo poderiam ser realizadas baseada neste parâmetro. Por exemplo, a adição de nutrientes e também, no caso de produção de proteínas heterólogas, a decisão de interrupção do processo podem ser realizadas quando a QO₂ atingir um determinado valor. Assim, o monitoramento da OUR em tempo real pode ser uma ferramenta útil para acompanhar o estado fisiológico da cultura.

CONCLUSÕES

O método de cálculo de OUR pelo Balanço de Oxigênio na Fase Líquida se mostrou realizável e preciso, apresentando um bom desempenho operacional. Os resultados mostram que é possível utilizar o BFL para estimar a concentração celular durante a fase de crescimento com exatidão mínima de 90%. Utilizando medidas de concentração celular do próprio ensaio a exatidão média pode ser de até 94%.

4.6. COMPARAÇÃO ENTRE SISTEMAS DE ANÁLISE DE GASES

Thiago Olitta Basso¹ e Aldo Tonso¹

¹Universidade São Paulo – Escola Politécnica – Depto. de Engenharia Química

Av. Prof. Luciano Gualberto, trav. 3, 380, CEP 05508-900 – Cid. Universitária – São Paulo – SP

Av. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900 – Butantã – São Paulo – SP

E-mail: atonso@usp.br

Alternativamente aos métodos apresentados até o momento, há uma outra metodologia para medida da velocidade de respiração, chamada de balanço gasoso (Schmidell, 2001), através da medida da composição de O₂ e CO₂ nos gases afluente e efluente do biorreator, considerando-se que o acúmulo de oxigênio no biorreator é desprezível em relação aos fluxos de entrada e saída. Dessa forma, se forem conhecidas as vazões de gases e as composições de oxigênio, pode-se calcular OUR através de:

$$\text{OUR} = \frac{(Q_E \cdot y_E - Q_S \cdot y_S)}{V},$$

onde Q_E e Q_S são respectivamente as vazões molares de gás de entrada e saída, y_E e y_S são respectivamente as frações molares de oxigênio na entrada e saída do biorreator e V é o volume de líquido no reator.

Através de analisadores de gases e medidores mássicos de vazão gasosa, calcula-se rotineiramente o valor de OUR de cultivos de leveduras no Laboratório de Engenharia Bioquímica da USP.

Particularmente no caso de cultivos com células animais, em virtude dos valores bem menores de velocidade de respiração, aparece uma dificuldade prática. Só dispúnhamos no LEB de um analisador de gases da New Brunswick Scientific (NBS), que necessita de grande vazão gasosa (0,6 L/min). Caso tal vazão fosse usada nos cultivos com células animais, a diferença entre as composições de entrada e saída de oxigênio seria desprezível, muito menor que o erro da medida, e não se chegaria a cálculos confiáveis. Recentemente foi adquirido em projeto do Prof. Andreas, um sistema de análise de gases da Applikon (Holanda), que não requer uma vazão mínima para medida.

Até o momento não foi possível a realização de ensaios com células animais para medida de OUR por balanço gasoso, mas foi feita uma comparação entre as medidas de dois

sistemas da Applikon (do LEB e do ICB/USP, gentilmente emprestado pelo Prof. Gregório) com o antigo da NBS. Os resultados são apresentados nas Figuras 4.6.1 e 4.6.2.

Figura 4.6.1 - Comparação das medidas de fração molar de oxigênio por diferentes analisadores (NBS, LEB e ICB), em relação à composição teórica, calculada pela formulação de um gás a partir de misturas de AR, N₂ e mistura de calibração (com 16% de O₂ e 4% de CO₂), através de uso de controladores mássicos de vazão gasosa da Brooks (Holanda), modelo 5850EM.

Figura 4.6.1 - Comparação das medidas de fração molar de dióxido de carbono por diferentes analisadores (NBS, LEB e ICB), em relação à composição teórica, calculada pela formulação de um gás a partir de misturas de AR, N₂ e mistura de calibração (com 16% de O₂ e 4% de CO₂), através de uso de controladores mássicos de vazão gasosa da Brooks (Holanda), modelo 5850EM.

Ainda não foi feito um ajuste dos coeficientes angulares e lineares da calibração desses sistemas (medidas em mA e/ou V), de modo que os valores lidos não representam uma fração molar do gás, porém os valores do coeficiente de correlação estão muito próximos da unidade, em todos os casos, indicando que feita uma calibração, as medidas interpoladas representarão adequadamente os valores de composição gasosa.

Evidentemente tratam-se de dados preliminares, mas comprovam a confiabilidade dos novos sistemas Applikon, até ligeiramente melhor que o sistema usado até o momento da New Brunswick. Em breve, esse sistema será usado para se obter uma outra estimativa dos valores de OUR nos cultivos de células animais no LEB.

5. CONCLUSÕES

Com base nos trabalhos apresentados anteriormente, pode-se concluir que houve um avanço na metodologia de monitoramento de cultivos celulares. Destaca-se:

- O método de determinação da viabilidade celular por exclusão de azul de Tripan pode fornecer resultados imprecisos, dependendo da linhagem celular cultivada.
- O aumento da osmolalidade gerou aumento na produção do anticorpo monoclonal antiTNF por hibridoma e aumento nas dimensões físicas da célula (diâmetro e volume).
- A rotina automatizada de análise de imagens permitiu a classificação morfológica rápida e imparcial do fungo filamentoso estudado.
- A técnica NIR se demonstrou sensível e eficiente no acompanhamento da fermentação alcoólica em anaerobiose restrita com *S. cerevisiae*.
- A nova metodologia proposta para medida da velocidade específica de consumo de oxigênio resulta em valores mais precisos e mais elevados que aqueles obtidos pelo Método Dinâmico tradicional.
- A velocidade de respiração de células de inseto varia bastante entre linhagens (Sf9 e S2) e construções (selvagens ou recombinantes).
- O método implementado para avaliação de Ccrit se mostrou adequado, tendo-se obtido os valores entre 5 e 12% da saturação com ar para as condições estudadas.
- O método de cálculo de OUR pelo Balanço de Oxigênio na Fase Líquida se mostrou realizável e preciso. Os resultados mostram que é possível utilizá-lo para estimar a concentração celular durante a fase de crescimento com exatidão mínima de 90%.
- O sistema Applikon de análise de gases mostrou-se ser confiável para medida da fração de O₂ e CO₂.

Como perspectivas futuras nesta linha de pesquisa no Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP, pretende-se estudar:

- ensaios com células animais em processo de perfusão (cultivos contínuos com reciclo de células para aumento da concentração celular no interior do biorreator), que usualmente requerem metodologia própria para monitoramento, como por exemplo, a instalação no biorreator de turbidímetro para estimativa *on-line* da concentração celular. Esse equipamento está em processo de aquisição.

- monitoramento da distribuição de diâmetro celular, para se poder acompanhar eventuais alterações de tamanho com o cultivo em meios de cultura de diferentes osmolalidades. Para tanto, está sendo comprado um Scepter Cell Counter, produzido pela Millipore, que utilizando o mesmo princípio do Coulter Counter, criou uma pipetador que com uma simples operação de pipetagem fornece estimativa da concentração celular e da distribuição de diâmetros.
- monitoramento da velocidade de respiração através de sistema de análise de gases da Applikon.

Referências Bibliográficas

- AGATHOS, S.N. Insect cell bioreactors. **Cytotechnology**, v.20, p.173-189, 1996.
- AKHNOUKH, R., KRETZMER, G., SCHUGERL, K. On-line monitoring and control of the cultivation of *Spodoptera frugiperda* Sf9 insect cells and beta-galactosidase production by Autographa californica virus vector. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.220-228, 1996.
- BARRAL MF, PEREIRALIMA PS, Automação e controle de processos fermentativos, In: Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W (Eds.) **Biotecnologia Industrial**, vol. 2, Engenharia Bioquímica, Edgard Blücher Ltda., São Paulo, pp. 397-424, 2001.
- BATISTA, F. R. X. Formulação de meio de cultura livre de proteínas animais para células de *Drosophila melanogaster* produtoras da glicoproteína do vírus da raiva. **Tese de doutorado**. Universidade de Campinas (UNICAMP), 2007.
- BEDARD, C., JOLICOEUR, M., JARDIN, B., TOM, R., PERRET, S., KAMEN, A. Insect-Cell Density in Bioreactor Cultures Can be Estimated from Online Measurements of Optical-Density. **Biotechnology Techniques**, v.8:605-610, 1994.
- BORIN, A., A aplicação de quimiometria e espectroscopia de infravermelho no controle de qualidade de lubrificantes, **Dissertação de mestrado**, Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2003.
- BREZINSKY, S. C. et al. A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. **J Immunol Methods**, v. 277, n. 1-2, p. 141-55, Jun 2003. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12799047> >.
- BUTLER, M. The characteristics and growth of cultured cells. In: BUTLER, M. **Mammalian cell biotechnology: A practical approach**, New York, Oxford University Press, p.1-25, 1991.
- BUTLER, M. **Animal cell culture & technology: The Basics**. Bios Scientific Publishers. 2nd Ed., 2004.
- CHEN, V.; ROLLINS, D. Issues regarding artificial neural network modeling for reactors and fermenters. **Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 1, p. 85-93, JAN 2000. ISSN 0178-515X.
- CHERLET, M.; MARC, A. Hybridoma cell behaviour in continuous culture under hyperosmotic stress. **Cytotechnology**, v. 29, n. 1, p. 71-84, Jan 1999. ISSN 0920-9069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003339> >.
- CHERLET, M.; MARC, A. Intracellular pH monitoring as a tool for the study of hybridoma cell behavior in batch and continuous bioreactor cultures. **Biotechnol Prog**, v. 14, n. 4, p. 626-38, 1998 Jul-Aug 1998. ISSN 8756-7938. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9694686> >.
- CHERMAN, J.L., Why automatic image analysis? An introduction to this issue, **Cement & Concrete Composites**, v.23, p.127-131, 2001.
- CHUPPA, S. et al. Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells. **Biotechnol Bioeng**, v. 55, n. 2, p. 328-38, Jul 1997. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18636491> >.
- COULTER WH. High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. **Proc Natl Electron Conf**. 12. Chicago: National Electronics Conference, Inc; 1957; pp 1034-1040, 1956.

- DAVEY, H. M.; KELL, D. B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. **Microbiol Rev**, v. 60, n. 4, p. 641-96, Dec 1996. ISSN 0146-0749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8987359> >.
- DIAZ, C. et al. Simultaneous adaptive predictive control of the partial pressures of dissolved oxygen (pO₂) and dissolved carbon dioxide (pCO₂) in a laboratory-scale bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 135-150, DEC 10 1996. ISSN 0168-1656.
- DIJKSTRA, J.J.F.M.; DENIE, L.H.; POT, A., In-line measurement of crystal size - Campaign experience with the Lasentec M200 system. **International Sugar Journal**, v.98, n.1174, p.521-523, 1996.
- DOWD, J. E. et al. Optimization and control of perfusion cultures using a viable cell probe and cell specific perfusion rates. **Cytotechnology**, v. 42, n. 1, p. 35-45, May 2003. ISSN 0920-9069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19002926> >.
- DUCOMMUN, P. et al. On-line determination of animal cell concentration. **Biotechnol Bioeng**, v. 72, n. 5, p. 515-22, Mar 2001. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11460241> >.
- FOX, S. R. et al. Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. **Biotechnol Bioeng**, v. 85, n. 2, p. 177-84, Jan 2004. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14705000> >.
- FRESHNEY, R.I., **Culture of animal cells: A Manual of Basic Technique**. Wiley-Liss. 5th Ed. p.340-362, 1994.
- GOMBERT, A.K., Apêndice de Cinética de Processos fermentativos In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Bornazi, W., **Biotecnologia Industrial**. Vol.2. Engenharia Bioquímica. Ed.1, Editora Edgard Blücher Ltda., cap.6, p.114-120, 2001.
- GOUDAR, C. T.; PIRET, J. M.; KONSTANTINOV, K. B. Estimating cell specific oxygen uptake and carbon dioxide production rates for mammalian cells in perfusion culture. **Biotechnol Prog**, May 2011. ISSN 1520-6033. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21626724> >.
- GUEZ, J. S. et al. Real time in situ microscopy for animal cell-concentration monitoring during high density culture in bioreactor. **J Biotechnol**, v. 111, n. 3, p. 335-43, Aug 2004. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15246669> >.
- HENZLER, H.J.; KAULING, D.J., Oxigenation of cell cultures, **Bioprocess Eng**. 9:61-75, 1993.
- HERZENBERG, L. A.; DE ROSA, S. C. Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. **Immunol Today**, v. 21, n. 8, p. 383-90, Aug 2000. ISSN 0167-5699. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10916141> >.
- JEFFERS, P. et al. Focussed beam reflectance measurement (FBRM) monitoring of particle size and morphology in suspension cultures of *Morinda citrifolia* and *Centaurea calcitrapa*. **Biotechnol Lett**, v. 25, n. 23, p. 2023-8, Dec 2003. ISSN 0141-5492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14719817> >.
- JOERIS, K. et al. In-situ microscopy: Online process monitoring of mammalian cell cultures. **Cytotechnology**, v. 38, n. 1-3, p. 129-34, Jan 2002. ISSN 0920-9069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003094> >.
- JOHNSON, M. J.; BORKOWSKI, J.; ENGBLOM, C. Steam sterilizable probes for dissolved oxygen measurement. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. VI, Issue 4, Pages 457-468

- (1964). **Biotechnol Bioeng**, v. 67, n. 6, p. 645-56, Mar 2000. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699847> >.
- JORGE, S. A. et al. Expression of the hepatitis B virus surface antigen in Drosophila S2 cells. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 51-9, May 2008. ISSN 0920-9069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003172> >.
- JORJANI, P.; OZTURK, S. S. Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines. **Biotechnol Bioeng**, v. 64, n. 3, p. 349-56, Aug 1999. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397872> >.
- KAMEN, A. A. et al. On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures. **Biotechnol Bioeng**, v. 50, n. 1, p. 36-48, Apr 1996. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18626897> >.
- KILBURN, D.G., Monitoring and control of bioreactors, In: Butler M (Ed.) **Mammalian cell biotechnology. A practical approach**, Oxford University Press, New York, pp. 159-185, 1991.
- KIOUKIA, N. et al. Physiological and environmental factors affecting the growth of insect cells and infection with baculovirus. **J Biotechnol**, v. 38, n. 3, p. 243-51, Jan 1995. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7765874> >.
- KONSTANTINOV, K. et al. Real-time biomass-concentration monitoring in animal-cell cultures. **Trends Biotechnol**, v. 12, n. 8, p. 324-33, Aug 1994. ISSN 0167-7799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7765262> >.
- KONSTANTINOV, K. B. et al. Control of long-term perfusion Chinese hamster ovary cell culture by glucose auxostat. **Biotechnol Prog**, v. 12, n. 1, p. 100-9, 1996 Jan-Feb 1996. ISSN 8756-7938. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8845100> >.
- KONSTANTINOV, K. B. Monitoring and control of the physiological state of cell cultures. **Biotechnol Bioeng**, v. 52, n. 2, p. 271-89, Oct 1996. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18629894> >.
- KOSTOV, Y. et al. Low-cost microbioreactor for high-throughput bioprocessing. **Biotechnol Bioeng**, v. 72, n. 3, p. 346-52, Feb 2001. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11135205> >.
- LARA, D. C., Monitoramento em-linha de reações de copolimerização de estireno e acrilato de butila em emulsão utilizando a técnica de infravermelho próximo (NIR), **Dissertação de mestrado** – Escola Politécnica – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2005.
- LE DUY, A.; ZAJIC, J.E., A geometrical approach for differentiation of na experimental function at a point: applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 15, n. 4, p. 805-810, 1973.
- LEE, E. K.; HUANG, L.; LEE, Y. H. Effect of liquid properties and flow on liquid film mass transfer coefficient in silicone membrane oxygenation. **Biotechnol Bioeng**, v. 36, n. 5, p. 530-3, Aug 1990. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18595109> >.
- LIN, J. et al. Enhanced monoclonal antibody production by gradual increase of osmotic pressure. **Cytotechnology**, v. 29, n. 1, p. 27-33, Jan 1999. ISSN 0920-9069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003334> >.
- LINDL, T. [Development of the human monoclonal antibodies]. **ALTEX**, v. 12, n. 1, p. 13-23, 1995. ISSN 1868-596X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11178412> >.

- MARQUES F. H. Influência do oxigênio dissolvido na produção de poliedros de baculovírus por células de inseto em biorreator. 102 f. **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia** – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- MATANGUIHAN, R.; MENESES, R.; SAJAN, E.; TONSO, A.; KONSTANTINOV, K.; NAVEH, D. Reliable on-line monitoring of cell concentration in perfusion mammalian cell culture using a retractable optical density probe. **Abstracts**, 217th American Chemical Society National Meeting, Anaheim, EUA, 1999.
- METTLER-TOLEDO, disponível em <http://www.mt.com>, acesso em 05/07/2011.
- MILES Corp., Antibody specific for tumor necrosis factor binding site of tumor necrosis factor receptor, **Patente** US 525,570, 03/Fevereiro/1993.
- MITSUHASHI, J., **Invertebrate Cell System Application**, Boca Raton, CRC, p.3-20, 1989.
- MOORE, A.; DONAHUE, C.J.; HOOLEY, J.; STOCKS, D.L.; BAUER, K.D.; MATHER, J.P., Apoptosis in CHO cell batch cultures: examination by flow cytometry, **Cytotechnology** 17:1-11, 1995.
- OLSSON, L.; NIELSEN, J., On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations, **Trends Biotechnol.** 15:517-522, 1997.
- O'NEAL, D.P.; MELEDEO, M.A.; DAVIS, J.R.; IBEY, B.L.; GANT, V.A.; PISHKO, M.V.; COTÉ, G.L., Oxygen sensor based on the fluorescence quenching of a ruthenium complex immobilized in a biocompatible poly(ethylene glycol) hydrogel, **IEEE Sensors Journal** 4:728-734, 2004.
- OZKAN, P.; MUTHARASAN, R. A rapid method for measuring intracellular pH using BCECF-AM. **Biochim Biophys Acta**, v. 1572, n. 1, p. 143-8, Aug 2002. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204343> >.
- OZTURK, S. S. et al. Real-time monitoring and control of glucose and lactate concentrations in a mammalian cell perfusion reactor. **Biotechnol Bioeng**, v. 53, n. 4, p. 372-8, Feb 1997. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18634025> >.
- OZTURK, S. S.; PALSSON, B. O. Effect of medium osmolarity on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. **Biotechnol Bioeng**, v. 37, n. 10, p. 989-93, Apr 1991. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18597326> >.
- PACKER, H. L.; THOMAS, C. R. Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. **Biotechnol Bioeng**, v. 35, n. 9, p. 870-81, Apr 1990. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18592591> >.
- PAMBOUKIAN, C.R.D.; FACCIOTTI, M.C.R.; SCHMIDELL, W., Relationship between morphology, rheology and glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in submerged cultures, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.15, n.3, p.265-272, 1998.
- PAMBOUKIAN, M. M. et al. Insect cells respiratory activity in bioreactor. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 37-44, May 2008. ISSN 0920-9069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003170> >.
- PANTOJA, P. A., Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo na caracterização da carga de petróleo para o processo de destilação atmosférica. **Dissertação de Mestrado**, Escola Politécnica – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2006.
- PATTISON, R. N. et al. Measurement and control of dissolved carbon dioxide in mammalian cell culture processes using an in situ fiber optic chemical sensor. **Biotechnol Prog**, v. 16, n. 5, p. 769-

- 74, 2000 Sep-Oct 2000. ISSN 8756-7938. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11027168> >.
- PAUL, G.C.; PRIEDE, M.A.; THOMAS, C.R., Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations, **Biochemical Engineering Journal**, v.3, p.121-129, 1999.
- PINTO, R. C. V., Separação de células CHO utilizando hidrociclones. **Tese de doutorado em ciências em Engenharia Química**. UFRJ, 2007.
- PONS, M. N. et al. Physiological investigations by image analysis. **J Biotechnol**, v. 65, n. 1, p. 3-14, Oct 1998. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9828451> >.
- QI, H. N. et al. Experimental and theoretical analysis of tubular membrane aeration for Mammalian cell bioreactors. **Biotechnol Prog**, v. 19, n. 4, p. 1183-9, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 8756-7938. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892480> >.
- REINECKE, M.; STEPHANOPOULOS, G. Flow injection analysis for simultaneous quantification of prolactin concentration and glycosylation macroheterogeneity in cell culture samples. **Cytotechnology**, v. 34, n. 3, p. 237-42, Nov 2000. ISSN 0920-9069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003399> >.
- RODAS, V. M. et al. Cell Culture Derived AgMNPV Bioinsecticide: Biological Constraints and Bioprocess Issues. **Cytotechnology**, v. 48, n. 1-3, p. 27-39, Jun 2005. ISSN 0920-9069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003030> >.
- RUFFIEUX, P. A.; VON STOCKAR, U.; MARISON, I. W. Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific (qO₂) oxygen uptake rates in animal cell cultures. **J Biotechnol**, v. 63, n. 2, p. 85-95, Aug 1998. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9772750> >.
- SANTOS, M. G. et al. Improving heterologous protein expression in transfected *Drosophila* S2 cells as assessed by EGFP expression. **Cytotechnology**, v. 54, n. 1, p. 15-24, May 2007. ISSN 0920-9069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003014> >.
- SANTOS, M.G., Expressão do gene da proteína verde fluorescente (EGFP) em células de *Drosophila melanogaster* como instrumento de otimização de bioprocesso para a produção de proteínas heterólogas. 59p. **Dissertação de mestrado**. Programa de pós-graduação interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT. 2006.
- SCHMIDELL, W., Agitação e aeração em biorreatores. In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, v.2, cap.14, p.277-331, 2001.
- SCHÜGERL K (Ed.), Measuring, Modelling and Control., vol. 4, 2nd ed., In: **Biotechnology**, Eds. Rehm HJ e Reed G, VCH, Weinheim, 1991.
- SCHÜGERL, K. Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years. **J Biotechnol**, v. 85, n. 2, p. 149-73, Feb 2001. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11165361> >.
- SCHUMPE, A., Gás Solubilities in Biomedica. In: Rehn, H.J.; Reed, G., **Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 Volumes**. H. Brauer, vol.2, cap.10, p. 159-170, 1986.
- SEBORG, D.E.; EDGAR, T.F.; MELLICHAMP, D.A., **Process Dynamics and Control**, 2nd ed., Wiley, New York, 2003.
- SEEWÖSTER, T.; LEHMANN, J. Cell size distribution as a parameter for the predetermination of exponential growth during repeated batch cultivation of CHO cells. **Biotechnol Bioeng**, v. 55, n. 5,

p. 793-7, Sep 1997. ISSN 0006-3592. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18636589>>.

SIESLER, H.W., OZAKI, Y., KAWATA, S., HEISE, H.M. **Near-Infrared Spectroscopy – Principles, Instruments and Applications**, Wiley-VCH, Die Deutsche Bibliothek, 2002.

SONNLEITNER, B. Instrumentation of biotechnological processes, **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, vol. 66. (pp. 1–64), Springer, Berlin, 2000.

SONNLEITNER, B.; LOCHER, G.; FIECHTER, A. Biomass determination. **J Biotechnol**, v. 25, n. 1-2, p. 5-22, Aug 1992. ISSN 0168-1656. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1368462>>.

SWIECH, K. et al. Evaluating kinetic and physiological features of rCHO-K1 cells cultured on microcarriers for production of a recombinant metalloprotease/disintegrin. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 200-210, APR 15 2007 2007. ISSN 0717-3458.

TONSO, A., Monitoramento e operação de cultivos de células animais em sistema de perfusão. **Tese de doutorado**. Escola Politécnica da Universidade São Paulo, Engenharia Química, 2000, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3137/tde-31072001-120313/>, acesso em 02/07/2011.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. Table 6.2-6. Solubility of oxygen in water at various temperatures and pressures. Disponível em:
<http://water.usgs.gov/owq/FieldManual/Chapter6/table6.2_6.pdf>. Acesso em 01 jul. 2011.

WANG, M. Y.; BENTLEY, W. E. Continuous insect cell (Sf-9) culture with aeration through sparging. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 41, n. 3, p. 317-23; May 1994. ISSN 0175-7598. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7764966>>.

WONGWICHARN, A.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Effect of oxygen enrichment on morphology, growth, and heterologous protein production in chemostat cultures of *Aspergillus niger* B1-D. **Biotechnol Bioeng**, v. 65, n. 4, p. 416-24, Nov 1999. ISSN 0006-3592. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10506417>>.

WU, P. et al. Evaluation and applications of optical cell density probes in mammalian cell bioreactors. **Biotechnol Bioeng**, v. 45, n. 6, p. 495-502, Mar 1995. ISSN 0006-3592. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18623249>>.

YOKOMIZO, A. Y. et al. Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. **Biotechnol J**, v. 2, n. 1, p. 102-9, Jan 2007. ISSN 1860-7314. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17225257>>.

YOON, S. J.; KONSTANTINOV, K. B. Continuous, real-time monitoring of the oxygen uptake rate (OUR) in animal cell bioreactors. **Biotechnol Bioeng**, v. 44, n. 8, p. 983-90, Oct 1994. ISSN 0006-3592. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18618917>>.