

Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração:

Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**Desenvolvimento de Meio de Cultura para Células de
Inseto e Avaliação do Potencial de Replicação de
Baculovírus**

Fabiana Regina Xavier Batista

Autora

Prof. Dr^a. Ângela Maria Moraes

Orientadora

Dr. Carlos Augusto Pereira

Co-Orientador

*Dissertação submetida à comissão de Pós-graduação da Faculdade de Engenharia
Química da UNICAMP como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química*

Campinas - São Paulo

Dezembro de 2003

À minha mãe pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Neide Xavier e família pelo carinho e gentil acolhimento em sua casa que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao querido amigo Álvaro Paiva Braga de Sousa, por todo carinho, paciência, respeito e incentivo que nunca lhe faltaram, principalmente nos momentos de dificuldades.

À querida amiga Maria Lúcia da Silva Gomes pelo carinho e colo maternal em todo os momentos.

À querida amiga Adriana Lages Lima Galesi pela contribuição na análise dos ensaios realizados neste estudo.

Aos companheiros do Laboratório de Imunologia Viral que sempre estiveram ao meu lado desde o início de minha chegada a São Paulo.

À Rosana de Lima Paole pela compreensão e auxílio na realização dos ensaios.

À Eliane Gama Lucchesi pela contribuição na digitalização das figuras desta dissertação.

A todas as companheiras do Laboratório de Bioprocessos e Colóides da UNICAMP que participaram de alguma forma contribuindo no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas das disciplinas da Pós-Graduação Amós, Ivanildo, Ana Paula, Mariana, Roberta, Paula, Ana Paula Rodrigues, que foram sempre motivos de alegria e descontração.

A Ronaldo Gonçalves dos Santos pelo incentivo, carinho e por me abrir os olhos a necessidade de uma postura política e racial.

Aos meus familiares que sempre torceram por meu sucesso.

À Dr^a Elisabeth de Fátima Pires Augusto do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo pela contribuição e pela utilização de seu laboratório, e a todos os colegas deste instituto.

À Prof. Dr^a Sílvia Celina Alfieri e a Elisabeth Furusho Pral pela contribuição e pela utilização do laboratório de Biologia Celular e Bioquímica de Protozoários do Instituto de Ciências Médicas da USP.

Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri por ter cedido gentilmente os suplementos extrato de levedura e os derivados de soro de leite ultrafiltrados.

Ao meu professor e co-orientador Dr. Carlos Augusto Pereira que contribuiu coerentemente no desenvolver deste estudo e pela cessão das dependências do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan, SP.

Ao professor e colaborador Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça pela intensa colaboração em todos os momentos através de novos conhecimentos fora de minha área de atuação, com paciência, respeito e amizade.

Em especial, à minha professora orientadora Dr^a Ângela Maria Moraes pela oportunidade do ingresso na pós-graduação, a orientação científica, a confiança em meu potencial, principalmente nos momentos de dificuldades e desânimo. Agradeço de coração.

A Capes e ao Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan, pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o sucesso desta difícil etapa de minha vida.

RESUMO

Na última década, células de inseto como a *Spodoptera frugiperda* Sf9 têm sido intensamente empregadas para a produção de proteínas recombinantes e de biopesticidas. Os sistemas de expressão baseados em baculovírus tornaram-se muito populares para a obtenção de componentes de vacinas, sendo uma de suas vantagens sobre outros sistemas a expressão em níveis elevados. Quando utilizados como pesticidas no controle da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*, os baculovírus do tipo AgMNPV são considerados eficientes e seguros, pois não infectam vertebrados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de substituir, em meios de cultura para células de inseto do tipo *Spodoptera frugiperda* Sf9, total ou parcialmente, o soro fetal bovino (SFB) por concentrado protéico de soro de leite bovino (CPSL) e permeado liofilizado do soro de leite (PL) associados a extrato de levedura, visando a aplicação na produção de baculovírus AgMNPV. A suplementação do meio Grace com estes componentes e com glicose e Pluronic F68 (PF68) foram avaliados através do planejamento experimental, com o intuito de aumentar a concentração e a viabilidade celular na fase média exponencial. A glicose foi empregada como fonte de carbono e energia, o Pluronic F68 foi utilizado como agente protetor contra tensões de cisalhamento, enquanto que o extrato de levedura e os derivados de leite ultrafiltrados como fonte de aminoácidos e fatores de crescimento. O emprego de extrato de levedura, CPSL e do PL resultaram em um aumento expressivo na concentração e na viabilidade celular. Após seis subcultivos para a adaptação celular nas formulações propostas, obtiveram-se em meio Grace contendo 2,7g/L de glicose, 8g/L de extrato de levedura, 1% (v/v) de SFB e 5% (m/v) de CPSL, $37,5 \times 10^5$ células viáveis/mL, ou 2,7g/L de glicose, 8g/L de extrato de levedura, 3% (v/v) de SFB e 1% (m/v) de PL, $46,7 \times 10^5$ células viáveis/mL. A infecção para a produção de baculovírus resultou em $1,6 \times 10^7$ poliedros/mL, valor este cerca de 2,6 vezes maior que o obtido com o meio Grace tradicionalmente empregado suplementado com 10% de soro fetal bovino e apenas 0,9 vezes menor que o observado no oneroso meio de composição química definida Sf900II, meio livre de soro bovino.

ABSTRACT

During the last decade, insect cells such as *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells have been extensively used for recombinant proteins and biopesticides production. Baculovirus-based expression systems have become very popular for the production of vaccine components, and one of the advantages of baculovirus over other expression systems is that proteins are normally expressed at very high levels. When used as biopesticides against soybean *Anticarsia gemmatalis* caterpillar, AgMNPV baculoviruses are considered effective and safe, since they are unable to infect vertebrates. The purpose of this work was to access the potential of lyophilized milk whey ultrafiltrate (MWU) and retentate (MWR) when associated to yeast extract (YE) to partially or totally substitute fetal calf serum (FCS) in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells culture media, aiming AgMNPV baculovirus production. The supplementation of Grace's media with these components as well with glucose and Pluronic F68 was evaluated through the use of an experimental factorial design approach, intending to increase cell concentration and viability in the midexponential phase. Glucose was employed as a carbon and energy source and Pluronic F68 (PF68) was used as a protective agent against shear stress, while yeast extract and both milk whey ultrafiltration fractions supplied essential aminoacids and growth factors, beyond other components. The use of YE, MWU and MWR resulted in significant increase in the concentration and viability of Sf9 cells. After 6 consecutive passages for cell adaptation, the largest concentrations of viable cells were obtained with Grace's media containing either 2.7 g/L glucose, 8 g/L YE, 1% (v/v) FCS and 5% (m/v) MWR, reaching 37.5×10^6 viable cells/mL, or 2.7 g/L glucose, 0.1 % (v/v) PF68, 8 g/L YE, 3% FCS and 1% of MWU, achieving 46.7×10^6 viable cells/mL. The infection of Sf9 cells in these media formulations with baculovirus resulted in $1,6 \times 10^7$ polyhedra/mL. This concentration value is 2.6 folds higher than that obtained with Grace's medium supplemented with 10% FCS and only 0,9 fold lower than that observed with the expensive Sf900II serum-free medium.

SUMÁRIO

Resumo	IV
Abstract	V
Lista de Figuras	VI
Lista de Tabelas	XV
Lista de Variáveis	XXI
Nomenclatura e Abreviações	XXIII
1. Introdução	1
2. Objetivo	5
3. Revisão da Literatura	6
3.1. Evolução Histórica do Cultivo de Células de Insetos	6
3.2. Comparação do Cultivo de Células de Insetos a Células de Mamíferos	10
3.3. Metabolismo de Células de Insetos	12
3.4. Meios de Cultivo Tradicionalmente Empregados na Proliferação de Células de Insetos	14
3.4.1. Utilização de Concentrados Protéicos e Extratos Celulares como Suplementos de Meio de Cultura para Células de Insetos	22
3.4.1.2. As Proteínas do Soro de Leite	23
3.4.1.3. O Emprego de Extrato de Levedura como Suplemento ao Meio de Cultivo	25
3.5. Planejamento Experimental para a Otimização de Meios de Cultivo	26
3.6. Escalonamento de Cultura de Células de Insetos	28
3.7. Produção de Baculovírus	31
3.7.1. Obtenção de Baculovírus Através da Infecção <i>in vitro</i> de Células de Inseto Sf9	32

4. Materiais e Métodos	34
4.1. Materiais.....	34
4.1.1. Linhagem Celular e Vírus	34
4.1.2. Componentes do Meio de Cultura e Outros Reagentes	34
4.1.2.1. Características do Extrato de Levedura Empregado como Suplemento para o Meio de Cultivo.....	35
4.1.2.2. Características do Concentrado Protéico e do Permeado do Soro de Leite Bovino Liofilizados e Empregados como Suplementos para o Meio de Cultivo.....	37
4.2. Métodos.....	41
4.2.1. Preparo e Propagação da Linhagem Celular	41
4.2.1.1. Preparo do Inóculo Celular em Meio Sf900II.....	41
4.2.1.2. Preparo de Inóculo Celular em Meio Grace	42
4.2.2. Caracterização Preliminar do Crescimento das Células Sf9	43
4.2.2.1. Determinação dos Parâmetros Cinéticos Taxa Máxima de Crescimento Específico, do Tempo de Duplicação e dos Coeficientes de Consumo Específicos de Glicose e Glutamina.....	44
4.2.3. Estudo do Efeito dos Suplementos no Crescimento Celular	44
4.2.4. Avaliação do Efeito da Ampliação da Faixa de Concentração de Extrato de Levedura, do CPSL e do SFB sobre o Crescimento e Viabilidade Celular	46
4.2.5. Avaliação do Efeito da Concentração de Permeado Liofilizado e da Concentração de SFB sobre o Crescimento e Viabilidade Celular	46
4.2.6. Adaptação das Células Sf9 e Subcultivos Subseqüentes nos Meios de Cultivo com Formulações Otimizadas	48

4.2.7. Procedimento de Quantificação e Obtenção do Lote-Semente Viral	51
4.2.8. Metodologia de Infecção Celular	52
4.2.9. Metodologia Analítica	53
4.2.9.1. Acompanhamento do Crescimento e Viabilidade Celular.....	53
4.2.9.2. Determinação da Concentração de Glicose e Glutamina Consumidas e de Lactato e Amônia Produzidos.....	53
4.2.9.3. Determinação da Osmolalidade	54
5. Resultados e Discussão.....	55
5.1. Caracterização Preliminar da Cultura.....	55
5.1.1. Análise do Efeito da Concentração do Inóculo no Crescimento Celular.....	55
5.2. Análise do Efeito das Concentrações dos Suplementos Extrato de Levedura, Concentrado Protéico de Soro de Leite, Pluronic F68, SFB e Glicose.....	59
5.2.1. Análise Comparativa dos Parâmetros Cinéticos Resultantes dos Ensaio do Planejamento Preliminar 2^{5-1} e o Ensaio Controle em Meio Grace com 10 % SFB	63
5.2.2. Análise do Consumo de Glicose, Glutamina e da Formação de Lactato nos Ensaio do Planejamento Fracionário 2^{5-1}	66
5.3. Otimização da Composição do Meio de Cultura através de Planejamento Fatorial Completo	77
5.3.1. Análise dos Efeitos das Concentrações de Extrato de Levedura, CPSL e do SFB sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Estacionária (X_{vs}), com Inóculo Proveniente do Meio de Grace + 10% de SFB	78
5.3.2. Análise dos Efeitos das Concentrações de Extrato de Levedura, CPSL e do SFB sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Média	

Exponencial (X_{me}), com Inóculo Proveniente do Meio de Grace + 10% de SFB	81
5.3.3. Análise dos Efeitos das Concentrações de Extrato de Levedura, CPSL e SFB sobre a Viabilidade das Células Sf9 na Fase Média de Crescimento exponencial (V_{me}), com Inóculo Proveniente do Meio de Grace + 10% de SFB.	87
5.3.4. Análise Comparativa entre os Parâmetros Cinéticos Obtidos para os Ensaio do Planejamento 2^3 (Inóculo Proveniente do Meio de Grace + 10% de SFB) e os Ensaio Controle em Meio Grace e Sf900II	92
5.3.5. Análise da Cinética de Crescimento Celular para os Ensaio do Planejamento 2^3 com 3 Pontos Centrais e 6 Axiais, a partir de Inóculo Mantido em Meio Grace + 10% de SFB	94
5.4. Análise dos Efeitos das Concentrações de Extrato de Levedura, CPSL e do SFB sobre a Concentração e Viabilidade das Células Sf9 no Planejamento 2^3 . Inóculo Proveniente do Meio de Cultivo Livre de Soro Sf900II.....	97
5.4.1. Análise dos Efeitos das Concentrações de Extrato de Levedura, CPSL e do SFB Sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Estacionária (X_{vs}), com Inóculo Proveniente do Meio Sf900II.	97
5.4.2. Análise dos Efeitos das Concentrações de Extrato de Levedura, CPSL e do SFB sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Média Exponencial (X_{me}), com Inóculo Proveniente do Meio Sf900II	100
5.4.3. Análise dos Efeitos das Concentrações de Extrato de Levedura, CPSL e do SFB sobre a Viabilidade das Células na Fase Média Exponencial (V_{me}), com Inóculo Proveniente do Meio Sf900II	102
5.4.4. Análise Qualitativa dos Efeitos das Concentrações de Extrato de	

Levedura, CPSL e do SFB sobre a Concentração de Células Viáveis na Fase Estacionária (X_{vs}), a Concentração de Células Viáveis na Fase Média Exponencial (X_{me}) e a Viabilidade na Fase Média Exponencial (V_{me})	104
5.4.5. Análise da Cinética de Crescimento Celular para o Planejamento 2^3 com 3 Pontos Centrais e 6 Pontos Axiais, a partir de Inóculo Obtido em Meio Livre de Soro (Sf900II)	106
5.4.6. Análise Comparativa entre os Parâmetros Cinéticos Obtidos para os Ensaios do Planejamento 2^3 (Inóculo Proveniente do Meio Sf900II) e os Ensaios Controle em Meio Grace e Sf900II	109
5.5. Análise dos Efeitos das Concentrações do Permeado Liofilizado e do SFB sobre a Concentração e Viabilidade das Células Sf9 no Planejamento 2^2 , com Inóculo Proveniente do Meio de Grace +10% de SFB	114
5.5.1. Análise dos Efeitos das Concentrações do Permeado Liofilizado e do SFB sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Estacionária (X_{vs}), com Inóculo Proveniente do Meio de Grace +10% de SFB	115
5.5.2. Análise dos Efeitos das Concentrações do Permeado Liofilizado e do SFB sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Média Exponencial (X_{me}), com Inóculo Proveniente do Meio de Grace+10% de SFB	120
5.5.3. Análise dos Efeitos das Concentrações de Permeado Liofilizado e SFB sobre a Viabilidade das Células Sf9 na Fase Média de Crescimento Exponencial (V_{me}), com Inóculo Proveniente do Meio de Grace +10% de SFB	122
5.5.4. Comparação entre os Ensaios do Planejamento Fatorial Completo 2^2 e os Ensaios Controle em Meio Grace com 10 % de SFB e em Meio Livre de	

Soro Sf900II	123
5.5.5. Análise do Consumo de Glicose, Glutamina e a Formação de Lactato nos Ensaio do Planejamento Completo 2 ² , com Inóculo Proveniente do Meio de Grace + 10% de SFB	125
5.6. Análise dos Efeitos das Concentrações do Permeado Liofilizado e do SFB sobre a Concentração e Viabilidade das Células Sf9 a Partir de Inóculo Proveniente do Meio Livre de Soro Sf900II	130
5.6.1. Análise dos Efeitos das Concentrações do Permeado Liofilizado e do SFB Sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Estacionária (X _{vs}), com Inóculo Proveniente do meio Sf900II	131
5.6.2. Análise dos Efeitos das Concentrações do Permeado Liofilizado e do SFB sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Média Exponencial (X _{me}), com Inóculo Proveniente do meio Sf900II	133
5.6.3. Análise dos Efeitos das Concentrações de Permeado Liofilizado e SFB Sobre a Viabilidade das Células Sf9 na Fase Média de Crescimento Exponencial (V _{me}), com Inóculo Proveniente do meio Sf900II	138
5.6.4. Comparação entre os Ensaio do Planejamento Fatorial Completo 2 ² e os Ensaio Controle em Meio Grace com 10 % SFB e em Meio Livre de Soro Sf900II	139
5.6.5. Análise do Consumo de Glicose, Glutamina e a Formação de Lactato nos Ensaio do Planejamento Fracionário 2 ² , com inóculo proveniente do meio Sf900II	140
5.7. Análise da Adaptação das Células Sf9 nas Formulações Testadas	145
5.7.1. Análise de Amônia no Cultivo das Células Sf9 nas Formulações de Meio de Cultivo Seleccionadas	155

5.7.2. Análise Comparativa entre os Parâmetros Cinéticos Obtidos para as Células Sf9 após Seis Passagens Consecutivas nas Formulações Seleccionadas e os Ensaio Controle em meio Grace acrescido de 10% de SFB e em Meio Sf900II	156
5.7.3. Análise da Osmolalidade das Formulações Seleccionadas Empregadas no Crescimento das Células Sf9	158
5.8. Análise da Infecção das Células Sf9 por Baculovírus Empregando-se Multiplicidade de Infecção 1	159
6. Conclusão e Sugestões	164
6.1 Conclusões.....	164
6.2 Sugestões para Trabalhos Futuros	165
7. Referências Bibliográficas	167
Apêndice A.....	174
A-1: Crescimento e Viabilidade Celular e Consumo de Glicose, Glutamina e Evolução de Lactato para o Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1}	174
A-2: Crescimento e Viabilidade Celular e Consumo de Glicose, Glutamina e Evolução de Lactato para o Planejamento Fatorial Completo 2^3 com Inóculo Proveniente do Meio Grace Acrescido de 10% de SFB	183
A-3: Crescimento e Viabilidade Celular e Consumo de Glicose, Glutamina e Evolução de Lactato para o Planejamento Fatorial Completo 2^3 com Inóculo Proveniente do Meio Sf900II	202
A-4: Crescimento e Viabilidade Celular e Consumo de Glicose, Glutamina e Evolução de Lactato para o Planejamento Fatorial Completo 2^2 com Inóculo Proveniente do Meio Grace Acrescido de 10% de SFB	219
A-5: Crescimento e Viabilidade Celular e Consumo de Glicose, Glutamina e Evolução de Lactato para o Planejamento Fatorial Completo 2^2 com Inóculo Proveniente do Meio Sf900II	226

A-6: Crescimento e Viabilidade Celular e Consumo de Glicose, Glutamina e Evolução de Lactato para os Ensaios de Adaptação Celular, Inóculo 3×10^5 células Viáveis/mL.....	233
Apêndice B.....	240
B1: Identificação da Morte Celular Usando Corantes Fluorescentes em Microscopia de Fluorescência	240
Apêndice C.....	242
C1: Titulação Viral através do Método da Diluição Final	242

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Principais vias do metabolismo celular proposta para células Sf9 (adaptada de Öhman et al.,1995)	12
Figura 3.2: Fórmula molecular do Pluronic F68.....	28
Figura 4.1: Fluxograma geral da obtenção do extrato de levedura desidratado	36
Figura 4.2: Fluxograma geral da produção do concentrado protéico de soro doce de leite (CPSL).....	38
Figura 4.3: Esquema dos ensaios realizados durante todo o estudo.	50
Figura 5.1: Células Sf9 cultivadas em suspensão em meio livre de soro (Sf900II)...	55
Figura 5.2: Efeito do inóculo celular no crescimento e viabilidade de células Sf9.....	56
Figura 5.3: Contrates principais das variáveis independentes sobre a concentração de células na fase média exponencial (X_{me}), na fase estacionária (X_{vs}) e a viabilidade celular na fase média exponencial (V_{me})com a realização do planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{5-1} descrito na Tabelas 5.2.	62
Figura 5.4: Parâmetros cinéticos para o ensaio 3 (1,8g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 1% SFB).	67
Figura 5.5: Parâmetros cinéticos para o ensaio 4 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 1% de SFB, 5% de CPSL).	68
Figura 5.6: Parâmetros cinéticos para o ensaio 8 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,2% de PF68, 1% de SFB).	69
Figura 5.7: Parâmetros cinéticos para o ensaio 11 (1,8g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 3% de SFB e 5% de CPSL).	70
Figura 5.8: Parâmetros cinéticos para o ensaio 12 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 3% de SFB).	71
Figura 5.9: Parâmetros cinéticos para o ensaio 15 (1,8g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,2% de PF68; 3% de SFB).	72

Figura 5.10: Parâmetros cinéticos para o ensaio 16 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,2% de PF68; 3% de SFB e 5% de CPSL).	73
Figura 5.11: Consumo específico de glicose nos ensaios do planejamento fracionário 2^{5-1}	75
Figura 5.12: Consumo específico de glutamina nos ensaios do planejamento fracionário 2^{5-1}	76
Figura 5.13: Superfície de resposta para X_{me} obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 , a partir de inóculo proveniente do meio Grace acrescido de 10% de SFB, em função da concentração de extrato de levedura e de CPSL.	84
Figura 5.14: Superfície de resposta para X_{me} obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 , a partir de inóculo proveniente do meio Grace acrescido de 10% de SFB, em função da concentração de extrato de levedura e de SFB.....	84
Figura 5.15: Superfície de resposta para X_{me} obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 a partir de inóculo proveniente do meio Grace acrescido de 10% de SFB, em função da concentração de CPSL e de SFB.	85
Figura 5.16: Superfície de resposta para V_{me} obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 a partir de inóculo proveniente do meio Grace acrescido de 10% de SFB, em função da concentração de CPSL e de extrato de levedura.	89
Figura 5.17: Superfície de resposta para V_{me} obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 a partir de inóculo proveniente do meio Grace acrescido de 10% de SFB, em função da concentração de SFB e de extrato de levedura.....	90
Figura 5.18: Superfície de resposta para V_{me} obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 a partir de inóculo proveniente do meio Grace acrescido de 10% de SFB, em função da concentração de SFB e de CPSL.	90
Figura 5.19: Consumo específico de glicose nos ensaios do planejamento fracionário 2^3 com inóculo oriundo do meio Grace acrescido de 10% de SFB.....	95
Figura 5.20: Consumo específico de glutamina nos ensaios do planejamento fracionário 2^3 com inóculo oriundo do meio Grace acrescido de 10% de SFB.....	96

Figura 5.21: Efeitos das variáveis independentes sobre a concentração de células na fase média exponencial (X_{me}), na fase estacionária (X_{vs}) e a viabilidade celular na fase média exponencial (V_{me}) com a realização do planejamento fatorial 2^3 com 3 pontos centrais e 6 axiais, com inóculo proveniente do meio Sf900II.	105
Figura 5.22: Parâmetros cinéticos para o ensaio 9 (2,7g/L de glicose; 2,6g/L de extrato de levedura; 0,1% de PF68; 4% de CPSL e 2% de SFB).	107
Figura 5.23: Parâmetros cinéticos para o ensaio 11 (2,7g/L de glicose; 6g/L de extrato de levedura; 0,1% de PF68; 2,3% de CPSL e 2% de SFB).	108
Figura 5.24: Consumo específico de glicose nos ensaios do planejamento completo 2^3 com inóculo oriundo do meio Sf900II.	112
Figura 5.25: Consumo específico de glutamina nos ensaios do planejamento fracionário 2^3 com inóculo oriundo do meio Sf900II.	113
Figura 5.26: Superfície de resposta para a concentração de células viáveis finais na fase estacionária obtida com o planejamento fatorial completo 2^2 com 3 pontos centrais.	119
Figura 5.27: Parâmetros cinéticos para o ensaio 1 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,1% de PF68; 1% de SFB e 5% de PL). Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.	126
Figura 5.28: Parâmetros cinéticos para o ensaio 3 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,1% de PF68; 3% de SFB e 5% de PL).	127
Figura 5.29: Consumo específico de glicose nos ensaios do planejamento completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.	128
Figura 5.30: Consumo específico de glutamina nos ensaios do planejamento completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.	129
Figura 5.31: Superfície de resposta para a concentração de células viáveis finais na fase média exponencial (X_{me}) obtida com o planejamento fatorial completo 2^2 com 3 pontos centrais. Inóculo proveniente do meio Sf900II.	136

Figura 5.32: Curvas de nível representativas da X_{me} obtida com o planejamento fatorial completo 2^2 com 3 pontos centrais em vista dos suplementos permeado liofilizado e SFB. Inóculo proveniente do meio Sf900II	137
Figura 5.33: Parâmetros cinéticos para o ensaio 1 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,1% de PF68; 1% de SFB e 1% de PL).	141
Figura 5.34: Parâmetros cinéticos para o ensaio 3 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,1% de PF68; 3% de SFB e 1% de PL).	142
Figura 5.35: Consumo específico de glicose nos ensaios do planejamento completo 2^2 , com inóculo proveniente do meio Sf900II.....	143
Figura 5.36: Consumo específico de glutamina nos ensaios do planejamento completo 2^2 , com inóculo proveniente do meio Sf900II.....	144
Figura 5.37: Concentração de células viáveis para as formulação 4, 16, 1, 3, 9, 11, C(1) e C(2). C(1): controle em Grace + 10% de SFB; C(2): controle em Sf900II. Concentração do inóculo, 3×10^5 células viáveis/mL.....	147
Figura 5.38: Viabilidade para as formulação 4, 16, 1, 3, 9, 11, C(1) e C(2).	148
Figura 5.39: Consumo de glicose para as formulação 4, 16, 1, 3, 9, 11, C(1) e C(2).	148
Figura 5.40: Consumo de glutamina para as formulação 4, 16, 1, 3, 9, 11, C(1) e C(2).	149
Figura 5.41: Evolução de lactato para as formulação 4, 16, 1, 3, 9, 11, C(1) e C(2).	149
Figura 5.42: Consumo específico de glicose pelas células Sf9 nas formulações de meio de cultivo testadas no sexto subcultivo consecutivo.....	152
Figura 5.43: Consumo específico de glutamina pelas células Sf9 nas formulações de meio de cultivo testadas no sexto subcultivo consecutivo.....	152
Figura 5.44: Células Sf9 cultivadas na formulação 3 de meio de cultivo, coradas com brometo de etídio e laranja de acridina.	154

Figura 5.45: Células Sf9 infectadas por baculovírus mantidas em meio Sf900II. (Figura gentilmente cedida pelo Dr. Ronaldo Z. Mendonça)	160
Figura 5.46: Cinética de produção de poliedros através das células Sf9 nas formulações 3, 4 e 11. Concentração do inóculo celular 3×10^5 células viáveis/mL. Multiplicidade de infecção 1.	161
Figura A1: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Grace +10% de SFB	174
Figura A2: Parâmetros cinéticos para o ensaio 1 (1,8g/L de glicose; 1% SFB e 5 % de CPSL).....	175
Figura A3: Parâmetros cinéticos para o ensaio 2 (2,7g/L de glicose e 1% SFB). ...	176
Figura A4: Parâmetros cinéticos para o ensaio 5 (1,8g/L de glicose; 0,2% de PF68 e 1% SFB).....	177
Figura A5: Parâmetros cinéticos para o ensaio 6 (2,7g/L de glicose; 0,2% de PF68; 1% SFB e 5% de CPSL).	178
Figura A6: Parâmetros cinéticos para o ensaio 7 (1,8g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,2% de PF68; 1% SFB e 5% de CPSL).	179
Figura A7: Parâmetros cinéticos para o ensaio 9 (1,8g/L de glicose e 3% SFB). ...	180
Figura A8: Parâmetros cinéticos para o ensaio 10 (2,7g/L de glicose; 3% SFB e 5% de CPSL).....	181
Figura A9: Parâmetros cinéticos para o ensaio 13 (1,8g/L de glicose; 0,2% de PF68; 3% SFB e 5% de CPSL).	182
Figura A10: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Grace +10% de SFB.	183
Figura A11: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Sf900II.	184
Figura A12: Parâmetros cinéticos para o ensaio 1 (4g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	185

Figura A13: Parâmetros cinéticos para o ensaio 2 (8g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	186
Figura A14: Parâmetros cinéticos para o ensaio 3 (4g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	187
Figura A15: Parâmetros cinéticos para o ensaio 4 (8g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	188
Figura A16: Parâmetros cinéticos para o ensaio 5 (4g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	189
Figura A17: Parâmetros cinéticos para o ensaio 6 (8g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	190
Figura A18: Parâmetros cinéticos para o ensaio 7 (4g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	191
Figura A19: Parâmetros cinéticos para o ensaio 8 (8g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	192
Figura A20: Parâmetros cinéticos para o ensaio 9 (2,6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	193
Figura A21: Parâmetros cinéticos para o ensaio 10 (9,4g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	194
Figura A22: Parâmetros cinéticos para o ensaio 11 (6g/L de extrato de levedura; 2,3% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	195
Figura A23: Parâmetros cinéticos para o ensaio 12 (6g/L de extrato de levedura; 5,7% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	196
Figura A24: Parâmetros cinéticos para o ensaio 13 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 0,3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	197
Figura A25: Parâmetros cinéticos para o ensaio 14 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 3,4% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	198
Figura A26: Parâmetros cinéticos para o ensaio 15 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	199

Figura A27: Parâmetros cinéticos para o ensaio 16 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	200
Figura A28: Parâmetros cinéticos para o ensaio 17 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	201
Figura A29: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Grace +10% de SFB	202
Figura A30: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Sf9000II.	203
Figura A31: Parâmetros cinéticos para o ensaio 1 (4g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	204
Figura A32: Parâmetros cinéticos para o ensaio 2 (8g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	205
Figura A33: Parâmetros cinéticos para o ensaio 3 (4g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	206
Figura A34: Parâmetros cinéticos para o ensaio 4 (8g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	207
Figura A35: Parâmetros cinéticos para o ensaio 5 (4g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	208
Figura A36: Parâmetros cinéticos para o ensaio 6 (8g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	209
Figura A37: Parâmetros cinéticos para o ensaio 7 (4g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	210
Figura A38: Parâmetros cinéticos para o ensaio 8 (8g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	211
Figura A39: Parâmetros cinéticos para o ensaio 10 (9,4g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	212
Figura A40: Parâmetros cinéticos para o ensaio 12 (6g/L de extrato de levedura; 5,7% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	213

Figura A43: Parâmetros cinéticos para o ensaio 13 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 0,3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).....	214
Figura A44: Parâmetros cinéticos para o ensaio 14 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 3,4% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).....	215
Figura A45: Parâmetros cinéticos para o ensaio 15 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).....	216
Figura A46: Parâmetros cinéticos para o ensaio 16 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).....	217
Figura A47: Parâmetros cinéticos para o ensaio 17 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).....	218
Figura A48: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Grace +10% de SFB	219
Figura A49: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meios Sf900II	220
Figura A50: Parâmetros cinéticos para o ensaio 2 (8g/L de extrato de levedura; 5% de PL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).....	221
Figura A51: Parâmetros cinéticos para o ensaio 4 (8g/L de extrato de levedura; 5% de PL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).....	222
Figura A52: Parâmetros cinéticos para o ensaio 5 (8g/L de extrato de levedura; 2,5% de PL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).....	223
Figura A53: Parâmetros cinéticos para o ensaio 6 (8g/L de extrato de levedura; 2,5% de PL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).....	224
Figura A54: Parâmetros cinéticos para o ensaio 7 (8g/L de extrato de levedura; 2,5% de PL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).....	225
Figura A55: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Grace +10% de SFB.	226
Figura A56: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Sf900II.....	227
Figura A57: Parâmetros cinéticos para o ensaio 2 (8g/L de extrato de levedura; 2,5% de PL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).....	228

Figura A58: Parâmetros cinéticos para o ensaio 4 (8g/L de extrato de levedura; 2,5% de PL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	229
Figura A59: Parâmetros cinéticos para o ensaio 5 (8g/L de extrato de levedura; 1,75% de PL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	230
Figura A60: Parâmetros cinéticos para o ensaio 6 (8g/L de extrato de levedura; 1,75% de PL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	231
Figura A61: Parâmetros cinéticos para o ensaio 7 (8g/L de extrato de levedura; 1,75% de PL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68).	232
Figura A62: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Grace +10% de SFB.	233
Figura A63: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Sf900II.	234
Figura A64: Parâmetros cinéticos para o ensaio 4 (8g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 1% de SFB e 2,7g/L de glicose).	235
Figura A65: Parâmetros cinéticos para o ensaio 16 (8g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 3% de SFB; 0,2% de PF68 e 2,7g/L de glicose).	236
Figura A66: Parâmetros cinéticos para o ensaio 1 (8g/L de extrato de levedura; 1% de PL; 1% de SFB; 0,1% de PF68 e 2,7g/L de glicose).	237
Figura A67: Parâmetros cinéticos para o ensaio 3 (8g/L de extrato de levedura; 1% de PL; 3% de SFB; 0,1% de PF68 e 2,7g/L de glicose).	238

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Sistemas de cultura de células de insetos para aplicações biotecnológicas diversas (adaptada de Agathos, 1991).....	9
Tabela 3.2- Comparação entre células de insetos e de mamíferos em termos de tecnologia de propagação celular (adaptada de Agathos, 1991)	11
Tabela 3.3- Composição do Meio Grace (Catálogo Sigma Chemical. Co, 2003).....	15
Tabela 3.4: Principais proteínas do soro de leite bovino (Mckenzey, 1970).....	23
Tabela 4.1: Composição aproximada do extrato de levedura, com 25% de Maltodextrina.....	37
Tabela 4.2: Composição aproximada do concentrado protéico de soro de leite bovino.....	39
Tabela 4.3: Composição aproximada do permeado liofilizado	40
Tabela 4.4: Composição aproximada de minerais no permeado liofilizado (adaptada de Saron, 2003)	41
Tabela 4.5. Resumo dos experimentos realizados.....	47
Tabela 5.1: Comparação dos parâmetros cinéticos obtidos em diferentes meios de cultivo	57
Tabela 5.2: Tabela dos níveis decodificados das variáveis no planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} e as variáveis resposta obtidas. Concentração do inóculo: $2,5 \times 10^5$ células viáveis/mL.	61
Tabela 5.3: Comparação entre os parâmetros cinéticos das células Sf9 em suspensão obtidos no planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} e o ensaio controle em meio Grace contendo 10% SFB.....	63
Tabela 5.4: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais e inóculo proveniente do meio Grace contendo 10% de SFB.	77

Tabela 5.5: Planejamento fatorial completo 2^3 com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, empregando-se inóculo celular ($2,5 \times 10^5$ células viáveis/mL) mantido em meio Grace + 10% de SFB.....	79
Tabela 5.6: Efeitos estatísticos calculados para a concentração de células viáveis na fase estacionária (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.....	80
Tabela 5.7: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis na fase estacionária (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.....	80
Tabela 5.8: Efeitos obtidos para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.....	81
Tabela 5.9: Coeficientes de regressão para a concentração de X_{me} para o planejamento completo 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais. Inóculo mantido em meio Grace + 10% de SFB, ignorados os efeitos não significativos.....	82
Tabela 5.10: A análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo mantido em Grace + 10% de SFB, ignorados os efeitos não significativos. .	83
Tabela 5.11: Valores experimentais e preditos pelo modelo para X_{me} para o planejamento completo 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais e inóculo mantido em Grace +10% de SFB. Efeitos das concentrações de extrato de levedura, CPSL e SFB estudados nas faixas de 2,6 a 9,4g/L%, 2,3 a 5,7% <i>m/v</i> e 0,3 a 3,4% <i>v/v</i> , respectivamente.	86
Tabela 5.12: Efeitos obtidos para a viabilidade das células na fase média exponencial (V_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo proveniente de meio Grace + 10% de SFB.....	87
Tabela 5.13: Coeficientes de regressão para a concentração de V_{me} para o planejamento completo 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais. Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB, ignorados os efeitos não significativos.	88

Tabela 5.14: A análise de variância (ANOVA) para a viabilidade das células na fase média exponencial (V_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo proveniente de meio Grace + 10% de SFB, ignorados os efeitos não significativos.	88
Tabela 5.15: Valores experimentais e preditos pelo modelo para V_{me} para o planejamento completo 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais. Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.	91
Tabela 5.16: Parâmetros cinéticos dos ensaios do planejamento 2^3 (Inóculo proveniente de meio Grace) e dos ensaios controle em meio Grace e em meio Sf900II.	93
Tabela 5.17: Planejamento fatorial completo 2^3 com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais. Inóculo oriundo do meio livre de soro Sf900II.	98
Tabela 5.18: Efeitos obtidos para a concentração de células viáveis na fase estacionária (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^3 com inóculo celular oriundo do meio Sf900II.	99
Tabela 5.19: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis finais na fase estacionária (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^3 a partir de inóculo celular oriundo do meio Sf900II.	100
Tabela 5.20: Efeitos obtidos para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo celular mantido em meio Sf900II.	101
Tabela 5.21: A análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis finais na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo celular oriundo de Sf900II, ignorados os fatores não significativos.	102
Tabela 5.22: Efeitos obtidos para a viabilidade das células na fase média exponencial (V_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo celular oriundo do meio Sf900II.	103

Tabela 5.23: Análise de variância (ANOVA) para a viabilidade das células na fase média exponencial (V_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo celular oriundo de Sf900II, ignorados os fatores não significativos.	103
Tabela 5.24: Parâmetros cinéticos dos ensaios do planejamento 2^3 , dos ensaios controle em meio Grace e em meio Sf900II. Inóculo proveniente de meio Sf900II	110
Tabela 5.25: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 com 3 pontos centrais.	114
Tabela 5.26: Planejamento fatorial completo 2^2 com 3 pontos centrais. Inóculo celular obtido do meio Grace +10% de SFB	116
Tabela 5.27: Efeitos obtidos para a concentração final de células viáveis na fase estacionária (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Grace +10% de SFB.....	117
Tabela 5.28: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB, ignorados os efeitos não significativos	117
Tabela 5.29: Coeficientes de regressão para a concentração de X_{vs} para o planejamento completo 2^2 com 3 pontos centrais.	118
Tabela 5.30: Desvios dos valores de X_{vs} preditos pelo modelo em relação aos valores experimentais para o planejamento completo 2^2 com 3 pontos centrais. Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB	119
Tabela 5.31: Efeitos obtidos para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.....	121
Tabela 5.32: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo Grace + 10% de SFB, ignorados os efeitos não significativos.	121

Tabela 5.33: Efeitos obtidos para a viabilidade das células na fase média exponencial (V_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.....	122
Tabela 5.34: A análise de variância (ANOVA) para a viabilidade das células na fase média exponencial (V_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB, ignorados os efeitos não significativos.....	123
Tabela 5.35: Comparação dos parâmetros cinéticos das células Sf9 em suspensão (concentração do inóculo de $2,5 \times 10^5$ células viáveis/mL) obtidos no planejamento fatorial completo 2^2 e nos meios controles Grace contendo 10% de SFB e Sf900II.....	124
Tabela 5.36: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 com 3 pontos centrais. Inóculo proveniente do meio Sf900II.....	130
Tabela 5.37: Planejamento fatorial completo 2^2 com 3 pontos centrais a partir de inóculo celular proveniente do meio Sf900II.....	131
Tabela 5.38: Efeitos obtidos para a concentração final de células viáveis na fase estacionária (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente de meio Sf900II.....	132
Tabela 5.39: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Sf900II, ignorados os efeitos não significativos.	133
Tabela 5.40: Efeitos obtidos para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Sf900II.....	134
Tabela 5.41: A análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Sf900II.....	134

Tabela 5.42: Coeficientes de regressão para a concentração de X_{me} para o planejamento completo 2^2 com 3 pontos centrais. Inóculo proveniente do meio Sf900II	135
Tabela 5.43: Desvios dos valores de X_{me} preditos pelo modelo em relação aos valores experimentais, para o planejamento completo 2^2 com 3 pontos centrais. Inóculo proveniente do meio Sf900II	136
Tabela 5.44: Efeitos obtidos para a viabilidade das células na fase média exponencial (V_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Sf900II	138
Tabela 5.45: Comparação dos parâmetros cinéticos das células Sf9 obtidos no planejamento fatorial completo 2^2 e dos meios controles Grace contendo 10% de SFB e Sf900II	139
Tabela 5.46: Ensaio selecionados para a adaptação celular.....	146
Tabela 5.47: Composições das formulações avaliadas no cultivo das células Sf9 após seis subcultivos consecutivos.....	146
Tabela 5.48: Concentração de amônio produzido pelas células Sf9, nas formulações de meio de cultivo selecionadas, após 12 dias de cultivo.....	155
Tabela 5.49: Parâmetros cinéticos, concentração e viabilidade celular para células Sf9 nas formulações testadas após seis subcultivos consecutivos.....	157
Tabela 5.50: Osmolalidade dos meios empregados no cultivo das células Sf9	158
Tabela 5.51: Custo estimado dos materiais empregados nas formulações de meio de cultivo estudada.	162
Tabela 5.52: Estimativa do custo de obtenção dos meios de cultivo empregados neste estudo.....	163
Tabela A1: Comparação do desempenho dos ensaios controle empregados no desenvolvimento deste trabalho.....	239
Tabela C1: Exemplo do cálculo de <i>Reed and Muench</i> (1938)	243
Tabela C2: Determinação das cavidades com pelo menos 50% das células	

Infectadas.....	244
Tabela C3: Determinação da porcentagem de infecção	244

LISTA DE VARIÁVEIS

C_{CPSL} : Concentração da variável CPSL codificada

$C_{\text{ext. Lev}}$: Concentração da variável extrato de levedura codificada

C_{PL} : Concentração da variável PL codificada

C_{SFB} : Concentração da variável SFB codificada

C_{xme} : Concentração de células viáveis na fase média exponencial prevista pelo modelo em função das variáveis codificadas

p : fator p

R^2 : Coeficiente de Determinação do Modelo

X_{me} : Concentração de Células Viáveis na Fase Média Exponencial

X_{vs} : Concentração de Células Viáveis na Fase Estacionária

V_{me} : Viabilidade na Fase Média Exponencial

NOMENCLATURA E ABREVIações

A: Porcentagem de Células com Resposta acima de 50% de Infecção

AgMNPV: Nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis*

ANOVA: Análise de Variância

ATCC: do inglês *American Type Culture Collection*

B: Porcentagem de Células com Resposta abaixo de 50% de Infecção

BPA: do inglês *Bovine Plasma Albumin*

BSA: do inglês *Bovine Serum Albumin*

C: Ensaio Controle

CaCl₂: Cloreto de Cálcio

cél: Células

CO₂: Dióxido de Carbono

conc: Concentração

CPSL: Concentrado Protéico do Soro (Doce) de Leite

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: do inglês *Desoxyrinonucleic Acid*

DP: Distância Proporcional

EDTA: do inglês *Ethylenediamine-tetraacetic Acid*

ELISA: do inglês *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*

EUA: Estados Unidos da América

FCS: do inglês *Fetal Calf Serum*

Gli: Glicose

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

HEPES: N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-(2-ácido etanossulfônico]

IgA: Imunoglobulina A

IgE: Imunoglobulina E

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IPT: Instituto de Pesquisas Tecnológicas

LH: do inglês *Lactalbumine Hydrolyzate*

MOI: do inglês *Multiplicity of Infection*

MWU: do inglês *Milk Whey Ultrafiltrate*

MWR: do inglês *Milk Whey Retentate*

μ : Taxa Específica de Crescimento

μ_{\max} : Taxa Máxima Específica de Crescimento

NaCl: Cloreto de Sódio

NaHCO₃: Bicarbonato de Sódio

NH₃: Amônio

NOV: do inglês *non-occluded virus*

O₂: Oxigênio

PF68: Pluronic F68

pH: Potencial Hidrogênio Iônico

PL: Permeado Liofilizado de Soro de Leite Bovino

ppm: partes por milhão

q: Coeficiente Específico de Consumo de Nutrientes

rpm: rotações por minuto

SDS: do inglês *Sodium Dodecil Sulfate*

SFB:Soro Fetal Bovino

SFM: do inglês *Serum Free Medium*

t: Tempo

TCA : do inglês *Tricarboxilic Acid Cycle*

TCID₅₀: do inglês *Tissue Culture Infectious Dose 50%*

t_d: Tempo de Duplicação Celular

t_{lag}: Tempo de Duração da Fase *lag* de Crescimento

TPB: do inglês *Tryptose Phosphate Broth*

t_s: Tempo para se Atingir a Fase Estacionária

Viab: Viabilidade

X: Concentração de Células Viáveis

YE: do inglês *Yeast Extract*

YPR: do inglês *Yeastolate Primatone*

1. INTRODUÇÃO

Calcula-se que 15% da produção agrícola global seja perdida devido a insetos (Vardar-Sukan e Sukan, 1992). O principal método de controle de insetos fundamenta-se no uso de agentes químicos, que representam sérios riscos de intoxicação ao homem e a animais, além de eliminarem insetos benéficos e poluírem o ambiente. Em adição, os insetos indesejáveis podem adquirir rápida resistência à sua ação. Em vista disto, tem-se dado significativa importância a pesquisas de métodos alternativos de controle de insetos. No Brasil, especificamente, a alternativa que vem se tornando alvo freqüente de estudos no controle da população de insetos é o uso de patógenos, como os baculovírus, que causam doenças fatais a estes organismos.

Baculovírus são partes integrantes do ecossistema e têm importância significativa na regulação da população de insetos. Devido à sua alta especificidade a determinadas espécies, podem ser encontrados quase que exclusivamente entre insetos (Sanderson et al., 1999 e Moscardi e Corso, 1981), não são nocivos à saúde humana, nem introduzem risco de desequilíbrio ambiental.

A vantagem mais importante propiciada pelo uso do baculovírus é o controle da *Anticarsia gemmatilis*, a lagarta da soja, sendo específico e mais eficiente que o controle químico. Se efetuado de maneira e na época adequada, pode proporcionar uma economia de até 75% quando comparado a inseticidas químicos, sem se considerar as enormes vantagens relativas ao controle ambiental (Moscardi, 1984).

O Baculovírus anticarsia está sendo utilizado no Brasil e em outros países da América Latina, como Argentina, Paraguai e Bolívia. Atualmente, este produto é comercializado por empresas como a Cooperativa Central Agropecuária de Desenvolvimento Tecnológico e Econômico (Coodetec-Cascavel, PR), Geratec Biotecnologia Aplicada (Cruz Alta, RS), Nitral Inoculantes e Produtos

Agropecuários (Pinhais, PR), Nova Era Biotecnologia Agrícola (Apucarana, PR), Tecnivita Produtos Biotecnológicos (Londrina, PR) e AEE Embrapa Soja. No ano de 2001, um milhão e 600 mil hectares de soja (mais que 10% do total ocupado com a cultura no país) foram tratados com o baculovírus, e a área coberta só não foi maior porque já em meados de dezembro daquele ano não mais se dispunha do inseticida biológico (Globo Rural on Line, editora Globo, edição 197, 2002).

Tendo por base que o produto biológico (baculovírus obtido da *lagarta*) custa em média a metade do preço da pulverização convencional com pesticida químico, resultando em benefício econômico em torno de R\$ 10,00/hectare, estima-se que o controle da *lagarta* através do uso do biopesticida baculovírus permite uma economia anual da ordem de 1,2 milhões de litros de inseticidas químicos (Embrapa Soja, 1997), equivalente a cerca de R\$ 12 milhões, sendo este um dos maiores programas de controle ambiental com um único agente de controle biológico (Vardar-Sukan e Sukan, 1992).

As limitações mais significativas da utilização do baculovírus como agente biológico referem-se ao fato dos vírus demorarem alguns dias para matar as *lagartas* e ao modo tradicional de obtenção do produto, que se fundamenta na infecção de *lagartas*. Em adição, no processo tradicional de obtenção, assim como em uma safra agrícola, as *lagartas* podem apresentar variações em suas características a cada ano, alterando a matéria-prima empregada e também o produto final obtido.

A produção do baculovírus certamente pode ser aumentada, utilizando-se ao invés do processo *in vivo* de infecção de *lagartas*, um processo baseado na infecção de células de inseto cultivadas *in vitro*. Em tal abordagem pode-se enfocar meios de cultivo com composição otimizada, metodologias de maior facilidade de escalonamento, controle de produção e, principalmente, de aumento de virulência e custo mais baixo que as exercidas atualmente.

Desta forma, no presente trabalho propõe-se a obtenção *in vitro* do vírus e dos poliedros que contêm vírions pela infecção de células de *Spodoptera*

frugiperda Sf9 desenvolvidas em meios de cultura de composição otimizada. Tais meios são formulados a partir de um meio basal de baixo custo (meio Grace), de maneira a reduzir a quantidade necessária de soro fetal bovino, cuja presença é parcialmente substituída pela suplementação com glicose (como fonte de carbono e energia), Pluronic F68 (estabilizante contra o cisalhamento celular), extrato de levedura, concentrado protéico e permeado do soro de leite bovino, que atuam como fontes de aminoácidos essenciais, fatores de crescimento e micronutrientes, dentre outros compostos.

O soro de feto bovino é um componente de alto custo no meio de cultura e, além de sua limitação inerente relativa à variação entre lotes, pode causar dificuldades nos processos de separação e purificação, devendo ser evitado em culturas que produzem proteínas terapêuticas e diagnósticas (Chisti, 2000). Devido às desvantagens de meios com soro, meios com composição química definida e livres de soro foram desenvolvidos com sucesso (como o Sf900II) e estão disponíveis comercialmente, entretanto, a um custo bastante elevado (da ordem de 10 vezes superior ao custo de um meio que requer a suplementação com soro fetal bovino).

Diversos estudos enfocando a formulação de meios de cultura para células de inseto vêm sendo realizados (Wilkie et al., 1980; Wang et al., 1993a; Drews et al., 1995; Vaughn and Fan, 1997, entre outros, conforme revisto por Ikononou et al., 2003), tanto com a finalidade de aumentar o rendimento e manter elevada a viabilidade celular, quanto com o propósito de reduzir o custo global de produção e aumentar a qualidade de bioprodutos de interesse. Entretanto, o emprego de concentrado protéico de soro de leite é uma inovação no cultivo de células de inseto.

Assim, o presente trabalho pode proporcionar o aproveitamento de resíduos industriais como o soro de leite e de leveduras resultantes da fermentação alcoólica, ambos abundantes no Brasil. A aplicação destes resíduos, principalmente do permeado do soro de leite bovino, considerado fonte poluidora,

possibilitaria uma apreciável redução na emissão de poluentes pelas indústrias produtoras de queijo.

A otimização do cultivo de células de insetos eventualmente possibilitará, além da produção de poliedros de vírus para biopesticida, a produção de proteínas heterólogas de interesse utilizando baculovírus recombinantes desenvolvidos em células de lepidópteros, como as células *Spodoptera frugiperda Sf9*, ou mesmo empregando células de dípteros transfectadas, como as células *Drosophila melanogaster* Schneider S2. Essas células são similares às Sf9, no entanto, atingem densidades celulares superiores às observadas para as de lepidópteros (Agathos, 1991). Estas células produzem constitutivamente a proteína heteróloga, que é coletada no sobrenadante e após a purificação, pode ser utilizada como antígeno, vacina e reativo de teste diagnóstico, dentre outras aplicações.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um meio de cultivo para células de inseto *Spodoptera frugiperda* da linhagem Sf9 cultivadas em suspensão, contemplando a substituição do soro fetal bovino pela suplementação do meio Grace com glicose, Pluronic F68, extrato de levedura, concentrado protéico e permeado de soro de leite bovino, com potencial de aplicação na produção de baculovírus, de tal forma que o processo seja economicamente atraente e apresente maior possibilidade de implementação de controles operacionais do que o tradicionalmente praticado, fundamentado na infecção de lagartas. Para atingir esse objetivo, o trabalho envolveu as seguintes etapas experimentais:

- (a) Avaliação dos efeitos das concentrações de suplementos do meio de cultivo Grace, nominalmente, glicose, extrato de levedura, Pluronic PF68, concentrado protéico e permeado de soro de leite bovino e soro fetal bovino na proliferação de células Sf9 e na manutenção de alta viabilidade celular e comparação dos resultados obtidos pelo cultivo das células no meio sintético de alto custo Sf900II.
- (b) Estudo do metabolismo das células Sf9 no tocante aos consumos de glicose e glutamina e à formação de lactato e amônio nos diferentes meios de cultivo testados.
- (c) Adaptação das células de inseto Sf9 nos meios de cultivo desenvolvidos que resultaram em melhor desempenho celular através de repiques sucessivos.
- (e) Aplicação na produção de partículas virais (poliedros de baculovírus) a partir da infecção de células Sf9 cultivadas, em frascos agitados, nos meios de cultura que propiciaram melhores desempenhos celulares.

3. REVISÃO DA LITERATURA FUNDAMENTAL

3.1. Evolução Histórica do Cultivo de Células de Insetos

As primeiras tentativas de se cultivar células de insetos ocorreram aproximadamente em 1915, sendo que até 1959 ainda não se havia conseguido uma linhagem permanente de células, observando-se apenas o crescimento e a sobrevivência de prolongamentos de tecidos (Grace, 1959).

A principal dificuldade estava na inexistência de uma formulação de meio de cultivo adequado que permitisse a manutenção celular *in vitro*. Trabalhos realizados neste campo, como o desenvolvido por Wyatt (1961) sobre a bioquímica da hemolinfa (fluido circulatório de insetos) e mais recentemente por Maranga et al. (2003), viabilizaram o desenvolvimento de meios de cultura nos quais as células de insetos se desenvolvem com maior eficiência. O último trabalho, em especial, serviu não somente para a formulação de meios quimicamente definidos para cultura de células de Lepidópteros (animais artrópodes da classe Lepidoptera, como borboletas e mariposas), mas também para ressaltar a importância da adição de hemolinfa de invertebrados antes de se tentar o estabelecimento de culturas de forma empírica.

As tentativas iniciais de se cultivar células de insetos tinham enfoques bastante distintos dos de hoje. O interesse pela cultura estava no estudo da fisiologia do inseto, tal como estudos de gametogênese, morfogênese e diferenciação, seguido do estudo da atuação de hormônios em insetos, dentre outros. Após alguns anos somente é que se cogitou o uso de células de insetos como hospedeiras para o cultivo de parasitas (Cestari e Simões, 1978). Além disto, células de insetos têm sido utilizadas na produção de proteínas recombinantes de mamíferos por serem capazes de realizar modificações pós-tradução na complexidade requerida.

A expressão de proteínas recombinantes pode ser realizada através de sistemas de expressão como células de bactérias, mamíferos, leveduras e insetos. A escolha do sistema de expressão depende de qual a aplicação terá a proteína recombinante e do grau de purificação requerido.

Embora as células de bactérias expressem estas proteínas em grande quantidade, em um menor tempo de produção, oferecendo fácil manipulação da cultura e menor custo, a proteína ativa expressa pode apresentar baixo rendimento, uma vez que é produzida intracelularmente requerendo uma etapa de renaturação devido a ação de proteases empregadas na lise celular. Além do fato destes organismos serem procariontes e não realizarem modificações protéicas pós-tradução na complexidade requerida.

O sistema de expressão células de levedura produz a proteína recombinante extracelularmente, realiza as modificações pós-tradução, já que são seres eucariontes, além de seu meio de cultivo ser simples e de baixo custo. No entanto neste sistema de expressão não podem ser utilizados genes heterólogos e a modificação pós-tradução pode não ter função *in vitro*.

Em vista disto emprega-se sistemas de expressão por células de mamíferos e de insetos. As células de mamíferos apresentam sinais de síntese que são facilmente reconhecidos, a proteína recombinante é expressa extracelularmente, além do fato destas células realizam modificações pós-tradução e poderem receber múltiplos plasmídios. Entretanto seu cultivo requer um meio rico e de alto custo.

Como alternativa a estes sistemas utiliza-se a expressão de proteínas recombinantes através de células de inseto que geram uma maior quantidade de proteína recombinante de forma mais segura. Isto ocorre, pois o baculovírus é um infectante natural destas células, apresentando transformação celular estável. Contudo, a maior dificuldade de empregar-se este sistema é a difícil manipulação do vetor de expressão (Verma et al., 1998).

A expressão de genes heterólogos via vetor baculovírus é comparável à expressão de proteínas recombinantes através de transfecção de genes. Neste sentido, células de *Spodoptera frugiperda* Sf9 têm sido frequentemente utilizadas para a obtenção de proteínas codificadas por genes heterólogos carregados por baculovírus. Uma das grandes dificuldades encontradas na obtenção de proteínas recombinantes via sistema de expressão vetor baculovírus é a ocorrência de proteólise, ou seja, a liberação de proteases capazes de afetar a qualidade e a quantidade do produto de interesse produzido por este sistema. Segundo Ikonomou et al. (2003), as proteases podem ser produzidas por células de insetos como resultado do estresse causado pela infecção por baculovírus, durante o ciclo de infecção, podendo ser também liberadas após a lise celular. Este problema pode ser agravado pelo emprego de meios livre de soro no cultivo destas células, já que as proteínas com função protetora, como albumina e macroglobulinas, estão ausentes.

A Tabela 3.1 apresenta algumas das diversas aplicações do cultivo de células de insetos. Dentre as linhagens citadas, destaca-se a *Spodoptera frugiperda* Sf9, derivadas do ovário de pupa de borboleta e utilizada para a obtenção de biopesticidas e proteínas recombinantes, além da linhagem *High Five* obtida de células ovo da *Trichopusia ni* empregada largamente também na produção de proteínas recombinantes.

Tabela 3.1: Sistemas de cultura de células de insetos para aplicações biotecnológicas diversas (adaptada de Agathos, 1991).

Tipo de Célula	Tipos de Produtos Obtidos
Células de Lepdópteros	
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Proteínas recombinantes, bioinseticida
<i>Trichoplusia ni</i>	Enzimas, fatores de crescimento, antígenos virais dentre outros.
<i>Bombyx mori</i>	Bioinseticida
<i>Autographa californica</i>	Bioinseticida
<i>Heliothis zea</i>	Bioinseticida
<i>Lymantris dispar</i>	Bioinseticida
<i>Orgyia pseudotsugata</i>	Bioinseticida
<i>Neodiprion sertifer</i>	Bioinseticida
Células de Dípteros	
<i>Aedes aegypti</i>	Compostos para diagnósticos, vacinas
<i>Drosophila melanogaster</i>	Proteínas recombinantes
<i>Sarcophage peregrina</i>	Inibidor de crescimento celular

O cultivo de células de inseto apresenta vantagens em relação à obtenção *in vitro* de vírus para bioinseticida, proporcionando um controle mais adequado do ambiente, e das condições fisiológicas, maior homogeneidade da amostra e economia global, destacando-se também a mais fácil caracterização da amostra. Entretanto, ao contrário de alguns microrganismos, as células de inseto não são capazes de sobreviver de maneira independente em um ambiente que não conserve as condições do tecido original do qual as mesmas são oriundas, o que aumenta a complexidade no entendimento das necessidades do sistema e no diagnóstico de problemas. Em adição, é válido ressaltar que o cultivo *in vitro* deve ser realizado de forma criteriosa, mantidas as condições assépticas,

principalmente porque estas células crescem mais lentamente que contaminantes como fungos e bactérias.

3.2. Comparação do Cultivo de Células de Insetos a Células de Mamíferos

Diversos aspectos devem ser avaliados no cultivo celular, destacando-se a composição do meio de cultivo, a idade e densidade do inóculo celular e, em se tratando de células aderentes, o tipo de suporte para adesão celular.

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 metabólitos e desprovido de nutrientes, e a subsequente adição de meio fresco.

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 (Mitsubishi, 1989). A combinação de fatores variados determina o sucesso do cultivo *in vitro* das células, tanto de mamíferos quanto de insetos. Na Tabela 3.2, compara-se o cultivo de células de mamíferos ao cultivo de células 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. O pH adequado para o bom desenvolvimento de células de mamíferos situa-se na faixa de 6,8 a 7,8, para tanto, utilizam-se agentes tamponantes como HEPES e ar acrescido de 5% de CO₂ para a manutenção do pH ótimo de operação. O pH adequado no cultivo de células de insetos situa-se, geralmente, entre 6,1 e 6,4, não havendo a necessidade de acréscimo de dióxido de carbono, o que reduz a complexidade e os custos do cultivo.

Tabela 3.2- Comparação entre células de insetos e de mamíferos em termos de tecnologia de propagação celular (adaptada de Agathos, 1991).

Fatores	Células de Insetos	Células de Mamíferos
Manutenção	Relativamente fácil	Difícil
Versatilidade de suspensão/ aderência	Maior	Menor
Imortalidade	Presente	Somente linhagens transformadas
Inibição por contato	Ausente	Presente, exceto para linhagens de linfócitos
Remoção suporte de adesão	Mecânica	Tratamento enzimático
Demanda de oxigênio	Relativamente alta	Relativamente baixa
Sensibilidade a mudanças de pH, temperatura e a choque osmótico	Relativamente baixa	Relativamente alta
Dependência do crescimento com a concentração do inóculo	Presente	Presente
Esterilidade	Requerida	Requerida

Muitas vantagens podem ser destacadas da Tabela 3.2, quando se compara o cultivo de células de mamíferos ao de insetos. Células de insetos revelam-se significativamente mais robustas quanto ao cultivo, principalmente em relação à manutenção, facilidade de adaptação na mudança de sistemas aderentes para suspensos, e principalmente por apresentarem maior resistência a estresse ambiental, como mudanças de pH e de osmolalidade (Ikonomou et al., 2003).

A osmolalidade é um dos parâmetros físico químico que merece atenção especial no meio de cultura. Este parâmetro leva em conta o número total de partículas osmoticamente ativas em solução, sendo igual à soma das molalidades

de todos os solutos presentes nesta solução. A maioria dos meios de cultivo para células é formulada para ter uma osmolalidade entre 260 e 330mOs/kg, aceitável para a maioria das células (Fresnhey, 1994).

Assim, novas tecnologias têm sido desenvolvidas para a obtenção de bioprodutos a partir de células de insetos e para o projeto racional de meios de cultivo adequados, o conhecimento de aspectos fundamentais sobre o metabolismo de células de inseto é requerido.

3.3. Metabolismo de Células de Insetos

Dentre os compostos de relevância no cultivo de células de inseto destacam-se as fontes de carbono e nitrogênio, glicose e glutamina e os produtos metabólicos lactato e amônio. A Figura 3.1 mostra as rotas metabólicas de consumo de glicose e glutamina e de formação de lactato e amônio no cultivo de células Sf9.

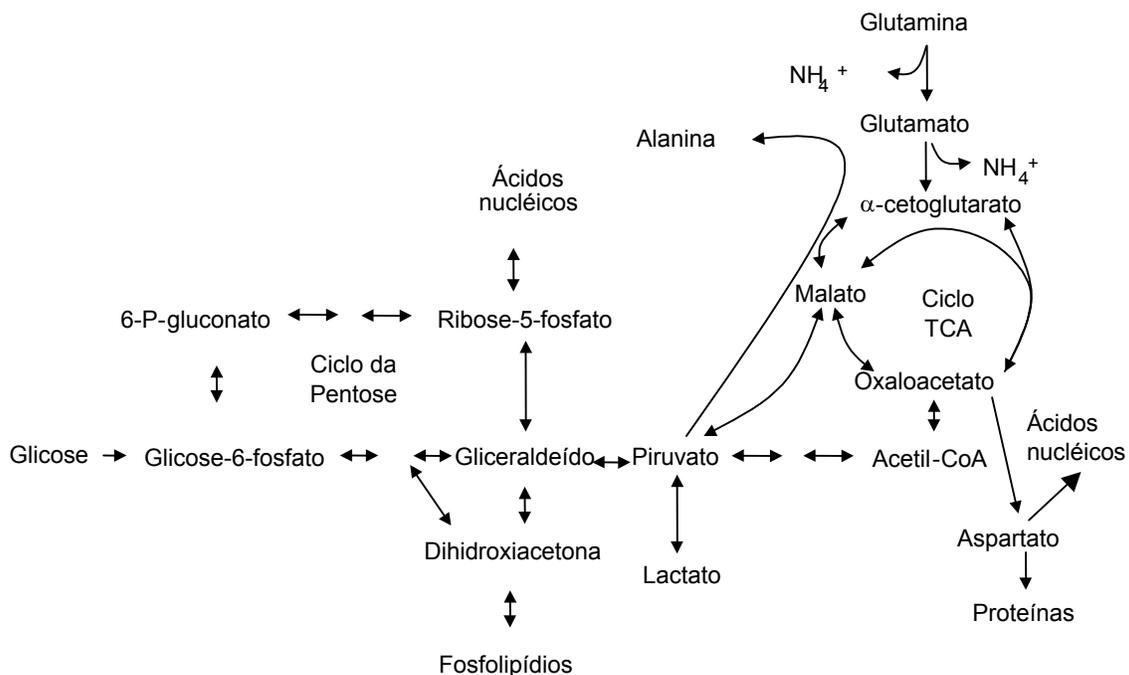


Figura 3.1: Principais vias do metabolismo celular propostas para células Sf9 (adaptada de Öhman et al., 1995).

O carboidrato mais comumente consumido por células de insetos, é a glicose, que produz lactato como principal metabólito. A glutamina é outro nutriente que sofre intenso metabolismo, podendo ser convertida em glutamato, alanina ou amônio. Entretanto, em alguns casos, segundo Öhman et al. (1996), a glutamina pode ser sintetizada pelas próprias células em quantidades capazes de suprir o crescimento celular.

As células de insetos, em geral, acumulam lactato em baixos níveis, diferentemente das células de mamíferos. Não obstante, o lactato pode ser produzido sob condições de estresse provocado pela limitação de oxigênio (Ikonomou et al., 2003).

Em algumas situações, o lactato pode ser consumido, sendo possivelmente um substrato alternativo para o suprimento de carbono ou energia ao metabolismo celular, proporcionando a produção de piruvato, através da enzima lactato desidrogenase, formando ácido α -cetoglutarato, composto resultante do ciclo TCA.

Um outro metabólito importante em cultura celular, por seu efeito tóxico e inibidor de crescimento é o amônio. O amônio é o principal subproduto do metabolismo da glutamina. Entretanto, quando a glicose torna-se escassa no meio de cultura as células podem utilizar a glutamina para a produção de energia.

Estudos realizados por Drews et al. (2000) mostram que em meios de cultura nos quais não se dispõe de glicose, nutrientes alternativos podem ser consumidos, resultando, no entanto, na redução da taxa de crescimento celular. Os autores verificaram ainda que a glicose excedente no meio de cultura provoca a formação preferencial de alanina. Ao mesmo tempo, a formação deste metabólito é suprimida em virtude da completa escassez de glutamina do meio de cultura. A limitação de glutamina no meio de cultura força o consumo de aminoácidos como aspartato (fortemente consumido em culturas de Sf9 em batelada) seguido do glutamato e da asparagina. Na ausência de glutamina os aminoácidos metionina e tirosina também podem ser consumidos pelas células Sf9 (Mendonça et al., 1999). A glutamina, o glutamato, e o aspartato são precursores de oxaloacetatos. Células de insetos podem necessitar de

requerimentos, como aspartato e glutamato, que são precursores de oxaloacetatos, que promovem um aumento do fluxo de metabólitos no ciclo TCA (ciclo dos ácidos tricarboxílicos) do metabolismo celular.

3.4. Meios de Cultivo Tradicionalmente Empregados na Proliferação de Células de Insetos

Conforme já mencionado, o conhecimento do metabolismo celular é imprescindível para a formulação de novos meios de cultivo. Estudos recentes avançam consideravelmente no desenvolvimento de meios de cultivo para muitas linhagens de células de insetos. Trabalhos realizados na década de oitenta mostraram que os componentes gerais do meio podem variar de célula para célula em tipo e quantidade (Mitsubishi, 1989).

A elaboração adequada de um meio de cultivo para células de insetos deve considerar primordialmente o inseto como um sistema, levando em conta as diferenças existentes na composição do fluido circulatório (hemolinfa), assim como as características gênicas de cada indivíduo do qual as células foram obtidas. Tais diferenças podem ser atribuídas a dietas alimentares distintas dentro da cadeia alimentar evolutiva.

A otimização de meios de cultivo para células de insetos requer testes interativos de cada constituinte proposto, para que com isso promova-se a determinação de sua composição preferencial. Em um sistema multicomponente como o ambiente celular, diversos fatores encontram-se interligados, podendo aparecer como essenciais em um determinado contexto e não essenciais em outro. A formulação inicial de um meio de cultivo para células de insetos pode ser muitas vezes baseada em mínimas informações da composição do fluido circulatório destes organismos (hemolinfa). No entanto, muitas vezes, nutrientes que não aparecem no organismo como um todo, essenciais para as atividades metabólicas nos tecidos e órgãos, podem ser completamente desnecessários na proliferação celular *in vitro*.

Na manutenção das condições do tecido original do qual a célula é oriunda, faz-se necessário a presença de um meio líquido que possua, dentre outras substâncias específicas para determinadas linhagens celulares, sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos, vitaminas, lipídios, ácidos orgânicos, proteínas, hormônios, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, soro sangüíneo, antibióticos, micronutrientes (íons orgânicos e minerais) e água. O meio de cultivo deve conter nutrientes essenciais para a síntese de novas células, substratos para a realização do metabolismo celular, além de compostos que desempenhem funções fisiológicas, catalíticas ou que atuem como cofatores. A cultura deve ser mantida livre de componentes com efeitos inibidores ou tóxicos.

O meio descrito por Grace em 1959 apresentou-se como um dos primeiros meios de cultivo que resultou em sucesso na proliferação *in vitro* de células de tecidos de insetos. Sua composição incluía originalmente a hemolinfa, possivelmente como agente promotor do crescimento celular. Este meio de cultivo possui osmolaridade em torno de 300mOsm/kg H₂O e pH em torno de 4,5. A Tabela 3.3 mostra a composição do meio Grace disponível comercialmente.

Tabela 3.3- Composição do Meio Grace (Catálogo Sigma Chemical. Co, 2003).

Componentes	G/L
Sais inorgânicos	
Cloreto cálcio (anidro)	1,000
Cloreto de magnésio (anidro)	1,068
Sulfato de magnésio (anidro)	1,350
Cloreto de potássio	2,240
Fosfato de sódio monobásico	0,870
Vitaminas	
p-Ácido Aminobenzóico	0,00002
D-Biotina	0,00001
Cloreto de Colina	0,0002
Ácido Fólico	0,00002
Mioinositol	0,00002
Niacina	0,00002
D-Ácido Pantotênico	0,00002
Piridoxina HCl	0,00002
Riboflavina	0,00002
Tiamina	0,00002
Outros	
D-Frutose	0,400
Ácido fumárico	0,055
D-Glicose	0,700
Ácido α -cetoglutárico	0,370
L-Ácido málico	0,670

Continuação da Tabela 3.3

Ácido Succínico	0,060
Sacarose	26,700
Aminoácidos	
β-alanina	0,200
L-alanina	0,225
L-arginina HCl	0,700
L-ácido aspártico	0,350
L-Asparagina (anidra)	0,350
L-Cistina 2HCl	0,025
L-Ácido Glutâmico	0,600
L-Glutamina	0,600
Glicina	0,650
L-Histidina	2,500
L-Isoleucina	0,050
L-Leucina	0,075
L-Lisina HCl	0,625
L-Metionina	0,050
L-Fenilalanina	0,150
L-Prolina	0,350
DL-Serina	1,100
L-Treonina	0,175
L-Triptofano	0,100
L-Tirosina 2Na	0,070
L-Valina	0,100

Dentre os diversos meios de cultivo que podem ser empregados no desenvolvimento e proliferação de células de insetos, destaca-se o meio Grace. Este meio, quando adequadamente suplementado com soro fetal bovino, pode ser empregado na cultura de células de lepidópteros e também de alguns dípteros (animais artrópodes da classe Díptera, como moscas e mosquitos). O meio Grace apresenta elevada quantidade de carboidratos, como por exemplo 27g/L de sacarose, empregados na manutenção adequada da pressão osmótica do meio, de cerca de 300mOsm/kg. Isso mostra que as células de inseto podem também tolerar altas concentrações de açúcares. Os meios de cultura são formulados normalmente para apresentar valores entre 260 a 330mOsm/kg (Fresnhey, 1994). A osmolalidade pode variar no decorrer do crescimento como resultado de fatores como o acúmulo de produtos metabólicos, a adição de agentes anti-espumantes, a alimentação de nutrientes, etc. O emprego de meios com osmolalidade superior a 400mOsm/kg costuma resultar em forte estresse osmótico para as células, em geral (Tonso, 2000).

Os sais inorgânicos são importantes na manutenção do balanço iônico e pressão osmótica. Já os açúcares são importantes como fonte de energia (Mitsubishi, 1989).

É consenso geral que a glicose é a fonte principal de energia e de material para a formação de esqueleto carbônico das células de insetos (Bédard et al., 1993), Drews et al., 1995, Mendonça et al., 1999 e Ikononou et al., 2003, dentre outros). Outros carboidratos como a frutose e a maltose podem ser consumidos quando a glicose não está disponível no meio de cultura (Reuveny et al., 1992). A sacarose só é consumida após a infecção de células de inseto por baculovírus (Wang et al., 1993b).

A trealose, principal carboidrato encontrado na hemolinfa de insetos, sofre clivagem *in vitro* em duas moléculas de glicose. Conforme Clements e Grace (1967) citado por Echaliier (1967), células de Lepidópteros não são capazes de metabolizar este carboidrato em glicose, tornando totalmente dispensável sua suplementação ao meio de cultivo.

Os aminoácidos são necessários para a constituição de proteínas, além de serem empregados no crescimento celular. Os aminoácidos necessários são α -alanina, β -alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cistina, ácido glutâmico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina, e sua existência e quantidade requerida variam com a necessidade de consumo de cada linhagem celular. A glutamina é fonte essencial de nitrogênio para muitas espécies, podendo ser sintetizada por outras (Mitsuhashi, 1989).

Öhman et al. (1995) mostraram que as células de insetos Sf9 e Sf21 foram capazes de crescer em meios de cultivo livres de glutamina, glutamato e aspartato desde que o meio de cultivo fosse suplementado adequadamente com íons amônio. No entanto, Mendonça et al. (1999) notaram que a escassez de glutamina no meio de cultivo provocava a redução da taxa de crescimento celular. A suplementação do meio de cultivo com metionina e tirosina, conforme discutido por Mendonça et al. (1999) pode retardar o processo de morte celular em culturas celulares da linhagem Sf9.

Os lipídios são considerados essenciais no crescimento celular, como constituintes de membranas, destacando-se colesterol e fosfolipídios (Mitsuhashi, 1989). Entretanto, uma das dificuldades de seu suprimento em concentrações adequadas reside em sua baixa solubilidade e meios aquosos. Para contornar esta limitação pode-se emulsificar os lipídios com agentes tensoativos não citotóxicos, como o Pluronic F68, conforme proposto por Maiorella et al. (1998). Outra possibilidade é efetuar a dispersão de lipídios na forma de lipossomas (vesículas), que podem ser preparados por diversas metodologias. O emprego de lipossomas na cultura de células de insetos tem se limitado, contudo, a processos de otimização de transfecções genéticas para a expressão de proteínas de interesse. O vetor a ser transfectado (plasmídeo) é inserido em células de inseto, como a S2 (*Drosophila melanogaster*), mascarado pela estrutura lipídica do lipossoma podendo com isso ser englobado pelas células (Park et al., 1999).

As vitaminas do complexo B (tiamina, niacinamida, riboflavina, piridoxina, pantotenato, biotina, ácido fólico e cianocobalamina) são comumente utilizadas no metabolismo celular de insetos em geral, conforme menção de Echalier (1997).

Ainda segundo Echalier (1997), os ácidos orgânicos também são considerados essenciais no crescimento celular. Os principais observados são ácido málico, ácido succínico, ácido fumárico e ácido α -cetoglutárico. O piruvato, succinato, malato e citrato participam de intensos fluxos metabólicos no ciclo de Krebs.

Não se conhece exatamente a função principal de proteínas e peptídeos ou de seus hidrolisados, mas a Fração 5 da albumina do plasma bovino (BPA) é freqüentemente adicionada ao meio, bem como o caldo de triptose fosfato (TPB) para o cultivo da *Spodoptera frugiperda*. Proteínas hidrolisadas são também freqüentemente adicionadas no meio, como a lactoalbumina hidrolisada (LH) e caseína hidrolisada, que podem promover o crescimento celular. Hidrolisados são misturas complexas de oligopeptídios, polipeptídios e aminoácidos produzidos a partir da digestão química ou enzimática da caseína, albumina, tecidos de plantas ou de animais (Ikononou et al., 2003).

Nas últimas décadas hidrolisados provenientes de tecidos animais como a Primatona RL foram suplementados ao meio de cultivo de células de hibridomas observando-se o prolongamento da fase estacionária e a redução de morte celular causada por apoptose, ou morte celular programada (Schlaeger, 1996b).

Comportamento similar foi verificado por Ikononou et al. (2001) em células de inseto Sf9 e High-Five. Recomenda-se, no entanto, o uso de hidrolisados de soja (Hy-Soy ou NZ-Soy) quando não é possível a utilização de hidrolisados de carne como a Primatona RL.

Hidrolisados oriundos de tecidos de plantas como Hy-Soy (peptona da soja) e NZ-Soy podem ser empregados na obtenção de glicoproteínas farmacêuticas. Estes hidrolisados não afetam a qualidade final do produto, podendo suplementar meios livres de soro em concentrações em torno de 4g/L (Ikononou et al., 2003).

Os extratos celulares, como o extrato de levedura, são produzidos a partir da autólise de células de levedura resultando em uma mistura complexa de polissacarídeos e vitaminas (Sommer, 1996). O extrato de levedura supre a necessidade vitamínica da célula, além de possuir em sua composição nucleotídeos, aminoácidos, traços de metais e lipídios (Echalier, 1997).

Os hormônios empregados no cultivo de células de insetos podem ser considerados basicamente como estimuladores de crescimento celular. A insulina de mamíferos suplementada no meio de cultivo na concentração de 0,125UI pode promover a proliferação celular de Dípteros como a *Drosófila* (Echalier, 1997).

No cultivo de células de insetos, o soro de vertebrados mais freqüentemente empregado é o soro fetal bovino. O soro fetal bovino é uma mistura de várias moléculas capazes de promover o crescimento celular. Destaca-se entre suas principais funções o estímulo ao crescimento e às atividades metabólicas, através de hormônios, fatores de crescimento, proteínas para o transporte de hormônios, minerais e lipídios (Freshney, 1994). Entretanto, o soro é um componente de alto custo do meio de cultivo e que pode ocasionar dificuldades nos processos de separação e purificação em sistemas nos quais os produtos de interesse sejam proteínas, além de aumentar o risco de contaminação por agentes dificilmente detectáveis como micoplasmas. Outro fator limitante no uso de soro bovino como suplemento ao cultivo celular é a variabilidade apresentada entre lotes do produto, o que reduz significativamente a reprodutibilidade dos ensaios. Em razão de tais dificuldades, tenta-se muitas vezes adaptar as células para meios livres de soro. Esta adaptação pode ocorrer de forma gradual entre subcultivos celulares, que inicialmente apresentam 10% em volume de SFB, sendo reduzidos a 5%, 2,5%, 1,5% e finalmente 0%, em etapas sucessivas. No entanto, nem todas as linhagens adaptam-se a meios livres de soro através desta abordagem, sendo necessário o desenvolvimento de meios específicos enriquecidos com componentes definidos. Avanços tecnológicos resultaram em meios de cultura sintéticos padronizados capazes de suprir as necessidades de células de insetos, proporcionando elevado crescimento celular. Os meios livres de soro Sf900II e KBM 10 são alguns destes meios. Estes meios

proporcionam maior reprodutibilidade dos ensaios, reduzem riscos de contaminação, entretanto, aumentam significativamente o custo de manutenção e cultivo celular. A título de exemplo, 1L do meio Sf900II é comercializado por cerca de US\$ 98, enquanto o meio Grace pode custar em torno de US\$ 12 por litro. Entretanto, o soro fetal bovino requerido para a suplementação do meio Grace pode ter custo aproximado de até US\$ 87 por litro, o que encarece significativamente o cultivo, podendo elevar muito o custo final. Assim, a substituição do SFB por componentes menos onerosos é de relevância econômica no desenvolvimento de meios de cultivo para células de insetos.

3.4.1. Utilização de Concentrados Protéicos e Extratos Celulares como Suplementos de Meio de Cultura para Células de Insetos

Devido ao mercado crescente, muitos estudos têm sido desenvolvidos enfocando o melhoramento de meios de cultivo na obtenção de bioprodutos em escalas semi-industriais e industriais. Conforme mencionado anteriormente, a literatura referente ao cultivo de células de mamíferos e de insetos cita a glicose como fonte principal de carbono, entretanto, algumas fontes alternativas têm sido sugeridas visando o aproveitamento de resíduos industriais e a diminuição dos custos de produção.

Goddard et al. (1998) avaliaram o emprego de um extrato contendo um fator de crescimento celular purificado a partir de soro de leite, notando diferentes respostas para dois tipos de células. Em fibroblastos pulmonares humanos MRC-5, o extrato de soro de leite estimulou o crescimento celular de maneira sinérgica para baixas concentrações de soro fetal bovino. Entretanto, no cultivo de células epiteliais pulmonares de mink Mv1Lu, a adição do extrato de leite resultou na inibição do crescimento. Desta forma, a resposta pode diferir para distintos tipos de células. O emprego bem sucedido de derivados de leite no cultivo de células de inseto é representado pela utilização de lactalbumina hidrolisada como suplemento ao meio de cultivo TNM-FH. O leite é reconhecido como fonte de

proteínas de importantes propriedades funcionais. A caseína representa grande parte do total de proteínas presentes no leite bovino, e apresenta-se na forma de micelas (Cavallaro, 1999). As proteínas do soro de leite diferem da caseína por apresentarem teores mais elevados dos aminoácidos treonina, aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína), leucina, isoleucina, lisina e triptofano, e teores mais baixos dos aminoácidos de cadeias aromáticas (fenilalanina e tirosina). O soro de leite e seus concentrados protéicos vêm sendo estudados como fonte suplementar de meios de cultivo para bactérias e, mais recentemente, no desenvolvimento de meios para células de insetos. Com o advento de novas descobertas da importância das proteínas do leite em ciência e tecnologia de alimentos tem havido forte incremento das pesquisas procurando intensificar o uso destas proteínas (Borges et al., 2001).

3.4.1.2. As Proteínas do Soro de Leite

A proteínas do soro de leite bovino (fração líquida do leite, obtido a partir da fabricação de queijo) são aquelas que encontram-se retidas no soro após o processo de coagulação da caseína. O emprego direto do soro é bastante limitado devido ao alto teor de água (>90%) e baixo teor protéico (<0,9%). A Tabela 3.4 mostra as principais proteínas existentes no soro de leite bovino.

Tabela 3.4: Principais proteínas do soro de leite bovino (Mckenzey, 1970).

Proteínas	Concentração (g/L)
β -lactoglobulina	3-4
α -lactalbumina	1,5
Soralbumina	0,3-0,6
IgG, IgA, IgM	0,6-0,9
Lactoperoxidase	0,06
Lactoferrina	0,05

A α -lactoalbumina, a β -lactoglobulina, a albumina bovina e as imunoglobulinas são as principais proteínas presentes nos concentrados protéicos de soro de leite bovino obtido após a ultrafiltração do soro de leite através de membranas com diâmetros de corte da ordem de 10kDa.

A α -lactoalbumina representa cerca de 20% do total de proteínas presentes no soro bovino e é constituída de 123 resíduos de aminoácidos, apresentando-se na conformação esférica, altamente compacta e com massa molecular de 14kDa. A β -lactoglobulina é a proteína mais abundante do leite bovino, representando 50% do total de proteínas. É constituída de 162 resíduos de aminoácidos, apresentando 18,3kDa de massa molecular. A BSA (albumina do soro bovino) está presente no soro na concentração aproximada de 0,1 a 0,4g/L, possuindo massa molecular de 69kDa, sendo composta por 582 resíduos de aminoácidos. As imunoglobulinas são glicoproteínas com massa molecular variando de 15 a 1000kDa, consistindo de quatro classes, IgG, IgA, IgM e IgE. Estas proteínas estão presentes no soro de leite bovino em concentrações entre 0,6 e 1g/L (Veredas, 2000).

As proteínas presentes nas frações de menor massa molecular, inferior a 10kDa, estão presentes no permeado do processo de ultrafiltração do soro bovino. O permeado é formado, na maior parte, pela água, encontrada originalmente no soro, contendo ainda grande parte de lactose, minerais, vitaminas e outros constituintes do leite de pequena massa molecular (Borges et al., 2001).

Embora o emprego de suplementos provenientes do soro de leite bovino ao meio de cultivo indique sucesso na obtenção de elevadas densidades celulares, recomenda-se a adição simultânea de extrato de levedura como fonte complementar de nutrientes, conforme discutido por Bury et al. (1998) para células de bactérias.

Drews et al. (1995) relataram que para aumentar a infectibilidade das células e a produção de proteínas recombinantes, as células de insetos devem ser ressuspensas em meio fresco que podem conter componentes como glicose, extrato de levedura, lipídios, e glutamina. Alguns meios comerciais, como o

Sf900II, cuja composição não está publicada, são suplementados com misturas de lipídios e extrato de levedura. Estudos realizados ainda por este grupo de pesquisa utilizando extrato de levedura como suplemento ao meio de cultivo, observaram um aumento de $6,5 \times 10^6$ células/mL para 18×10^6 células/mL em células de inseto Sf9, para uma concentração de extrato de levedura que variou de 4 a 8 g/L respectivamente, dados que destacam, mais uma vez, a importância deste componente.

3.4.1.3. O Emprego de Extrato de Levedura como Suplemento ao Meio de Cultivo

O aproveitamento de resíduos industriais como o soro de leite e o extrato de levedura, resultante da autólise de leveduras, obtidas por exemplo, de cervejarias, reduz significativamente o custo com o tratamento destes compostos, agregando valor a estes subprodutos. Estes produtos podem ser avaliados como alternativa ao soro fetal bovino no cultivo de células de insetos para a produção de proteínas recombinantes e bioinseticidas.

O extrato de levedura possui em sua composição essencialmente proteínas, lipídios e vitaminas. Este suplemento é rico em aminoácidos como alanina, leucina, lisina dentre outros. Este aditivo é citado na literatura como rica fonte de ácidos graxos, sendo 40,6% saturados, 43,3% monoinsaturados e 14,5% poliinsaturados (Sgarbieri et al., 1999).

Drews et al. (1995) verificaram que a glicose, como fonte de carbono, e o extrato de levedura, como fonte de nitrogênio, em um meio suplementado com SFB atuaram como nutrientes limitantes da taxa de crescimento celular da linhagem Sf9 cultivada em batelada e em contínuo. Segundo os autores, os possíveis agentes promotores de crescimento celular encontrados no extrato de levedura foram aminoácidos, peptídios e ácidos nucleicos. Concentrações de extrato de levedura superiores a 16g/L deste suplemento inibiam o crescimento celular.

Durante a última década esforços foram dedicados à completa eliminação do soro fetal bovino do meio de cultura de células de mamíferos e de insetos. Em vista disso foram desenvolvidos meios livres de soro com composição definida, Sf900 e Express Five SFM, dentre outros. Sabe-se, contudo, que estes meios livres de soro possuem em sua composição, em geral, 4g/L de extrato de levedura (Ikonomou et al., 2003). A principal limitação do emprego deste meio livre de soro é o custo, cerca de 10 vezes maior do que o dos meios de composição mínima suplementados com 10% de SFB. Dentro deste contexto, torna-se imprescindível o estudo sistemático da otimização de meios de cultivo, para a completa ou a parcial eliminação do SFB, utilizando-se suplementos de menor custo como o soro de leite e o extrato de levedura.

3.5. Planejamento Experimental para a Otimização de Meios de Cultivo

Uma linha de pesquisa que tem se intensificado nos últimos anos é o emprego da estratégia de planejamento estatístico de experimentos para a otimização de meio de cultivo celular, estratégia esta introduzida por Box na década de 1950 (Barros Neto et al., 1995). Esta forma de análise estatística mostra-se como um caminho racional e eficiente para a determinação direta e rápida do efeito e da interação entre os parâmetros analisados (Montgomery and Runger, 1999). Este tipo de procedimento experimental resulta na minimização de custos e tempo de análises.

Segundo Ikonomou et al. (2001), a utilização de planejamentos fracionários para a análise qualitativa do emprego de hidrolisados protéicos como suplementos para o cultivo de células de inseto, mostrou-se fortemente adequado. Neste estudo foi avaliada a composição do meio de cultura mais adequada para as células de inseto *High Five*. Os autores avaliaram os efeitos da suplementação do meio de cultivo IPL-41 com o extrato de levedura (0,6%), o hidrolizado de carne Primatona RL (0,5%), a lactoalbumina hidrolizada (0,33%), a triptose fosfato (0,26%), a HyPep 1510 (peptona de soja, 0,4%), a HyPep 5603 (peptona de arroz,

0,4%) e a HyPep 4602 (peptona de carne, 0,4%) através de um planejamento fracionário 2^{7-4} . As interações entre os hidrolizados foram avaliadas a partir da variável resposta células viáveis/mL. A maior concentração celular foi obtida pela interação entre o extrato de levedura, a lactoalbumina hidrolizada e a Primatona RL.

Em vista deste resultado, os autores optaram pela realização de um planejamento fatorial completo 2^2 , avaliando os efeitos dos suplementos extrato de levedura (0,4 a 0,6%) e da Primatona RL (0,3 a 0,5%) sobre a densidade das células *High Five*, utilizando como controle as células *High Five* mantidas em um meio livre de soro, Insect-Xpress. A formulação final do meio de cultivo denominado então YPR (Yeastolate-Primatone) apresentou 55,5 mM de glicose, 15-17 mM de glutamina, 0,1% de Pluronic F68, definidos previamente, e as composições otimizadas dos suplementos avaliados 0,6% de extrato de levedura e 0,5% de Primatona RL.

O planejamento experimental consiste na variação de todas as variáveis ao mesmo tempo, para que o efeito de interação que possa haver entre elas não seja desprezado, como muitas vezes acontece na análise univariável. Em um planejamento fatorial completo é necessária a realização de experimentos para todas as combinações dos valores extremos das faixas de variação escolhidas para cada variável. Este planejamento é denominado planejamento fatorial completo 2^n , onde n é o número de variáveis e 2^n , o número de experimentos que serão realizados. Quando o número de variáveis é muito grande pode-se realizar primeiramente uma triagem inicial das variáveis através da execução de um planejamento fatorial fracionário. Neste tipo de planejamento, pode-se verificar, com um menor número de experimentos, quais variáveis são não-significativas estatisticamente e descartá-las na realização de um planejamento fatorial completo (Barros Neto et al., 1995).

O planejamento experimental permite também a proposição de modelos que correlacionam as variáveis independentes com as variáveis resposta e a construção de superfícies de resposta para a determinação das faixas ótimas de

operação. O método mais utilizado para se avaliar numericamente a qualidade do ajuste de um modelo é a análise da variância (ANOVA).

Os meios de cultura utilizados para o cultivo de células de insetos e de mamíferos são extremamente complexos. O uso desta ferramenta permite então que pelo menos alguns de seus componentes sejam otimizados proporcionando altos rendimento, produtividade, pureza e qualidade com menores custos.

3.6. Escalonamento de Cultura de Células de Insetos

O escalonamento do cultivo de células de insetos é muito dependente do fornecimento adequado de oxigênio. Devido à sua baixa solubilidade em água, o oxigênio necessita ser continuamente suprido ao meio líquido, a fim de sanar a necessidade celular, e de maneira suave, para evitar danos celulares por cisalhamento. As células Sf9 consomem aproximadamente 4×10^{-17} moles de O_2 /célula*s (Vardar-Sukan e Sukan, 1992), ocorrendo aumento significativo após a infecção viral, devido à intensificação metabólica para a produção de novas partículas virais. Dentro deste contexto, para casos onde a dispersão de oxigênio no meio de cultura seja efetuada através de agitação intensa do meio, passa a ser de relevância o emprego do composto Pluronic F68. Este agente é utilizado para diminuir efeitos de cisalhamento na membrana celular, viabilizando o cultivo de células de inseto tanto em contínuo quanto em batelada.

O Pluronic F68 tem massa molecular de 8358 Da e uma concentração micelar crítica de aproximadamente 9,2g/L. O bloco central de poli-oxipropileno da molécula é hidrofóbico e os blocos de poli-oxietileno são hidrofílicos (Chisti, 2000). A Figura 3.2 mostra a fórmula molecular deste composto:

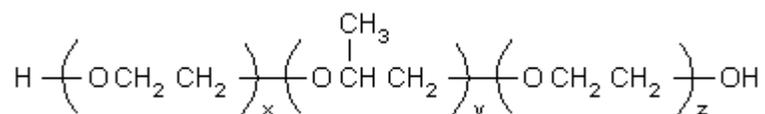


Figura 3.2: Fórmula molecular do Pluronic F68, no qual $x=z=78$ e $y=30$

Este composto deve ser esterelizado por filtração para evitar a formação de peróxidos decorrentes da esterilização em autoclave. Nas culturas sob aeração o Pluronic F68 atua minimizando a ligação das células às bolhas, diminuindo danos celulares que ocorrem quando aquelas são transportadas até a superfície. O surfatante tem efeito ainda sob culturas não aeradas, nas quais os danos celulares ocorrem em razão dos vórtices formados durante a agitação, impedindo a adesão celular à nova superfície. Em adição, o Pluronic F68 tem ação tensoativa e é capaz de se acumular na interface gás-líquido formando um filme na superfície celular, protegendo, com isso, as células do rompimento das bolhas na superfície do meio de cultivo durante a aeração do meio (van der Pol e Tramper, 1998). A adição deste agente ao meio de cultivo é indicada para concentrações até 0,2% m/v, dependendo de sua toxicidade à linhagem celular em estudo (van der Pol e Tramper, 1998). Para células Sf9, a adição de Pluronic F68 mostrou-se vantajosa, pois não só este agente interage com a membrana celular, como também modifica a capacidade de produção de proteínas recombinantes e de vírus por estas células, embora tais observações fundamentam-se no emprego de apenas 0,05 % do agente no meio (Palomares et al., 2000).

No cultivo de células em suspensão, como em frascos do tipo *schott* de 100mL de capacidade, não ocorre forte limitação de oxigênio. Freshney (1992), por exemplo menciona que , no cultivo estático de células de animais, deve-se manter uma relação entre o volume de ar e o volume de meio de cultura de cerca de 10:1 para prover oxigênio em quantidade ineficiente.

Contudo, em razão do alto requerimento de oxigênio no cultivo de células de insetos em reatores de maior capacidade, faz-se necessária a agitação e injeção de ar rigorosamente controlados. É relevante mencionar, no entanto, que taxas elevadas como 100% de saturação ou maiores (em condições hiperbáricas) e inferiores a 10%, podem causar inibição ao crescimento celular e na produção de proteínas recombinantes (Agathos, 1991).

Durante as décadas de 70 e 80 intensificaram-se as pesquisas no desenvolvimento de biorreatores para o cultivo de células animais, de uma

maneira geral. Em vista das necessidades requeridas no cultivo celular em relação à agitação e aeração, intensificaram-se estudos para diversas geometrias de reatores. Biorreatores de leito fixo, leito fluidizado e sistemas com fibras ocas são empregados para células aderentes. Para células em suspensão recomenda-se a utilização de reatores do tipo tanque agitado, do tipo *airlift* e de coluna de bolhas. Devido ao seu tamanho e versatilidade emprega-se mais freqüentemente no cultivo celular o reator de tanque agitado. Projetos de biorreatores do tipo tanque agitado incluem o uso de fermentadores de fundo redondo, impelidores adequados e a prevenção de regiões de vórtices, que, conforme anteriormente mencionado podem causar danos às células (van der Pol e Tramper, 1998).

Outras configurações de biorreatores são citadas por Ikonomou et al. (2003) como alternativas para a produção de proteínas recombinantes e biopesticidas. Configurações como o biorreator de vaso de parede rotativa (*Rotating wall vessels*) e o biorreator de ondas (*Wave Bioreactor*).

O biorreator de parede rotativa consiste de uma parede cilíndrica ao redor de um eixo horizontal que trabalha com baixas condições de cisalhamento. A oxigenação é realizada livre da formação de bolhas e o meio de cultivo de renovação é alimentado por membranas. O biorreator de ondas (*Wave Bioreactor*), consiste em um sistema com bolsas de polietileno pré-esterilizadas e descartáveis em forma de plataforma. As bolsas são preenchidas com meio de cultivo e células e o resto da câmara é preenchida por ar. O movimento da plataforma gera ondas que garantem a transferência de oxigênio, distribuição de nutrientes e suspensão de células. Esta configuração pode ser empregada na produção de biopesticidas pelo produtor de soja na própria área de produção rural, devida as facilidades oferecidas como o descarte das bolsas de polietileno após a realização da batelada.

3.7. Produção de Baculovírus

O termo baculovírus é oriundo do latim no qual *baculum* significa bastão, onde uma ou múltiplas partículas de DNA-proteína viral podem estar contidas. Os baculovírus podem ser divididos em duas famílias, a Baculoviridae Eubaculovirinae, e Nudibaculovirinae. Nas partículas virais de Eubaculovirinae a estrutura protéica em forma de bastão é composta por um capsídeo, definida como corpo de oclusão, conhecido também como poliedro. Toda a informação genética está contida na dupla hélice de DNA circular viral. Os baculovírus já foram isolados de mais de 500 espécies de insetos (Vardar-Sukan e Sukan, 1992).

O grupo de viroses de poliedrose nuclear (baculovírus) possui várias características que as tornam ideais para o uso em programas de controle de pragas. Estas viroses têm demonstrado alta especificidade, sendo sua patogenicidade restrita a classe Insecta (Moscardi e Corso, 1981).

A infecção de células de insetos por baculovírus tem sido utilizada recentemente na produção de partículas virais para a aplicação como bioinseticida e para a obtenção de proteínas recombinantes como a β -galactodidase (Mckenna et al., 1998) e a fosfatase alcalina (Taticcek et al., 2001).

Tradicionalmente no Brasil a produção dos poliedros de baculovírus para uso como biopesticidas ocorre de forma trabalhosa, através da coleta de partículas virais (poliedros) de *lagartas* infectadas na lavoura de soja. A partir das *lagartas* infectadas, infectam-se *lagartas* sadias, que morrem, liberando mais baculovírus.

A infecção da *lagarta* da soja ocorre com a ingestão do poliedro, que é dissolvido em seu intestino em pH entre 9,5 e 11,5. As partículas de vírus infectam as células do epitélio intestinal, que se sofrem lise celular infectando as adjacentes. Parte do vírus chega a hemolinfa, causando uma infecção sistêmica secundária, alastrando-se assim pelo inseto. A *lagarta* morre e é liquefeita, devido à ação de proteases produzidas durante a infecção. A *lagarta* é então, macerada,

liberando partículas virais. O macerado homogeneizado é, em seguida, seco e estocado para comercialização.

Em razão do trabalho despendido na manutenção de *lagartas*, e a exigência da padronização da produção em larga escala, seria recomendável a produção do vírus *in vitro* através de células de insetos, como as da linhagem Sf9 desenvolvidas a partir do ovário de pupa da borboleta.

A infecção das células de insetos por baculovírus é mais eficiente durante o crescimento exponencial. Este período de crescimento é caracterizado por elevada viabilidade celular, fator imprescindível para o sucesso do processo de infecção. A densidade celular tem influência direta sobre a produção de vírus. Desta forma, otimizando-se o meio de cultura das células, pode-se aumentar não somente a produção de poliedros de baculovírus, como também a produção de proteínas recombinantes que poderão ser produzidas por culturas infectadas com baculovírus recombinantes. Com o objetivo de se otimizar a produção de proteínas recombinantes pelo sistema baculovírus recombinantes através de células de lepidópteros e definir condições e processos ideais de cultura e infecção, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos (Pereira et al., 2001; Massotte et al., 1999; Cruz et al., 1998; O'Reilly et al., 1992).

3.7.1. Obtenção de Baculovírus Através da Infecção *in vitro* de Células de Inseto Sf9

Requisitos primordiais, entretanto, para o sucesso do crescimento celular e infecção celular são a nutrição celular, o oxigênio disponível, o tamanho do inóculo celular em proporção ao meio de cultura utilizado, a fase de infecção celular e o efeito da multiplicidade de infecção (Kioukia et al, 1995). Quando se discute a produção de baculovírus por inoculação celular, normalmente define-se a multiplicidade de infecção (MOI), ou o número de vírus por célula que influencia a fração de células que serão infectadas e o número de poliedros por célula no fim da infecção (Vardar-Sukan e Sukan, 1992).

Para infectar a célula, o vírus não ocluso (NOV) deve entrar na célula por endocitose ou fusão. O DNA viral é replicado no núcleo da célula em algumas horas. Posterior a este período, as partículas virais são liberadas da célula. Os NOVs são responsáveis pela infecção das demais células em cultivo, sendo que sua produção cessa após aproximadamente vinte horas, quando então se inicia a produção de poliedros contendo vírus ou corpos de oclusão. Alguns dias depois da infecção, a célula sofre lise e os corpos de oclusão são liberados (Vardar-Sukan e Sukan, 1992). O processo de produção do vírus *in vitro* pode mostrar-se oneroso, contudo, possibilita a maximização da densidade celular e, por conseguinte, elevadas concentrações de poliedros por mililitro de meio de cultura.

As alterações morfológicas que podem ser visualizadas ao microscópio óptico e ocorrem quando as células em cultura são infectadas por vírus são, até certo ponto, características para cada grupo de vírus e recebem o nome de efeito citopático. O efeito citopático *in vitro* a ser observado fundamenta-se na análise de formação de poliedros virais. O número de poliedros produzidos por célula em cultura (após lise das células com dodecil sulfato de sódio - SDS) é determinado através da contagem dos poliedros por microscopia ótica e expresso como poliedros/mL. A virulência (caracterizada *in vitro*) para as amostras de maior relevância pode ser observada em bioensaios em lagartas *Anticarsia gemmatalis*, efetuando-se ensaios em triplicata de diluições dos poliedros obtidos, em que se verificará a susceptibilidade das lagartas aos poliedros ingeridos com a dieta.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Linhagem Celular e Vírus

As células utilizadas, de *Spodoptera frugiperda* Sf9, e o vírus em estudo, baculovírus *Anticarsia gemmatalis* Nucleopolyhedrovirus (AgMNPV), foram cedidos pelo Dr. Ronaldo Zucатели Mendonça, do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan coordenado pelo Dr. Carlos Augusto Pereira.

A linhagem de células Sf9 CRL 1711 foi originalmente obtida da ATCC (*American Type Culture Collection*, EUA). Toda a produção de baculovírus deste estudo foi realizada a partir de amostras virais mantidas em refrigerador a 4°C. O baculovírus é coletado do ambiente a partir de *lagartas* infectadas. Com isso, buscou-se evitar a perda de virulência e da capacidade de infecção do vírus durante a realização dos ensaios, já que o vírus pode apresentar instabilidade genética entre suas passagens.

4.1.2. Componentes do Meio de Cultura e Outros Reagentes

O meio de cultivo basal empregado nos ensaios, meio Grace, foi preparado conforme orientação do fabricante (Gibco, Inc., EUA). Adicionou-se cerca de 0,6 g de hidróxido de sódio (LabSynth, Brasil) a cada litro de meio preparado para a correção do pH para a faixa entre 6,1 e 6,4. Destaca-se que o meio Grace continha em sua formulação 0,70g/L de D-glicose. O meio foi esterilizado por filtração e mantido refrigerado a 4°C.

Neste estudo foram empregados também o meio de cultura Sf900II (Gibco, Inc., EUA), fundamentalmente utilizado na preparação do inóculo e na realização de ensaios controle, a glicose também foi obtida da Gibco, Inc. (EUA). O soro fetal

bovino empregado no planejamento fatorial fracionário foi da Cutilab (Brasil), enquanto que nos demais experimentos o soro empregado foi da Gibco, Inc. (EUA). O Pluronic F68 foi adquirido da Sigma-Aldrich Corp. (EUA), o dimetilsulfóxido da Merck & Co., Inc. (EUA) e os corantes azul de Trypan, da Inlab (Brasil), o brometo de etídio e o laranja de acridina da Sigma-Aldrich Corp. (EUA).

Os suplementos extrato de levedura, concentrado protéico e permeado de soro de leite bovino liofilizados foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, e foram mantidos congelados em freezer a -20°C.

4.1.2.1. Características do Extrato de Levedura Empregado como Suplemento para o Meio de Cultivo

A produção do extrato de levedura, conforme descrita em detalhes por Sgarbieri et al. (1999), é um processo que envolve diversas etapas. A Figura 4.1 mostra o fluxograma de obtenção do extrato de levedura, a partir do autolisado obtido da biomassa desamargada (biomassa livre de resíduos de parede celular).

As células íntegras foram submetidas ao processo de autólise com o auxílio de um pré-autolisado na proporção de 15% em volume, 7% em volume de etanol e 2% em massa de NaCl. Esta etapa foi realizada em um reator agitado de 250L, durante 24 horas a 55°C. A centrifugação em cesto de lona foi empregada na obtenção do extrato bruto (parte solúvel) e da parede celular (parte insolúvel). Na etapa final de obtenção do produto liofilizado, adicionou-se amido solúvel (cerca de 5%) e, para a redução da higroscopicidade, maltodextrina (cerca de 25%).

O extrato de levedura utilizado apresentou a composição aproximada descrita na Tabela 4.1, observando-se que o material apresenta um teor de proteínas razoavelmente elevado, e baixa concentração de lipídios, sendo isento de fibras insolúveis.

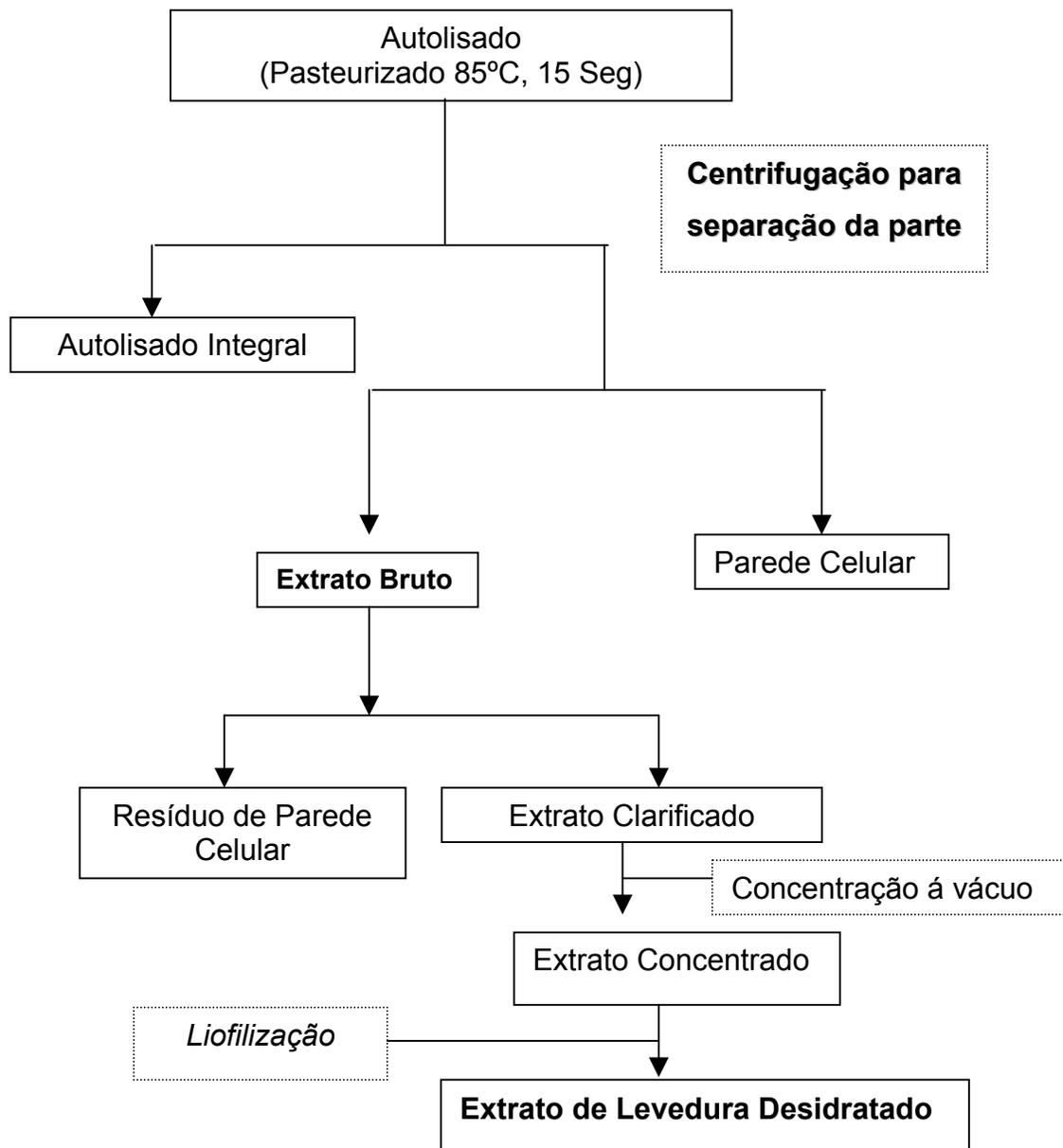


Figura 4.1: Fluxograma geral da obtenção do extrato de levedura desidratado

Tabela 4.1: Composição aproximada do extrato de levedura, com 25% de Maltodextrina.

Componentes	Percentagem em massa (%)
Proteínas	48,5
Lipídios	0,4
Carboidratos	25,6
Cinzas	11,7
Fibras	3,3

4.1.2.2. Características do Concentrado Protéico e do Permeado do Soro de Leite Bovino Liofilizados e Empregados como Suplementos para o Meio de Cultivo

O concentrado protéico do soro de leite (CPSL) e o permeado liofilizado são obtidos do leite desnatado e pasteurizado. O soro do leite e seus respectivos concentrados foram produzidos em uma planta piloto do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas, SP), planta piloto do TECNOLAT, empregando leite fornecido pela Cooperativa dos Produtores de Leite da Região de Campinas (Jaguariúna, SP). A Figura 4.2 mostra o fluxograma do processo de obtenção do concentrado protéico de soro doce e do permeado liofilizado.

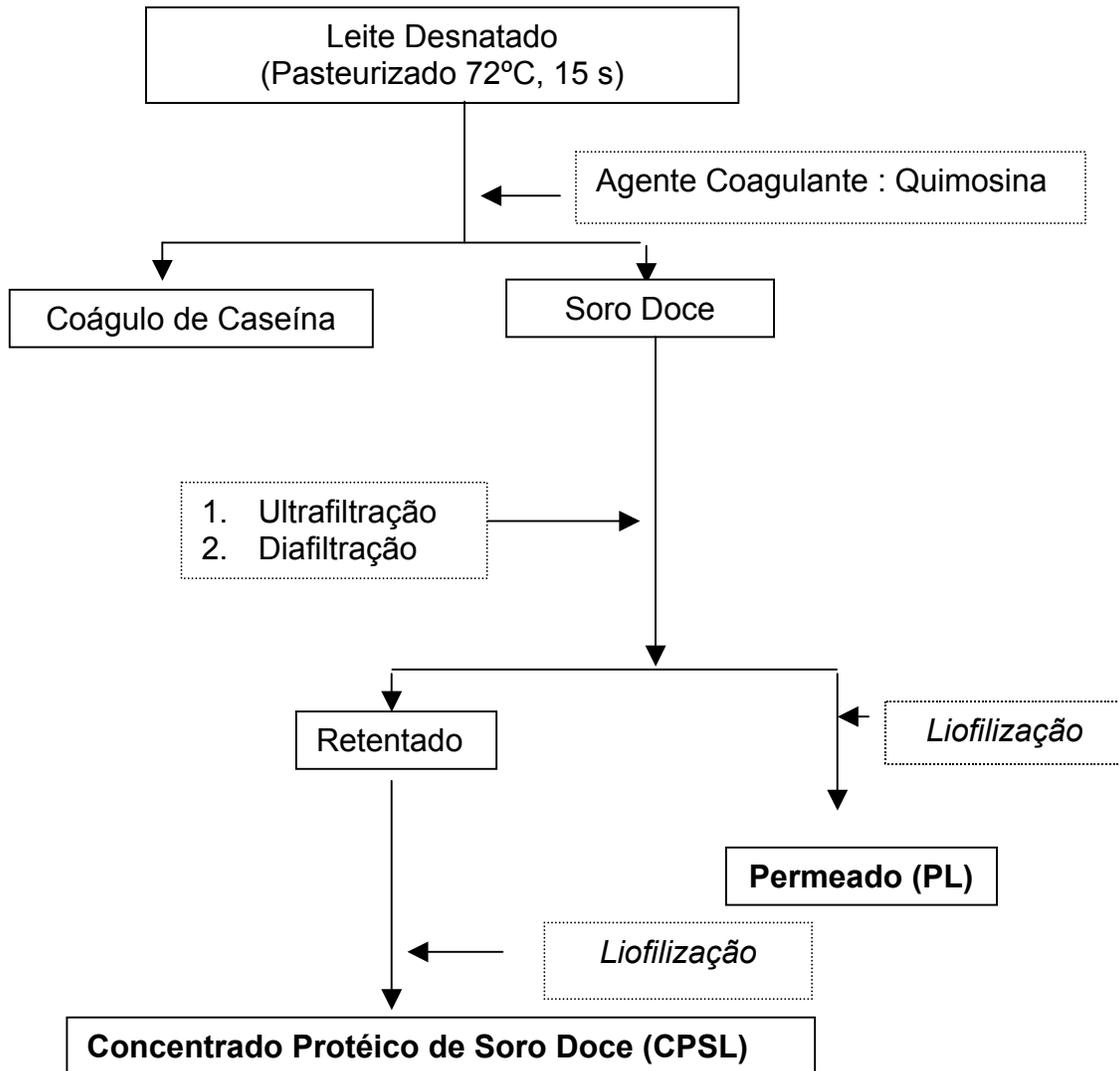


Figura 4.2: Fluxograma geral da produção do concentrado protéico de soro doce de leite (CPSL) e do permeado liofilizado.

Após a desnatação e pasteurização a 72°C e 15 segundos, o leite foi estocado em tanques encamisados de aço inoxidável e aquecido a 35°C para uma coagulação prévia. A coagulação foi realizada através da adição de uma enzima, atribuindo ao queijo obtido do processamento a denominação de queijo doce. O processo de coagulação pode ser realizado também através da adição de ácido láctico até se atingir pH 4,6 (pl das caseínas) onde ocorre a precipitação das mesmas. Na produção do queijo tipo doce adicionou-se o coalho, enzima

quimosina, em concentração de 30mL por 100mL de leite, juntamente com uma solução de CaCl₂ a 50% em uma concentração de 25mL por 100mL de leite. O material foi homogeneizado e mantido em repouso por um período de até 60 minutos para a coagulação.

O soro do leite obtido foi estocado em um tanque de aço inoxidável de 200L, no qual foi mantido aquecido a 37°C. Nesta temperatura o soro foi ultrafiltrado em membranas com tamanho de poro de 10kDa. O fator de concentração do processo de ultrafiltração variou de 8 a 10, sendo seguido de 12 ciclos de diafiltração. Após o processo, o soro do leite foi congelado a -20°C e posteriormente, desidratado por liofilização, o que possibilita a estocagem por um longo período, sob refrigeração de 0 a 8°C.

A composição aproximada deste suplemento (CPSL) do meio de cultivo é mostrada na Tabela 4.2. Além da presença de lipídios e lactose, destaca-se também o elevado teor protéico do material (83,34%), que contém fundamentalmente proteínas de massa molecular superior a 10kDa, em decorrência do diâmetro de corte da membrana empregada no processo de ultrafiltração citado anteriormente.

Tabela 4.2: Composição aproximada do concentrado protéico de soro de leite bovino.

Componentes	Percentagem em massa (%)
Sólidos totais	96,4
Proteínas	83,3
Cinzas	2,8
Lactose	8,9
Lipídios	4,5

Além do CPSL, a Figura 4.2 mostra o processo de obtenção do permeado liofilizado, no qual se encontram as proteínas de massa molecular inferior a 10KDa, também empregado neste estudo como suplemento ao meio de cultivo

para as células de inseto Sf9. O permeado liofilizado apresenta em sua composição basicamente lactose, vitaminas, sais minerais e água (Borges et al., 2001). A composição do permeado de soro de leite mostra-se bastante deficiente, contudo, em proteínas e aminoácidos, que são nutrientes essenciais para o crescimento de células (Saron, 2003).

A composição centesimal aproximada em base seca do permeado liofilizado do soro de leite é mostrada na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Composição aproximada do permeado liofilizado

Componentes	Permeado Liofilizado (%)
Lactose	85,0
Cinzas	9,6
Nitrogênio Total	0,7

Nota-se que, quantitativamente, o componente mais importante do permeado é a lactose. Este componente pode atingir a concentração de 40g/L, já que toda a lactose do soro de leite concentra-se nesta fração de menor massa molecular proveniente da ultrafiltração. Com relação aos aminoácidos totais, o permeado do soro apresenta maior concentração de ácido glutâmico, isoleucina, lisina e NH₃. Os aminoácidos ácido aspártico, treonina, prolina, glicina, alanina, cistina e leucina apresentam-se em menor quantidade. Já a serina, a valina, a metionina, a tirosina, a fenilalanina, a histidina e a arginina não foram detectadas, conforme informado pelo fornecedor.

Geralmente, a concentração de sais minerais no CPSL diminui com o aumento do conteúdo de proteínas, conseqüentemente aumentando o teor de cinzas no permeado. A Tabela 4.4 mostra a composição aproximada de sais no permeado liofilizado.

Tabela 4.4: Composição aproximada de minerais no permeado liofilizado
(adaptada de Saron, 2003)

Minerais	Concentração (mg/100g de permeado liofilizado)
Potássio	150
Cálcio	30
Fósforo	40
Sódio	65
Magnésio	7
Cloreto	120

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo e Propagação da Linhagem Celular

Os experimentos realizados neste estudo empregaram inóculos celulares que foram mantidos nos meios de cultivo Sf900II e Grace. Este procedimento foi adotado em virtude da verificação de diferenças observadas no crescimento e viabilidade celular durante os ensaios.

4.2.1.1. Preparo do Inóculo Celular em Meio Sf900II

A propagação da linhagem em estudo para a obtenção do lote-semente celular padronizado foi realizada em frascos do tipo *schott* de 100mL de capacidade, com 15mL de meio Sf900II, mantidos em incubadora agitada a 28°C e 100rpm. Após a obtenção de cerca de 6×10^6 células viáveis/mL, a suspensão celular foi transferida para tubos estéreis de 50mL de capacidade, adicionando-se 10% em volume de DMSO. As amostras foram subdivididas e transferidas para criotubos de 2mL de capacidade (Nunc), com 1,5 mL de volume de trabalho,

armazenadas inicialmente em freezer a -80°C por 72h e subsequentemente, em nitrogênio líquido.

Os lotes de ensaios foram iniciados a partir de uma amostra padronizada de cultura congelada. Após o descongelamento, a suspensão celular (1,5mL) foi transferida para garrafas de 40mL de capacidade (Nunc), acrescentando-se 3,5mL de meio Sf900II fresco. Após 24 horas em estufa a 28°C , o meio de cultura foi removido com o auxílio de uma pipeta, para a completa eliminação do agente crioprotetor, e adicionou-se 4mL de meio fresco. Após 72 horas adicionais de cultivo estático, as células foram removidas mecanicamente, através de agitação manual vigorosa, e transferidas para frascos do tipo *schott*. A esta suspensão celular adicionou-se meio Grace contendo 10% em volume de SFB, no qual as células foram mantidas durante duas passagens para adaptação, já que a cultura foi preservada em meio Sf900II. No segundo repique sucessivo após o crescimento, as culturas foram transferidas para tubos de centrifuga estéreis de 15mL de capacidade e centrifugadas a 1000 rpm durante 2 minutos. O sedimento obtido foi ressuspendido em um volume definido de meio Grace para a obtenção de uma suspensão celular de alta concentração preparada em condições padronizadas.

4.2.1.2. Preparo de Inóculo Celular em Meio Grace

O inóculo celular em meio Grace foi preparado similarmente ao anterior, em meio Sf900II. Após a obtenção de cerca de 2×10^6 células viáveis/mL, a suspensão celular foi transferida para tubos estéreis de 50mL de capacidade, adicionando-se 10% em volume de SFB e 10% de glicerina. As amostras foram subdivididas e transferidas para criotubos de 1,8mL de capacidade (Nunc), com 1,5 mL de volume de trabalho, armazenadas inicialmente em freezer a -80°C e subsequentemente, em nitrogênio líquido.

Como anteriormente, após o descongelamento, a suspensão celular (1,5mL) foi transferida para garrafas de 40mL de capacidade (Nunc),

acrescentando-se 3,5mL de meio Grace fresco suplementado com 10% SFB. Após 24 horas em estufa a 28°C, o meio de cultura foi removido e adicionou-se 4mL de meio fresco. Após 72 horas adicionais de cultivo estático, as células foram removidas mecanicamente e transferidas para frascos do tipo *schott*, aos quais se adicionou meio Grace contendo 10% em volume de SFB. Após obter-se a concentração celular desejada para a inoculação nos ensaios, as culturas foram transferidas para tubos de centrífuga estéreis de 15mL de capacidade e centrifugadas a 1000 rpm durante 2 minutos, obtendo-se um sedimento que foi ressuspenso em um volume definido de meio Grace para a obtenção de uma suspensão celular de alta concentração preparada em condições padronizadas.

4.2.2. Caracterização Preliminar do Crescimento das Células Sf9

Ensaio preliminares foram realizados para a caracterização da cultura de células Sf9 quanto à concentração celular requerida para a inoculação, à duração da fase *lag* de crescimento, a taxa específica máxima de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$), o tempo de duplicação, o início e a duração do período estacionário. Diferentes concentrações de inóculos celulares ($2,5, 5$ e 8×10^5 células viáveis/mL) foram avaliadas em frascos *schott* de 100 mL de capacidade, com 15 mL de volume de trabalho, mantidos em incubadora agitada a 28°C e 100 rpm. Nestes ensaios empregou-se o meio Grace acrescido de 10% em volume de SFB. Amostras foram coletadas a partir de 24 horas após a inoculação para a determinação da concentração e da viabilidade celular.

4.2.2.1. Determinação dos Parâmetros Cinéticos Taxa Máxima de Crescimento Específico, do Tempo de Duplicação e dos Coeficientes de Consumo Específicos de Glicose e Glutamina

A taxa máxima de crescimento específico ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi determinada pelo coeficiente angular da reta ajustada para a variação do logaritmo neperiano da concentração celular com o tempo.

O tempo de duplicação celular (t_d) foi determinado pela razão entre o logaritmo neperiano de 2 e $\mu_{m\acute{a}x}$.

Os coeficientes de consumo específicos de glicose e glutamina foram determinados durante a fase de crescimento exponencial através da Equação 4.1:

$$q_i = \frac{dS_i / dt}{dX_v / dt} * \mu_{m\acute{a}x} \quad \text{Equação 4.1}$$

na qual S_i é a concentração do substrato i (glicose ou glutamina), X_v é a concentração de células viáveis, $\mu_{m\acute{a}x}$ é a taxa máxima de crescimento específico e t o tempo.

4.2.3. Estudo do Efeito dos Suplementos no Crescimento Celular

Os efeitos dos seguintes suplementos ao meio Grace concentração de extrato de levedura e a concentração do concentrado protéico de soro de leite bovino foram avaliados com o intuito de se minimizar o percentual de soro fetal bovino. Estudou-se também o efeito da concentração de glicose, concentração de Pluronic F68 no crescimento e na viabilidade celular. Em decorrência do número elevado de ensaios requeridos, realizou-se preliminarmente um planejamento fracionário 2^{5-1} . A seleção dos níveis das variáveis independentes na estratégia de planejamento fatorial fracionário preliminar foi baseada em análise de literatura pertinente. Variou-se a concentração de extrato de levedura de 0 a 8 g/L (Drews et

al. 1995 e Wu et al., 1998), a concentração de glicose de 1,8 a 2,7 g/L (Mendonça et al., 1999 e Wang et al., 1993), a concentração de Pluronic F68 de 0 a 0,2%(m/v) (van der Pol e Tramper, 1998), a concentração de concentrado protéico de soro de leite bovino de 0 a 5% (m/v) (Sereni et al., 1981) e a concentração de soro fetal bovino de 1 a 3% em volume.

Os ensaios foram realizados em frascos de vidro do tipo *schott* de 100 mL de capacidade com tampas rosqueadas, com 15 mL de volume de trabalho, mantidos em incubadora agitada a 28°C e 100 rpm. Utilizou-se em cada ensaio um inóculo celular de concentração $2,5 \times 10^5$ células viáveis/mL obtido conforme o procedimento descrito no item 4.2.1. As variáveis resposta concentração e viabilidade celular foram avaliadas a partir de 24 horas após a inoculação por um período de até 11 dias. Determinou-se, através deste planejamento, os suplementos com efeitos mais relevantes, com base na análise dos valores dos contrastes, descartando-se os demais em ensaios posteriores. Os dados obtidos foram tratados no programa *Statistica 5.0*.

Nas etapas subseqüentes foram realizados dois planejamentos fatoriais 2^3 com seis pontos axiais e três pontos centrais, empregando-se um inóculo celular composto por células adaptadas ao meio de composição mínima, meio Grace, e ao meio de composição definida e livre de soro, Sf900II, respectivamente. Os planejamentos fatoriais 2^3 com seis pontos axiais e três pontos centrais buscaram avaliar o efeito dos suplementos extrato de levedura, concentrado protéico do soro de leite bovino e do soro fetal bovino em uma faixa de concentração superior àquela empregada no planejamento fracionário inicial. As faixas de concentrações empregadas foram baseadas na expansão do planejamento fatorial completo em estrela e são mostradas na Tabela 4.5.

Foram realizados também dois planejamentos fatoriais 2^2 com o intuito de avaliar a atuação do permeado do soro de leite liofilizado em substituição ao soro fetal bovino. Estes planejamentos foram realizados em condições similares aos anteriores. A faixa de concentração dos suplementos empregados foi baseada na literatura similarmente aos ensaios realizados com o concentrado protéico de soro

de leite bovino. Em vista disso foi empregada inicialmente a concentração de 5% de permeado liofilizado (Sereni et al., 1981). No segundo planejamento fatorial, 2^2 com três pontos centrais, foram utilizadas concentrações que variaram de 1 a 2,5%.

4.2.4. Avaliação do Efeito da Ampliação da Faixa de Concentração de Extrato de Levedura, do CPSL e do SFB sobre o Crescimento e Viabilidade Celular

Com o intuito de obter uma composição de meio de cultura na qual a concentração de células viáveis na fase estacionária e na fase média exponencial assim como a viabilidade celular fossem maximizadas, realizou-se o planejamento fatorial 2^3 , com três pontos centrais e seis axiais, no qual diferentes concentrações de extrato de levedura (2,6, 4, 6, 8 e 9,4 g/L), de CPSL (2,3, 3, 4, 5 e 5,7 %m/v) e SFB (0,3, 1, 2, 3 e 3,4 %v/v) foram empregadas. As concentrações de glicose e Pluronic F68 foram mantidas constantes em 2,7g/L e 0,1% m/v, respectivamente.

Estudo similar foi realizado na avaliação das variáveis concentração de permeado liofilizado do soro de leite bovino e da concentração do soro fetal bovino, como descrito no item a seguir.

4.2.5. Avaliação do Efeito da Concentração de Permeado Liofilizado e da Concentração de SFB sobre o Crescimento e Viabilidade Celular

Além dos aditivos ao meio de cultivo citados anteriormente, avaliou-se também neste estudo, as concentração de permeado liofilizado, na tentativa de substituição parcial do SFB, que proporcionasse a máxima concentração de células viáveis na fase estacionária e na fase média exponencial, e sobre a viabilidade celular. Para tanto foram realizados dois planejamentos fatoriais 2^2 . No primeiro planejamento foram empregadas diferentes concentrações de permeado liofilizado (0, 2,5 e 5 %m/v) e de SFB (1, 2 e 3 %v/v), sendo que o inóculo de

células Sf9 era oriundo do meio Grace acrescido de 10% de SFB. No segundo planejamento foram empregadas as concentrações de permeado liofilizado (1, 1,75 e 2,5 %m/v) e SFB (1, 2 e 3 %v/v), no entanto, o inóculo celular era oriundo de meio de cultivo de composição otimizada Sf900II. Os experimentos realizados durante este estudo estão resumidos na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Resumo dos experimentos realizados.

Experimento	Variáveis estudadas e suas concentrações
Caracterização preliminar da cultura	SFB: 10%; Inóculo: 2,5 a 8x 10 ⁵ cél/mL.
Planejamento fracionário 2 ⁵⁻¹	Extrato de levedura: 0 a 8 g/L; SFB: 1 a 3%; CPSL: 0 a 5%; Pluronic F68: 0 a 0,2%; Glicose: 1,8 a 2,7g/L.
Ampliação da faixa de Extrato de levedura, CPSL e SFB	Extrato de levedura: 2,6, 4, 6, 8 e 9,4g/L; CPSL: 2,3, 3, 4, 5 e 5,7%; SFB: 0,3, 1, 2, 3 e 3,4%; Glicose: 2,7 g/L; Pluronic F68: 0,1%; Inóculo: meio Grace.
Ampliação da faixa de Extrato de levedura, CPSL e SFB	Extrato de levedura: 2,6, 4, 6, 8 e 9,4g/L; CPSL: 2,3, 3, 4, 5 e 5,7%; SFB: 0,3, 1, 2, 3 e 3,4%; Glicose: 2,7 g/L; Pluronic F68: 0,1%; Inóculo: meio Sf900II.
Planejamento completo 2 ²	Permeado liofilizado: 0 a 5%; SFB: 1 a 3%; Glicose: 2,7g/L; Pluronic F68: 0,1%; Extrato de levedura: 8g/L; Inóculo: meio Grace.
Planejamento completo 2 ²	Permeado liofilizado: 1 a 2,5%; SFB: 1 a 3%; Glicose: 2,7g/L; Pluronic F68: 0,1%; Extrato de levedura: 8g/L; Inóculo: meio Sf900II.

Todos os ensaios dos planejamentos experimentais deste estudo foram realizados em frascos do tipo *schott* de 100 mL de capacidade contendo 15 mL de meio de cultura, e estes foram mantidos a 28°C em incubadora agitada.

4.2.6. Adaptação das Células Sf9 e Subcultivos Subseqüentes nos Meios de Cultivo com Formulações Otimizadas

Nos planejamentos fatoriais realizados neste estudo descritos até o momento, os resultados obtidos quanto à concentração e viabilidade celular estiveram baseados na primeira passagem das células Sf9, proveniente de culturas congeladas isoladamente nos meio Grace (acrescido de 10% de SFB em volume) e Sf900II, para as diversas formulações testadas.

Em vista disto, julgou-se necessária a adaptação e subcultivo destas células nos meios de cultivo previamente otimizados para a subseqüente infecção por baculovírus. Foram adaptadas culturas congeladas isoladamente nos meio Grace (acrescido de 10% de SFB em volume) e Sf900II. A adaptação celular foi realizada em cultivo estático em garrafas do tipo Nunc de 40mL de capacidade. As culturas foram mantidas em estufa a 28°C durante 6 passagens.

A adaptação celular foi dividida em três etapas, sendo que o mesmo processo de adaptação foi realizado para as células Sf9 originalmente congeladas em meio Grace com 10% de SFB).

1. As células Sf9 foram inoculadas em concentração de $0,2 \times 10^5$ células/cm² em 3,6mL do meio Sf900II. Após 24 horas, adicionou-se 0,36mL do meio cuja formulação se desejava avaliar (denominado como meio em teste) e incubou-se as amostras até que 60% de confluência fosse atingida.
2. O subcultivo foi realizado em 3mL de meio (2,7mL de Sf900II e 0,3mL do meio em teste cuja formulação se desejava avaliar). Após 24 horas adicionou-se 0,75mL do meio em teste. Incubou-se as amostras até que 60% de confluência fosse alcançada.

3. O subcultivo foi realizado em 3mL de meio (2,25mL de Sf900II e 0,75mL do meio em teste). Adicionou-se após 24 horas 0,75mL do meio em teste.

Após o período de prévio de adaptação celular foram realizados seis subcultivos (passagens) em cada meio em teste.

Os meios cujas formulações otimizadas se desejava avaliar foram: o meio 4 (8g/L de extrato de levedura, 2,7g/L de glicose, 1% de SFB, 5% do CPSL) e o meio 16 (8g/L de extrato de levedura, 2,7g/L de glicose, 3% de SFB, 5% do CPSL e 0,2% de PF68) referentes ao planejamento fracionário preliminar, o meio 1 (8g/L de extrato de levedura, 2,7g/L de glicose, 1% de SFB, 1% do permeado liofilizado e 0,1% de PF68) e o meio 3 (8g/L de extrato de levedura, 2,7g/L de glicose, 3% de SFB, 1% do CPSL e 0,1% de PF68), referentes ao planejamento fatorial completo 2^2 , além do meio 9 (2,6g/L de extrato de levedura, 2,7g/L de glicose, 2% de SFB, 4% do CPSL e 0,1% de PF68) e do meio 11 (6g/L de extrato de levedura, 2,7g/L de glicose, 2% de SFB, 2,3% do CPSL e 0,1% de PF68) referentes ao planejamento fatorial completo 2^3 , com inóculo da cultura congelada em meio Sf900II.

Todos os subcultivos foram realizados em frascos do tipo *schott* de 100 mL de capacidade contendo 15 mL de volume de trabalho, e estes foram mantidos a 28°C em incubadora agitada. A Figura 4.3 mostra o esquema dos ensaios realizados neste estudo.

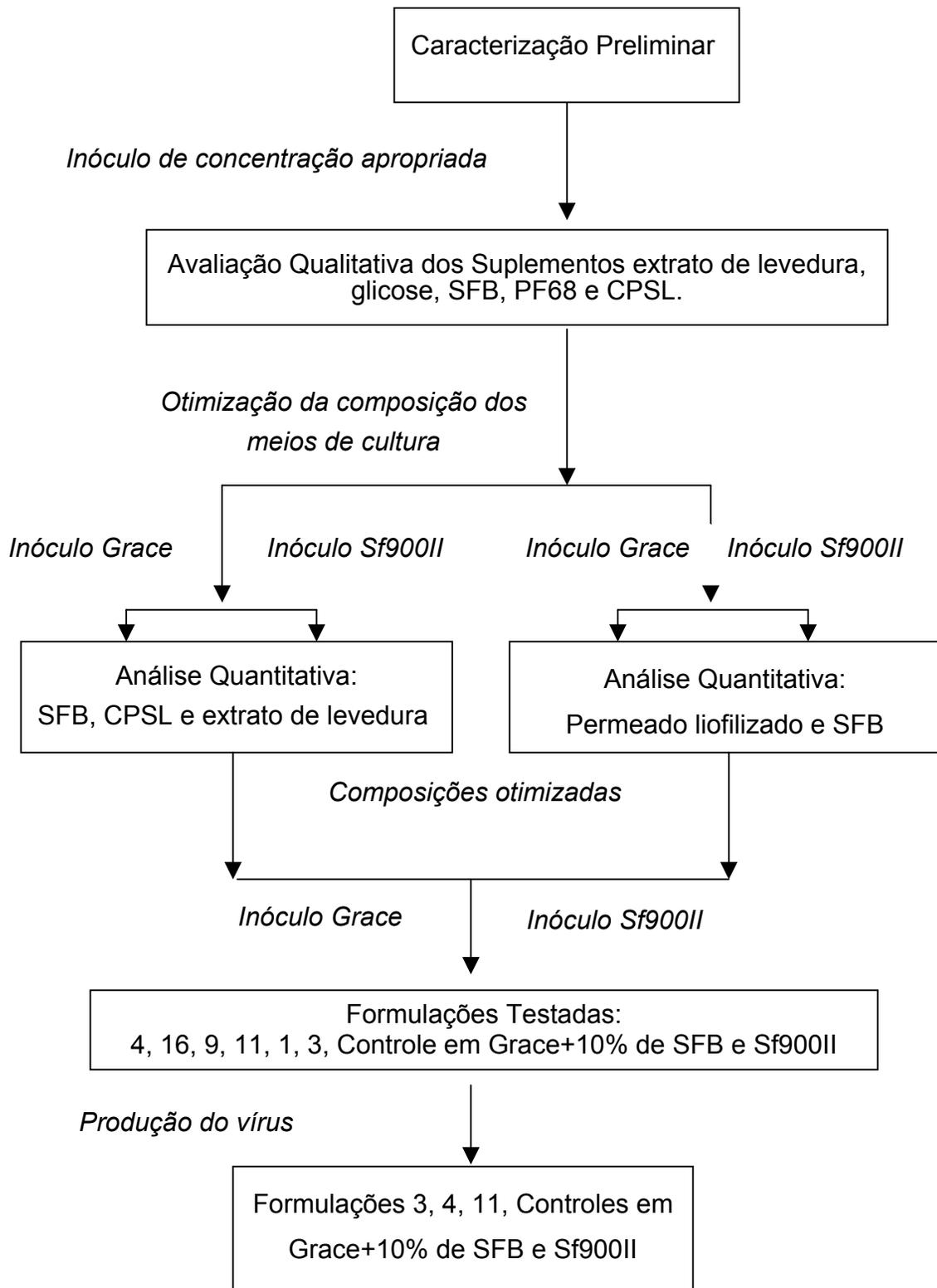


Figura 4.3: Esquema dos ensaios realizados durante todo o estudo.

Foram avaliadas as cinética de crescimento, o consumo de nutrientes e a formação de metabólitos das culturas adaptadas e submetidas aos subcultivos subseqüentes. Amostras foram coletadas a partir de 24 horas após a inoculação durante os dias de cultivo. As amostras coletadas para a determinação de nutrientes e metabólitos foram centrifugadas por 30s a 1000rpm e mantidas a -20°C, quando não foi possível a determinação imediata da concentração do composto desejado.

Os meios em teste que resultaram em concentração celular superior a 3×10^6 células viáveis/mL tiveram suas culturas infectadas com baculovírus, durante a fase de crescimento exponencial, empregando um fator de multiplicidade de infecção igual a 1, conforme descrito a seguir.

4.2.7. Procedimento de Quantificação e Obtenção do Lote-Semente Viral

O lote semente viral foi obtido através da infecção de uma cultura de células Sf9, em cultivo estático, na fase de crescimento exponencial. Para tal, estabeleceu-se uma cultura de células Sf9 mantida em meio Sf900II, em garrafas do tipo Nunc de 40mL de capacidade e 5mL de volume de trabalho. A cultura celular foi então infectada com 100µL de amostra viral, cedida pelo Pesquisador Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça, da qual não se conhecia o título viral e a multiplicidade de infecção. O baculovírus foi titulado empregando-se o método da diluição final segundo o procedimento descrito a seguir:

Primeiramente, diluições seriadas do vírus foram preparadas (10^{-1} a 10^{-12}). As células Sf9 foram semeadas em placa com 96 cavidades colocando-se 0,1mL por cavidade com a concentração de células necessária (ver apêndice viral). A seguir, 0,1mL das amostras referentes a cada diluição viral foram adicionados em cada cavidade. Para cada diluição viral infectou-se um total de 6 cavidades. Após infectar as células com as 12 diluições virais, a placa foi incubada a 28°C (mantida em ambiente úmido, para que o meio de cultivo não secasse) durante sete dias. O

número de cavidades contendo células infectadas foi determinado observando-se as células através de microscópio ótico.

A titulação do vírus disperso, *budded viral*, no sobrenadante da cultura é definida pelo inverso da diluição da amostra que causa alteração (efeito citopático) em pelo menos 50% das células da cavidade da microplaca empregada (TCID₅₀ por mililitro). Segundo esta metodologia, o título viral é expresso em TCID₅₀/mL. Detalhes deste procedimento, acompanhado do cálculo de *Reed e Muench* (1938) para quantificação do título viral, encontram-se no Apêndice C.

4.2.8. Metodologia de Infecção Celular

Foram estabelecidas culturas de células Sf9, adaptadas nos meios em teste previamente otimizados, em frascos do tipo *schott* com 15mL de volume de trabalho. Foi realizada também, como dado comparativo, a infecção das células Sf9 mantidas meio de cultivo Sf900II e em meio Grace. As células foram infectadas pelo baculovírus quando a concentração celular atingiu 1x10⁶ células viáveis/mL. Esta fase de infecção corresponde à fase média do crescimento exponencial para os meios selecionados. O volume do inóculo viral, com título viral definido e empregado no processo de infecção, foi calculado através da Equação 4.2:

$$\text{volume de inóculo viral (mL)} = \frac{\text{moi} \times \text{número de células totais}}{\text{título viral}} \quad \text{Equação 4.2}$$

Amostras da cultura celular infectada foram coletadas a partir de 24 horas após a infecção durante 6 dias para a determinação do consumo de nutrientes e a formação de metabólitos, assim como para determinação do número de poliedros formados por mililitro de meio. As amostras coletadas para a contagem foram centrifugadas por 1 minuto a 1000rpm e mantidas a -20°C quando a determinação imediata dos componentes não foi possível.

Com o intuito de quantificar os poliedros formados após a infecção por baculovírus foi necessária a lise das células Sf9. Para tanto, as amostras foram congeladas a -20°C por 24 horas e descongeladas à temperatura ambiente. Em seguida foi adicionada uma solução aquosa de SDS a 1% na proporção 1:1 (v/v) da amostra coletada.

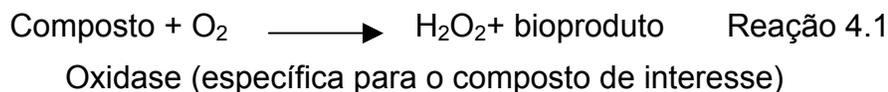
4.2.9. Metodologia Analítica

4.2.9.1. Acompanhamento do Crescimento e Viabilidade Celular

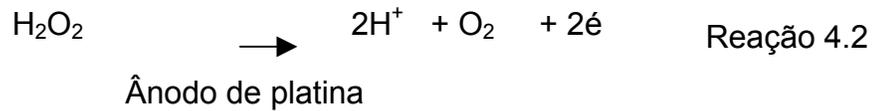
A concentração, a viabilidade e a morfologia celular foram monitoradas através de microscopia ótica (Olympus CK2), empregando-se um hemocitômetro, segundo o método de exclusão de Trypan. Este método identifica as células vivas e mortas. Para a determinação das células viáveis, ou seja, aquelas passíveis de duplicação, empregou-se o método de identificação de morte celular através dos corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídio utilizando-se a microscopia de fluorescência (Olympus BX51) em aumento de 200 vezes. O procedimento detalhado destas metodologias é descrito no Apêndice B.

4.2.9.2. Determinação da Concentração de Glicose e Glutamina Consumidas e de Lactato e Amônia Produzidos

O consumo dos nutrientes glicose e glutamina e a formação do metabólito lactato foram determinados através do analisador bioquímico YSI 2700, que emprega enzimas imobilizadas em membranas de policarbonato para a detecção dos compostos especificados. O composto presente na amostra difunde-se através da membrana, na qual ocorre a Reação 4.1:



O peróxido de hidrogênio gerado é oxidado em um eletrodo de platina, segundo a Reação 4.2



Os elétrons gerados são, então, quantificados e a resposta é convertida para a concentração do composto de interesse.

Alíquotas de 180 μL de amostra dos ensaios foram coletadas, a partir de 24 horas após a inoculação, durante os dias de cultivo. As amostras foram centrifugadas durante 30s a 1000 rpm, para a remoção das células, e determinadas diretamente no analisador bioquímico, que aspira 25 μL de amostra por análise. As faixas de detecção são de 0 a 9g/L para a glicose, 0 a 1,2 g/L para a glutamina e 0 a 2,7 g/L para o lactato.

Para determinar a concentração de amônia utilizou-se um eletrodo específico (Analyser, modelo ORION 95-12) e um potenciômetro (Procyon, modelo SA720). Este eletrodo detecta variações logarítmicas de mili-voltagem que ocorrem com a conversão de amônia em amônio, em solução. Antes da dosagem, preparou-se uma curva de calibração, utilizando as soluções padrões de sulfato de amônio em diferentes concentrações (0,1,0,5,1, 5, 10, 25, 50 e 100 ppm).

4.2.9.3. Determinação da Osmolalidade

A osmolalidade (mOsm/kg H_2O) foi medida através do aparelho Osmette A, (*Automatic Osmometer*) *Precision System, Inc.* A leitura foi feita alíquotando-se 2mL da amostra num frasco do aparelho e aguardando-se por aproximadamente 3 minutos até o congelamento da amostra, quando se obtém a leitura. O aparelho foi calibrado antes de cada lote de amostra com os padrões de 100 e 500 mOsm/kg H_2O .

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização Preliminar da Cultura

Ensaio preliminares de crescimento celular em frascos do tipo *schott* mantidos em incubadora, a 28°C, com agitação a 100 rpm, foram realizados para a linhagem celular Sf9. O cultivo em incubadora agitada mostrou-se o mais adequado para o estudo em questão, já que esta linhagem celular possui crescimento em suspensão. A Figura 5.1 mostra o aspecto morfológico das células Sf9.



Figura 5.1: Células Sf9 cultivadas em suspensão em meio livre de soro (Sf900II).

5.1.1. Análise do Efeito da Concentração do Inóculo no Crescimento Celular

Ensaio preliminares de crescimento celular para a caracterização da cultura de células de inseto Sf9, com diferentes concentrações de inóculo celular, foram realizados com a finalidade de definir a concentração inicial de células nos experimentos posteriores. Os resultados obtidos poderiam ser, então, comparados aos publicados por outros autores. A Figura 5.2 mostra os resultados observados.

Resultados e Discussão

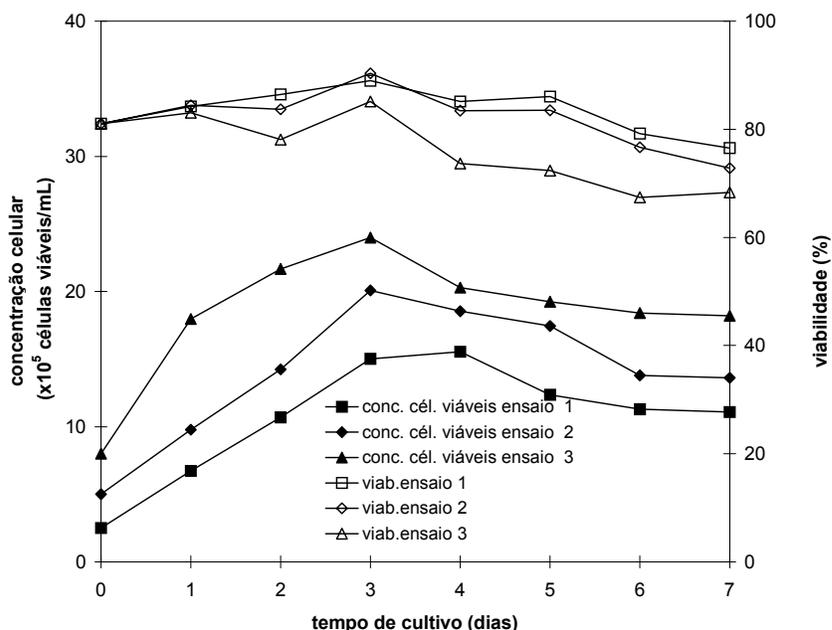


Figura 5.2: Efeito do inóculo celular no crescimento e viabilidade de células Sf9. Concentrações dos inóculos: $2,5 \times 10^5$ células viáveis/mL (ensaio 1), 5×10^5 células viáveis/mL (ensaio 2) e 8×10^5 células viáveis/mL (ensaio 3). Os ensaios foram realizados, conforme já mencionado, em meio Grace acrescido de 10% de SFB, em frascos *schott* de 100mL de capacidade e 15mL de volume de trabalho, mantidos em incubadora agitada a 28°C e 100 rpm.

Embora o emprego do inóculo com elevada concentração celular tenha resultado em altas concentrações celulares (até 28×10^5 células totais/mL), observou-se queda acentuada da viabilidade celular após um período de 3 dias. Os cultivos iniciados com inóculos menores que 8×10^5 células viáveis/mL mantiveram-se com viabilidade entre 90 e 80% por 4 dias, fato imprescindível para a infecção por baculovírus em ensaios futuros. O tempo de duplicação ficou em média em 30 h, e a taxa máxima de crescimento específico variou entre 0,021 e 0,027 h^{-1} . A fase *lag* de crescimento, caso tenha ocorrido, durou menos de 24 horas e a fase estacionária foi atingida após 3 dias de cultivo.

Os resultados verificados são comparáveis aos obtidos em estudos exploratórios de rotas metabólicas e requerimentos nutricionais para células de

insetos, publicados anteriormente por outros grupos (Doverskog et al., 2000; Mendonça et al., 1999; Drews et al., 2000, Wang et al., 1993a e Kinoukia et al. (1995), para cultivos em batelada, em frascos agitados, mantidos a 28°C e 100rpm, mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Comparação dos parâmetros cinéticos obtidos em diferentes meios de cultivo.

Meios Cultivo	de	Inóculo (x10 ⁵ cél./mL)	Células finais (x10 ⁵ cél./mL)	Fase lag (h)	Referência
KBM 10		2,3	40	25	Doverskog et al. (2000)
		4	50	13	
		9	60	10	
KBM 10 +4g/L ext.lev.		3	70	30	Drews et al. (2000)
TNM-FH + 10% SFB		2	18	36	Mendonça et al (1999)
TNM-FH + 10% SFB		2	15	40	Wang et al. (1993)
TC-100 +5% SFB		1,5	11	50	Kinoukia et al (1995)
Grace +10% SFB		2,5	12	<24	Presente estudo

Doverskog et al. (2000), realizaram estudos com três concentrações distintas de células Sf9, 2,3x10⁵ células/mL, 4x10⁵ células/mL e 9x10⁵ células/mL, empregando o meio livre de soro, KBM 10. Os ensaios mostraram que a

concentração celular final (40×10^5 células/mL, 50×10^5 células viáveis/mL e 60×10^5 células viáveis/mL, respectivamente para as três concentrações de inóculo) e a fase *lag* de crescimento celular (25h, 13h e 10h, respectivamente) eram dependentes da concentração do inóculo, e que quanto maior a concentração de inóculo empregada, maior a concentração celular final obtida. Este fato estava provavelmente vinculado à presença de fatores de crescimento encontrados nos inóculos empregados.

Comportamento similar foi verificado por Drews et al. (2000), empregando inóculo de Sf9 na concentração de 3×10^5 células/mL, meio livre de soro KBM 10 enriquecido com extrato de levedura 4 g/L. Estes autores observaram uma duração da fase *lag* de 30 horas e uma concentração de células finais de 70×10^5 células/mL, elevação considerável em comparação aos dados obtidos por Doverskog et al. (2000).

Mendonça et al. (1999), empregando inóculo celular de Sf9 na concentração de 2×10^5 células/mL, e utilizando meio TNM-FH suplementado com 10% em volume de SFB observaram uma fase *lag* de crescimento de 36 horas, e concentração celular máxima final de 18×10^5 células viáveis/mL. A longa duração da fase *lag* e a baixa concentração final de células em comparação às verificadas pelos autores dos trabalhos anteriormente mencionados podem ser atribuídas à formulação do meio TNM-FH, que não é tão rica em nutrientes quanto ao KBM 10.

O mesmo meio de cultivo (TNM-FH acrescido de 10% em volume de SFB) e a mesma concentração de inóculo (2×10^5 células/mL) foram utilizados por Wang et al. (1993a) na investigação dos efeitos de nutrientes como glicose, glutamina e oxigênio na expressão de proteínas recombinantes. Estes autores observaram um período de 40 horas para fase *lag* de crescimento, e concentração máxima de 15×10^5 células/mL.

Kinoukia et al. (1995) empregaram um inóculo de $1,5 \times 10^5$ células/mL para investigar os fatores que afetavam o crescimento de células de insetos e a infecção por baculovírus. Foi utilizado o meio TC-100 suplementado com 5% em volume de SFB. Os autores observaram um período de fase *lag* de crescimento

em torno de 50 horas, e máxima concentração final de 11×10^5 células/mL, portanto, maior fase *lag* que os valores obtidos nos trabalhos anteriormente mencionados quando se empregou uma concentração de inóculo reduzida.

Com base nestes trabalhos, pode-se concluir que quanto menor a concentração de inóculo empregada, maior é a duração da fase *lag* e menor é a concentração celular final, fatos de conhecimento geral. Notou-se também que concentrações celulares finais superiores a 50×10^5 células/mL podem ser obtidas utilizando-se meios otimizados como o KBM 10. Ao contrário das células de mamíferos, observa-se que mesmo concentrações reduzidas de inóculo podem resultar em crescimento celular apreciável.

Sabendo-se que no ensaio com a menor concentração de inóculo ($2,5 \times 10^5$ células viáveis/mL), mostrado na Figura 5.2, a viabilidade manteve-se acima de 80% por um período de até 6 dias, e estando estes resultados compatíveis com os observados na literatura, optou-se em se utilizar em ensaios posteriores esta concentração de inóculo. Levou-se também em consideração as limitações com custos operacionais e a maior dificuldade de obtenção de um número elevado de células em ensaios simultâneos.

5.2. Análise do Efeito das Concentrações dos Suplementos Extrato de Levedura, Concentrado Protéico de Soro de Leite, Pluronic F68, SFB e Glicose

Os estudos de formulação de um meio de cultura a partir do enriquecimento do meio Grace foram iniciados pela avaliação qualitativa, através de um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} , da influência simultânea das variáveis concentração de extrato de levedura, de concentrado protéico de soro de leite, de Pluronic F68, de SFB e de glicose sobre a concentração e a viabilidade das células Sf9 na fase média do crescimento exponencial e sobre a concentração destas células na fase estacionária.

Em razão da possível necessidade de componentes como fatores de crescimento e hormônios, dentre outros, comumente essenciais para o

crescimento celular, não foram realizados ensaios na ausência de SFB, que variou então de 1 a 3 % em volume. A concentração de glicose foi elevada além do nível normalmente estabelecido no meio Grace (0,7g/L) por este composto representar o açúcar preferencialmente consumido durante o cultivo das células Sf9 (Mendonça et al., 1999). As variáveis independentes, as variáveis respostas e seus níveis de variação encontram-se na Tabela 5.2.

Foram selecionados os ensaios nos quais a concentração de células na fase estacionária foi pelo menos 4 vezes maior que a do ensaio controle, ensaios 3, 4, 8, 11, 12, 15 e 16. Estas formulações de meio de cultivo possuíam o suplemento extrato de levedura na concentração de 8g/L. Observou-se que, nesta concentração, este aditivo pode contribuir para o aumento da densidade celular, além de suprir possivelmente as necessidades protéicas das células Sf9.

Ressalta-se que todos os dados das variáveis resposta avaliadas, concentração de células viáveis na fase média exponencial e na fase estacionária, foram obtidos através de curvas suavizadas do crescimento celular *versus* o tempo de cultivo.

Optou-se em obter as variáveis resposta na fase média de crescimento exponencial já que esta fase mostrou-se como a mais adequada para o período de infecção celular para moderada multiplicidade de infecção (Power et al., 1994).

Tabela 5.2: Tabela dos níveis decodificados das variáveis no planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} e as variáveis resposta obtidas. Concentração do inóculo: $2,5 \times 10^5$ células viáveis/mL.

Ensaio	Variáveis independentes					Variáveis resposta		
	Gli (g/L)	Ext. de Lev. (g/L)	PF68 (%m/v)	SFB (%v/v)	CPSL (%m/v)	$X_{me}^{(1)}$ ($\times 10^5$ cél. viáveis/mL)	$Viab_{me}^{(2)}$ (%)	$X_{vs}^{(3)}$ ($\times 10^5$ cél. viáveis/mL)
1	1,8	0	0	1	5	9,6	99	20,3
2	2,7	0	0	1	0	3,1	76	2,1
3**	1,8	8	0	1	0	15,4	90	40,4
4**	2,7	8	0	1	5	10	93	44,1
5	1,8	0	0,2	1	0	2,5	84	3,3
6	2,7	0	0,2	1	5	7,7	95	20,7
7	1,8	8	0,2	1	5	10,1	91	35,4
8**	2,7	8	0,2	1	0	8,5	96	39,6
9	1,8	0	0	3	0	4,1	99	5,0
10	2,7	0	0	3	5	9,4	98	19,2
11**	1,8	8	0	3	5	16,9	99	41,8
12**	2,7	8	0	3	0	13,6	92	36,5
13	1,8	0	0,2	3	5	9,8	98	23,2
14	2,7	0	0,2	3	0	5,6	86	6,4
15**	1,8	8	0,2	3	0	8,7	87	36,6
16**	2,7	8	0,2	3	5	15,8	98	47,0
C*	0,7	-	-	10	-	4,0	80	9,0

⁽¹⁾Concentração de células na fase média exponencial. ⁽²⁾Viabilidade na fase média exponencial; ⁽³⁾Concentração de células viáveis na fase estacionária; *Ensaio controle em meio Grace + 10% de SFB. ** Ensaios selecionados.

Observou-se na Tabela 5.2 a possibilidade de redução do SFB de 10% para 1% em volume no meio de cultivo ao adicionar-se 5% m/v de CPSL, como mostrado nas formulações dos ensaios 1, 4, 6 e 7. A análise estatística dos dados obtidos foi efetuada e para efeito comparativo, os contrastes principais das variáveis independentes sobre as variáveis respostas de interesse podem ser simultaneamente visualizados através da Figura 5.3.

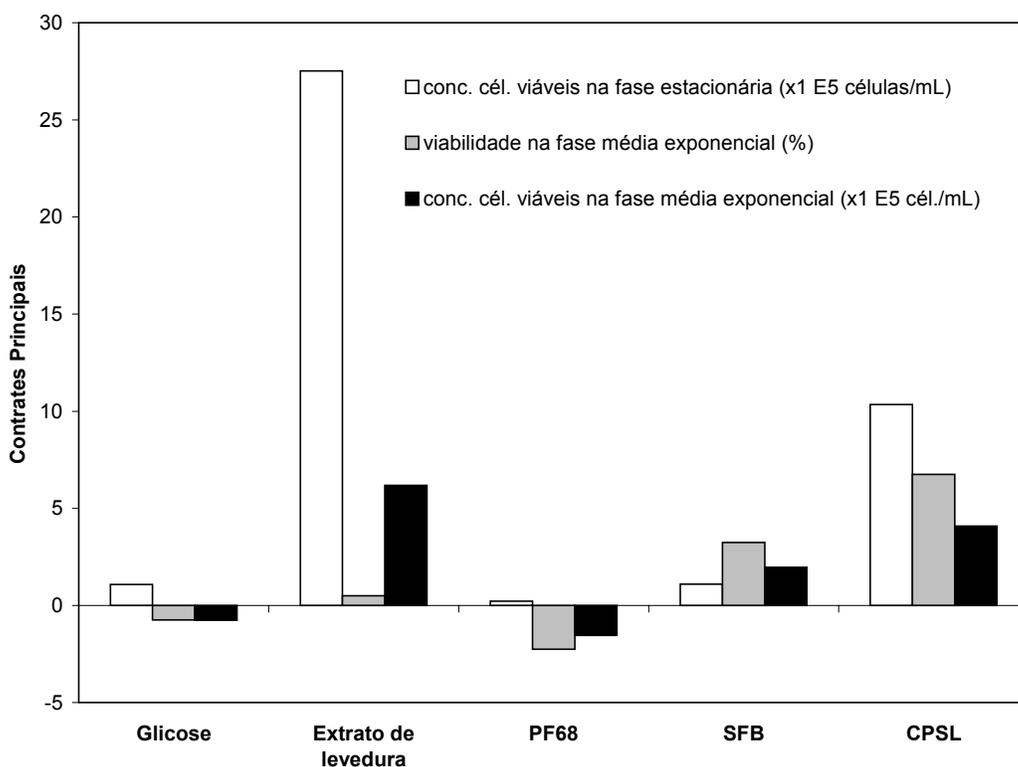


Figura 5.3: Contrastes principais das variáveis independentes sobre a concentração de células na fase média exponencial (X_{me}), na fase estacionária (X_{vs}) e a viabilidade celular na fase média exponencial (V_{me}) com a realização do planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{5-1} descrito na Tabelas 5.2.

As variáveis que apresentaram maiores efeitos positivos sobre a concentração de células na fase estacionária, a concentração e viabilidade celular na fase média exponencial foram o extrato de levedura e o concentrado protéico de soro de leite. Observando-se os efeitos da concentração de concentrado protéico de soro de leite, verificou-se que a viabilidade de células Sf9 na fase

média exponencial aumenta com o acréscimo deste suplemento ao meio de cultivo. O extrato de levedura mostrou-se como eficaz promotor do crescimento celular. Em razão do bom desempenho dos suplementos extrato de levedura e CPSL com relação às variáveis resposta estudadas neste planejamento fracionário preliminar, foram ampliadas suas concentrações em estudo realizados em experimentos posteriores. Através dos resultados apresentados na Figura 5.3, observou-se também que a glicose não apresentou efeito significativo sobre as variáveis resposta em análise, embora a glicose seja um nutriente essencial ao crescimento celular para células de insetos (Mendonça et al., 1999).

Drews et al. (1995) realizaram ensaios em condições similares aos avaliados neste estudo com meios de cultivo contendo até 10g/L de glicose. Em razão da não observação de repressão catabólica por este aditivo nos ensaios realizados no nível superior desta variável, a concentração de glicose será fixada em 2,7g/L nos ensaios subseqüentes. A adição de Pluronic F68 ao meio de cultivo celular proporcionou redução discreta na concentração de células viáveis na fase média exponencial. Em se tratando de um composto protetor contra o cisalhamento recomendável no cultivo das células em biorreatores, sua concentração será reduzida para 0,1% nos ensaios posteriores, minimizando custos e visando a redução de eventuais efeitos inibitórios.

5.2.1. Análise Comparativa dos Parâmetros Cinéticos Resultantes dos Ensaio do Planejamento Preliminar 2⁵⁻¹ e o Ensaio Controle em Meio Grace com 10 % SFB

Embora os dados obtidos no planejamento fracionário tenham indicado excelente potencial de utilização dos suplementos para estimular o crescimento celular, é recomendável a comparação direta do desempenho das células ao comumente verificado no cultivo em meio de Grace tradicional contendo 10% de soro fetal bovino. A Tabela 5.3 mostra os resultados obtidos nesta comparação em relação aos parâmetros cinéticos de crescimento para as células Sf9.

Tabela 5.3: Comparação entre os parâmetros cinéticos das células Sf9 em suspensão obtidos no planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} e o ensaio controle em meio Grace contendo 10% SFB.

Ensaio	$\mu_{\text{máx}}^{(1)}$ (h^{-1})	$t_{\text{lag}}^{(2)}$ (d)	$t_d^{(3)}$ (h)	$t_s^{(4)}$ (d)	Viabilidade em t_s (%)
1	0,0223	1	31	4	98
2	0,0064	1	107	3	80
3**	0,0141	<1	49	8	92
4**	0,0223	2	31	8	99
5	0,0069	2	100	7	76
6	0,0223	2	31	6	97
7	0,0247	3	28	8	97
8**	0,0223	2	31	8	96
9	0,0223	2	31	7	53
10	0,0231	2	30	7	98
11**	0,0165	2	42	8	98
12**	0,0161	2	43	9	94
13	0,0187	1	37	6	99
14	0,0161	2	43	6	66
15**	0,0187	1	37	7	98
16**	0,0239	3	29	8	98
C*	0,0266	<1	26	5	84

⁽¹⁾Taxa máxima de crescimento específico; ⁽²⁾Tempo de duração da fase lag de crescimento celular; ⁽³⁾:Tempo de duplicação celular; ⁽⁴⁾Tempo para se atingir fase estacionária; *Ensaio controle em meio Grace + 10% de SFB. ** Ensaio selecionados.

Observa-se também na Tabela 5.3 que a variável mais afetada pelo suplemento soro fetal bovino foi a viabilidade celular na fase média exponencial, o que já era esperado, devido à função protetora do soro na membrana celular.

Entretanto, o SFB pouco contribuiu no aumento da concentração celular. Em vista disto, foram realizados estudos para a redução da faixa de concentração deste suplemento no meio, visando a redução dos custos de produção e manutenção celular.

A análise destes dados indica, conforme também observado na Figura 5.3, que se pode efetivamente alcançar resultados de elevação da taxa específica máxima de crescimento celular e da acumulação de células com alta viabilidade pela substituição parcial do soro fetal bovino no meio Grace pelos suplementos estudados. Diversas formulações de meios de cultura, como os dos ensaios 4 e 16, conduziram a resultados globalmente melhores que o meio controle.

As taxas de crescimento específico variaram de 0,0064 a 0,0266h⁻¹, enquanto o tempo para se atingir a fase estacionária variou de 3 a 9 dias.

No tocante à duração da fase *lag* de crescimento celular observou-se um período médio de 2 dias.

Verificou-se que nos ensaios controle e no ensaio 3 o tempo de duração da fase *lag* de crescimento foi inferior a 24 horas, possivelmente em razão da rápida adaptação das células Sf9 a estas composições de meio de cultivo.

Os ensaios 2 e 5, nos quais as concentrações de extrato de levedura e de CPSL eram nulas e a concentração de SFB era de apenas 1%, apresentaram longo tempo de duplicação celular, não resultando em crescimento satisfatório, possivelmente pela ausência de nutrientes essenciais ao metabolismo das células.

Com relação à viabilidade celular no início da fase estacionária, observou-se variações de 53 a 99%.

Durante a fase de adaptação celular (*lag*) foram observadas alterações morfológicas acentuadas, como granulações e aumento do diâmetro das células Sf9, nos ensaios que continham CPSL, sugerindo um estresse celular referente a possíveis alterações na osmolalidade do meio de cultivo que pode ter atingido valores superiores a 300 mOsm/Kg, valor este aceitável para a maioria das células

(Freshney, 1994). Tal efeito será mais profundamente abordado em itens posteriores.

5.2.2. Análise do Consumo de Glicose, Glutamina e da Formação de Lactato nos Ensaio do Planejamento Fracionário 2⁵⁻¹

Os principais indicadores de metabolismo celular são a glicose, a glutamina e o amônio e o lactado. Assim, o consumo de glicose e de glutamina, a formação de lactato, a concentração e viabilidade celular, foram monitoradas nos ensaios que resultaram em concentração celular final pelo menos quatro vezes superior à obtida no ensaio controle, ensaios 3, 4, 8, 11, 12, 15 e 16, descritos nas Tabelas 5.2 e 5.3. Os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 5.4 a 5.10.

O lactato não mostrou-se inibidor do crescimento das células Sf9, sendo consumido durante parte do tempo de cultivo celular, conforme mostrado nas Figuras 5.4 a 5.10. Estudos realizados por Palomares e Ramirez (1996), citados por Mendonça et al. (1999), mostraram que este metabólito não apresenta efeitos inibitórios para uma concentração de até 0,3g/L no meio de cultura.

No entanto, o presente estudo mostrou que esta linhagem celular pode atingir cerca de 7×10^6 células/mL quando mantida em meio livre de soro (Sf900II), estando o lactato presente neste meio em uma concentração de até 1,4g/L, como indicado no Apêndice A.

O metabólito amônio não foi monitorado no planejamento fracionário, já que segundo análise da literatura pertinente, as células de insetos produzem este composto em quantidades reduzidas (Ikonomou et al., 2003).

Resultados e Discussão

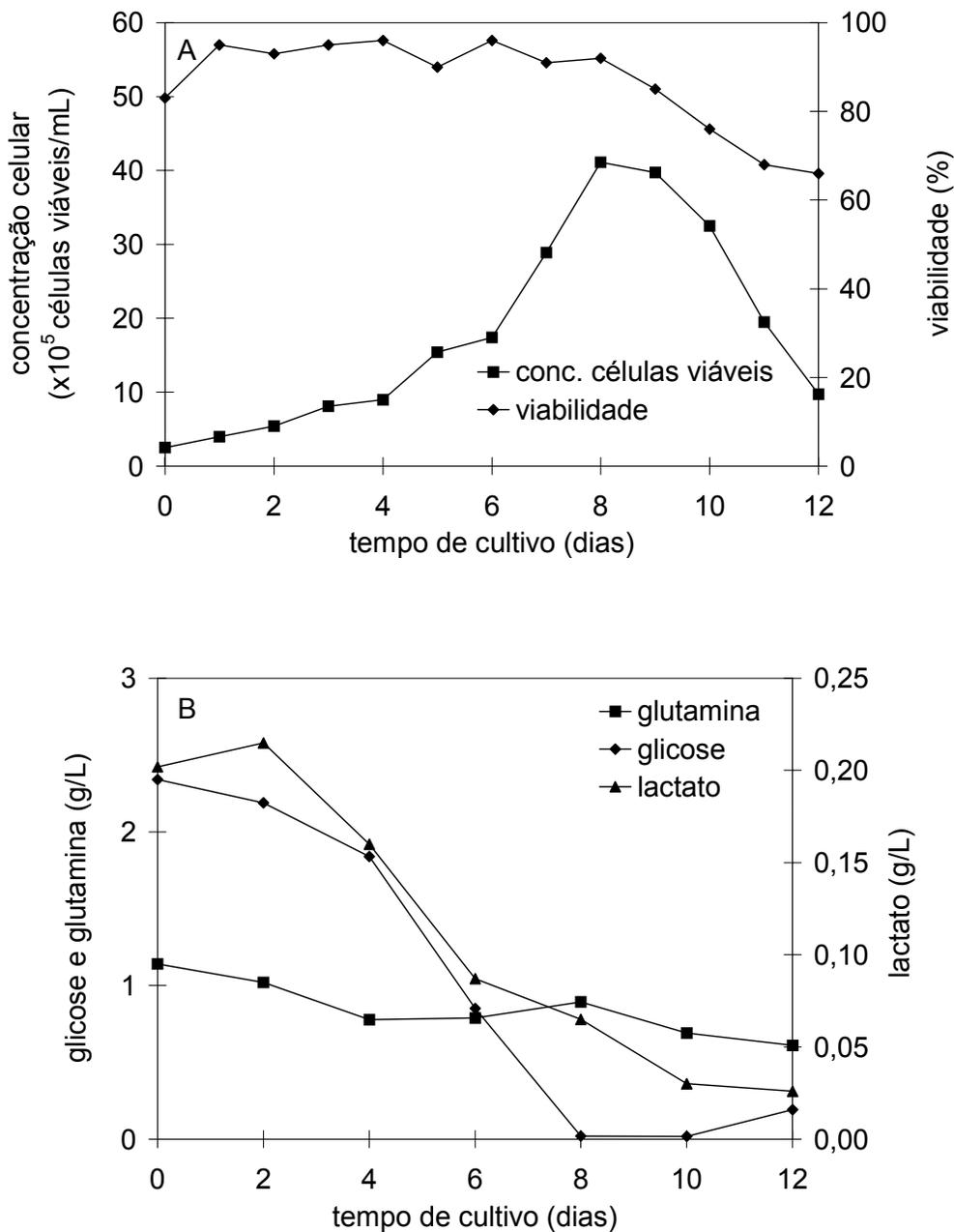


Figura 5.4: Parâmetros cinéticos para o ensaio 3 (1,8g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 1% SFB). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

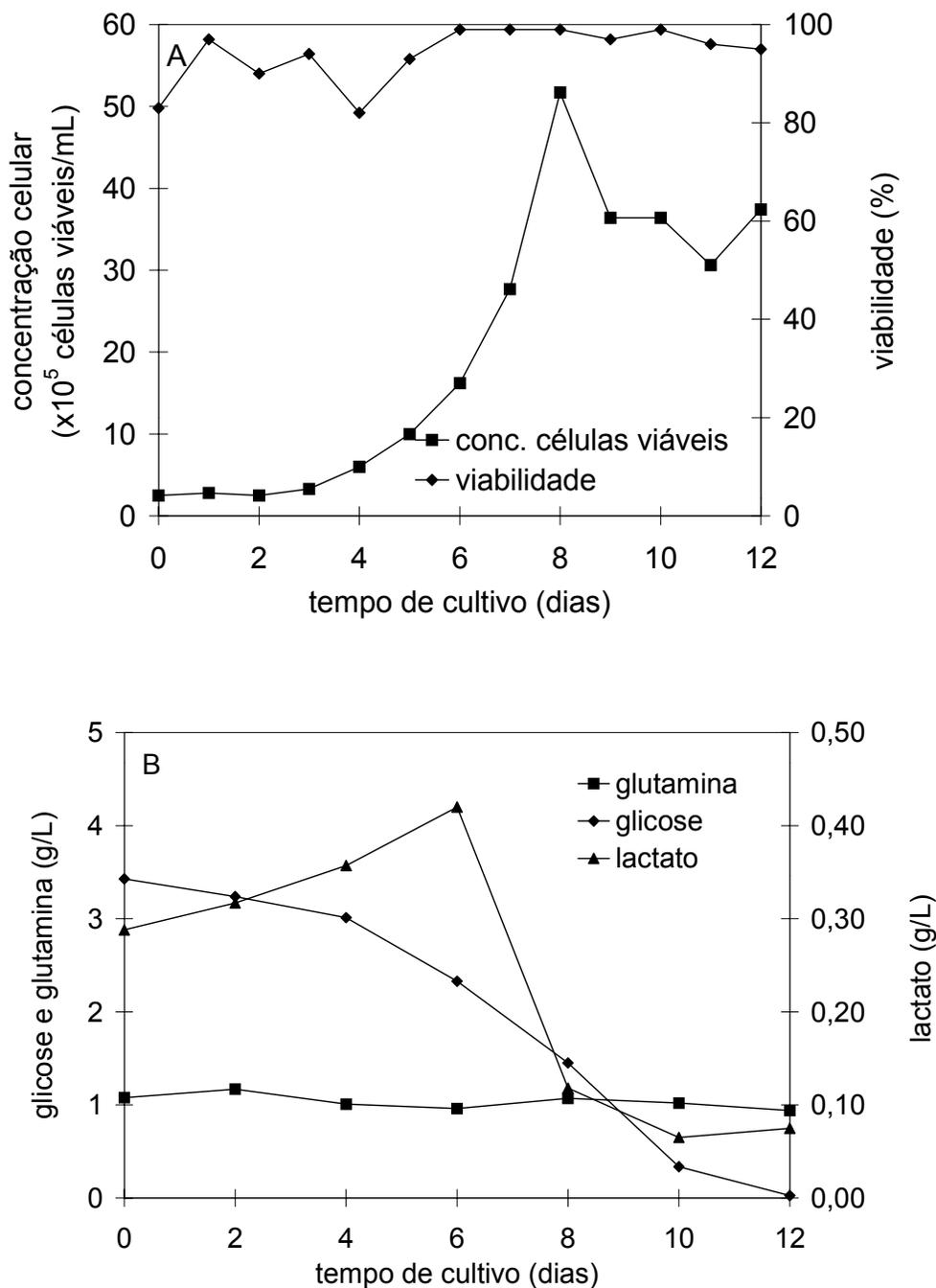


Figura 5.5: Parâmetros cinéticos para o ensaio 4 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 1% de SFB, 5% de CPSL). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

Resultados e Discussão

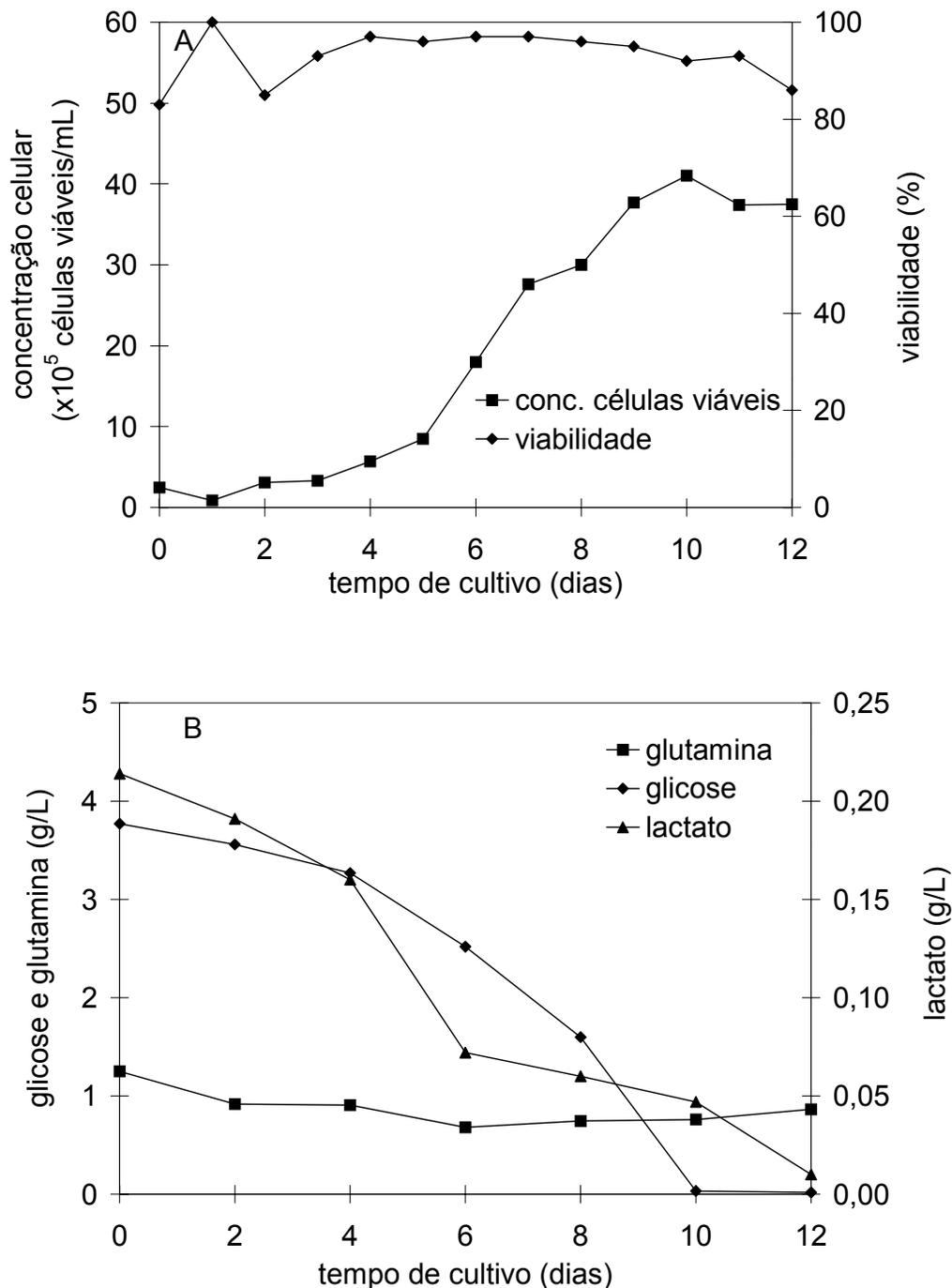


Figura 5.6: Parâmetros cinéticos para o ensaio 8 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,2% de PF68, 1% de SFB). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

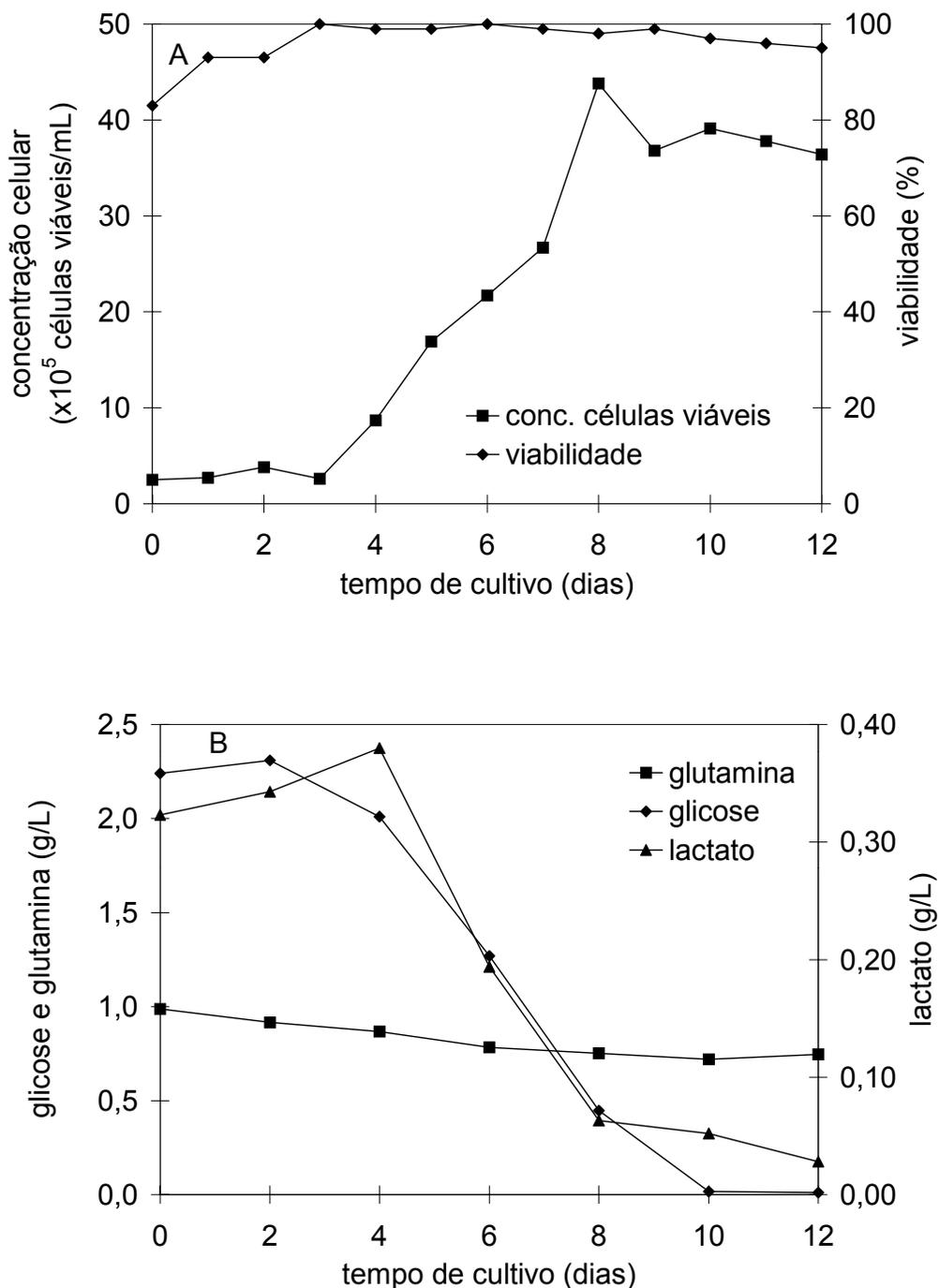


Figura 5.7: Parâmetros cinéticos para o ensaio 11 (1,8g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 3% de SFB e 5% de CPSL). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

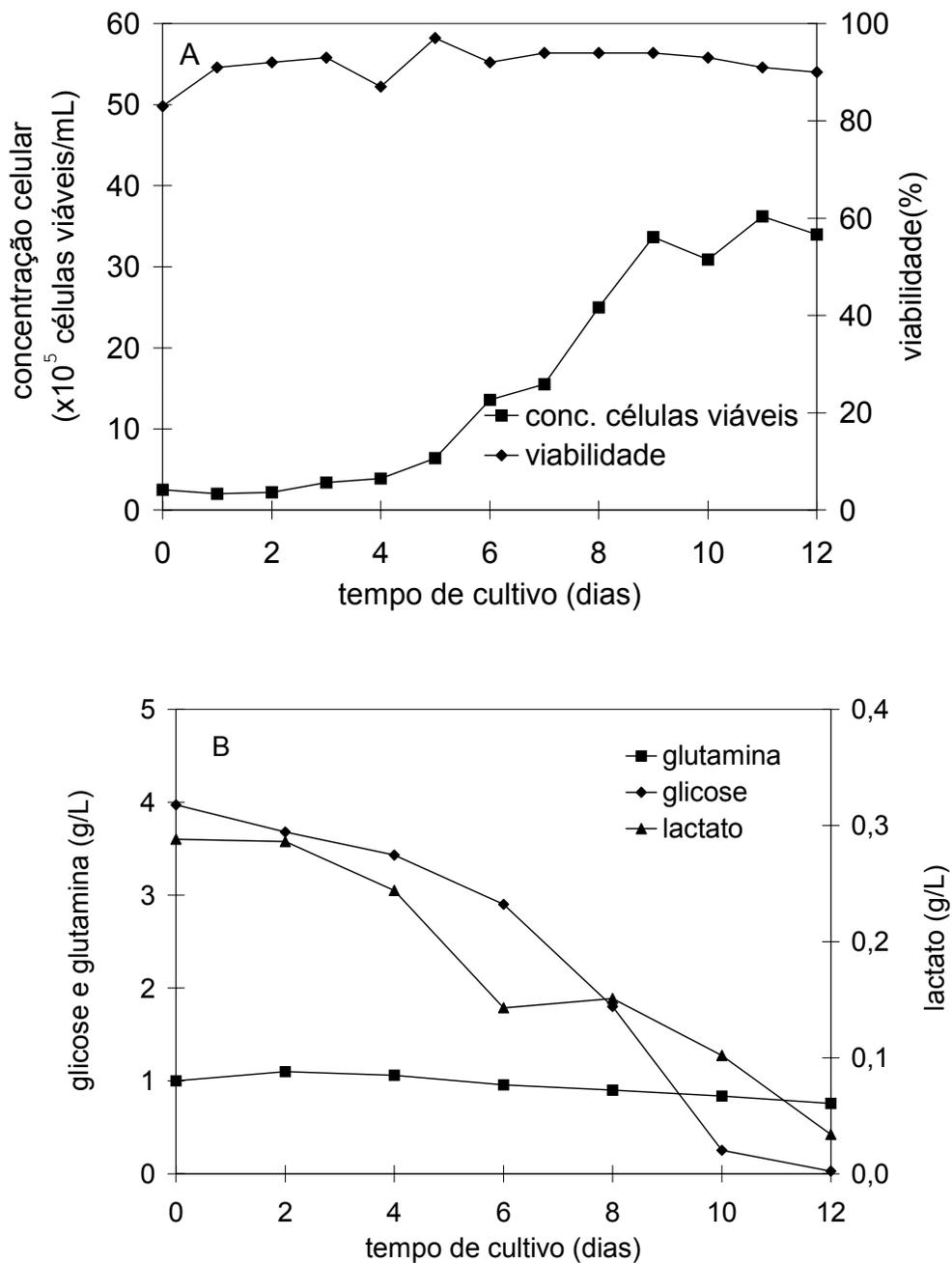


Figura 5.8: Parâmetros cinéticos para o ensaio 12 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 3% de SFB). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

Resultados e Discussão

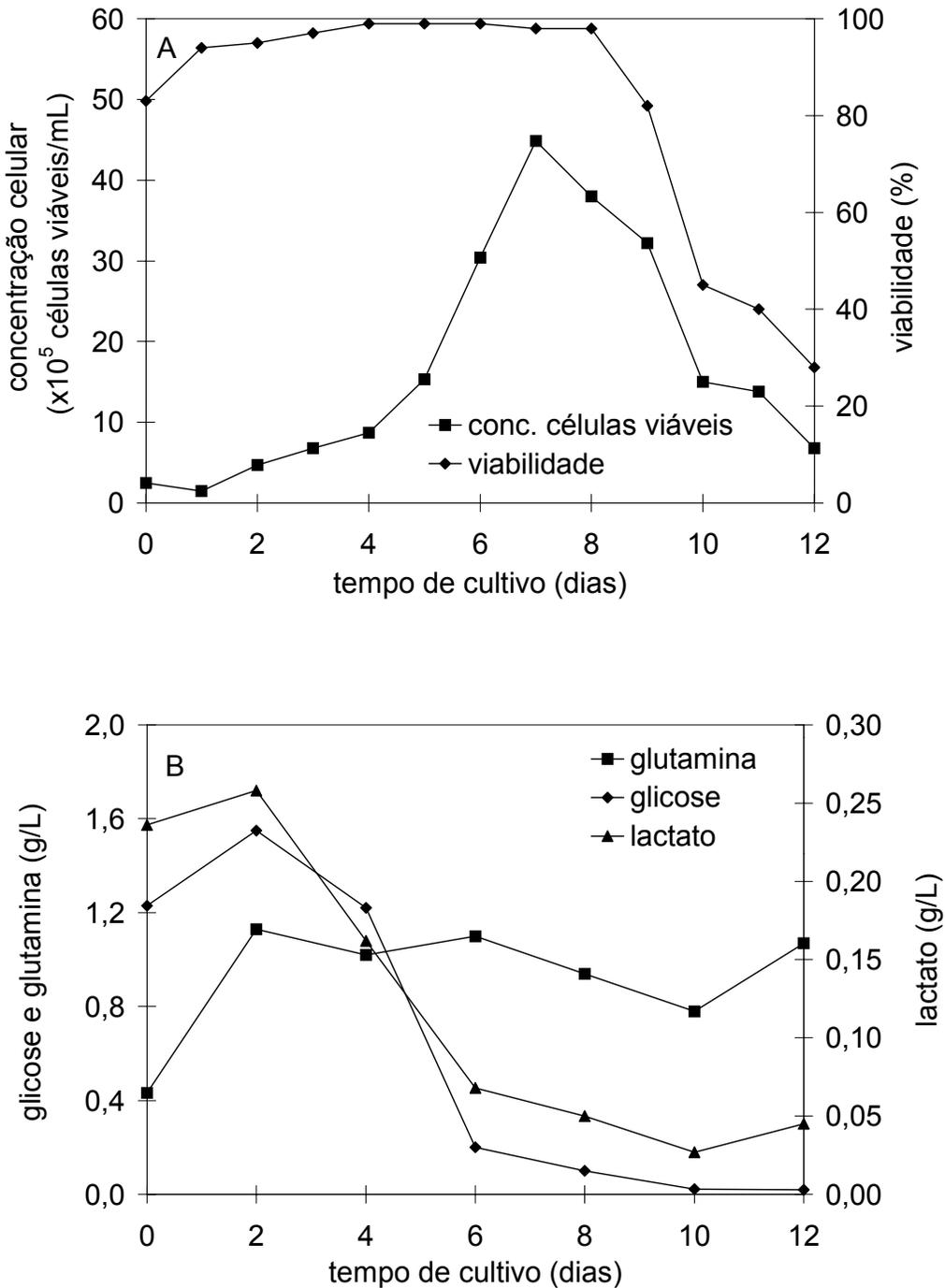


Figura 5.9: Parâmetros cinéticos para o ensaio 15 (1,8g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,2% de PF68; 3% de SFB). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

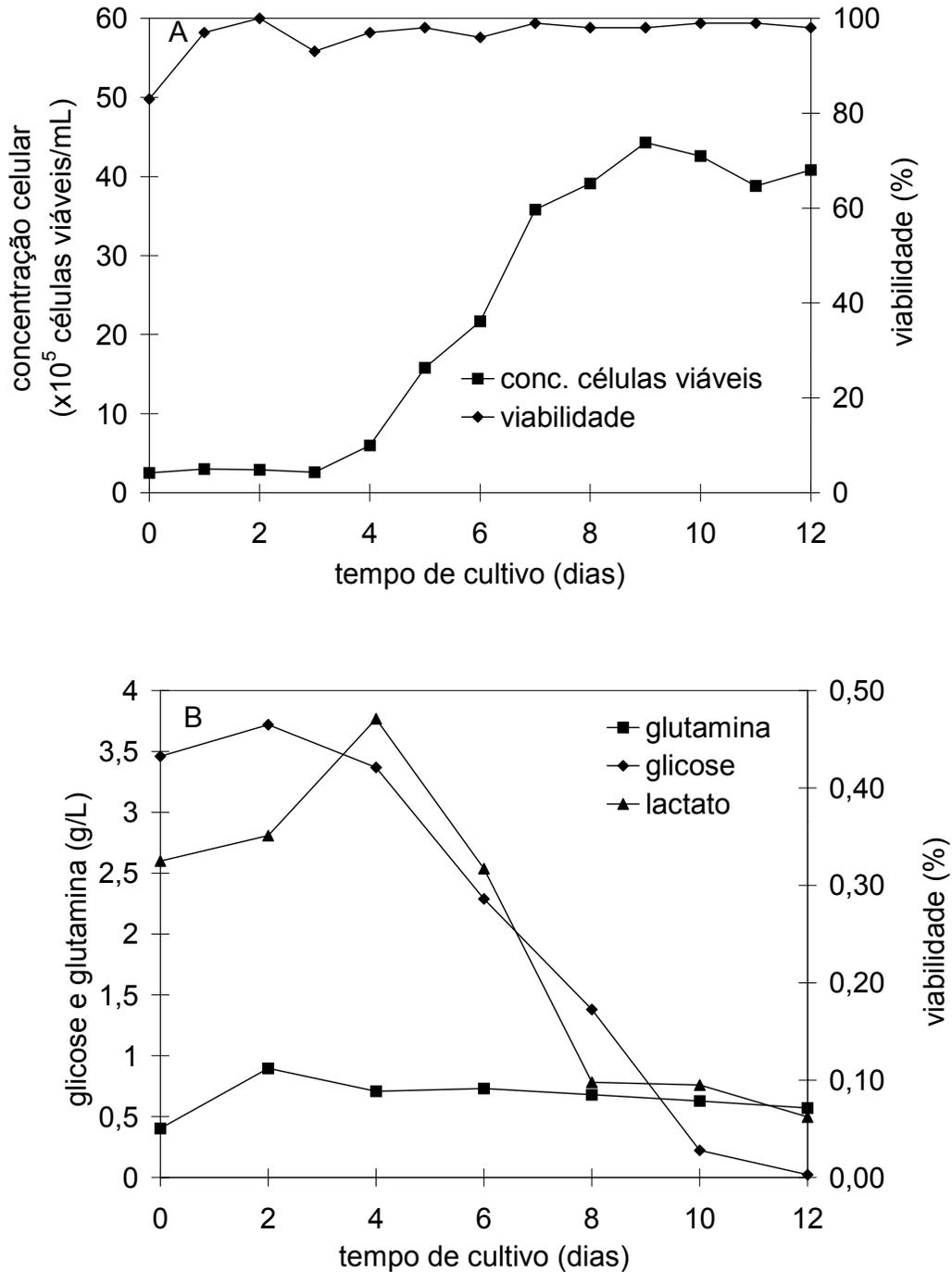


Figura 5.10: Parâmetros cinéticos para o ensaio 16 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,2% de PF68; 3% de SFB e 5% de CPSL). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

A viabilidade celular, nos ensaios 4, 8, 11, 12 e 16 manteve-se entre 80% e 100% ao longo de todo o cultivo. No ensaio 3 a viabilidade chegou a reduzir-se para cerca de 70%, possivelmente pela escassez de nutrientes. No ensaio 15 a viabilidade foi drasticamente reduzida para cerca de 40% após 8 dias de cultivo. Neste período do cultivo, a concentração de glicose e de glutamina encontravam-se abaixo de 0,5g/L. A escassez destes nutrientes reduziu a fase estacionária, antecipando a morte celular, conforme é mostrado na Figura 5.9.

O ensaio que resultou na máxima concentração celular dentre todos os efetuados foi o ensaio 4, no qual obteve-se um crescimento cinco vezes maior que o do ensaio controle (9×10^5 células viáveis/mL), mantendo a viabilidade celular entre 90 e 100%. Entretanto, sabendo que a infecção por baculovírus deve ser realizada durante a fase média de crescimento exponencial (Wang et al., 1993a), o ensaio 4 disponibilizaria somente 2 dias para que este procedimento fosse realizado. Em vista disso, o ensaio 16 poderia ser selecionado como o de melhor desempenho, apresentando quatro vezes e meia a densidade celular máxima em relação ao ensaio controle, e viabilidade mantida entre 90 e 100% durante os 11 dias de cultivo, além do fato de proporcionar cerca de 3 dias para infecção celular, intervalo de tempo superior ao observado no ensaio 4.

Observa-se também nas Figuras 5.4 a 5.10 que os ensaios 3, 4, 8, 11, 12, 15, 16, apresentaram comportamentos similares quanto ao consumo de glicose e à evolução de lactato. Em geral, os ensaios realizados no planejamento fracionário apresentaram durante os primeiros 4 dias a formação acentuada de lactato. A partir de então, o lactato passou a ser consumido simultaneamente em relação à glicose, que sofre depleção ao longo de todo o cultivo. Transcorridos 10 dias de cultivo, o lactato volta a ser produzido. Estes dados indicam que, aparentemente, quando a concentração de glicose atinge cerca de 0,5g/L no meio de cultura, possivelmente outra fonte de carbono passa a ser consumida, já que o lactato tem sua produção reiniciada. Este comportamento também foi observado por Mendonça et al. (1999), na investigação de nutrientes essenciais ao crescimento das células Sf9. Estes autores observaram que quando a concentração de glicose torna-se limitante no meio, a frutose passa a ser consumida. E que, quando a

frutose atinge concentração inferior a 0,02g/L, o lactato que vinha sendo produzido passa a ser, então, consumido. Os autores observaram também que as células Sf9 em meios de cultura com fontes de carbono alternativas (frutose e lactato), alcançavam valores 25% menores de taxa máxima de crescimento específico que em meios de cultura com glicose disponível. Desempenho semelhante foi também observado por Drews et al. (2000), através de estudos exploratórios sobre rotas metabólicas para Sf9 nas mesmas condições experimentais que as empregadas neste estudo, ou seja, células Sf9 cultivadas em suspensão, em frascos agitados, mantidas a 28°C e 100 rpm. Com base nestes dados pode-se concluir que a suplementação de glicose no meio poderia prolongar o tempo de cultura, uma vez que em vários ensaios a viabilidade celular continuava elevada apesar da pouca disponibilidade de glicose.

Segundo estudos realizados por Mendonça et al. (1999) a glicose mostrou-se como o principal carboidrato consumido para a formação do esqueleto carbônico e para suprimento energético. As Figuras 5.11 e 5.12 mostram os resultados obtidos correspondentes aos consumos específicos de glicose e glutamina na fase de crescimento exponencial para os ensaios do Planejamento Fracionário 2⁵⁻¹.

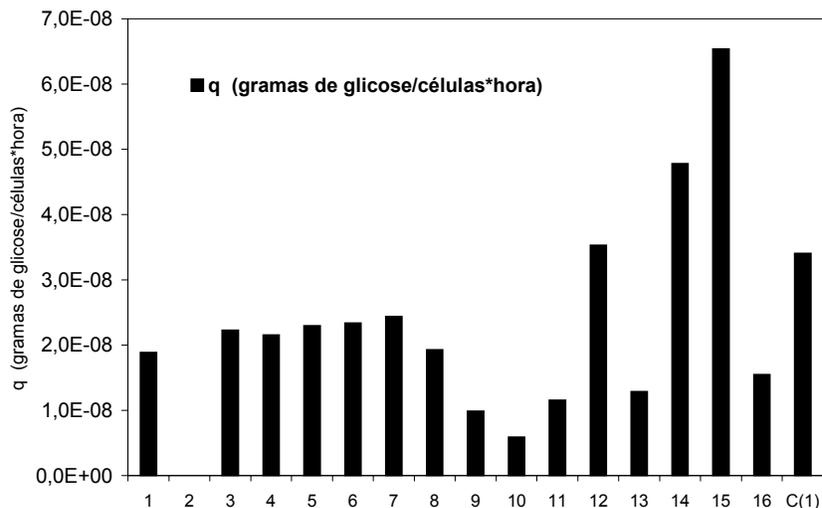


Figura 5.11: Consumo específico de glicose nos ensaios do planejamento fracionário 2⁵⁻¹. C(1): Ensaio controle em meio Grace + 10% de SFB.

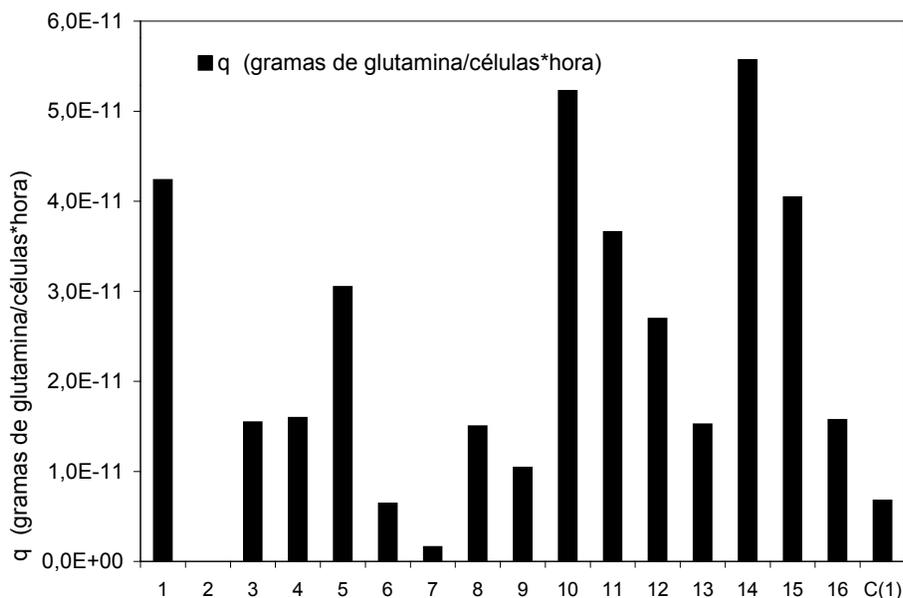


Figura 5.12: Consumo específico de glutamina nos ensaios do planejamento fracionário 2^{5-1} . C(1): Ensaio controle em meio Grace + 10% de SFB.

Observou-se na Figura 5.11 que os ensaios 12, 14, e 15 apresentaram elevadas taxas de consumo específico de glicose quando comparados ao ensaio controle, revelando o consumo preferencial deste nutriente para a formação do esqueleto carbônico celular. Esta figura mostra também que, dentre os ensaios selecionados, o consumo de glicose é menor quando a concentração de SFB está acima de 3% em volume, com exceção do ensaio 15. Em vista dos dados obtidos, pode-se concluir que a possibilidade do emprego de concentrações de glicose em torno de 2g/L mostra-se factível desde que outros nutrientes não específicos sejam adicionados no meio de cultivo através de complexos protéicos ou extratos celulares.

A Figura 5.12 mostra que, em geral, a glutamina foi pouco consumida pelas células Sf9. No entanto, em apenas três dos ensaios do planejamento fracionário 2^{5-1} (ensaios 2, 6 e 7), este aminoácido foi menos consumido que no ensaio controle. Através destes resultados pode-se concluir que a introdução de suplementos (extrato de levedura, CPSL, PF68, glicose e SFB) no meio de cultivo

Grace nas faixas de concentrações estudadas proporcionaram a redução do consumo deste aminoácido, induzindo possivelmente o consumo de outro aminoácido que não foi monitorado.

5.3. Otimização da Composição do Meio de Cultura através de Planejamento Fatorial Completo

A influência das variáveis concentração de extrato de levedura, CPSL e de SFB sobre a concentração final de células viáveis na fase estacionária, a concentração de células viáveis na fase média exponencial e a viabilidade na fase média exponencial foi estudada através de um planejamento fatorial completo do tipo 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais. O planejamento com pontos axiais foi realizado para que a faixa de estudo fosse ampliada e um modelo quadrático pudesse ser considerado. As variáveis e seus níveis estão apresentados na Tabela 5.4. Com o intuito de avaliar sistematicamente possíveis alterações metabólicas observadas nas células Sf9 referentes à proliferação celular foram realizados dois planejamentos fatoriais 2^3 expandidos, empregando-se as mesmas composições de meios de cultivos, no entanto, com inóculo celular oriundo do meio Grace acrescido de 10% em volume de SFB e do meio livre de soro Sf900II.

Tabela 5.4: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais e inóculo proveniente do meio Grace contendo 10% de SFB.

Variáveis	Nível				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Extrato de levedura (g/L)	2,6	4	6	8	9,4
CPSL (%m/v)	2,3	3	4	5	5,7
SFB (% v/v)	0,3	1	2	3	3,4

A Tabela 5.5 mostra o planejamento fatorial completo e os resultados obtidos com sua utilização empregando-se inóculo celular proveniente do meio Grace acrescido de 10% de SFB. Analisando-se os resultados, verificou-se que não ocorreu uma variação tão grande quanto a observada anteriormente na concentração de células finais viáveis na fase estacionária, que ficou entre 0 e $25,8 \times 10^5$ células/mL. Observa-se que a concentração de células viáveis na fase média exponencial esteve entre 0 e $12,8 \times 10^5$ células/mL, assim como a viabilidade na fase média exponencial esteve entre 0 e 99%. A concentração de células viáveis por mililitro para os ensaios do ponto central correspondeu a $3,2 \pm 0,5$ células viáveis/mL. O desvio padrão calculado referente a X_{vs} foi de 0,50 células viáveis/mL, indicando um desvio em torno da média de até 18% para a replicata 17. Em média a X_{me} foi de $2,13 \pm 0,32$ células viáveis/mL, em vista disso, o erro calculado para a mesma replicata em função das células viáveis na fase média exponencial foi de 17%. Os valores obtidos para viabilidade celular na fase média exponencial foi cerca de $78,3 \pm 17\%$ contribuindo com um erro de até 22% para replicata 17. Considerando-se que o erro atribuído à contagem celular é de em média 30%, os intervalos de confiança mostraram-se aceitáveis.

5.3.1. Análise dos Efeitos das Concentrações de Extrato de Levedura, CPSL e do SFB sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Estacionária (X_{vs}), com Inóculo Proveniente do Meio de Grace + 10% de SFB

Os efeitos das variáveis extrato de levedura, CPSL e SFB sobre a concentração final de células viáveis na fase estacionária (X_{vs}) são mostrados na Tabela 5.6. Constatou-se que a variação da concentração de extrato de levedura de 2,6 para 9,4 g/L e da concentração de CPSL de 2,3 para 5,7 %m/v apresentaram efeitos significativos sobre a X_{vs} . Incrementos na concentração de SFB ocasionaram um pequeno aumento de, em média, $5,4 \times 10^5$ células viáveis/mL na X_{vs} . A interação entre os fatores extrato de levedura e o SFB apresentou efeito estatisticamente significativo a 90% de confiança, enquanto que, as demais interações não apresentaram efeitos sinérgicos nas faixas de concentração

testadas. A validade do modelo foi verificada pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 5.7.

Tabela 5.5: Planejamento fatorial completo 2^3 com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, empregando-se inóculo celular ($2,5 \times 10^5$ células viáveis/mL) mantido em meio Grace + 10% de SFB.

Ensaio	Variáveis independentes			Variáveis resposta		
	Ext. de lev. (g/L)	CPSL (%m/v)	SFB (%v/v)	$X_{vs}^{(1)}$ ($\times 10^5$ cél. viáveis/mL)	$X_{me}^{(2)}$ ($\times 10^5$ cél. viáveis/mL)	$V_{me}^{(3)}$ (%)
1	-1	-1	-1	16,4	5,8	87
2	+1	-1	-1	14,3	5,8	66
3	-1	+1	-1	0,0	0,0	0
4	+1	+1	-1	0,0	0,0	0
5	-1	-1	+1	24,2	10,4	94
6	+1	-1	+1	20,1	8,0	86
7	-1	+1	+1	7,4	3,5	87
8	+1	+1	+1	3,7	2,2	77
9	-1,68	0	0	15,6	5,8	86
10	+1,68	0	0	4,0	2,9	79
11	0	-1,68	0	25,8	12,2	99
12	0	+1,68	0	22,2	7,4	71
13	0	0	-1,68	0,0	0,0	0
14	0	0	+1,68	5,8	3,5	83
15	0	0	0	3,3	2,0	63
16	0	0	0	3,7	2,5	96
17	0	0	0	2,7	1,9	76
C(1)	-	-	10	9,6	6,4	92
C(2)	-	-	-	60,0	11,0	82

C(1): Ensaio controle em meio Grace+10% de SFB; C(2): Ensaio controle em Sf900II;

⁽¹⁾Concentração de células viáveis na fase estacionária; ⁽²⁾Concentração de células viáveis na fase média exponencial; ⁽³⁾ Viabilidade na fase média exponencial.

Resultados e Discussão

Embora 85,3% da variação pode ser explicada pela regressão (15,7% da variação é devido aos resíduos), a análise de variância mostrou que a razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ foi de 2,9, mostrando que o modelo não é preditivo e significativo.

Tabela 5.6: Efeitos estatísticos calculados para a concentração de células viáveis na fase estacionária (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.

	Efeitos ($\times 10^5$ cél./mL)	Desvio Padrão	t(2)	p
Média*	3,37	0,29	11,61	0,0073
(1) Extrato de levedura (L)*	-4,31	0,27	-15,81	0,0039
Extrato de levedura (Q)*	3,74	0,30	12,47	0,0064
(2) CPSL (L)*	-10,25	0,27	-37,62	0,0007
CPSL (Q)*	13,81	0,30	45,98	0,0005
(3) SFB (L)*	5,04	0,27	18,52	0,0029
SFB (Q)*	-1,15	0,30	-3,81	0,0624
1(L) x 2 (L)	0,62	0,35	1,75	0,2216
1 (L) x 3 (L)*	-1,43	0,36	-4,00	0,0571
2 (L) x 3 (L)	-0,62	0,36	-1,75	0,2211

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Tabela 5.7: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis na fase estacionária (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	1134,57	7	162,08	7,43
Resíduos	196,29	9	21,81	
Falta de Ajuste	195,79	7		
Erro Puro	0,501	2		
Total	1330,86	16		

$F_{0,90;7;9} = 2,51$.

% variação explicada (R^2) = 85,3%.

5.3.2. Análise dos Efeitos das Concentrações de Extrato de Levedura, CPSL e do SFB sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Média Exponencial (X_{me}), com Inóculo Proveniente do Meio de Grace + 10% de SFB

Considerou-se apropriado reduzir, nesta análise, o nível de confiança de 95% para 90%, o que proporcionou o aumento do número de efeitos estatisticamente significativos. Os valores dos efeitos dos fatores independentes estudados sobre X_{me} são apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8: Efeitos obtidos para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.

	Efeitos ($\times 10^5$ cél./mL)	Desvio Padrão	t(2)	p
Média*	2,17	0,21	10,44	0,009
(1) Extrato de levedura (L)*	-1,25	0,16	-6,43	0,023
Extrato de levedura (Q)*	1,13	0,21	5,26	0,034
(2) CPSL (L)*	-4,74	0,20	-24,30	0,001
CPSL (Q)*	4,99	0,22	23,22	0,002
(3) SFB (L)*	2,69	0,20	13,80	0,005
SFB (Q)*	-0,71	0,22	-3,31	0,080
1 (L) x 2 (L)	0,27	0,25	1,08	0,393
1 (L) x 3 (L)*	-0,92	0,25	-3,62	0,068
2 (L) x 3 (L)	-0,27	0,26	-1,08	0,394

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Como os termos de segunda ordem para todas as variáveis independentes avaliadas (extrato de levedura, CPSL e SFB) apresentaram efeitos significativos sobre X_{me} , verificou-se a possibilidade da proposição de um modelo de segunda ordem que descrevesse o crescimento de células Sf9 na fase média de crescimento exponencial. A Tabela 5.9 apresenta os coeficientes de regressão

para este modelo. Vale ressaltar, que mesmo sem a redução do intervalo de confiança de 95% para 90% de confiança, o modelo apresentava cinco parâmetros significativos, o que pode proporcionar o ajuste da maioria dos dados experimentais.

Tabela 5.9: Coeficientes de regressão para a concentração de X_{me} para o planejamento completo 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais. Inóculo mantido em meio Grace + 10% de SFB, ignorados os efeitos não significativos.

	Coeficientes de Regressão	Desvio Padrão
Média*	2,17	0,21
(1) Extrato de levedura (L)*	-0,63	0,10
Extrato de levedura (Q)*	0,56	0,11
(2) CPSL (L)*	-2,37	0,10
CPSL (Q)*	2,49	0,11
(3) SFB (L)*	1,34	0,10
SFB (Q)*	-0,36	0,11
1 (L) x 3 (L)*	-0,46	0,13

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

A Equação 6.1 relaciona X_{me} em função das variáveis codificadas para um nível de confiança de 90%.

$$C_{X_{em}} = 2,17 - 0,63 \cdot C_{Ext.lev} + 0,56 \cdot C_{Ext.lev}^2 - 2,37 \cdot C_{CPSL} + 2,49 \cdot C_{CPSL}^2 + 1,35 \cdot C_{SFB} - 0,35 C_{SFB}^2 - 0,46 (C_{Ext.Lev} \cdot C_{SFB})$$

(Equação 5.1)

A validade deste modelo foi verificada pela Análise de Variância (ANOVA) apresentada na Tabela 5.10.

Comparando-se os valores de $F_{calculado}$ e $F_{tabelado}$, pode-se verificar se o modelo proposto é estatisticamente significativo e preditivo. Para isso, o valor de

$F_{\text{calculado}}$ deve ser no mínimo de quatro vezes maior que o valor de F_{tabelado} (Barros Neto e col., 1995).

Pela análise de variância verificou-se que o $F_{\text{calculado}}$ é 7 vezes maior que o F_{tabelado} (igual a 2,51), o que mostra que o modelo de segunda ordem obtido para a X_{me} na faixa estudada é preditivo e estatisticamente significativo. Além disso, observa-se que 93% da variação é descrita pela regressão, ficando apenas 7% com os resíduos.

Tabela 5.10: A análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo mantido em Grace + 10% de SFB, ignorados os efeitos não significativos.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	193,4	7	27,63	17,58
Resíduos	14,14	9	1,57	
Falta de Ajuste	13,88	7		
Erro Puro	0,26	2		
Total	207,54	16		

$F_{0,90;7;9} = 2,51$.

% variação explicada (R^2) = 93%.

A partir do modelo, foram construídas as superfícies de resposta de X_{me} em função da concentração de extrato de levedura e CPSL, mantida constante a concentração de o SFB (Figura 5.13), assim como a superfície de resposta em função da concentração de extrato de levedura e SFB, mantendo-se constante a concentração de CPSL (Figura 5.14) e de X_{me} em função de CPSL e SFB, mantendo-se constante a concentração de extrato de levedura (Figura 5.15). Verifica-se nas Figuras 5.13 e 5.15, respectivamente, que a diminuição da percentagem de CPSL e o aumento percentual de SFB, para qualquer concentração de extrato de levedura, proporcionaram o aumento de X_{me} . Não obstante, a interação sinérgica entre estes dois fatores contribuiu negativamente no crescimento das células nesta fase.

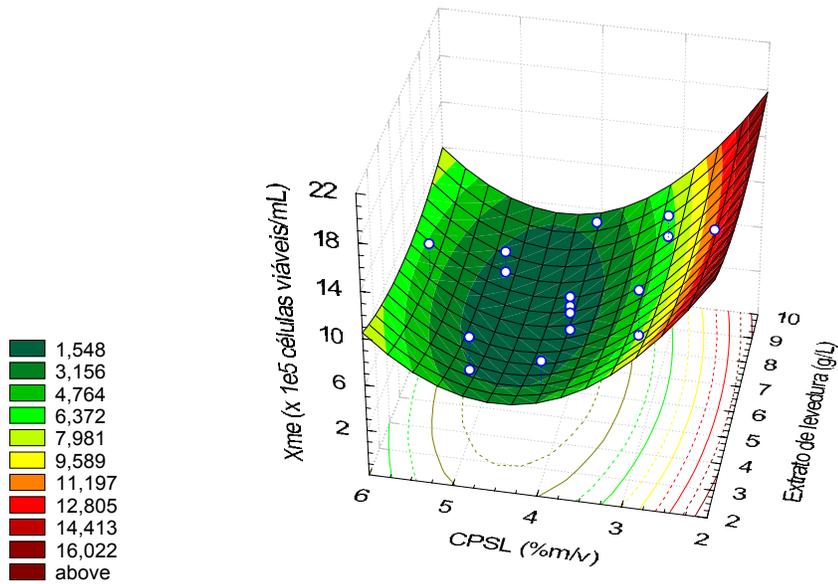


Figura 5.13: Superfície de resposta para X_{me} obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 , a partir de inóculo proveniente do meio Grace acrescido de 10% de SFB, em função da concentração de extrato de levedura e de CPSL.

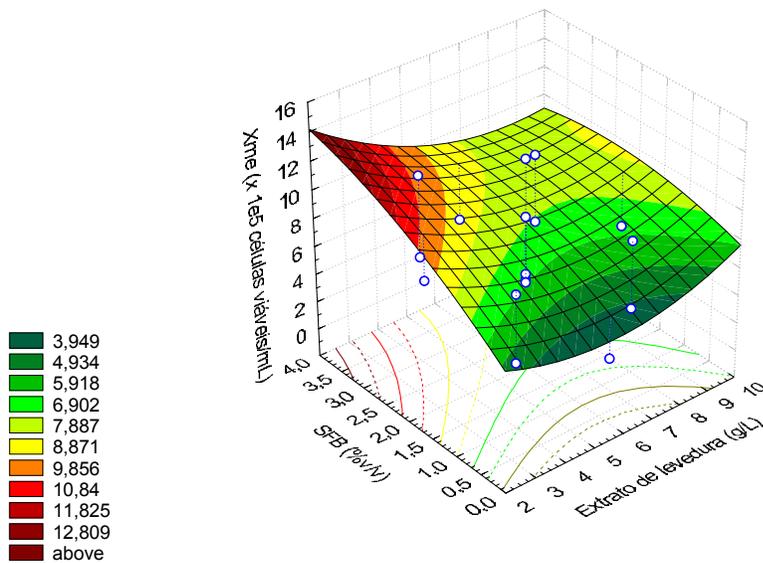


Figura 5.14: Superfície de resposta para X_{me} obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 , a partir de inóculo proveniente do meio Grace acrescido de 10% de SFB, em função da concentração de extrato de levedura e de SFB.

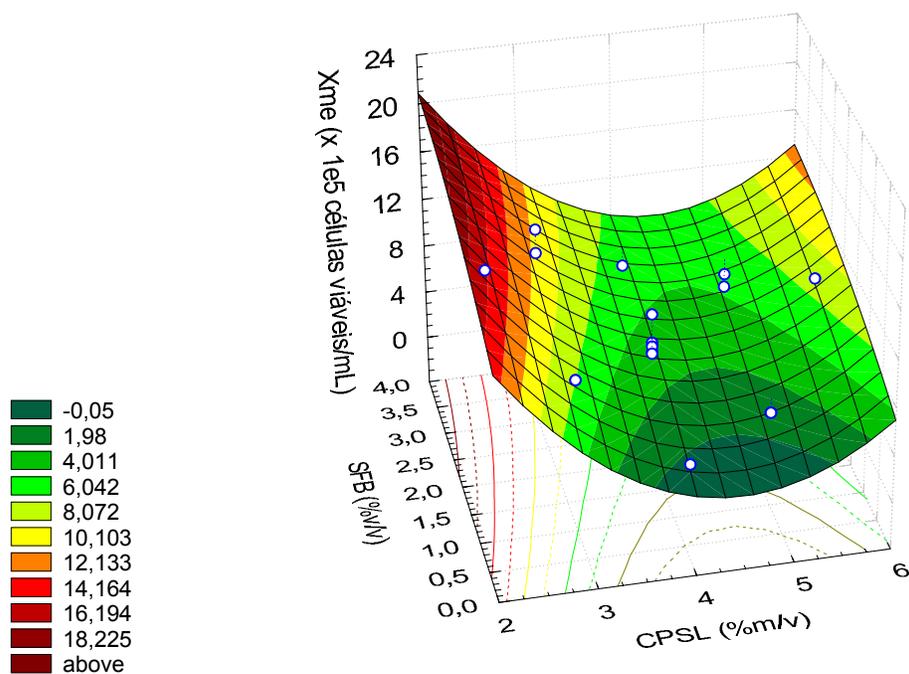


Figura 5.15: Superfície de resposta para X_{me} obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 a partir de inóculo proveniente do meio Grace acrescido de 10% de SFB, em função da concentração de CPSL e de SFB.

Na Tabela 5.11 observam-se os desvios dos valores de X_{me} preditos pelo modelo em relação aos valores experimentais.

Tabela 5.11: Valores experimentais e preditos pelo modelo para X_{me} para o planejamento completo 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais e inóculo mantido em Grace +10% de SFB. Efeitos das concentrações de extrato de levedura, CPSL e SFB estudados nas faixas de 2,6 a 9,4g/L%, 2,3 a 5,7%*m/v* e 0,3 a 3,4%*v/v*, respectivamente.

Ensaio	X_{me} experimental	X_{me} predita	Desvio (%)
1	5,8	6,1	4,5
2	5,8	5,7	1,4
3	0,0	1,3	-
4	0,0	1,0	-
5	10,4	9,7	6,9
6	8,0	7,5	6,3
7	3,5	4,9	41,1
8	2,2	2,8	25,5
9	5,8	4,8	17,1
10	2,9	2,7	7,2
11	12,2	13,2	8,0
12	7,4	5,2	29,5
13	0,0	-1,1	-
14	3,5	3,5	1,4
15	2,0	2,2	8,5
16	2,5	2,2	13,2
17	1,9	2,2	14,2

Embora o modelo tenha se mostrado significativo os desvios entre os valores preditos e os valores experimentais atingiram até 41%, conforme é mostrado na Tabela 5.11. Isto pode estar relacionado ao fato de que nem sempre uma regressão dada como significativa pelo teste F é considerada útil na realização de previsões. Ao invés da relação $F_{calculado}$ e $F_{tabelado}$ ser considerada suficiente ao assumir o valor quatro, na prática podemos considerar uma regressão como útil quando esta relação assumir pelo menos valor dez.

5.3.3. Análise dos Efeitos das Concentrações de Extrato de Levedura, CPSL e SFB sobre a Viabilidade das Células Sf9 na Fase Média de Crescimento exponencial (V_{me}), com Inóculo Proveniente do Meio de Grace + 10% de SFB

A análise estatística dos efeitos das concentrações de extrato de levedura, CPSL e SFB sob a viabilidade das células Sf9 na fase média exponencial são mostrados na Tabela 5.12. Observou-se um coeficiente de correlação do modelo de 0,80%, no entanto, pode-se supor a existência de uma relação entre as variáveis, já que a razão entre $F_{calculado}$ e $F_{tabelado}$ foi de 6,13 como observado na análise estatística (ANOVA) na Tabela 5.14.

Tabela 5.12: Efeitos obtidos para a viabilidade das células na fase média exponencial (V_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo proveniente de meio Grace + 10% de SFB.

	Efeitos (%)	Desvio Padrão	t(2)	P
Média*	78,79	9,57	8,22	0,014
(1) Extrato de levedura (L)	-7,44	9,00	-0,82	0,495
Extrato de levedura (Q)	-0,169	9,92	-0,02	0,987
(2) CPSL (L)*	-31,66	9,00	-3,51	0,072
CPSL (Q)	1,60	9,91	0,16	0,886
(3) SFB (L)*	48,43	9,00	5,38	0,033
SFB (Q)*	-29,55	9,23	-3,20	0,085
1 (L) x 2 (L)	4,75	11,75	0,40	0,725
1 (L) x 3 (L)	0,75	11,75	0,06	0,954
2 (L) x 3 (L)	34,25	11,75	2,19	0,100

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

A Tabela 5.13 sumariza os coeficientes do modelo proposto na descrição de V_{me} em função das variáveis extrato de levedura, CPSL e do SFB a 90% de confiança.

Tabela 5.13: Coeficientes de regressão para a concentração de V_{me} para o planejamento completo 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais. Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB, ignorados os efeitos não significativos.

	Coeficientes de Regressão	Desvio Padrão
Média*	79,50	5,47
(2) CPSL (L)*	-15,83	4,50
(3) SFB (L)*	24,22	4,50
SFB (Q)*	-14,77	4,61

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

A Equação 5.2 relaciona a V_{me} em função das variáveis codificadas para um nível de confiança de 90%.

$$C_{Vem} = 79,50 - 15,83 \cdot C_{CPSL} + 24,22 \cdot C_{SFB} - 14,77 \cdot C_{SFB}^2 \quad \text{Equação 5.2}$$

A validade deste modelo foi verificada pela Análise de Variância (ANOVA) apresentada na Tabela 5.14.

Tabela 5.14: A análise de variância (ANOVA) para a viabilidade das células na fase média exponencial (V_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo proveniente de meio Grace + 10% de SFB, ignorados os efeitos não significativos.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	14256,2	3	4752,1	15,7
Resíduos	3933,7	13	302,6	
Falta de Ajuste	3380,8	11		
Erro Puro	552,7	2		
Total	18189,9	16		

$F_{0,90;3;13} = 2,56$.

% variação explicada (R^2) = 80%.

Através da análise de variância verificou-se que o $F_{\text{calculado}}$ é 6,13 vezes maior que F_{tabelado} (igual a 2,56), o que mostra que o modelo de segunda ordem obtido para a V_{me} na faixa estudada é preditivo e estatisticamente significativo. Além disso, observa-se que 80% da variação é descrita pela regressão, ficando 20% com os resíduos.

A partir do modelo, foram construídas as superfícies de resposta de V_{me} em função da concentração de extrato de levedura e de CPSL, mantendo-se constante a concentração de SFB (Figura 5.16), assim como em função da concentração de extrato de levedura e de SFB, mantendo-se constante a concentração de CPSL (Figura 5.17) e V_{me} em função das concentrações de CPSL e de SFB, mantendo-se constante a concentração de extrato de levedura (Figura 5.18).

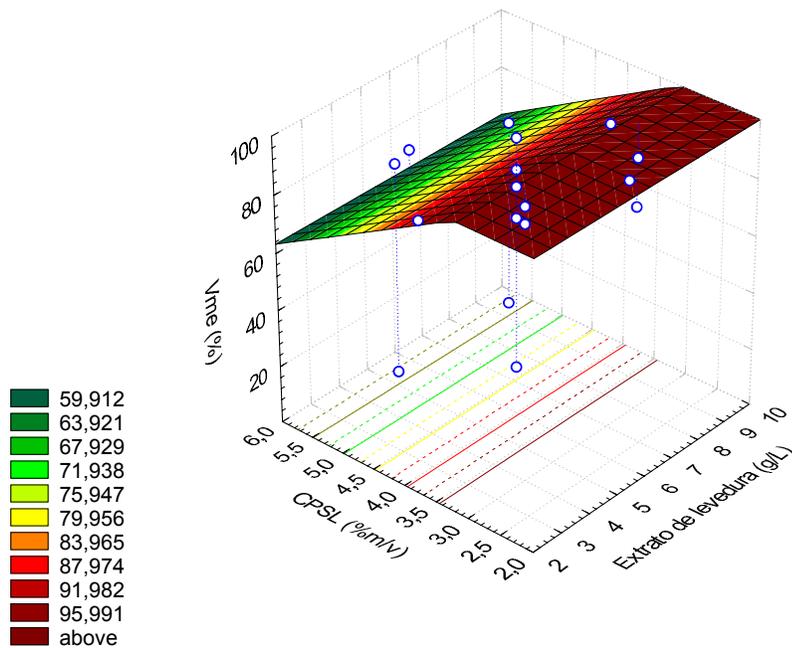


Figura 5.16: Superfície de resposta para V_{me} obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 a partir de inóculo proveniente do meio Grace acrescido de 10% de SFB, em função da concentração de CPSL e de extrato de levedura.

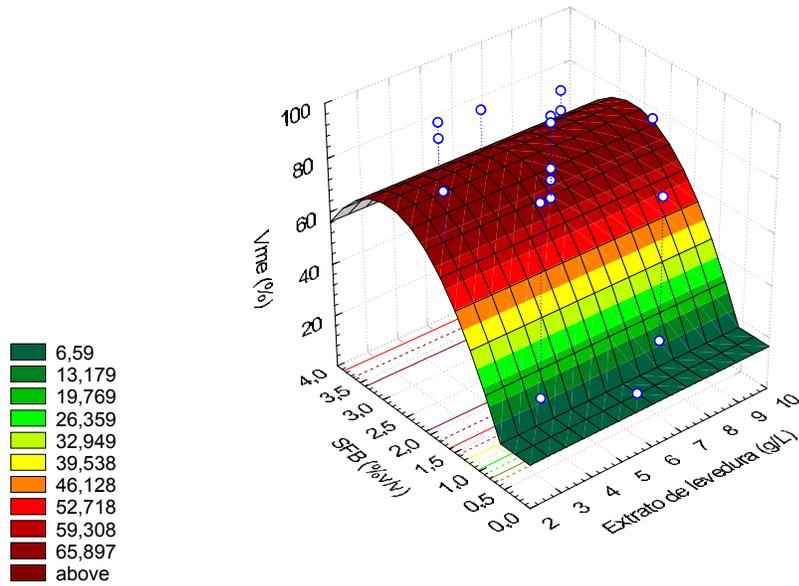


Figura 5.17: Superfície de resposta para V_{me} obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 a partir de inóculo proveniente do meio Grace acrescido de 10% de SFB, em função da concentração de SFB e de extrato de levedura.

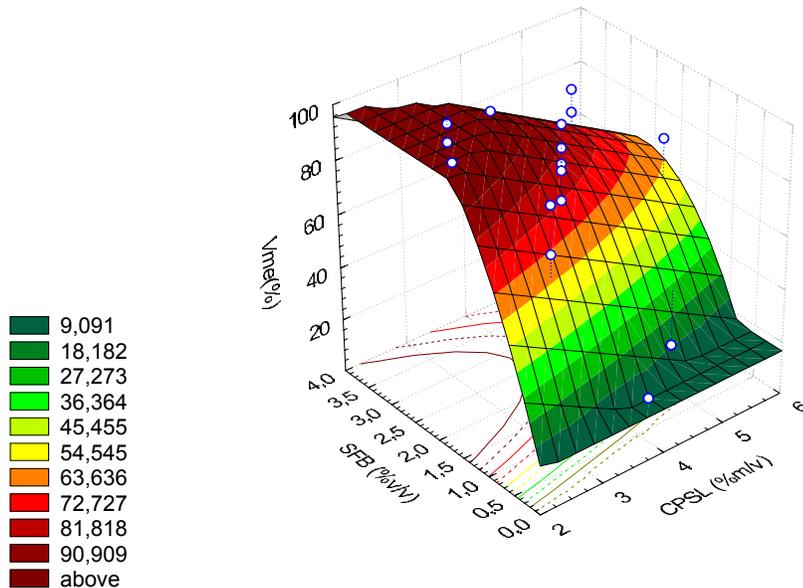


Figura 5.18: Superfície de resposta para V_{me} obtida com o planejamento fatorial completo 2^3 a partir de inóculo proveniente do meio Grace acrescido de 10% de SFB, em função da concentração de SFB e de CPSL.

Verifica-se nas Figuras 5.16 e 5.18, respectivamente, que a redução do percentual de CPSL e o aumento percentual de SFB a cerca de 3% em volume, empregando-se de 0 a 8g/L, levam ao aumento da viabilidade das células na fase média exponencial.

Na Tabela 5.15 são mostrados os desvios dos valores de V_{me} preditos pelo modelo em relação aos valores experimentais. Os erros obtidos ficaram na faixa de 0,60 a 35,2%.

Tabela 5.15: Valores experimentais e preditos pelo modelo para V_{me} para o planejamento completo 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais. Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.

Ensaio	V_{me} experimental	V_{me} predita	Desvio (%)
1	87	56	35,2
2	66	56	14,6
3	0	25	-
4	0	25	-
5	94	105	11,5
6	86	105	21,8
7	87	73	16,0
8	77	73	5,0
9	86	80	7,6
10	79	80	0,6
11	99	106	7,2
12	71	53	25,5
13	0	82	-
14	83	79	5,4
15	63	80	26,2
16	96	80	17,2
17	76	80	4,6

Análise similar à realizada para a concentração de células viáveis na fase média exponencial pode ser realizada para V_{me} no que se refere à predição do modelo proposto. Foram obtidos até 35% de desvio entre os dados previstos e os dados experimentais. Em vista disso, podemos concluir que o modelo descreve bem o fenômeno estudado em uma determinada faixa, ou ainda, se aumentarmos a rigorosidade da análise dos resultados concluiremos que temos uma regressão pouco significativa.

5.3.4. Análise Comparativa entre os Parâmetros Cinéticos Obtidos para os Ensaio do Planejamento 2³ (Inóculo Proveniente do Meio de Grace + 10% de SFB) e os Ensaio Controle em Meio Grace e Sf900II

Observou-se em todos os ensaios realizados neste planejamento alterações morfológicas acentuadas. Estas alterações caracterizavam-se pelo aumento do diâmetro da célula e a presença de granulações no citoplasma. Acredita-se que ao inocular uma cultura celular adaptada em meio Grace (acrescido de 10% em volume de SFB) em formulações nas quais a concentração de CPSL variou de 2,3 a 5,7%, o estresse celular gerado possa ter ocasionado morte celular, como mostrado na Tabela 5.16, para os ensaios 3, 4 e 13.

Tabela 5.16: Parâmetros cinéticos dos ensaios do planejamento 2³ (Inóculo proveniente de meio Grace) e dos ensaios controle em meio Grace e em meio Sf900II.

Ensaio	$\mu_{\text{máx}}^{(1)}$ (h ⁻¹)	$t_{\text{lag}}^{(2)}$ (d)	$t_d^{(3)}$ (h)	$t_s^{(4)}$ (d)	Viabilidade em t_s (%)
1	0,0223	3	31	7	97
2	0,0216	3	32	7	94
3*	-	-	-	-	-
4*	-	-	-	-	-
5	0,0216	2	32	7	97
6	0,0144	2	48	8	95
7	0,0182	3	38	7	93
8	0,0157	3	44	7	84
9	0,0266	4	26	7	96
10	0,0072	6	96	11	51
11	0,0128	1	54	8	99
12	0,0135	2	51	8	88
13*	-	-	-	-	-
14	0,0203	4	34	7	91
15	0,0090	4	77	7	86
16	0,0100	4	70	7	96
17	0,0035	4	198	9	72
C(1)	0,0182	<1	38	4	92
C(2)	0,0301	2	23	6	82

⁽¹⁾ Taxa máxima específica de crescimento celular; ⁽²⁾ Duração da fase *lag* de crescimento; ⁽³⁾ Tempo de duplicação celular; ⁽⁴⁾ Tempo para atingir a fase estacionária; C(1): Ensaio controle em meio Grace + 10% de SFB; C(2): Ensaio controle em Sf900II.* Inibição do crescimento celular.

A Tabela 5.16 mostra que no planejamento 2³ expandido em estrela cujos fatores analisados consistiam em concentrações entre 2,6 e 9,4g/L para o extrato de levedura, 2,3 e 5,7% para o CPSL e 0,3 a 3% de SFB, a taxa de crescimento específico variou de 0,0035 a 0,0301 h⁻¹. A fase *lag* de crescimento apresentou variação de 0 a 3 dias e o parâmetro tempo de duplicação variou entre 23 e 198 horas. Valores elevados no tempo de duplicação celular podem ter resultado da não adaptação das células a algumas formulações estudadas, ou ainda, da escassez de nutrientes essenciais para o desenvolvimento celular. Em geral, os ensaios atingiram a fase estacionária com pelo menos 84% de viabilidade celular, desconsiderando-se os ensaios que não evoluíram satisfatoriamente. Observa-se claramente que o melhor desempenho celular ocorreu com o emprego do meio sintético Sf900II, quanto ao $\mu_{\text{máx}}$, ao t_d e ao t_s . Entretanto a formulação 9 mostrou-se promissora em função dos mesmos parâmetros de crescimento. O comportamento cinético do ensaio 9 é mostrado no Apêndice A.

5.3.5. Análise da Cinética de Crescimento Celular para os Ensaio do Planejamento 2³ com 3 Pontos Centrais e 6 Axiais, a partir de Inóculo Mantido em Meio Grace + 10% de SFB

O emprego de inóculo proveniente do meio Grace acrescido de 10% em volume de SFB comprometeu a análise dos ensaios realizados neste planejamento, já que, diversas das cinéticas de crescimento obtidas não foram satisfatórias. Em vista disso, os dados cinéticos de crescimento e viabilidade celular, assim como, o consumo de nutrientes como a glicose e a evolução do lactato são apenas mostrados no Apêndice A.

A glicose, como já extensamente discutido, é o carboidrato preferencialmente consumido pelas células Sf9. A Figura 5.19 mostra a taxa de consumo deste nutriente nos ensaio do planejamento 2³ com inóculo oriundo do meio Grace acrescido de 10% de SFB, calculado para os dados da fase de crescimento exponencial.

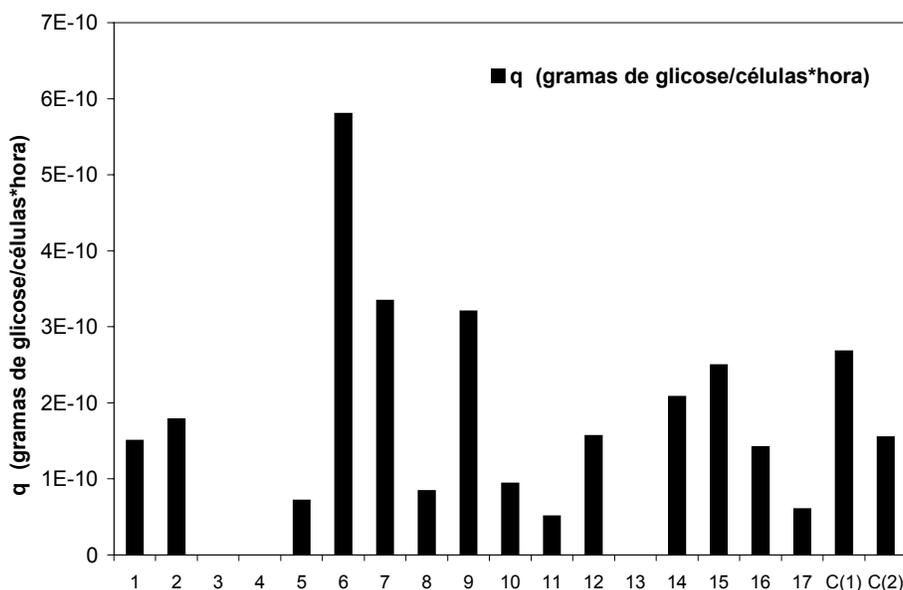


Figura 5.19: Consumo específico de glicose nos ensaios do planejamento fracionário 2^3 com inóculo oriundo do meio Grace acrescido de 10% de SFB. C(1): ensaio controle em meio Grace + 10% de SFB; C(2): ensaio controle em meio Sf900II.

Observa-se na Figura 5.19 que o maior consumo de glicose ocorreu no ensaio 6. Os demais ensaios apresentaram consumos específicos deste carboidrato próximos ao do ensaio controle em meio Grace com 10% de SFB. Os ensaios 3, 4 e 13 não apresentaram crescimento celular satisfatório, em vista disto este nutriente não foi consumido relevantemente.

A glutamina é o aminoácido consumido preferencialmente em situação de escassez de glicose (Ikonomou et al., 2003). A Figura 5.20 mostra o consumo específico deste nutriente durante a fase de crescimento exponencial.

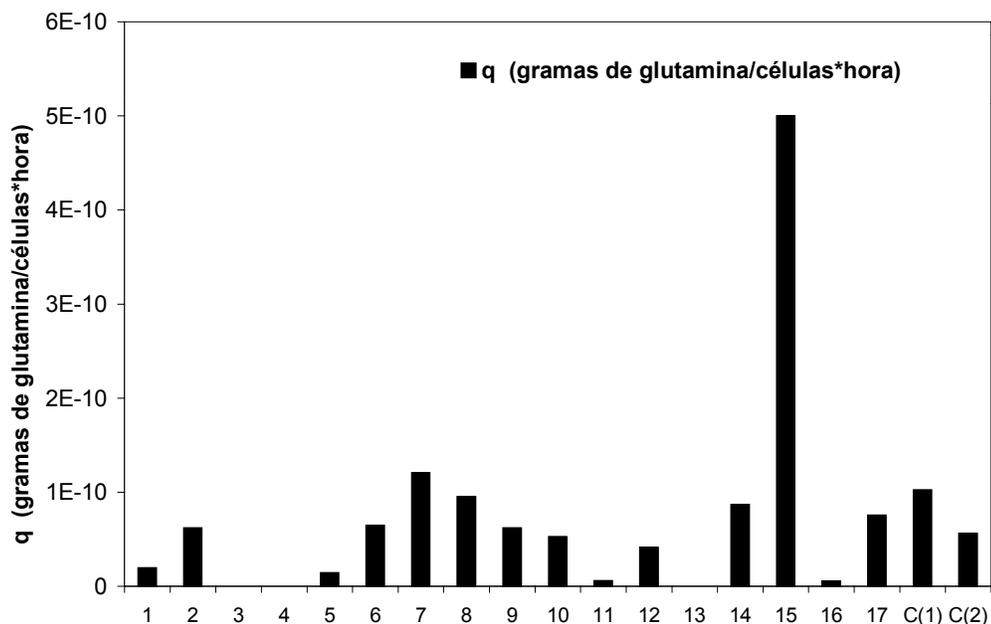


Figura 5.20: Consumo específico de glutamina nos ensaios do planejamento fracionário 2^3 com inóculo oriundo do meio Grace acrescido de 10% de SFB. C(1): ensaio controle em meio Grace + 10% de SFB; C(2): ensaio controle em meio Sf900II.

Segundo a Figura 5.20, a glutamina foi consumida em maior escala no ensaio 15 quando comparada aos outros ensaios do planejamento em estudo. Isto pode ter ocorrido possivelmente por um desvio de metabolismo ou mesmo pela ativação da rota de consumo de glutamina, já que em condições de baixa concentração de glicose no meio, o consumo deste aminoácido é intensificado (Öhman et al., 1995). Assim como observado para a glicose, os demais ensaios apresentaram comportamento similar ao ensaio controle em meio Grace com 10% de SFB.

Uma vez que os resultados deste planejamento completo foram, em geral, inferiores ao do planejamento fracionário realizado com inóculo preparado com meio Sf900II, foi realizado um novo planejamento completo, com inóculo preparado com meio sintético Sf900II.

5.4. Análise dos Efeitos das Concentrações de Extrato de Levedura, CPSL e do SFB sobre a Concentração e Viabilidade das Células Sf9 no Planejamento 2³. Inóculo Proveniente do Meio de Cultivo Livre de Soro Sf900II.

Uma análise sistemática do comportamento do crescimento das células de inseto da linhagem Sf9 foi realizada com relação aos aditivos do meio de cultivo extrato de levedura, CPSL e SFB através de um planejamento 2³ com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais, mas empregando inóculo proveniente do meio livre de soro Sf900II. Os níveis avaliados estão descritos na Tabela 5.4.

5.4.1. Análise dos Efeitos das Concentrações de Extrato de Levedura, CPSL e do SFB Sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Estacionária (X_{vs}), com Inóculo Proveniente do Meio Sf900II

A Tabela 5.17 mostra o planejamento fatorial completo e os resultados obtidos a partir da análise estatística. Observou-se que a concentração de células finais viáveis ao atingir-se a fase estacionária esteve entre 0 e $54,6 \times 10^5$ células/mL.

A concentração de células viáveis na fase média exponencial esteve entre 0 e $13,8 \times 10^5$ células/mL, enquanto que a viabilidade na fase média exponencial esteve entre 0 e 94%.

Tabela 5.17: Planejamento fatorial completo 2³ com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais. Inóculo oriundo do meio livre de soro Sf900II.

Ensaio	Variáveis independentes			Variáveis resposta		
	Ext. de lev. (g/L)	CPSL (%m/v)	SFB (%v/v)	X _{vs} ⁽¹⁾ (x 10 ⁵ cél. Viáveis/mL)	X _{me} ⁽²⁾ (x 10 ⁵ cél. viáveis/mL)	V _{me} ⁽³⁾ (%)
1	-1	-1	-1	35,2	12,9	91
2	+1	-1	-1	34,2	10,1	88
3	-1	+1	-1	37,5	10,1	91
4	+1	+1	-1	0,0	0,0	0
5	-1	-1	+1	31,1	13,4	92
6	+1	-1	+1	25,0	8,5	78
7	-1	+1	+1	27,5	9,8	85
8	+1	+1	+1	20,1	9,7	82
9*	-1,68	0	0	37,5	19,5	92
10	+1,68	0	0	14,0	5,4	62
11*	0	-1,68	0	54,6	13,2	94
12	0	+1,68	0	22,4	8,7	82
13	0	0	-1,68	33,1	7,9	90
14	0	0	+1,68	34,2	13,8	93
15	0	0	0	29,2	9,8	86
16	0	0	0	20,1	8,0	84
17	0	0	0	25,0	9,5	88
C(1)	-	-	10	14,7	8,1	96
C(2)	-	-	-	41,0	14,6	66

*Ensaio que obtiveram os melhores resultados quanto a crescimento e viabilidade celular; C(1): Ensaio controle em meio Grace+10% de SFB; C(2): Ensaio controle em Sf900II. ⁽¹⁾Concentração de células viáveis na fase estacionária; ⁽²⁾Concentração de células viáveis na fase média exponencial; ⁽³⁾ Viabilidade na fase média exponencial.

Os efeitos das variáveis extrato de levedura, CPSL e SFB sobre a concentração final de células viáveis na fase estacionária (X_{vs}) são mostrados na Tabela 5.18. Verifica-se que a variação da concentração de extrato de levedura,

da concentração de CPSL e da concentração de SFB apresenta efeitos significativos sobre a X_{vs} a 90% de intervalo de confiança no termo linear do aditivo extrato de levedura, no termo linear do CPSL e sob a interação entre estes dois fatores.

Tabela 5.18: Efeitos obtidos para a concentração de células viáveis na fase estacionária (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^3 com inóculo celular oriundo do meio Sf900II.

	Efeitos ($\times 10^5$ cél./mL)	Desvio Padrão	t(2)	P
Média*	25,22	2,62	9,61	0,0106
(1) Extrato de levedura (L)*	-13,41	2,47	-5,44	0,0322
Extrato de levedura (Q)	-2,33	2,71	-0,86	0,4799
(2) CPSL (L)*	-13,85	2,47	-10,31	0,0303
CPSL (Q)	6,69	2,71	2,46	0,1326
(3) SFB (L)	-0,19	2,46	-0,08	0,9432
SFB (Q)	3,25	2,71	1,19	0,3531
1 (L) x 2 (L)*	-9,45	3,22	-2,93	0,0992
1 (L) x 3 (L)	6,25	3,22	1,94	0,1918
2 (L) x 3 (L)	5,85	3,22	1,81	0,2109

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Observou-se que ao se eliminar os efeitos não significativos, o coeficiente de regressão sofreu um decréscimo de 81,2% para 65,5%, aumentando assim a contribuição dos resíduos. Segundo análise da variância (ANOVA) mostrada na Tabela 5.19 verificou-se que a razão entre $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ assume o valor 3,2, portanto o modelo proposto não é preditivo ou significativo na descrição de X_{vs} .

Tabela 5.19: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis finais na fase estacionária (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^3 a partir de inóculo celular oriundo do meio Sf900II.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	1446,38	3	482,11	8,24
Resíduos	760,62	13	58,5	
Falta de Ajuste	719,14	11		
Erro Puro	41,49	2		
Total	2206,97	16		

$$F_{0,90;3;13} = 2,56.$$

$$\% \text{ variação explicada } (R^2) = 65,5\%.$$

5.4.2. Análise dos Efeitos das Concentrações de Extrato de Levedura, CPSL e do SFB sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Média Exponencial (X_{me}), com Inóculo Proveniente do Meio Sf900II

Os efeitos dos fatores sobre X_{me} estão calculados na Tabela 5.20. De acordo com estes resultados verifica-se que a 90% de confiança, somente os fatores lineares das variáveis estudadas e a interação entre o concentrado e o SFB mostraram-se significativas.

Tabela 5.20: Efeitos obtidos para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo celular mantido em meio Sf900II.

	Efeitos ($\times 10^5$ cél./mL)	Desvio Padrão	t(2)	P
Média*	9,25	0,55	16,64	0,004
(1) Extrato de levedura (L)*	-6,09	0,52	-11,67	0,007
Extrato de levedura (Q)	1,36	0,57	2,38	0,14
(2) CPSL (L)*	-3,35	0,52	-6,42	0,023
CPSL (Q)	0,30	0,57	0,53	0,647
(3) SFB (L)	2,67	0,52	5,11	0,036
SFB (Q)	0,23	0,57	0,41	0,721
1 (L) x 2 (L)	-0,63	0,68	-0,92	0,456
1 (L) x 3 (L)	1,97	0,68	2,89	0,101
2 (L) x 3 (L)*	2,63	0,68	3,85	0,061

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Uma análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 5.21, foi realizada para verificar se um modelo de primeira ordem poderia ser proposto para descrever a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}), já que com a eliminação dos efeitos não significativos, o R^2 passa de 81% para 75,5%.

Tabela 5.21: A análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis finais na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo celular oriundo de Sf900II, ignorados os fatores não significativos.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	203,14	4	50,79	9,28
Resíduos	65,70	12	5,47	
Falta de Ajuste	63,84	10		
Erro Puro	1,86	2		
Total	268,84	16		

$F_{0,90;4;12} = 2,48$.

% variação explicada (R^2) = 75,5%.

A análise mostrou a que a razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ assumia o valor de 3,7, sendo o percentual de variação explicado pelo modelo de apenas 75,5% quando os efeitos não significativos a 90% de confiança são ignorados. Pode-se concluir com isso que o modelo proposto não é adequado para predizer a concentração de células viáveis na fase média exponencial.

5.4.3. Análise dos Efeitos das Concentrações de Extrato de Levedura, CPSL e do SFB sobre a Viabilidade das Células na Fase Média Exponencial (V_{me}), com Inóculo Proveniente do Meio Sf900II

Os efeitos das variáveis extrato de levedura, CPSL e SFB sobre a viabilidade das células na fase média exponencial (V_{me}) são mostrados na Tabela 5.22. Verifica-se que a variação da concentração de extrato de levedura, da concentração de CPSL e da concentração de SFB não apresentou efeitos significativos sobre a V_{me} a 90% de intervalo de confiança nos termos quadráticos do CPSL e do SFB.

Tabela 5.22: Efeitos obtidos para a viabilidade das células na fase média exponencial (V_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo celular oriundo do meio Sf900II.

	Efeitos (%)	Desvio Padrão	t(2)	P
Média*	93,27	2,39	38,88	0,00066
(1) Extrato de levedura (L)*	-23,66	2,25	-10,49	0,0089
Extrato de levedura (Q)*	-12,39	2,31	-5,36	0,0331
(2) CPSL (L)*	-16,29	2,25	-7,22	0,0186
CPSL (Q)*	-7,40	2,48	-2,98	0,0965
(3) SFB (L)*	10,56	2,25	4,68	0,0427
SFB (Q)	-4,92	2,48	-1,98	0,1860
1 (L) x 2 (L)*	-19,25	2,94	-6,53	0,0226
1 (L) x 3 (L)*	19,25	2,94	6,53	0,0226
2 (L) x 3 (L)*	21,25	2,94	7,21	0,0187

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

O valor do efeito do fator quadrático da variável independente SFB estudado sob a V_{me} não foi significativo dentro de 90% de confiança. Ignorando-se o fator quadrático do SFB observou-se a redução do coeficiente de correlação para 74%. Pela análise estatística mostrada na Tabela 5.23, verifica-se que o modelo proposto não é adequado para descrever a V_{me} , já que o $F_{calculado}$ (3,59) é apenas 1,4 vezes maior que o $F_{tabelado}$.

Tabela 5.23: Análise de variância (ANOVA) para a viabilidade das células na fase média exponencial (V_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^3 . Inóculo celular oriundo de Sf900II, ignorados os fatores não significativos.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	6078,89	7	868,4	3,59
Resíduos	2172,17	9	241,1	
Falta de Ajuste	2137,50	7		
Erro Puro	34,67	2		
Total	8251,06	16		

$F_{0,90;7;9} = 2,51$.

% variação explicada (R^2) = 74%.

5.4.4. Análise Qualitativa dos Efeitos das Concentrações de Extrato de Levedura, CPSL e do SFB sobre a Concentração de Células Viáveis na Fase Estacionária (X_{vs}), a Concentração de Células Viáveis na Fase Média Exponencial (X_{me}) e a Viabilidade na Fase Média Exponencial (V_{me})

A partir dos resultados obtidos para o planejamento fatorial 2^3 completo, com inóculo proveniente do meio livre de soro Sf900, não foi possível realizar uma análise quantitativa dos efeitos das variáveis independentes estudadas (extrato de levedura, CPSL e SFB) sobre as variáveis resposta X_{vs} , X_{me} e V_{me} . Em vista disso efetuou-se uma análise qualitativa comparativa, mostrada na Figura 5.21.

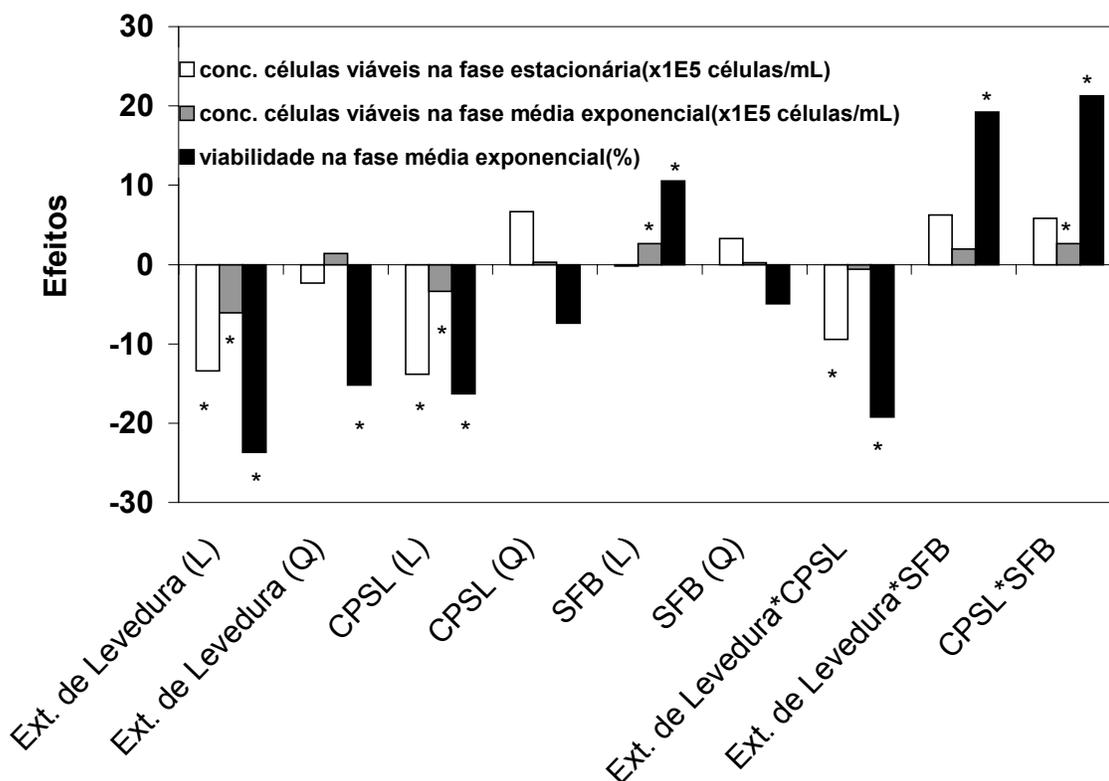


Figura 5.21: Efeitos das variáveis independentes sobre a concentração de células na fase média exponencial (X_{me}), na fase estacionária (X_{vs}) e a viabilidade celular na fase média exponencial (V_{me}) com a realização do planejamento fatorial 2^3 com 3 pontos centrais e 6 axiais, com inóculo proveniente do meio Sf900II. * Efeitos significativos a 90% de confiança.

Observa-se na Figura 5.21 que um aumento da concentração dos suplementos no meio de cultivo testados extrato de levedura e CPSL, proporcionam uma redução da concentração e da viabilidade das células Sf9 em geral. Isto indica que estas variáveis poderiam ter sua concentração reduzida em ensaios futuros. Enquanto que, o aumento da concentração de SFB e a interação deste fator com o CPSL promovem o aumento da X_{me} .

De forma geral, o estudo qualitativo dos suplementos extrato de levedura e concentrado protéico do soro de leite bovino (CPSL) realizado no planejamento fatorial completo 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais indicou que a redução

de suas concentrações no meio de cultivo pode proporcionar o aumento da concentração de células viáveis.

Entretanto, incrementos na concentração de SFB podem promover o aumento da viabilidade celular, ainda que seja possível obter-se crescimento celular satisfatório empregando-se concentrações reduzidas deste aditivo.

5.4.5. Análise da Cinética de Crescimento Celular para o Planejamento 2³ com 3 Pontos Centrais e 6 Pontos Axiais, a partir de Inóculo Obtido em Meio Livre de Soro (Sf900II)

A análise comparativa direta dos ensaios do planejamento 2³ com 3 pontos centrais e 6 axiais foi realizada para os ensaios que obtiveram melhores resultados quanto ao crescimento e viabilidade celular, ensaios 9 e 11.

As Figuras 5.22 e 5.23 mostram o crescimento e a viabilidade celular, o consumo de glicose e glutamina e a evolução de lactato durante 12 dias do cultivo para os ensaios 9 e 11, respectivamente.

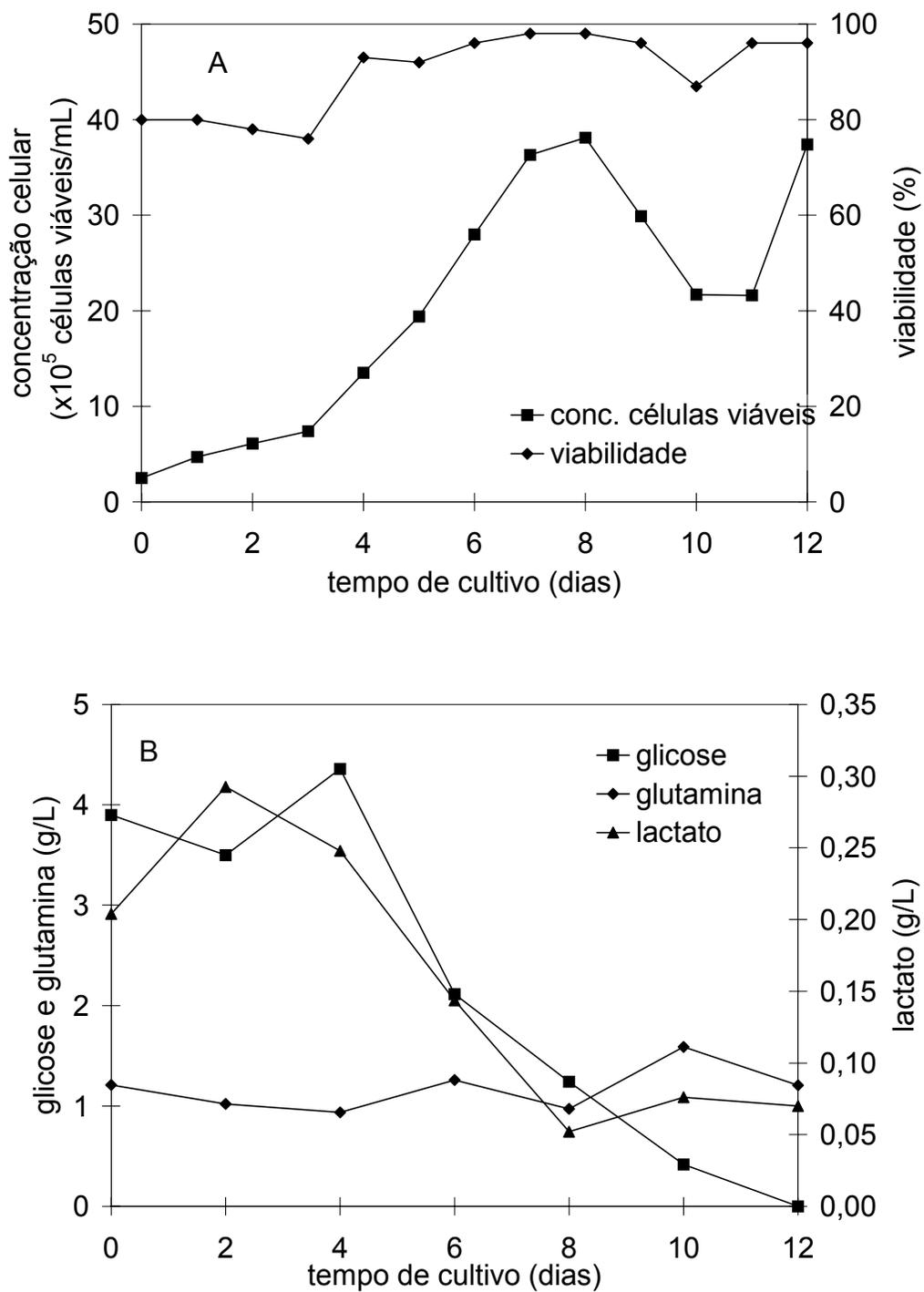


Figura 5.22: Parâmetros cinéticos para o ensaio 9 (2,7g/L de glicose; 2,6g/L de extrato de levedura; 0,1% de PF68; 4% de CPSL e 2% de SFB). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

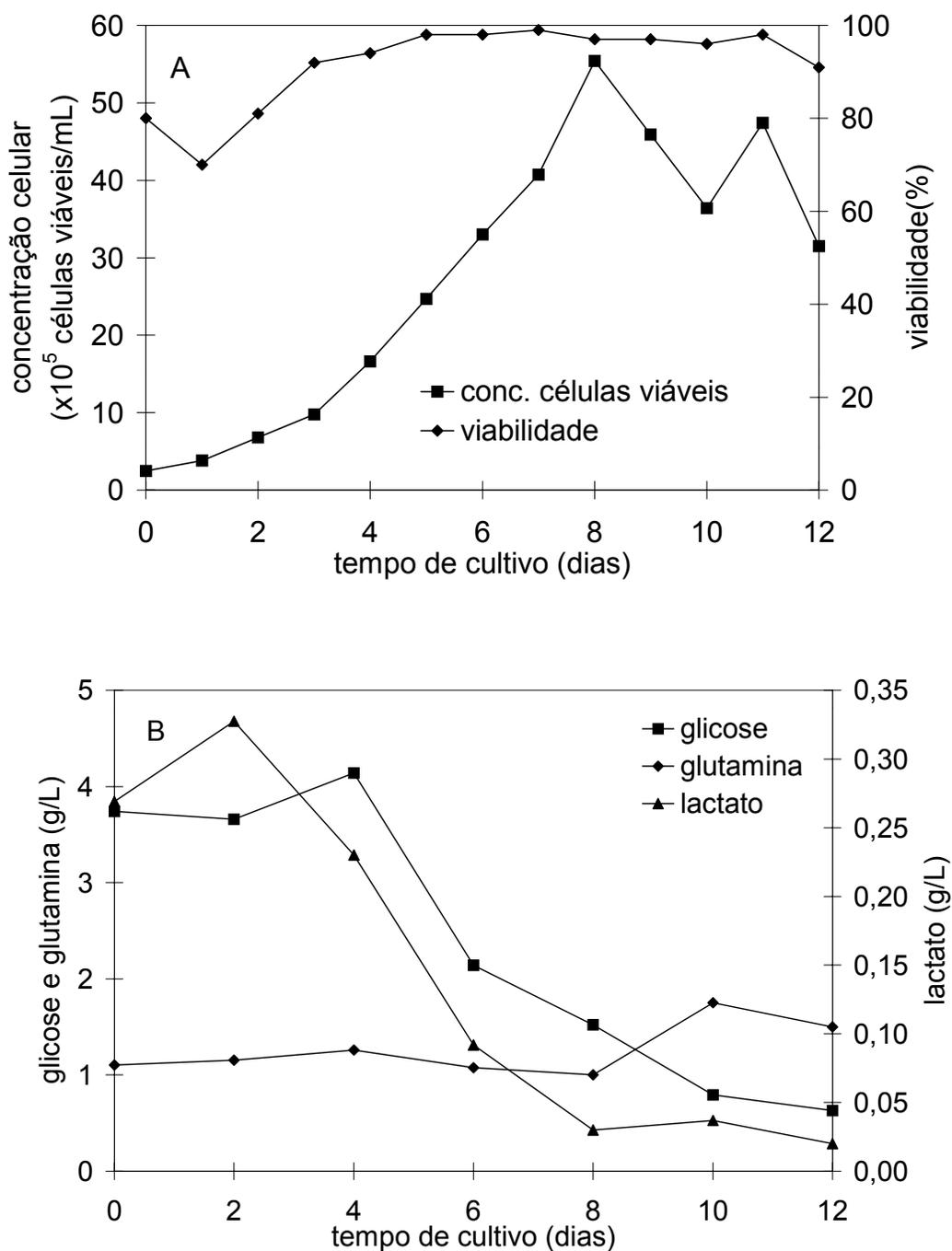


Figura 5.23: Parâmetros cinéticos para o ensaio 11 (2,7g/L de glicose; 6g/L de extrato de levedura; 0,1% de PF68; 2,3% de CPSL e 2% de SFB). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

Nota-se através das Figuras 5.22 e 5.23 que a viabilidade nos ensaios 9 e 11 manteve-se entre 80 e 100% após o 3 dia de cultivo, período que marca o final da fase *lag* de crescimento e início da fase de crescimento exponencial. Nesta fase de crescimento é imprescindível que a cultura mantenha elevada viabilidade para ser passível de infecção por baculovírus. Ambos os ensaios atingiram concentração celular superior a 30×10^5 células viáveis/mL, concentração considerada plenamente satisfatória quando comparada ao ensaio controle em meio Grace acrescido de 10% de SFB ($14,5 \times 10^5$ células viáveis/mL), realizado simultaneamente aos demais ensaios deste planejamento e mostrado no Apêndice A. Optou-se por não realizar uma comparação direta dos dados de crescimento celular dos ensaios 9 e 11, em relação ao ensaio controle em meio Sf900II, já que as células Sf9 no meio de composição definida (Sf900II) não atingiram a concentração celular comumente obtida, entre 5 e 10×10^6 células viáveis/mL. Este fato pode ter sido ocasionado por erro experimental na realização do ensaio ou ainda pela contaminação branda da cultura por leveduras ou agentes de difícil detecção como micoplasmas.

O consumo de nutrientes foi similar nos ensaios 9 e 11, como mostrado nas Figuras 5.22 e 5.23. A glicose foi consumida durante todo o tempo de cultivo. A glutamina foi pouco consumida pelas células Sf9 nas formulações de meio de cultivo testadas. O lactato é formado durante os 2 primeiros dias do cultivo. Este metabólito passa então a ser consumido simultaneamente à glicose até 8º dia, quando sua produção é reiniciada.

5.4.6. Análise Comparativa entre os Parâmetros Cinéticos Obtidos para os Ensaio do Planejamento 2³ (Inóculo Proveniente do Meio Sf900II) e os Ensaio Controle em Meio Grace e Sf900II

Com a finalidade de caracterizar adequadamente os ensaios realizados no planejamento fracionário 2³ com inóculo celular oriundo do meio livre de soro

Sf900II, foram calculados parâmetros cinéticos como a taxa máxima de crescimento específico ($\mu_{\text{máx}}$) e o tempo de duplicação celular, dentre outros.

A Tabela 5.24 mostra os parâmetros cinéticos obtidos para os ensaios deste planejamento. Não foi possível obter os parâmetros cinéticos para a formulação 4, já que neste ensaio ocorreu a inibição do crescimento celular.

Tabela 5.24: Parâmetros cinéticos dos ensaios do planejamento 2³, dos ensaios controle em meio Grace e em meio Sf900II. Inóculo proveniente de meio Sf900II.

Ensaio	$\mu_{\text{máx}}^{(1)}$ (h ⁻¹)	$t_{\text{lag}}^{(2)}$ (d)	$t_d^{(3)}$ (h)	$t_s^{(4)}$ (d)	Viabilidade em t_s (%)
1	0,0147	<1	47	7	91
2	0,0141	3	49	10	88
3	0,0198	3	35	8	91
4	-	-	-	-	-
5	0,0165	<1	42	6	92
6	0,0216	3	32	7	78
7	0,0182	3	38	7	85
8	0,0187	3	37	8	82
9*	0,0150	<1	46	7	92
10	0,0141	4	49	10	62
11*	0,0154	<1	45	8	94
12	0,0154	3	45	8	82
13	0,0138	2	50	9	90
14	0,0138	1	50	8	93
15	0,0169	3	41	8	86
16	0,0141	3	49	8	84
17	0,0133	<1	52	7	88
C(1)	0,0231	1	30	4	90
C(2)	0,0198	1	35	8	86

C(1): Ensaio controle em meio Grace + 10% de SFB; C(2): Ensaio controle em Sf900II.

*Ensaio que apresentaram crescimento celular pelo menos 2,5 vezes maior que o ensaio controle C(1). ⁽¹⁾ Taxa máxima específica de crescimento celular; ⁽²⁾ Duração da fase lag de crescimento; ⁽³⁾ Tempo de duplicação celular; ⁽⁴⁾ Tempo para atingir a fase estacionária.

Ressalta-se que o ensaio controle em meio Sf900II apresentou um desvio do comportamento esperado, uma vez que o tempo de duplicação foi de 41 horas. Entretanto, verificou-se em experimentos anteriores que as células Sf9 apresentam um crescimento celular ótimo quando cultivadas neste meio. O fato desta cultura ter apresentado resultados significativamente distintos dos comumente verificados, embora não elucidado, pode estar vinculado, por exemplo, a uma contaminação por micoplasma. Não obstante, observou-se que no ensaio controle em meio Sf900II ocorre a produção acentuada de lactato, mostrada no Apêndice A. A Tabela 5.24 mostra que a taxa de crescimento específico variou entre 0,0133 e 0,0231 h⁻¹. Assim como o tempo de duplicação variou de 30 a 52 horas. Nota-se através destes resultados que a adição de suplementos como o CPSL ao meio Grace de cultivo proporciona incrementos no tempo de duplicação celular. A fase *lag* de crescimento celular também sofreu acréscimo, variando de inferior a 24 horas a 3 dias, sendo que no ensaio controle em meio Grace com 10% de SFB este parâmetro é menor que 24 horas.

Notou-se que no planejamento 2³ com inóculo proveniente de meio Grace e no planejamento 2³ com inóculo proveniente do meio Sf900II os ensaios 4 apresentaram inibição do crescimento celular. Estes ensaios possuíam em sua formulação 8g/L de extrato de levedura, 5% de CPSL e 1% de SFB, além de 0,1% de PF68 e 2,7g/L de glicose. Contudo, o planejamento fatorial fracionário preliminar possui uma formulação equivalente, ensaio 4, que apresentou crescimento celular satisfatório. A diferença existente entre o ensaio 4 do planejamento preliminar e os ensaios 4 dos planejamentos 2³ foi a ausência do tensoativo Pluronic F68. Supõe-se com isso que o PF68 possa ter atuado no metabolismo das células, não apresentando somente a função protetora da membrana celular.

As Figuras 5.24 e a Figura 5.25 mostram, respectivamente os consumos específicos de glicose e glutamina no planejamento 2³ com inóculo proveniente do meio Sf900II.

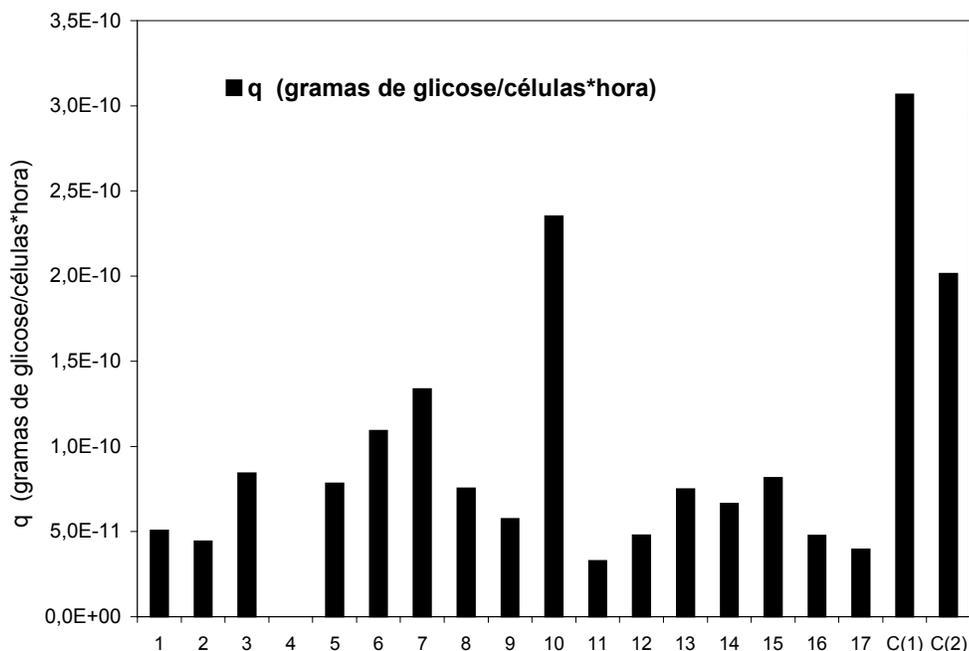


Figura 5.24: Consumo específico de glicose nos ensaios do planejamento completo 2^3 com inóculo oriundo do meio Sf900II.

Observa-se na Figura 5.24 que o maior consumo de glicose ocorreu no ensaio controle em meio Grace com 10% de SFB, seguido pelo ensaio 10. A replicata do ponto central correspondente ao ensaio 15 mostrou diferença no consumo específico de glicose em relação às demais replicatas, ensaios 16 e 17, mostrando, como em outros pontos deste estudo, que a reprodutibilidade dos ensaios nem sempre é efetivamente alcançada, o que justifica em face dos múltiplos fatores que podem afetar o desempenho celular.

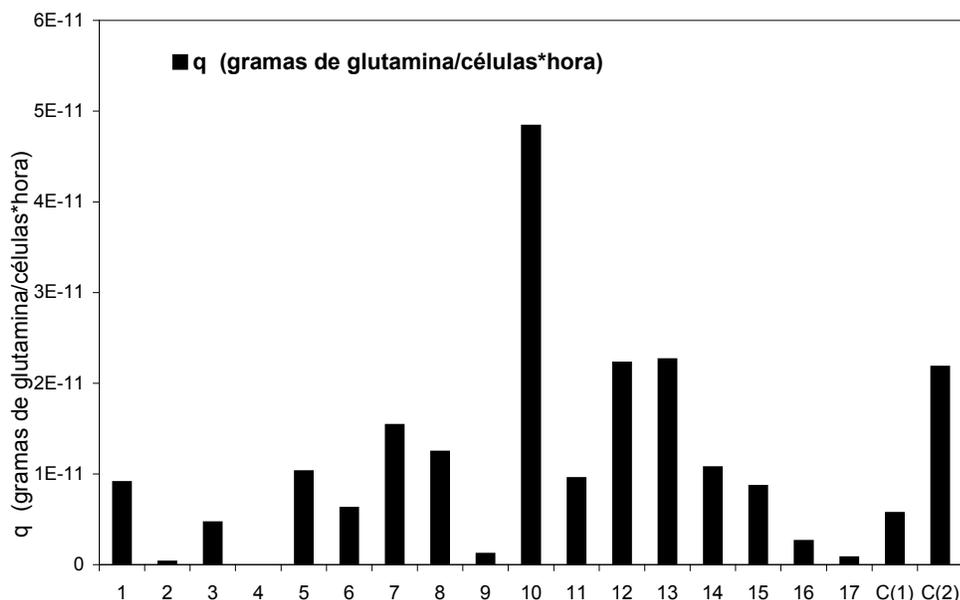


Figura 5.25: Consumo específico de glutamina nos ensaios do planejamento fracionário 2^3 com inóculo oriundo do meio Sf900II.

Similarmente aos demais experimentos, as células Sf9 mesmo em formulações distintas de meio de cultivo consumiram glutamina em baixa escala. O ensaio 10 consumiu simultaneamente glicose e este aminoácido durante o crescimento exponencial em taxas superiores às verificadas nos outros ensaios, inclusive aos ensaios controle. Entretanto, o decaimento deste aminoácido nas cinéticas de consumo de nutrientes e evolução de lactato apresenta queda pouco acentuada, como mostrado no Apêndice A, para todos os ensaios deste planejamento.

Observou-se durante a realização dos planejamentos completos 2^3 , que o emprego de inóculo celular proveniente do meio livre de soro (Sf900II) minimizou as alterações morfológicas nas células Sf9, proporcionou maior crescimento e manteve a viabilidade elevada por mais tempo.

5.5. Análise dos Efeitos das Concentrações do Permeado Liofilizado e do SFB sobre a Concentração e Viabilidade das Células Sf9 no Planejamento 2², com Inóculo Proveniente do Meio de Grace +10% de SFB

Com o objetivo de continuar a otimização do meio de cultivo para células de inseto da linhagem Sf9 foi realizado um planejamento fatorial completo 2² com 3 pontos centrais, buscando-se estudar sistematicamente a influência de proteínas de menor massa molecular (<10 kDa) presentes no permeado do soro de leite bovino liofilizado. A concentração de extrato de levedura, glicose e de Pluronic F68 foram mantidas constante (8g/L, 2,7g/L e 0,1% respectivamente). As variáveis estudadas foram concentração do permeado liofilizado e de SFB sobre a concentração final de células viáveis na fase estacionária (X_{vs}), a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}), a viabilidade na fase média exponencial (V_{me}) e seus níveis de variação estão apresentados na Tabela 5.25.

Com o intuito de avaliar as possíveis alterações metabólicas observadas nas células Sf9 referentes à proliferação celular, foram realizados dois planejamentos fatoriais 2² completos com 3 pontos centrais, a partir de inóculo celular proveniente do meio Grace acrescido de 10% em volume de SFB e do meio livre de soro Sf900II.

Tabela 5.25: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2² com 3 pontos centrais.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Permeado liofilizado (%m/v)	0	2,5	5
SFB (% v/v)	1	2	3

Os níveis dos fatores mostrados na Tabela 5.25 foram escolhidos baseados parcialmente nos resultados obtidos no planejamento fracionário 2⁵⁻¹, no qual o

derivado de leite CPSL apresentou a faixa de concentração estudada entre 0 e 5%, embora o permeado liofilizado tenha características muito distintas do CPSL.

5.5.1. Análise dos Efeitos das Concentrações do Permeado Liofilizado e do SFB sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Estacionária (X_{vs}), com Inóculo Proveniente do Meio de Grace +10% de SFB

A Tabela 5.26 mostra o planejamento fatorial completo 2^2 e os resultados obtidos a partir da análise estatística. Observou-se que a concentração de células finais viáveis na fase estacionária esteve entre 0 e $34,1 \times 10^5$ células/mL. A concentração de células viáveis na fase média exponencial esteve entre 0 e $13,4 \times 10^5$ células/mL, enquanto a viabilidade na fase média exponencial manteve-se entre 0 e 96%.

Ao empregar-se proteínas de menor massa molecular presentes no permeado liofilizado do leite bovino observou-se a inibição do crescimento celular nos ensaios que apresentaram concentração deste aditivo em 5% m/v. O acréscimo na concentração de SFB de 1 a 3 %v/v e a interação entre os fatores estudados não apresentaram efeitos significativos sobre a X_{vs} . A percentagem de permeado liofilizado apresentou efeito estatisticamente significativo a 95%, de confiança proporcionando aumento da concentração final de células Sf9 viáveis na fase estacionária para as faixas de concentração testadas. A validade do modelo foi verificada pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 5.28.

Tabela 5.26: Planejamento fatorial completo 2² com 3 pontos centrais. Inóculo celular obtido do meio Grace +10% de SFB.

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis resposta		
	Permeado liofilizado (%m/v)	SFB (%v/v)	$X_{vs}^{(1)}$ (x 10 ⁵ cél. viáveis/mL)	$X_{me}^{(2)}$ (x 10 ⁵ cél. Viáveis/mL)	$V_{me}^{(3)}$ (%)
1*	-1	-1	33,1	13,4	95
2	+1	-1	0,0	0,0	0
3*	-1	+1	34,1	11,2	96
4	+1	+1	0,0	0,0	0
5	0	0	6,4	3,5	90
6	0	0	6,9	3,6	91
7	0	0	6,2	3,4	86
C(1)	-	10	10,4	9,1	88
C(2)	-	-	78,0	17,0	95

C(1): Ensaio controle em meio Grace + 10% de SFB; C(2): Ensaio controle em meio livre de soro (Sf900II). *Ensaio de melhor desempenho quanto a concentração celular. ⁽¹⁾Concentração de células viáveis na fase estacionária; ⁽²⁾Concentração de células viáveis na fase média exponencial; ⁽³⁾ Viabilidade na fase média exponencial.

Através da análise estatística realizada, mostrada na Tabela 5.27, pode-se verificar que apenas a concentração do permeado liofilizado mostrou efeito significativo sobre a concentração final de células viáveis na fase estacionária (X_{vs}).

Tabela 5.27: Efeitos obtidos para a concentração final de células viáveis na fase estacionária (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Grace +10% de SFB.

	Efeitos ($\times 10^5$ cél./mL)	Desvio Padrão	t(2)	p
Média*	12,39	0,14	90,88	0,0001
(1) Permeado liofilizado*	-33,60	0,36	-93,19	0,0001
(2) SFB	0,50	0,36	1,38	0,2998
(1) x (2)	-0,50	0,36	1,38	0,2998

*fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança.

Pela análise de variância verificou-se que o $F_{\text{calculado}}$ é 4,6 vezes maior que o F_{tabelado} (igual a 6,61), o que mostra que o modelo de primeira ordem obtido para a X_{vs} na faixa estudada é preditivo e estatisticamente significativo. Além disso, observa-se que 86% da variação é descrita pela regressão, restando apenas 14% de contribuição dos resíduos.

Tabela 5.28: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB, ignorados os efeitos não significativos.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	1128,96	1	1128,96	30,9
Resíduos	182,629	5	36,53	
Falta de Ajuste	182,369	3	60,79	
Erro Puro	0,26	2	0,13	
Total	1311,589	6	218,59	

$F_{0,95;1;5} = 6,61$.

% variação explicada (R^2) = 86%.

O termo de primeira ordem para a variável independente permeado liofilizado apresentou efeito significativo sobre X_{vs} a 95% de confiança possibilitando a proposição de um modelo de primeira ordem que descrevesse o crescimento de células viáveis Sf9 na fase estacionária. A Tabela 5.29 apresenta os coeficientes de regressão para este modelo.

Tabela 5.29: Coeficientes de regressão para a concentração de X_{vs} para o planejamento completo 2^2 com 3 pontos centrais.

	Coeficientes De Regressão	Desvio Padrão
Média*	12,39	0,14
Permeado liofilizado*	-16,80	0,18

*fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança.

A Equação 5.3 relaciona X_{vs} em função da variável codificada para um nível de confiança de 95%.

$$C_{x_{em}} = 12,39 - 16,8 \cdot C_{PL} \quad \text{Equação 5.3}$$

A partir do modelo proposto foi construída a superfície de resposta de X_{vs} em função das variáveis permeado liofilizado e SFB, mostrada na Figura 5.26. Observa-se que a redução da concentração de permeado liofilizado no meio de cultivo resulta no aumento da concentração de células viáveis finais na fase estacionária, possivelmente decorrente de inibição catabólica por lactato, composto abundante neste suplemento.

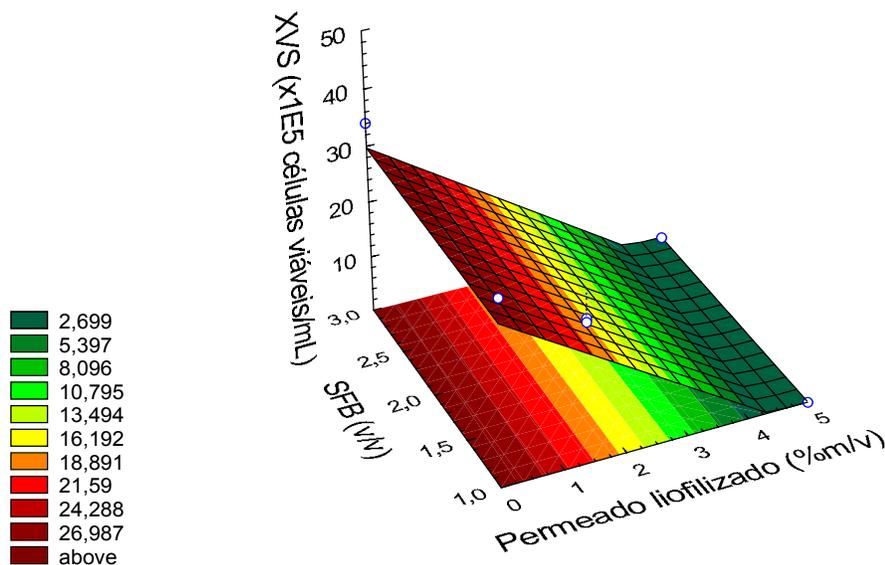


Figura 5.26: Superfície de resposta para a concentração de células viáveis finais na fase estacionária obtida com o planejamento fatorial completo 2^2 com 3 pontos centrais. Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.

A Tabela 5.30 mostra os desvios dos valores de X_{vs} preditos pelo modelo em relação aos valores experimentais. Observa-se contudo, que os erros obtidos em relação aos ensaios referentes aos pontos centrais estão acima de 79% na previsão de X_{vs} , indicando como em casos anteriores que a capacidade preditiva do modelo não é adequada.

Tabela 5.30: Desvios dos valores de X_{vs} preditos pelo modelo em relação aos valores experimentais para o planejamento completo 2^2 com 3 pontos centrais. Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.

Ensaio	X_{vs} experimental	X_{vs} predita	Desvio (%)
1	33,1	29,2	11,8
2	0,0	-	-
3	34,1	29,2	14,4
4	0,0	-	-
5	6,4	12,4	93,6
6	6,9	12,4	79,8
7	6,2	12,4	99,8

Os valores dos coeficientes de correlação (0,86) e do coeficiente do teste F (valor calculado 4,7 vezes maior que o valor tabelado) mostraram que o modelo é significativo estatisticamente para o sistema de dados obtidos. No entanto, os desvios observados entre os dados experimentais e os dados previstos pelo modelo foram muito elevados, principalmente os referentes aos ensaios realizados no ponto central. Isto mostra que na prática o modelo gerado não é confiável para prever a variável resposta avaliada (X_{vs}), possivelmente em razão da complexidade e do número elevado de variáveis envolvidas no sistema biológico estudado.

5.5.2. Análise dos Efeitos das Concentrações do Permeado Liofilizado e do SFB sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Média Exponencial (X_{me}), com Inóculo Proveniente do Meio de Grace +10% de SFB

A análise estatística dos efeitos do permeado liofilizado e do SFB sob X_{me} é mostrada na Tabela 5.31, excluindo-se os efeitos não significativos com $R^2=93\%$. Embora a contribuição dos resíduos seja de apenas 7%, a relação $F_{calculado}/F_{tabelado}$ foi de 1,4 como observado na análise estatística (ANOVA), Tabela 5.32. Em vista

disso não se obteve evidência estatística significativa suficiente para fazer a suposição da existência de relação linear entre as variáveis estudadas.

Tabela 5.31: Efeitos obtidos para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.

	Efeitos ($\times 10^5$ cél./mL)	Desvio Padrão	t(2)	P
Média*	5,01	0,038	132,67	0,00006
(1) Permeado liofilizado*	-12,30	0,100	-123,00	0,00007
(2) SFB*	-1,10	0,100	-11,00	0,00816
(1) x (2)*	1,10	0,100	11,00	0,00816

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Tabela 5.32: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo Grace + 10% de SFB, ignorados os efeitos não significativos.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	153,71	3	51,24	12,75
Resíduos	12,06	3	4,02	
Falta de Ajuste	12,04	1		
Erro Puro	0,02	2		
Total	167,77	6		

$F_{0,90;3;3} = 9,28$.

% variação explicada (R^2) = 93%.

5.5.3. Análise dos Efeitos das Concentrações de Permeado Liofilizado e SFB sobre a Viabilidade das Células Sf9 na Fase Média de Crescimento Exponencial (V_{me}), com Inóculo Proveniente do Meio de Grace +10% de SFB

No estudo realizado dos efeitos das variáveis independentes (permeado liofilizado e SFB) sob a V_{me} , mostrados na Tabela 5.33, o coeficiente de correlação do modelo (0,75) e o teste F (valor calculado 2,35 vezes maior que o valor tabelado) não exibiram altos valores a 90% de confiança. A análise estatística (ANOVA), mostrada na Tabela 5.34, permite concluir que não foi observada uma regressão significativa.

Tabela 5.33: Efeitos obtidos para a viabilidade das células na fase média exponencial (V_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.

	Efeitos (%)	Desvio Padrão	t(2)	P
Média*	65,43	1,00	65,43	0,0002
(1) Permeado liofilizado*	-95,50	2,64	-36,09	0,0008
(2) SFB	0,50	2,64	0,18	0,8675
(1) x (2)	-0,50	2,64	-0,18	0,8675

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Tabela 5.34: A análise de variância (ANOVA) para a viabilidade das células na fase média exponencial (V_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB, ignorados os efeitos não significativos.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	9120,3	1	9120,25	15,56
Resíduos	2931,5	5	586,29	
Falta de Ajuste	2917,5	3		
Erro Puro	14,0	2		
Total	12051,7	6		

$F_{0,90;1;5} = 2,35$.

% variação explicada (R^2) = 75%.

Para a realização de uma avaliação mais profunda dos ensaios realizados no planejamento fatorial 2^2 com 3 pontos centrais, foram comparados os parâmetros cinéticos obtidos para os ensaios controle em meio basal acrescido de SFB e em meio livre de soro. Estes parâmetros são mostrados na Tabela 5.35.

5.5.4. Comparação entre os Ensaios do Planejamento Fatorial Completo 2^2 e os Ensaios Controle em Meio Grace com 10 % de SFB e em Meio Livre de Soro Sf900II

Com o intuito de se realizar uma análise sistemática do desempenho das células Sf9 em formulações que apresentavam o permeado do soro de leite liofilizado foram calculados os parâmetros mostrados na A Tabela 5.35.

Tabela 5.35: Comparação dos parâmetros cinéticos das células Sf9 em suspensão (concentração do inóculo de $2,5 \times 10^5$ células viáveis/mL) obtidos no planejamento fatorial completo 2^2 e nos meios controles Grace contendo 10% de SFB e Sf900II.

Ensaio	$\mu_{\text{máx}}^{(1)}$ (h^{-1})	$t_{\text{lag}}^{(2)}$ (d)	$t_d^{(3)}$ (h)	$t_s^{(4)}$ (d)	Viabilidade em t_s (%)
1*	0,0128	<1	54	8	99
2**	-	-	-	-	-
3*	0,0169	1	41	8	95
4**	-	-	-	-	-
5	0,0113	2	61	5	95
6	0,0117	2	59	5	92
7	0,0115	1	60	4	92
C ⁽¹⁾	0,0130	2	53	7	91
C ⁽²⁾	0,0346	3	20	8	95

C(1): Ensaio controle em meio Grace + 10% de SFB; C(2): Ensaio controle em meio livre de soro (Sf900II). ⁽¹⁾ Taxa máxima específica de crescimento celular; ⁽²⁾ Duração da fase *lag* de crescimento; ⁽³⁾ Tempo de duplicação celular; ⁽⁴⁾ Tempo para atingir a fase estacionária; *Ensaio que apresentou melhores desempenhos quando a crescimento e viabilidade celular. **Inibição do crescimento celular.

Observa-se na Tabela 5.35 a inibição do crescimento celular nos ensaios 2 e 4, cuja formulação de meio de cultivo possuía 5% m/v do permeado liofilizado. Verifica-se através destes resultados a impossibilidade do emprego deste suplemento em concentrações iguais ou superiores a 5%.

A análise destes dados indica que o emprego do permeado liofilizado, na faixa estudada, não proporcionou aumento expressivo nas taxas específicas de crescimento celular das células Sf9, resultando elevados tempos de duplicação celular, que variaram de 41 a 60 horas. As taxas de crescimento específico entre os ensaios do planejamento variaram de 0,0115 a $0,0346 \text{h}^{-1}$, enquanto o tempo para se atingir a fase estacionária variou de 4 a 8 dias. No tocante à duração da fase *lag* de crescimento celular observou-se uma variação de 0 a 2 dias. Com relação à viabilidade celular no início da fase estacionária, observou-se variações de 92 a 99%.

Embora o emprego do permeado liofilizado não tenha proporcionado a obtenção de elevada concentração celular, as formulações de meio de cultivo que possuíam este suplemento em concentração de até 2,5% m/v viabilizaram o cultivo das células Sf9 em meio de cultura Grace com uma redução de 70% do SFB.

5.5.5. Análise do Consumo de Glicose, Glutamina e a Formação de Lactato nos Ensaio do Planejamento Completo 2², com Inóculo Proveniente do Meio de Grace + 10% de SFB

Foi realizado neste planejamento um estudo sistemático dos fatores relevantes ao metabolismo celular, o consumo de glicose e de glutamina e a formação de lactato, com vistas às formulações de meios de cultivo que possuem proteínas de massa molecular inferior a 10kDa, além de lactose.

As Figuras 5.27 e 5.28 mostram os ensaios que resultaram em concentração celular pelo menos três vezes superior àquela obtida com o ensaio controle (em meio Grace acrescido de 10% em volume de SFB), quanto à concentração celular na fase estacionária. Os ensaios que apresentaram melhores resultados foram os ensaios 1 (2,7 g/L de glicose, 8g/L de extrato de levedura, 0,1% de Pluronic F68, 1% de SFB e 5% de permeado liofilizado) e 3 (2,7 g/L de glicose, 8g/L de extrato de levedura, 0,1% de Pluronic F68, 3% de SFB e 5% de permeado liofilizado) destacados na Tabela 5.36.

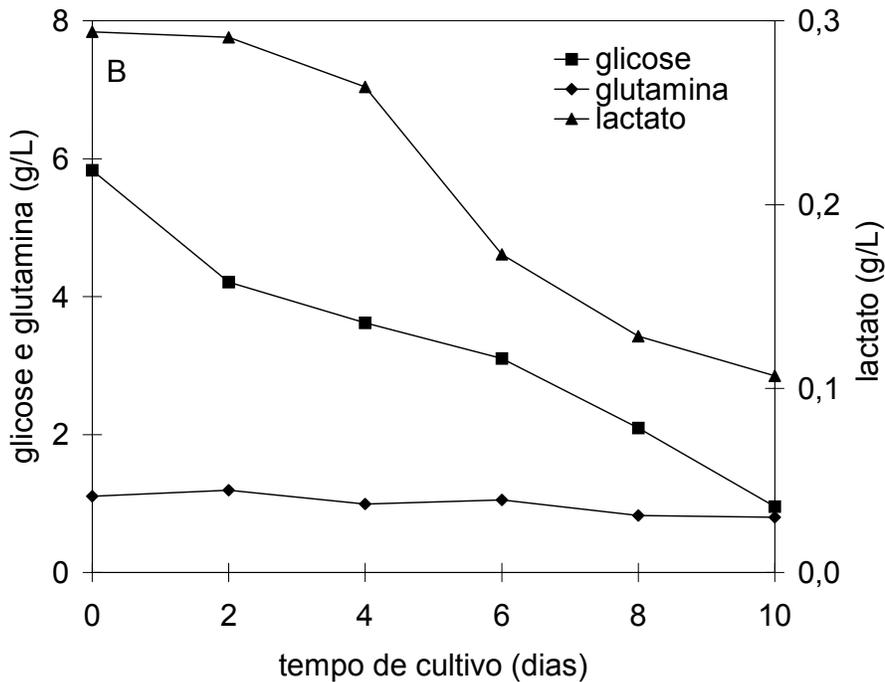
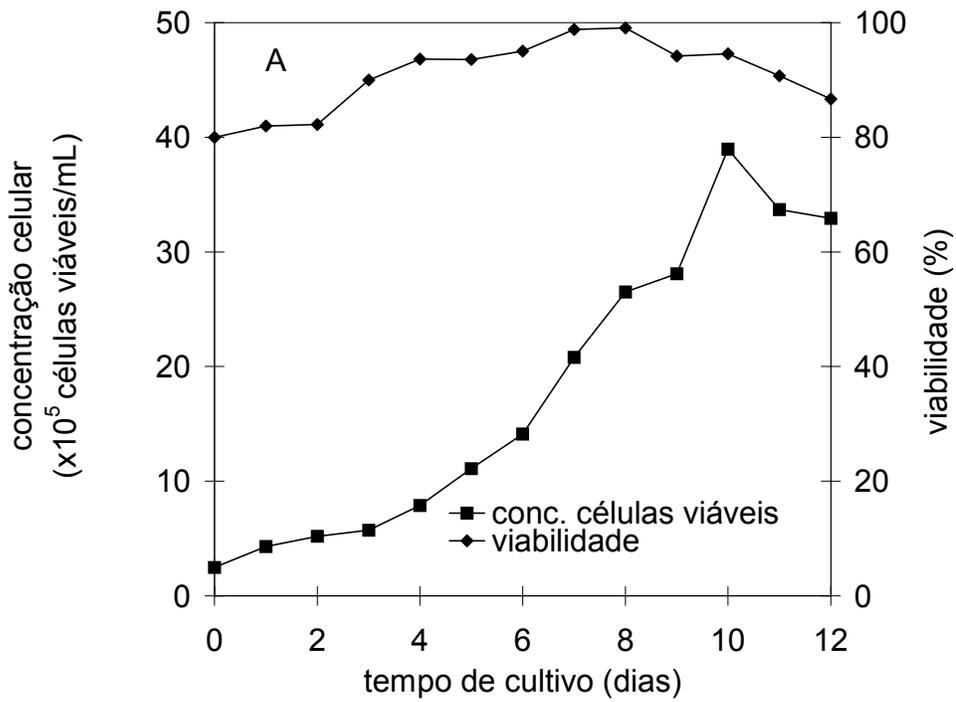


Figura 5.27: Parâmetros cinéticos para o ensaio 1 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,1% de PF68; 1% de SFB e 5% de PL). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

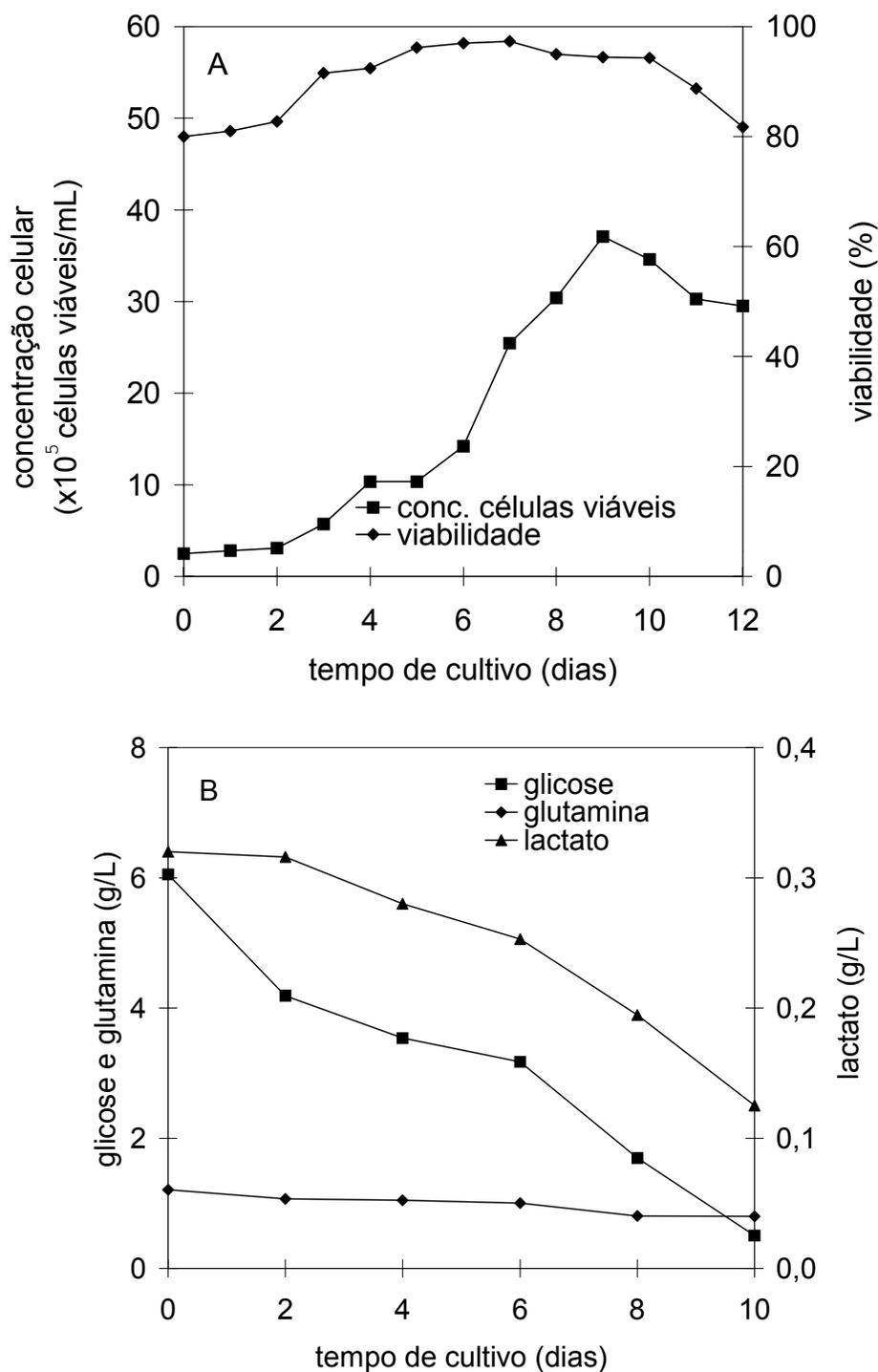


Figura 5.28: Parâmetros cinéticos para o ensaio 3 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,1% de PF68; 3% de SFB e 5% de PL). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

Nota-se através das Figuras 5.27 e 5.28 um comportamento cinético similar entre os ensaios 1 e 3. Estes ensaios resultaram praticamente na mesma concentração de células viáveis finais, embora as concentração de SFB nestes ensaios fossem distintas, respectivamente, 1 e 3%. Este fato mostrou a real possibilidade de se reduzir a concentração do SFB e obter a mesma concentração de células viáveis na fase estacionária. O consumo de nutrientes como a glicose e a glutamina foram similares. A glicose foi consumida durante todo o cultivo, a glutamina não apresentou consumo expressivo pelas células durante os 10 dias em que a cultura foi mantida. A suplementação do meio Grace com o permeado de leite liofilizado, nas faixas empregadas, mostrou que o lactato presente inicialmente no cultivo foi consumido durante todo período do cultivo. A presença deste metabólito no início do cultivo deve-se à contribuição do inóculo celular, assim como, a contribuição dos demais suplementos empregados simultaneamente ao permeado. As Figuras 5.29 e 5.30 mostram os consumos específicos de glicose e glutamina na fase de crescimento exponencial para os ensaios do planejamento fatorial completo 2².

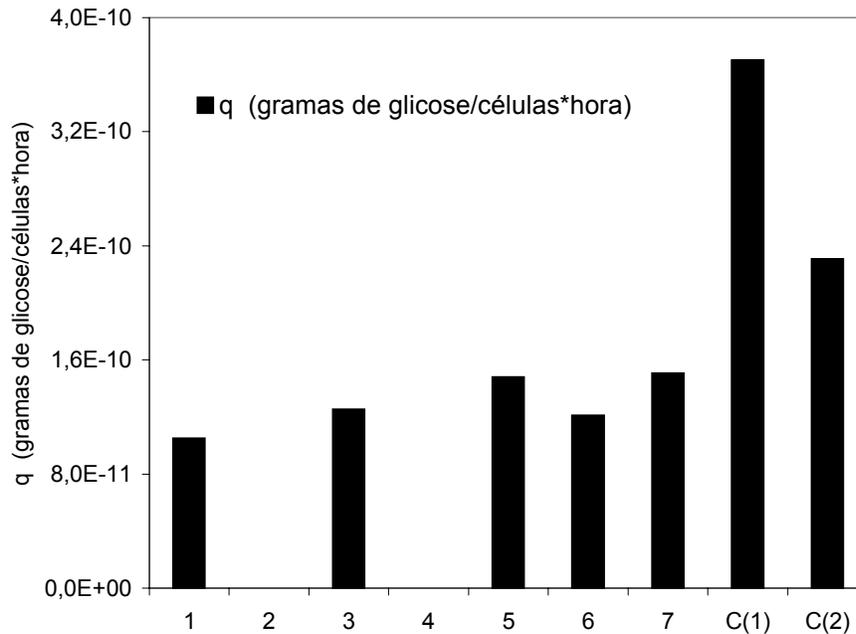


Figura 5.29: Consumo específico de glicose nos ensaios do planejamento completo 2². Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.

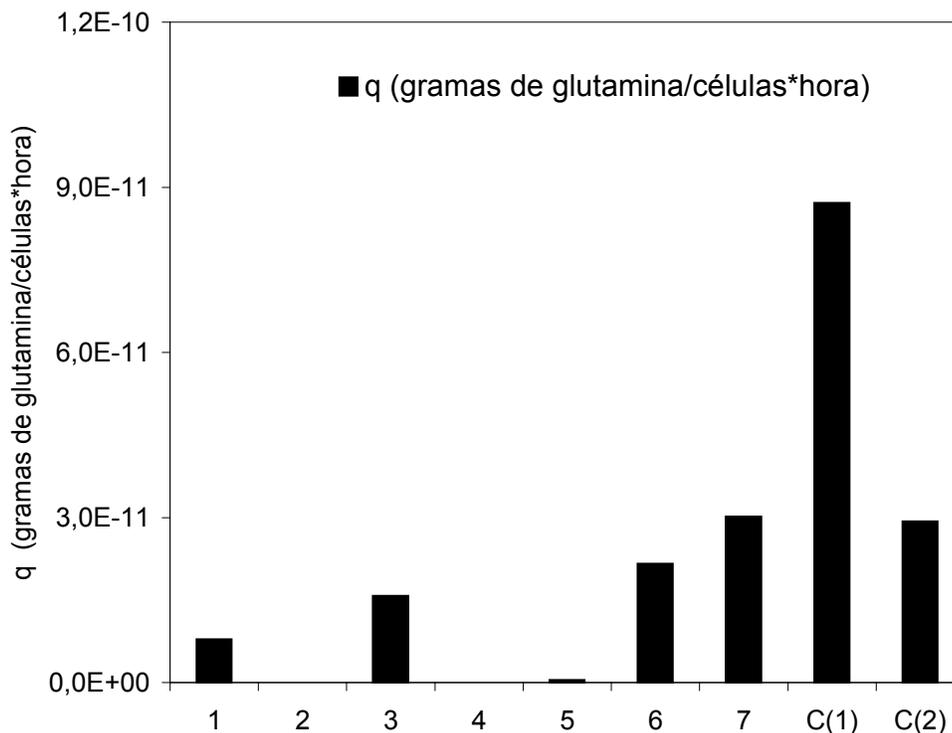


Figura 5.30: Consumo específico de glutamina nos ensaios do planejamento completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Grace + 10% de SFB.

Observou-se na Figura 5.29 que, em geral, os ensaios do planejamento completo 2^2 apresentaram taxas de consumo específico de glicose aproximadas entre $1,0$ e $1,5 \times 10^{-10}$ g de glicose/células*hora. Verifica-se que o consumo de glicose nos ensaios controle é superior aqueles obtidos nos ensaios do planejamento. Não obstante, o consumo de glicose pelas células Sf9 mostrou-se maior em um meio basal suplementado com 10% de SFB do que em um meio livre de soro. A glutamina foi pouco consumida por estas células, conforme mostra a Figura 5.30. As repetições do ensaio no ponto central (ensaio 5, 6 e 7) apresentaram um desvio representativo quanto do consumo específico da glutamina, possivelmente em relação a alterações metabólicas ou mesmo erros experimentais, entretanto o consumo de glicose mostrou-se bastante reprodutivo.

5.6. Análise dos Efeitos das Concentrações do Permeado Liofilizado e do SFB sobre a Concentração e Viabilidade das Células Sf9 a Partir de Inóculo Proveniente do Meio Livre de Soro Sf900II

Neste planejamento foi avaliada a influência das variáveis concentração de permeado liofilizado e da concentração do SFB em relação à concentração final de células viáveis na fase estacionária (X_{vs}), à concentração final de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}), à viabilidade na fase média exponencial (V_{me}), a partir de inóculo proveniente do meio livre de soro Sf900II. Buscou-se estudar sistematicamente, além dos efeitos destes aditivos ao meio de cultivo, a influência metabólica ocasionada pelo inóculo celular, proveniente de meio sintético, na cinética de crescimento da linhagem de células de inseto Sf9 para as diversas composições de meio de cultivo testadas. A Tabela 5.36 mostra os valores das variáveis estudadas neste planejamento, assim como seus respectivos níveis de variação.

Tabela 5.36: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 com 3 pontos centrais. Inóculo proveniente do meio Sf900II.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Permeado liofilizado (%m/v)	1	1,75	2,5
SFB (% v/v)	1	2	3

A Tabela 5.37 mostra o planejamento fatorial completo e os resultados obtidos a partir da análise estatística. Observou-se que a concentração de células finais viáveis na fase estacionária esteve entre 16,8 e 30×10^5 células/mL. Observa-se também que a concentração de células viáveis na fase média exponencial esteve entre 6,4 e $9,5 \times 10^5$ células/mL, assim como a viabilidade na fase média exponencial esteve entre 91 e 98%.

5.6.1. Análise dos Efeitos das Concentrações do Permeado Liofilizado e do SFB Sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Estacionária (X_{vs}), com Inóculo Proveniente do meio Sf900II

Em vista das inibições observadas no crescimento das células Sf9 no planejamento fatorial 2^2 anterior, no qual o permeado liofilizado foi estudado como suplemento ao meio de cultivo na faixa de 0 a 5%, optou-se pelo emprego de novas formulações de meio de cultivo empregando-se concentrações deste aditivo em concentrações inferiores a 2,5%.

Tabela 5.37: Planejamento fatorial completo 2^2 com 3 pontos centrais a partir de inóculo celular proveniente do meio Sf900II.

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis resposta		
	Permeado liofilizado (%m/v)	SFB (%v/v)	$X_{vs}^{(1)}$ ($\times 10^5$ cél. viáveis/mL)	$X_{me}^{(1)}$ ($\times 10^5$ cél. viáveis/mL)	$V_{me}^{(3)}$ (%)
1*	-1	-1	23,7	8,7	95
2	+1	-1	16,8	6,4	94
3*	-1	+1	29,9	9,5	97
	+1	+1	23,3	9,3	98
5	0	0	17,3	8,6	91
6	0	0	16,9	8,6	93
7	0	0	16,8	8,0	94
C(1)	-	10	8,0	4,8	93
C(2)	-	-	77,2	16,6	91

C(1): Ensaio controle em meio Grace acrescido de 10% de SFB; C(2): Ensaio controle em meio livre de soro (Sf900II); ⁽¹⁾Concentração de células viáveis na fase estacionária; ⁽²⁾Concentração de células viáveis na fase média exponencial; ⁽³⁾Viabilidade na fase média exponencial. *Ensaio que apresentou concentração celular na fase estacionária pelo menos 3 vezes superior ao ensaio controle em meio Grace.

As variáveis que apresentaram efeitos significativos em um intervalo de 90% de confiança para X_{vs} , segundo a Tabela 5.38, foram o permeado liofilizado e o SFB. As interações entre estes fatores não apresentaram sinergia ou antagonismo, significativa a 90% de confiança quanto a X_{vs} .

Tabela 5.38: Efeitos obtidos para a concentração final de células viáveis na fase estacionária (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente de meio Sf900II.

	Efeitos ($\times 10^5$ cél/mL)	Desvio Padrão	t(2)	p
Média*	20,67	0,100	206,71	0,00002
(1) Permeado liofilizado*	-6,75	0,265	-25,51	0,00153
(2) SFB*	6,35	0,265	24,00	0,00173
(1) x (2)	0,15	0,26	0,56	0,62789

*fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança.

Pode-se verificar através da tabela de ANOVA, Tabela 5.39, que segundo o coeficiente de regressão (0,55) e o teste F ($F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ inferior a uma unidade), não foi possível a obtenção de um modelo capaz de prever significativamente a variação de X_{vs} com relação aos aditivos empregados.

Tabela 5.39: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{vs}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Sf900II, ignorados os efeitos não significativos.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	85,88	2	42,94	2,42
Resíduos	70,92	4	17,73	
Falta de Ajuste	70,78	2		
Erro Puro	0,14	2		
Total	156,81	6		

$$F_{0,90;2;4} = 6,94.$$

$$\% \text{ variação explicada } (R^2) = 55\%.$$

5.6.2. Análise dos Efeitos das Concentrações do Permeado Liofilizado e do SFB sobre a Concentração Final de Células Viáveis na Fase Média Exponencial (X_{me}), com Inóculo Proveniente do meio Sf900II

A análise estatística dos efeitos do permeado liofilizado e do SFB sob X_{me} é mostrada na Tabela 5.40. Observa-se que a redução da concentração de permeado liofilizado, o aumento da concentração de SFB e a interação entre eles proporcionam um aumento na X_{me} .

Tabela 5.40: Efeitos obtidos para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Sf900II.

	Efeitos ($\times 10^5$ cél/mL)	Desvio Padrão	t(2)	p
(1) Permeado liofilizado*	-1,25	0,35	-3,61	0,06895
(2) SFB (L)*	1,85	0,35	0,33	0,03332
(1) x (2)*	1,05	0,35	0,09	0,09378

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

A relação entre $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ foi de 4,5 como observado na análise estatística (ANOVA) na Tabela 5.41. Conclui-se com isso que o modelo proposto descreve significativamente uma relação linear para X_{me} em função dos aditivos ao meio de cultivo testados neste planejamento.

Tabela 5.41: A análise de variância (ANOVA) para a concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Sf900II.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	6,0875	3	2,03	24,4
Resíduos	0,2496	3	0,08	
Falta de Ajuste	0,0096	1		
Erro Puro	0,2400	2		
Total	6,3371	6		

$F_{0,90;3;3} = 5,39$.

% variação explicada (R^2) = 96%.

A Tabela 5.42 apresenta os coeficientes de regressão para o modelo proposto para a variável resposta X_{me} .

Tabela 5.42: Coeficientes de regressão para a concentração de X_{me} para o planejamento completo 2^2 com 3 pontos centrais. Inóculo proveniente do meio Sf900II.

	Coeficientes de Regressão	Desvio Padrão
Média*	8,44	0,13
(1) Permeado liofilizado(L)*	-0,63	0,17
(2) SFB (L)*	0,93	0,17
(1) x (2)*	0,53	0,17

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

A Equação 5.4 relaciona X_{me} em função da variável codificada para um nível de confiança de 90%.

$$C_{X_{me}} = 8,44 - 0,63 \cdot C_{PL} + 0,93 \cdot C_{SFB} + 0,53 \cdot C_{PL} \cdot C_{SFB} \quad \text{Equação 5.4}$$

Em vista disso foi proposta a superfície de resposta, mostrada na Figura 5.31, que apresenta a relação entre os suplementos do meio de cultivo permeado liofilizado e o SFB com relação à produção de células na fase média exponencial (X_{me}).

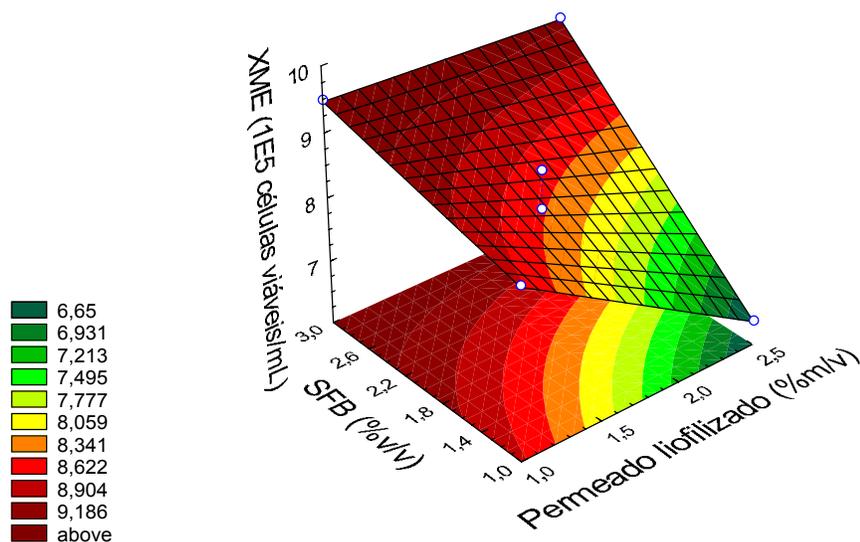


Figura 5.31: Superfície de resposta para a concentração de células viáveis finais na fase média exponencial (X_{me}) obtida com o planejamento fatorial completo 2^2 com 3 pontos centrais. Inóculo proveniente do meio Sf900II.

Na Tabela 5.43 pode-se observar os desvios dos valores de X_{me} preditos pelo modelo em relação aos valores experimentais.

Tabela 5.43: Desvios dos valores de X_{me} preditos pelo modelo em relação aos valores experimentais, para o planejamento completo 2^2 com 3 pontos centrais. Inóculo proveniente do meio Sf900II.

Ensaio	X_{me} experimental	X_{me} predita	Desvio (%)
1	8,70	8,67	0,3
2	6,40	6,35	0,8
3	9,50	9,47	0,3
4	9,30	9,27	0,3
5	8,60	8,44	1,9
6	8,60	8,44	1,9
7	8,00	8,44	5,5

Observa-se na Tabela 5.43 uma faixa de erro de 0,3 a 5,5% entre as variáveis experimentais e as variáveis previstas pelo modelo, confirmando que o modelo é satisfatório para prever X_{me} .

Pode-se obter uma representação bidimensional da superfície modelada através de suas curvas de nível, que são linhas em que a resposta é constante. As curvas de nível que representam a influência do permeado liofilizado e do SFB sobre a X_{me} é mostrada na Figura 5.32.

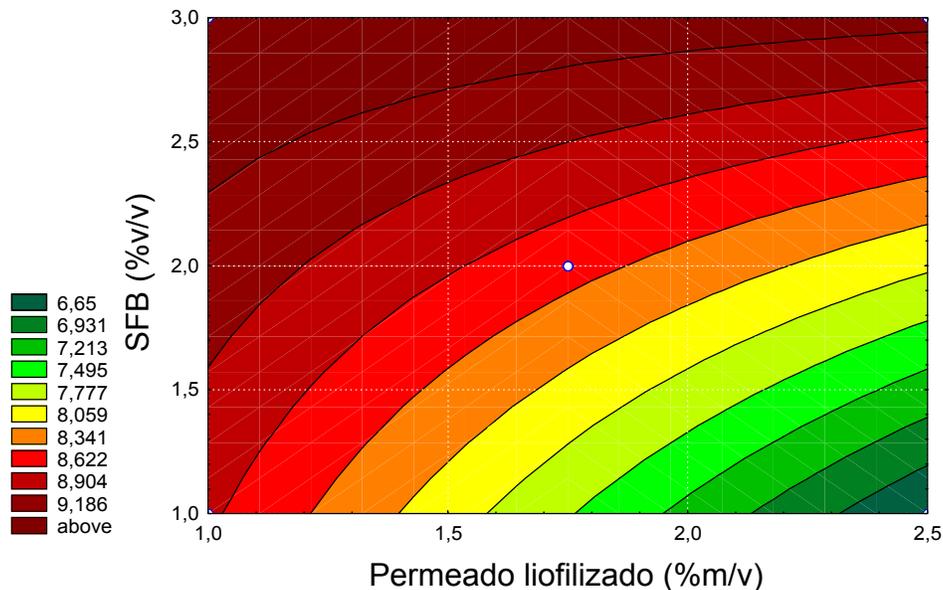


Figura 5.32: Curvas de nível representativas da X_{me} obtida com o planejamento fatorial completo 2^2 com 3 pontos centrais em vista dos suplementos permeado liofilizado e SFB. Inóculo proveniente do meio Sf900II.

Através das curvas de nível obtidas para X_{me} verifica-se que a redução da concentração do permeado liofilizado no meio de cultivo contribui para o aumento da concentração de células viáveis na fase média exponencial (X_{me}), assim como incrementos na concentração de SFB no cultivo celular também proporcionam o aumento desta variável resposta.

5.6.3. Análise dos Efeitos das Concentrações de Permeado Liofilizado e SFB Sobre a Viabilidade das Células Sf9 na Fase Média de Crescimento Exponencial (V_{me}), com Inóculo Proveniente do meio Sf900II

No estudo realizado dos efeitos das variáveis independentes (permeado liofilizado e SFB) sob a V_{me} não foram observados efeitos significativos a 90% de confiança, como mostrado na Tabela 5.44. Em vista disso a análise estatística (ANOVA) não foi realizada sendo que os valores numéricos obtidos refletem apenas os erros aleatórios do experimento.

Tabela 5.44: Efeitos obtidos para a viabilidade das células na fase média exponencial (V_{me}) para o planejamento fatorial completo 2^2 . Inóculo proveniente do meio Sf900II.

	Efeito (%)	Desvio Padrão	t(2)	p
Média*	94,57	0,58	163,80	0,00004
(1) Permeado liofilizado	0,00	1,52	0,00	1,00000
(2) SFB	3,00	1,52	1,96	0,18845
(1) x (2)	1,00	1,52	0,65	0,57992

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

5.6.4. Comparação entre os Ensaios do Planejamento Fatorial Completo 2² e os Ensaios Controle em Meio Grace com 10 % SFB e em Meio Livre de Soro Sf900II

Segundo estudos realizados em experimentos anteriores, buscou-se nesta análise avaliar os parâmetros cinéticos das células Sf9 nas formulações testadas. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 5.45.

Tabela 5.45: Comparação dos parâmetros cinéticos das células Sf9 obtidos no planejamento fatorial completo 2² e dos meios controles Grace contendo 10% de SFB e Sf900II.

Ensaios	$\mu_{\text{máx}}^{(1)}$ (h ⁻¹)	$t_{\text{lag}}^{(2)}$ (d)	$t_d^{(3)}$ (h)	$t_s^{(4)}$ (d)	Viabilidade em t_s (%)
1*	0,0130	2	53	8	96
2	0,0111	2	62	8	97
3*	0,0135	1	51	8	97
4	0,0126	1	55	8	99
5	0,0091	2	76	10	92
6	0,0088	2	78	10	93
7	0,0088	2	78	10	93
C(1)	0,0239	1	29	4	93
C(2)	0,0301	3	23	7	91

C(1): Ensaio controle em meio Grace + 10% de SFB; C(2): Ensaio controle em meio livre de soro (Sf900II). ⁽¹⁾ Taxa máxima específica de crescimento celular; ⁽²⁾ Duração da fase *lag* de crescimento; ⁽³⁾ Tempo de duplicação celular; ⁽⁴⁾ Tempo para atingir a fase estacionária * Ensaios que apresentaram melhores desempenhos quando a crescimento e viabilidade celular.

Segundo a Tabela 5.45, a taxa de crescimento específico variou de 0,0088 a 0,0301 h⁻¹, enquanto o tempo de duplicação variou de 23 a 78 horas. Este comportamento das células Sf9 revela que a suplementação do meio Grace com o permeado liofilizado na faixa estudada proporciona um acréscimo na taxa de

duplicação celular e conseqüente na redução da taxa de crescimento específico. No entanto, o permeado liofilizado mostrou-se capaz de produzir células Sf9 em concentração da ordem de 33×10^5 células viáveis/mL, mesmo quando a concentração do SFB é reduzida em até 90% do comumente praticado. A fase *lag* de crescimento variou de 1 a 3 dias de cultivo e a viabilidade celular manteve-se acima de 90% em todos os ensaios ao se atingir a fase estacionária de crescimento. Os resultados obtidos do tempo levado para se atingir a fase estacionária revelam que em média são oferecidos de 3 a 6 dias do período de crescimento exponencial para a infecção por baculovírus.

5.6.5. Análise do Consumo de Glicose, Glutamina e a Formação de Lactato nos Ensaios do Planejamento Fracionário 2², com inóculo proveniente do meio Sf900II

Foram avaliados sistematicamente os efeitos no metabolismo celular, quanto ao consumo de glicose e glutamina e à formação de lactato, similarmente à análise realizada no planejamento fatorial anterior.

As Figuras 5.33 e 5.34 mostram os ensaios que resultaram em concentração celular pelo menos três vezes superior àquela obtida com o ensaio controle, células Sf9 em meio Grace acrescido de 10% em volume de SFB, quanto à concentração celular na fase estacionária. Os ensaios que apresentaram melhores resultados foram os ensaios 1 (2,7 g/L de glicose, 8g/L de extrato de levedura, 0,1% de Pluronic F68, 1% de SFB e 1% de permeado liofilizado) e 3 (2,7 g/L de glicose, 8g/L de extrato de levedura, 0,1% de Pluronic F68, 3% de SFB e 1% de permeado liofilizado) destacados na Tabela 5.46.

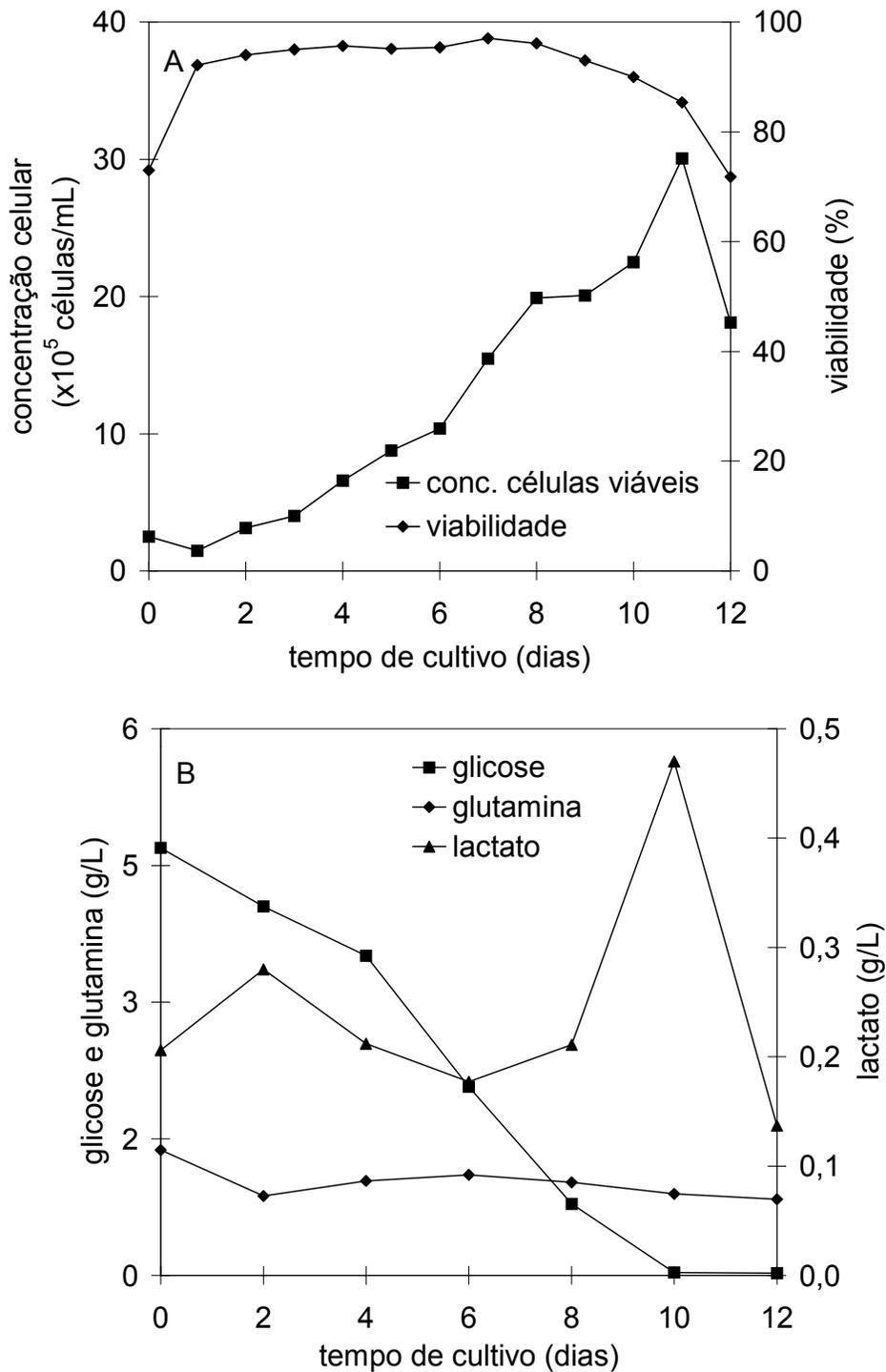


Figura 5.33: Parâmetros cinéticos para o ensaio 1 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,1% de PF68; 1% de SFB e 1% de PL). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

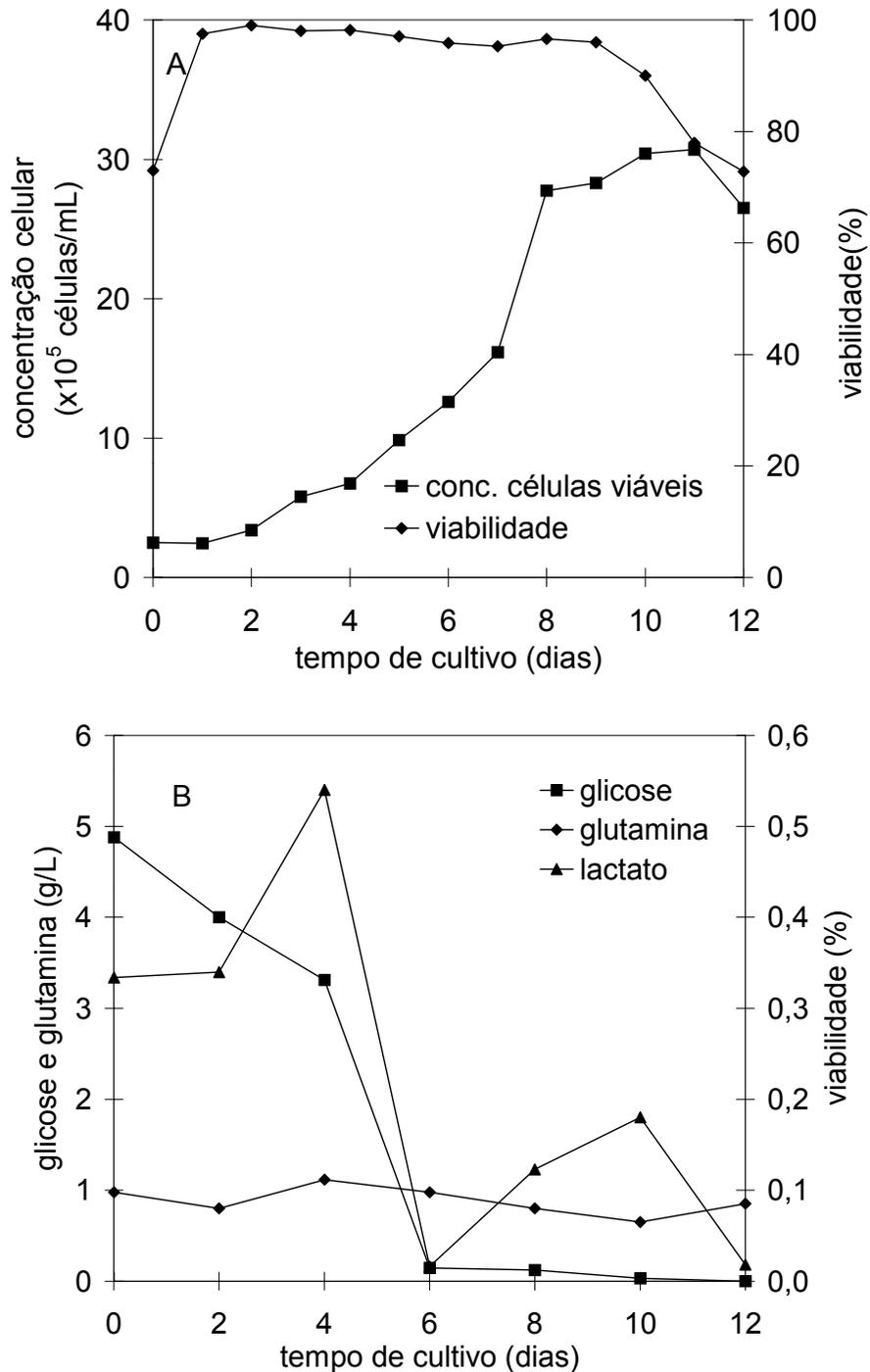


Figura 5.34: Parâmetros cinéticos para o ensaio 3 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,1% de PF68; 3% de SFB e 1% de PL). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

Os ensaios 1 e 3 realizados no planejamento 2², a partir de inóculo mantido em meio livre de soro, apresentaram crescimento celular em geral três vezes superior àquele obtido com inóculo controle em Grace acrescido de 10% de SFB, (mostrado no Apêndice A). No tocante ao consumo de nutrientes pelas células Sf9 nestas formulações, a glicose sofreu depleção durante todo o tempo de cultivo. A glutamina não foi consumida expressivamente. No ensaio 1, o lactato não apresentou alteração significativa em sua concentração inicial. No entanto, no ensaio 3 este metabólito foi produzido durante os 3 primeiros dias do cultivo e então consumido simultaneamente com a glicose. Quando a concentração de glicose mostrou-se indisponível no cultivo, o lactato voltou a ser produzido, possivelmente em função do consumo de outra fonte de carbono.

A glicose mostrou-se como o nutriente preferencialmente consumido, como já verificado nos outros planejamentos realizados neste estudo. As Figuras 5.35 e 5.36 mostram os resultados obtidos correspondentes aos consumos específicos de glicose e glutamina na fase de crescimento exponencial para os ensaios do planejamento fatorial completo 2².

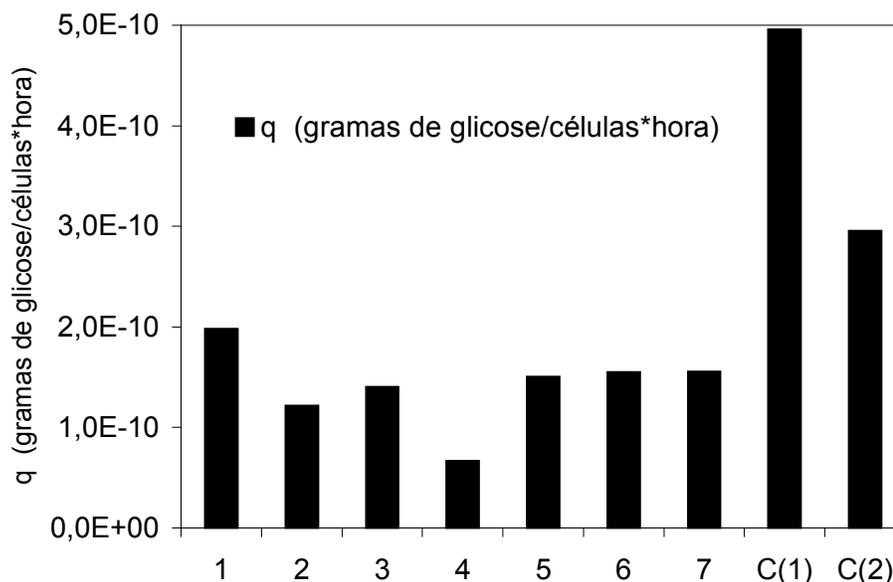


Figura 5.35: Consumo específico de glicose nos ensaios do planejamento completo 2², com inóculo proveniente do meio Sf900II.

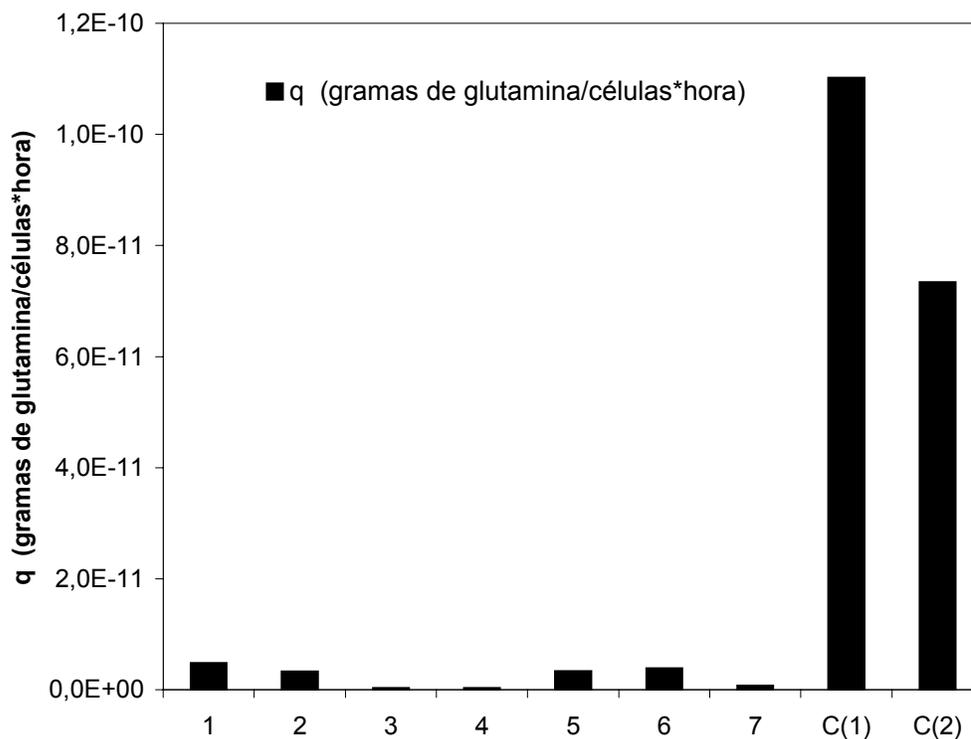


Figura 5.36: Consumo específico de glutamina nos ensaios do planejamento completo 2², com inóculo proveniente do meio Sf900II.

Verifica-se na Figura 5.35 que o consumo de glicose nos ensaios controles é superior àqueles obtidos nos demais ensaios do planejamento. Já a Figura 5.36 mostra que a glutamina é pouco consumida pelas células Sf9 nas formulações testadas de meio de cultivo quando comparadas aos ensaios controles. Não obstante, o consumo de glicose e de glutamina pelas células Sf9 mostrou-se maior em meio basal suplementado com 10% de SFB do que em um meio livre de soro.

Analisando-se o comportamento cinético das células Sf9 nas formulações empregadas nos planejamentos completos 2², verificou-se que no planejamento fatorial cujo inóculo celular era proveniente do meio Sf900II apresentou melhores resultados quanto a concentração e viabilidade celular. Não foram observadas inibições no crescimento celular e alterações morfológicas.

Segundo estudos realizados por Frankel et al. (1994), a lactose (carboidrato presente em maior quantidade no permeado liofilizado) pode ser metabolizada pelas células Sf9 proporcionando o aumento da expressão de proteínas recombinantes como a ricina B. Não obstante, o emprego do permeado liofilizado como suplemento para o meio Grace resultou em elevada concentração celular, podendo contribuir para a produção de biopesticidas e para o aumento da produção de proteínas recombinantes através do emprego de baculovírus geneticamente modificados.

Com o intuito de mostrar a variabilidade intrínseca entre os ensaios controle em meio Grace acrescido de 10% de SFB e em meio livre de soro (Sf900II) realizados nos planejamentos fatoriais deste estudo, foi elaborada a tabela comparativa mostrada no Apêndice A (Tabela A1). Nota-se claras diferenças nos parâmetros cinéticos de crescimento das células Sf9 nestes meios de cultivo. Apesar de se ter empregado protocolos experimentais idênticos entre os diferentes lotes de ensaios, a reprodutibilidade dos resultados não pode ser considerada como elevada, o que mostra de maneira efetiva a necessidade da realização de experimentos controle em todos os conjuntos de ensaios para que a interpretação dos resultados não fique comprometida.

5.7. Análise da Adaptação das Células Sf9 nas Formulações Testadas

Todos os resultados apresentados e discutidos até este ponto do trabalho foram obtidos da primeira passagem das células Sf9 nas formulações de meio de cultura propostas nos planejamentos estudados. Com o intuito de avaliar sistematicamente o desempenho das células Sf9 nestas formulações, foram realizados seis subcultivos consecutivos. O critério da seleção das formulações foi a obtenção de elevada concentração celular (pelo menos 3 vezes o valor da obtida no ensaio controle em meio Grace acrescido de 10% de SFB de cada planejamento). A Tabela 5.46 indica os ensaios que resultaram nos melhores desempenhos nos planejamentos realizados durante todo o estudo e que

foram, em vista disto, selecionados para a adaptação celular. A Tabela 5.47 sumariza as composições das formulações empregadas.

Tabela 5.46: Ensaios selecionados para a adaptação celular.

Planejamento Fatorial	Ensaios
Fracionário 2 ⁵⁻¹	4, 16
Planejamento completo 2 ³ (inóculo oriundo de Sf900II)	9, 11
Planejamento completo 2 ² (inóculo oriundo de Sf900II)	1, 3

Tabela 5.47: Composições das formulação avaliadas no cultivo das células Sf9 após seis subcultivos consecutivos.

Formulações	Suplementos					
	Ext. de Lev (g/L)	CPSL (%m/v)	PL (%m/v)	SFB (%v/v)	PF68 (%m/v)	Glicose (g/L)
4	8	5	-	1	-	2,7
16	8	5	-	3	0,2	2,7
9	2,6	4	-	2	0,1	2,7
11	6	2,3	-	2	0,1	2,7
1	8	-	1	1	0,1	2,7
3	8	-	1	3	0,1	2,7

A adaptação celular foi avaliada a partir de inóculos celulares oriundos dos meios Grace e Sf900II. As cinéticas dos ensaios 4, 16, 1 e 3 foram avaliadas simultaneamente com inóculos provenientes dos meios Grace e Sf900II. As cinéticas dos ensaios 9 e 11 foram avaliadas somente em função do inóculo proveniente do meio Sf900II, já que os ensaios 9 e 11 realizados no planejamento completo 2³ com inóculo celular oriundo do meio Grace acrescido de 10% de SFB

não apresentaram crescimentos satisfatórios. O crescimento e viabilidade celular dos ensaios controles em meio basal, Grace acrescido com 10% de SFB, e em meio de composição quimicamente definida, Sf900II foram avaliados simultaneamente de maneira comparativa. As células foram inoculadas a uma concentração de $3,0 \times 10^5$ células viáveis/mL. Ressalta-se que a viabilidade neste estudo foi avaliada através dos corantes laranja de acridina e brometo de etídio. Isto possibilitou a contagem das células passíveis de duplicação durante o tempo de cultivo, além de identificar precisamente as fases de crescimento celular e com isso proporcionar uma infecção por baculovírus mais efetiva. Os melhores resultados quanto à concentração e a viabilidade celular foram obtidos a partir de inóculo proveniente do meio livre de soro Sf900II. O crescimento e viabilidade celular, o consumo de glicose e glutamina e a evolução do lactato são mostrados nas Figura 5.37 a 5.41. As cinéticas realizadas a partir de inóculo oriundo de meio Grace acrescido de 10% de SFB não resultaram em concentrações e viabilidades celulares satisfatórias e são mostradas no Apêndice A.

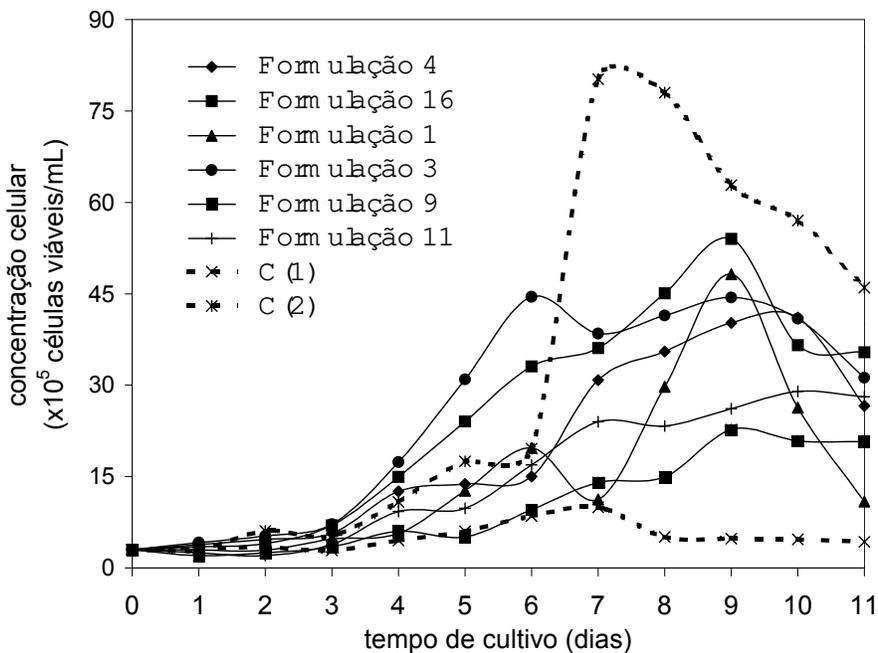


Figura 5.37: Concentração de células viáveis para as formulação 4, 16, 1, 3, 9, 11, C(1) e C(2). C(1): controle em Grace + 10% de SFB; C(2): controle em Sf900II. Concentração do inóculo, 3×10^5 células viáveis/mL.

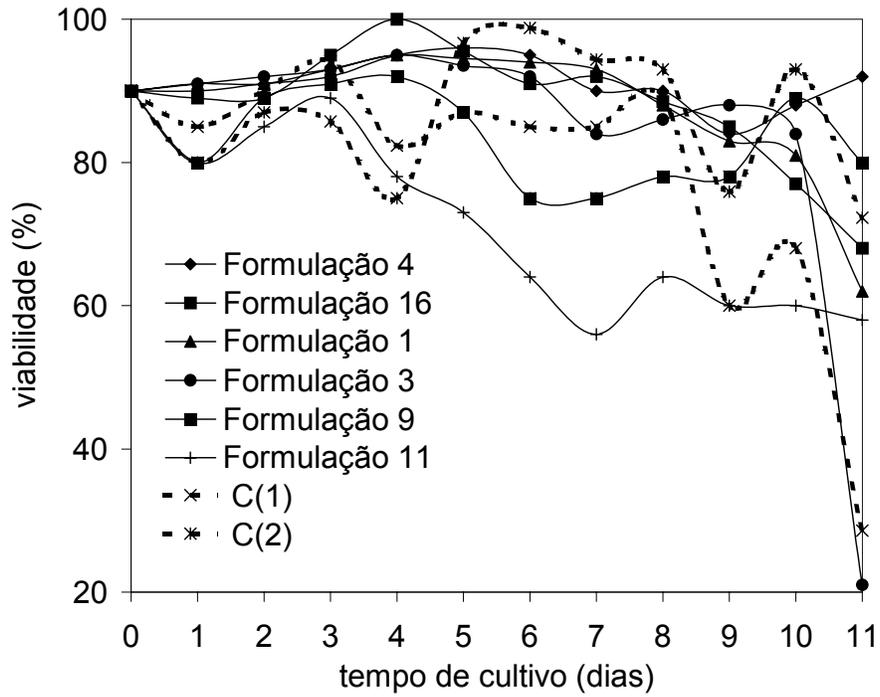


Figura 5.38: Viabilidade para as formulação 4, 16, 1, 3, 9, 11, C(1) e C(2). C(1): controle em Grace + 10% de SFB; C(2): controle em Sf900II.

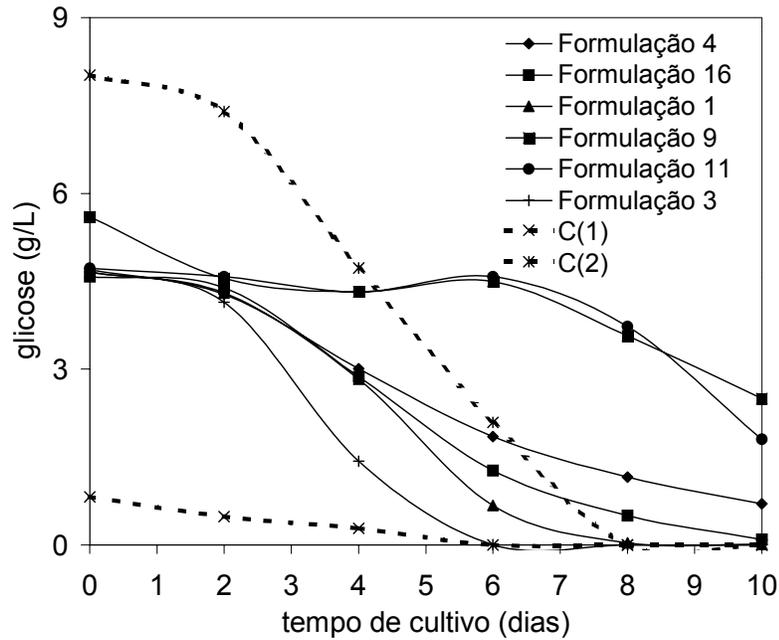


Figura 5.39: Consumo de glicose para as formulação 4, 16, 1, 3, 9, 11, C(1) e C(2). C(1): controle em Grace + 10% de SFB; C(2): controle em Sf900II.

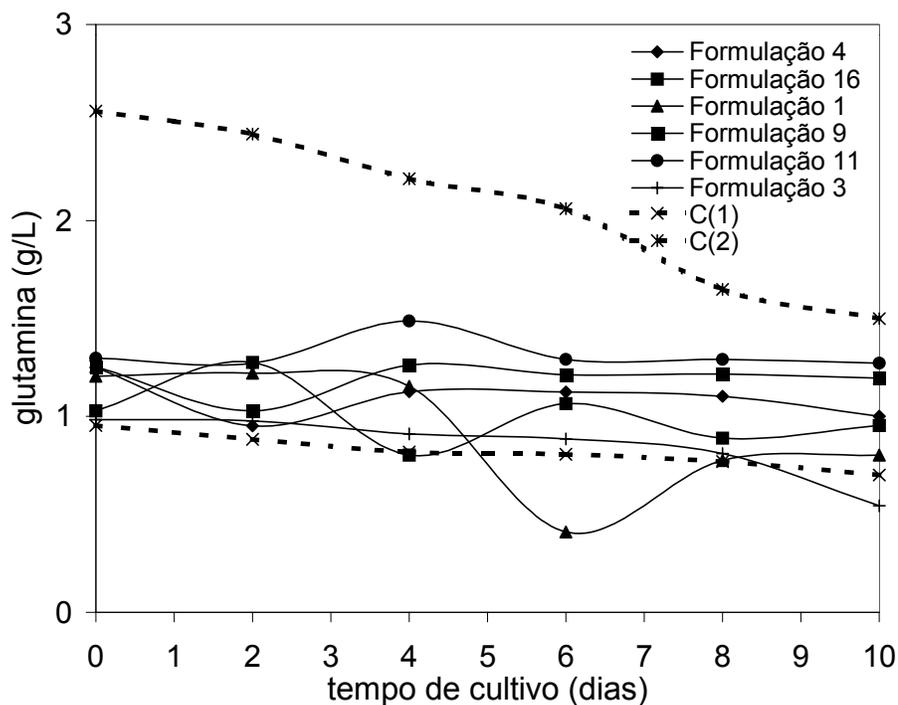


Figura 5.40: Consumo de glutamina para as formulação 4, 16, 1, 3, 9, 11, C(1) e C(2). C(1): controle em Grace + 10% de SFB; C(2): controle em Sf900II.

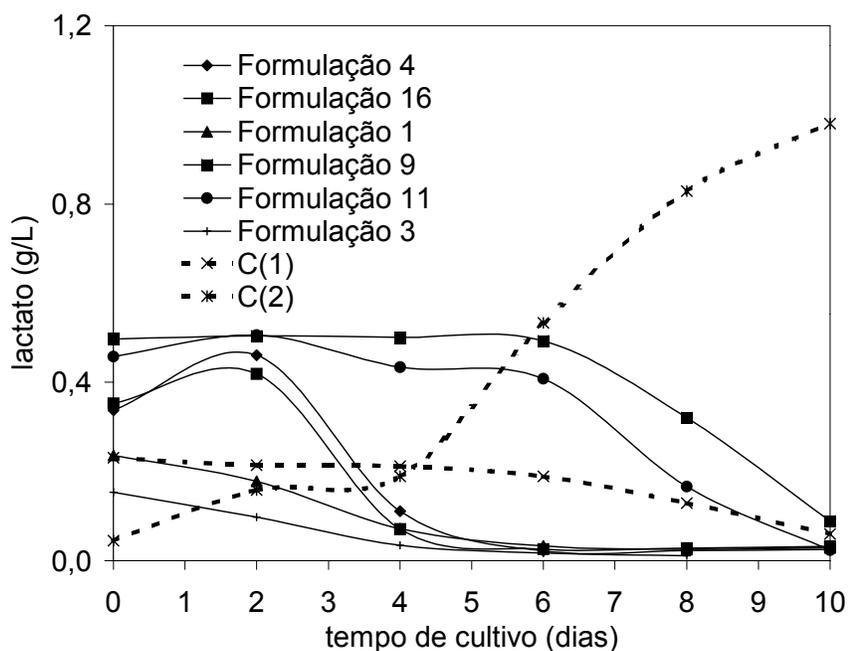


Figura 5.41: Evolução de lactato para as formulação 4, 16, 1, 3, 9, 11, C(1) e C(2). C(1): controle em Grace + 10% de SFB; C(2): controle em Sf900II.

Pode-se observar nas Figuras 5.37 a 5.41 o crescimento e viabilidade celular, o consumo de glicose e glutamina e a evolução de lactato. As formulações 4 e 16 são provenientes do planejamento fracionário 2^{5-1} . Observou-se para a formulação 4 um crescimento celular pelo menos 4 vezes maior que o ensaio controle em Grace + 10% de SFB e 2 vezes menor que o ensaio controle em Sf900II. A formulação 16 apresentou um crescimento 5,4 vezes maior que o ensaio controle em Grace + 10% de SFB e 1,5 vezes menor que o ensaio controle em Sf900II. Mesmo durante o período de adaptação celular foram observadas alterações morfológicas como granulações no citoplasma celular e aparente aumento no diâmetro das células. Contudo, o padrão de crescimento celular após 6 passagens manteve-se o mesmo que o da primeira passagem das células Sf9 nas formulações testadas.

Análise similar foi realizada para as formulações 9 e 11 do planejamento completo 2^3 com inóculo proveniente de meio Sf900II. Observou-se para a formulação 9 um crescimento celular pelo menos 2,3 vezes maior que o ensaio controle em Grace + 10% de SFB e 3,5 vezes menor que o ensaio controle em Sf900II. A formulação 11 apresentou um crescimento 2,8 vezes maior que o ensaio controle em Grace + 10% de SFB e 3 vezes menor que o ensaio controle em Sf900II. Entretanto esta formulação apresentou queda acentuada da viabilidade celular após o 4º dia de cultivo atingindo cerca de 60%.

Em continuidade à análise realizada para os ensaios de adaptação celular, foram efetuados seis subcultivos celulares sucessivos também nas formulações 1 e 3, nas quais o permeado de soro de leite liofilizado esteve presente. Observou-se para a formulação 1 um crescimento celular pelo menos 3,3 vezes maior que o ensaio controle em Grace + 10% de SFB e 2,4 vezes menor que o ensaio controle em Sf900II. A formulação 3 apresentou um crescimento 4,7 vezes maior que o ensaio controle em Grace + 10% de SFB e apenas 1,7 vezes menor que o ensaio controle em Sf900II. Observa-se nas formulações 1 e 3 que a glicose é consumida durante todo o tempo de cultivo. A glutamina não foi consumida expressivamente. Na formulação 1, o lactato foi consumido durante todo o tempo de cultivo, já na

formulação 3, as células produziram lactato nos primeiros 2 dias de cultivo. Após este período, o lactato foi consumido pelas células.

Em geral, o comportamento quanto ao metabolismo celular não foi significativamente alterado comparando-se as análises provenientes de dados de primeira passagem das células e de células adaptadas por vários subcultivos. A glicose foi consumida durante todo o cultivo celular. Não foi observado consumo expressivo de glutamina. O lactato foi produzido durante os 2 primeiros dias de cultivo, e a partir de então passou a ser consumido simultaneamente à glicose. Nota-se que o consumo de lactato ocorre durante a fase *lag* de crescimento e os primeiros dias do crescimento exponencial. A partir deste momento, a produção de lactato é estabilizada.

Observa-se que o consumo de glicose nestas formulações foi menos acentuado do que os ensaios avaliados até o momento. A glutamina permaneceu pouco consumida. A concentração de lactato manteve-se aproximadamente constante até o 6º dia de cultivo, a partir de então, este metabólito passa a ser consumido intensamente até o 10º dia do período monitorado. A glicose foi o nutriente preferencialmente consumido pelas células Sf9 nas formulações de meio de cultivo avaliadas. As Figuras 5.42 e 5.43 mostram o consumo específico de glicose e glutamina, respectivamente.

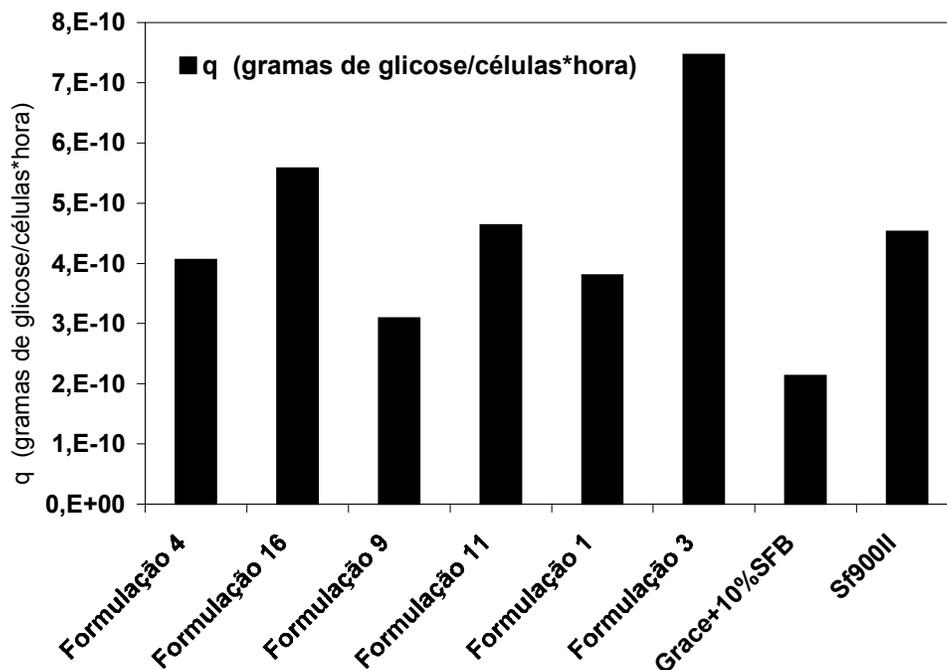


Figura 5.42: Consumo específico de glicose pelas células Sf9 nas formulações de meio de cultivo testadas no sexto subcultivo consecutivo.

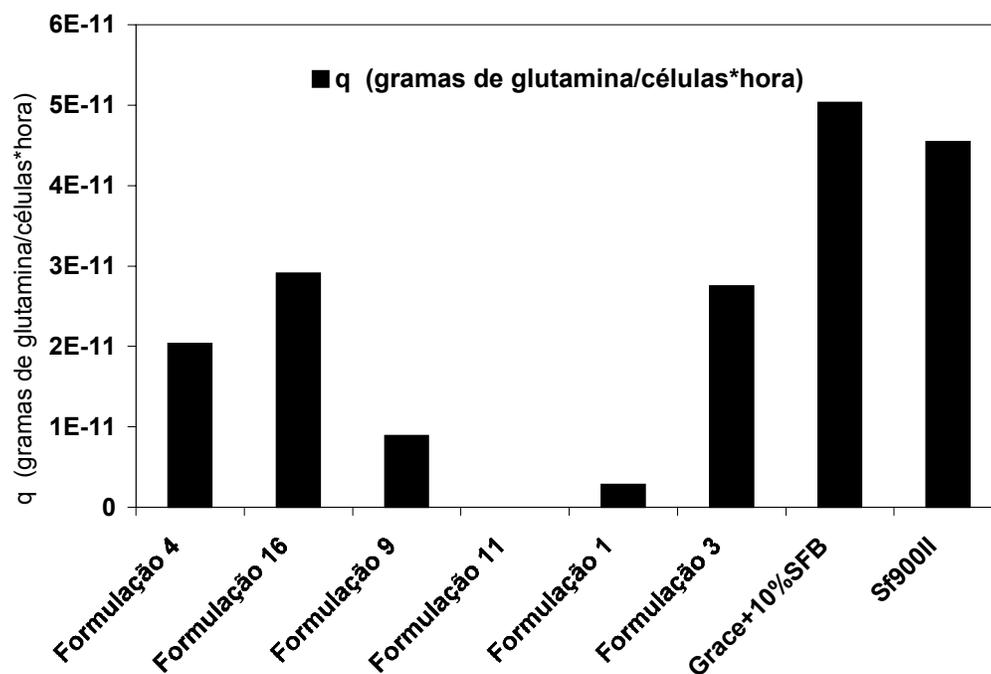


Figura 5.43: Consumo específico de glutamina pelas células Sf9 nas formulações de meio de cultivo testadas no sexto subcultivo consecutivo.

Conforme a Figura 5.42, o maior consumo de glicose ocorreu na formulação 3 de meio de cultivo. Observa-se também nesta Figura que a adição de permeado liofilizado (meio 3) proporcionou um maior consumo de glicose pelas células Sf9 em relação à adição de CPSL (meio 16) como suplemento do meio de cultivo. Pode-se concluir, então, que no meio suplementado por CPSL ocorre o consumo de outros carboidratos, contudo, reduzindo a taxa de crescimento específico destas células como mostrado na Tabela 5.49. Os dados de Mendonça et al. (1999) corroboram esta observação, uma vez que estes autores verificaram a redução da taxa de crescimento específico de células Sf9 quando a frutose é consumida na ausência de glicose no meio.

Distintamente das análises anteriormente realizadas nos ensaios dos planejamentos experimentais, este carboidrato mostrou-se mais fortemente consumido pelas células Sf9 em meio Sf900II do que em meio Grace acrescido de 10% de SFB. A diferença observada pode ter resultado de alterações metabólicas ou mesmo em virtude do emprego de lotes diferentes dos meios e do SFB empregados neste experimento.

Segundo Ikonou et al. (2003), as células de insetos apresentam menor sensibilidade a metabólitos como lactato e amônia. Estudos realizados por Bédard et al. (1993) mostraram que o crescimento das células Sf9 não é afetado significativamente pela adição de sais de amônio (NH_4Cl) no meio de cultura em uma concentração de até 535mg/L.

Em vista das observações destes autores e da literatura consultada a concentração de amônio não foi monitorada sistematicamente nos ensaios realizados neste estudo. No entanto, com o intuito de quantificar a presença de amônio produzido pelas células Sf9 nas formulações selecionadas, foram realizadas medidas deste metabólito durante o cultivo celular.

A Figura 5.44 mostra através da microscopia de fluorescência as células Sf9 cultivadas na formulação 3.

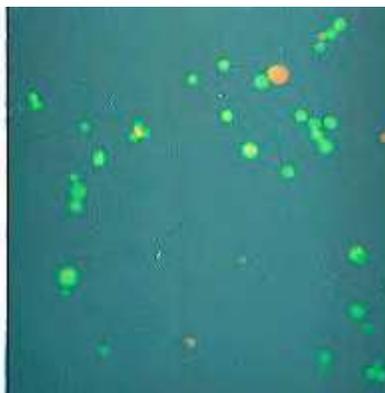


Figura 5.44: Células Sf9 cultivadas na formulação 3 de meio de cultivo, coradas com brometo de etídio e laranja de acridina.

A Figura 5.44 mostra através da microscopia de fluorescência as células Sf9 cultivadas no meio de cultura de formulação 3. O emprego destes corantes permitiu melhor identificar as células viáveis e, portanto, passíveis de infecção pelo baculovírus, visto que as células não viáveis são caracterizadas pela coloração laranja, enquanto que as células viáveis podem ser identificadas pela coloração verde. Um fator que deve ser monitorado pois pode-se apresentar como limitante do crescimento celular é o oxigênio. No entanto, não se identificou, nos ensaios realizados, condições potenciais para limitação do crescimento celular em virtude da depleção de oxigênio nas culturas não infectadas. Segundo Freshney (1992), a razão mínima é de cerca de $6\mu\text{gO}_2/10^6$ células*h para garantir a sobrevivência celular. Considerando-se que a solubilidade do oxigênio em água é igual a $7,6\mu\text{g/mL}$, e levando-se em consideração que os frascos de cultivo utilizados apresentavam capacidade total de 100mL, operando-se sempre com 15mL de volume de trabalho, nos 85mL restantes, preenchidos com ar, tinha-se disponível $0,0255\text{g}$ de O_2 ($85 \cdot 0,21 \cdot 32/22400$) e em 15mL de meio, $0,0114\text{g}$ de O_2 ($15 \cdot 7,6 \cdot 10^{-4}$), totalizando $0,0369\text{g}$ de oxigênio inicial disponível. Considerando-se o cultivo das células Sf9 em meio Sf900II a partir de inóculo celular de concentração $5 \cdot 10^5$ células/mL, disponibilizaria-se a cada tempo de duplicação (cerca de 25 horas) o valor de $1,5 \cdot 10^{-9}\text{gO}_2/\text{célula} \cdot \text{h}$, mostrando que o suprimento de oxigênio não foi fator limitante do crescimento celular em culturas não infectadas. Ressalta-se que o ar era renovado a cada 24 horas para a contagem

celular. Entretanto, na produção de células de insetos em maior escala através do emprego de biorreatores, recomenda-se o controle rigoroso de oxigênio no meio de cultivo para evitar limitações de crescimento celular.

5.7.1. Análise de Amônia no Cultivo das Células Sf9 nas Formulações de Meio de Cultivo Seleccionadas

O amônio é um importante produto catabólico produzido por culturas de células de mamíferos e de insetos. As células de insetos, em geral, apresentam menor sensibilidade a presença deste catabólico no meio de cultura quando comparadas as células de mamíferos. Linhagens como a Sf9 tradicionalmente não acumulam amônia durante o crescimento celular (Rhiel et al., 1997). Com o objetivo de verificar se as culturas de células Sf9 nas formulações de meios de cultivo propostas realmente não produziam amônio em concentrações danosas às células foram realizadas algumas análises deste catabólito. A Tabela 5.48 mostra os resultados obtidos para as formulações seleccionadas dos planejamentos realizados.

Tabela 5.48: Concentração de amônio produzido pelas células Sf9, nas formulações de meio de cultivo seleccionadas, após 12 dias de cultivo.

Formu lações	NH ₄ ⁺ (m g/L)
3	5,5
4	4,2
9	4,5
11	6,1
C(1)	5,1
C(2)	66,2

C(1): Ensaio controle em meio Grace + 10% de SFB; C(2): Ensaio controle em meio Sf900II.

Pode-se observar que as culturas das células Sf9, nas formulações de meio de cultivo mostradas na Tabela 5.48, não acumularam elevadas concentrações de amônio durante todo o cultivo.

Mendonça et al. (1999) verificaram que as células Sf9 cultivadas em batelada produziam 20,4mg/L de amônia até o final da fase estacionária, valor este cerca de 4 vezes superior àqueles quantificados nos ensaios mostrados na Tabela 5.48, o que, no entanto não implicou em efeitos inibitórios durante o crescimento celular.

Na cultura controle em meio Sf900II ocorreu a produção deste metabólito em concentrações similares àquelas observadas para células de mamíferos. Contudo, não foram observados efeitos inibitórios do crescimento celular neste ensaio. A glutamina é o aminoácido precursor do amônio e fonte de carbono e nitrogênio essencial para o metabolismo celular. Em vista disso, a sua concentração foi monitorada durante todo o cultivo em todos os ensaios realizados. Verificou-se que não houve escassez deste aminoácido e que a glutamina apresentou pouca variação nas concentrações durante o cultivo.

5.7.2. Análise Comparativa entre os Parâmetros Cinéticos Obtidos para as Células Sf9 após Seis Passagens Consecutivas nas Formulações Seleccionadas e os Ensaios Controle em meio Grace acrescido de 10% de SFB e em Meio Sf900II

Com o intuito de continuar uma análise sistemática do real desempenho das células Sf9 nas formulações de meio de cultivo testadas, foram calculados os parâmetros cinéticos mostrados na Tabela 5.49.

Tabela 5.49: Parâmetros cinéticos, concentração e viabilidade celular para células Sf9 nas formulações testadas após seis subcultivos consecutivos.

Formulações	$t_d^{(1)}$ (h)	$\mu_{Máx}^{(2)}$ (h ⁻¹)	$t_{lag}^{(3)}$ (d)	$X_{vs}^{(4)}$ (x10 ⁵ cél. Viáveis/mL	$X_{me}^{(5)}$ (x10 ⁵ cél. Viáveis/mL	$V_s^{(6)}$ (%)
4*	48	0,0144	1	37,5	13,8	90
16	35	0,0198	1	34,2	14,0	91
9	43	0,0161	2	23,0	6,3	78
11*	33	0,0210	2	27,5	5,8	56
1	53	0,0130	2	33,1	9,5	88
3*	34	0,0203	<1	46,7	10,1	92
C(1)	47	0,0147	2	9,5	5,8	85
C(2)	25	0,0277	4	80,0	18,0	94

*Ensaio selecionados para a infecção por baculovírus; ⁽¹⁾Tempo de duplicação celular; ⁽²⁾Taxa máxima de crescimento celular; ⁽³⁾Tempo de duração da fase *lag*; ⁽⁴⁾Concentração de células viáveis na fase estacionária ⁽⁵⁾Concentração de células viáveis na fase média exponencial; ⁽⁶⁾Viabilidade ao se atingir a fase estacionária; C(1): ensaio controle em meio Grace + 10% de SFB; C(2): ensaio controle em meio Sf900II.

Através destes parâmetros e das cinéticas de crescimento celular mostradas nas Figuras 5.37 a 5.41 foi possível avaliar o real desempenho global destas células nos meios de cultivo empregados. Pode-se observar que a taxa de crescimento específico variou de 0,0130 a 0,0277 h⁻¹e o tempo de duplicação variou de 25 e 48 horas. Com já mencionado, a utilização dos derivados de leite, nas faixas de concentrações testadas, ocasionou um acréscimo no tempo de duplicação celular no cultivo de células de inseto da linhagem Sf9. Contudo, o crescimento celular foi de pelo menos 2,9 vezes maior que o crescimento das células em meio Grace acrescido de 10% de SFB. A viabilidade celular ao se atingir a fase estacionária variou entre 56 e 94%. Ainda que adaptadas às formulações testadas, as células Sf9 apresentaram alterações morfológicas como granulações no citoplasma e aumento no diâmetro celular. Em função desta observação foi realizada a análise da osmolalidade das formulações de meio de cultivo testadas, descritas a seguir, para se verificar se esta não seria uma das causas, principalmente, das longas fase *lag* costumeiramente observadas.

5.7.3. Análise da Osmolalidade das Formulações Seleccionadas Empregadas no Crescimento das Células Sf9

Conforme já mencionado, observou-se que durante o cultivo celular foram observadas alterações morfológicas nas células Sf9 quando o CPSL era empregado como suplemento ao meio de cultivo. Estas alterações foram monitoradas através de microscopia ótica. Objetivou-se com isso estabelecer uma relação direta entre a osmolalidade medida e as alterações morfológicas observadas.

A Tabela 5.50 mostra as osmolalidades do meio de composição mínima, meio Grace, do meio de composição quimicamente definida, Sf900II e das formulações de meio de cultivo propostas neste estudo que proporcionaram elevada concentração e viabilidade celular.

Tabela 5.50: Osmolalidade dos meios empregados no cultivo das células Sf9.

Meios de Cultivo	Osmolalidade (mOsm/kgH ₂ O)	Aumento da osmolalidade em relação ao Meio Grace contendo SFB (%)
Grace	326	-
Sf900II	350	7
Formulação 4	408	20,0
Formulação 16	427	23,4
Formulação 9	379	13,9
Formulação 11	400	18,5
Formulação 1	441	26,0
Formulação 3	438	25,5

Os meios de cultivo comumente empregados para células de insetos como o meio Grace e o meio livre de soro Sf900II apresentaram osmolalidade em média de 340 mOsm/kgH₂O. O meio Grace, conforme indicação do fabricante, deveria apresentar osmolalidade de 300 mOsm/kgH₂O, ou seja, cerca de 9% inferior ao valor obtido através do osmômetro empregado neste estudo. A diferença pode decorrer da diferença entre lotes ou mesmo da preparação da amostra para a realização da medida no equipamento.

A adição de suplementos como o concentrado protéico de soro de leite bovino (CPSL) e o permeado de soro de leite liofilizado ao meio Grace aumentou significativamente os valores de osmolalidade. Os meios de cultivo que possuem em sua formulação 5% de CPSL (formulações 4 e 16) proporcionaram um acréscimo em média de 22% na osmolalidade em relação à do meio Grace. Os meios que possuem 4 e 2,3% de CPSL (formulações 9 e 11) proporcionaram um acréscimo em média de 16% e as formulações que empregaram o permeado liofilizado em sua composição na concentração de 1% (formulações 1 e 3) proporcionaram aumento de até 26% na osmolalidade do meio. As alterações morfológicas foram observadas somente nos meios que apresentavam CPSL em variadas faixas de concentração. Entretanto, as maiores contribuições no aumento da osmolalidade ocorreram nas formulações nas quais o permeado liofilizado estava presente, possivelmente em razão de lactose presente em elevada concentração neste suplemento.

Após a análise do desempenho cinético das células nas formulações estudadas, foi realizada a infecção das culturas celulares pelo baculovírus, para os meios cujas composições se julgou mais adequadas.

5.8. Análise da Infecção das Células Sf9 por Baculovírus Empregando-se Multiplicidade de Infecção 1

A produção de baculovírus ocorreu através da infecção das células Sf9 durante o período médio de crescimento exponencial. A Figura 5.45 mostra o efeito citopático do baculovírus ocasionado nas células Sf9. Este efeito é

caracterizado através da formação de poliedros, cápsulas protéicas que envolvem o material genético viral.

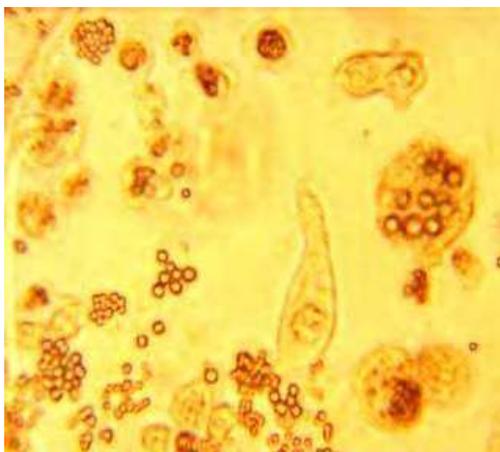


Figura 5.45: Células Sf9 infectadas por baculovírus mantidas em meio Sf900II. (Figura gentilmente cedida pelo Dr. Ronaldo Z. Mendonça)

A Figura 5.45 apresenta o estágio final do período de infecção celular, aproximadamente 6 a 7 dias após a infecção viral. Neste estágio, as células Sf9 sofreram lise e liberaram os poliedros no meio de cultivo. Estes poliedros são coletados e passam por um processo de centrifugação para a concentração do material. Após este processamento podem ser empregados como biopesticida, para infectar a lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*.

A produção do vírus foi realizada empregando-se as formulações 4, 11 e 3, em vista do bom desempenho cinético quanto ao crescimento e a viabilidade celular durante a fase de crescimento exponencial. A Figura 5.46 mostra a cinética de produção de poliedros.

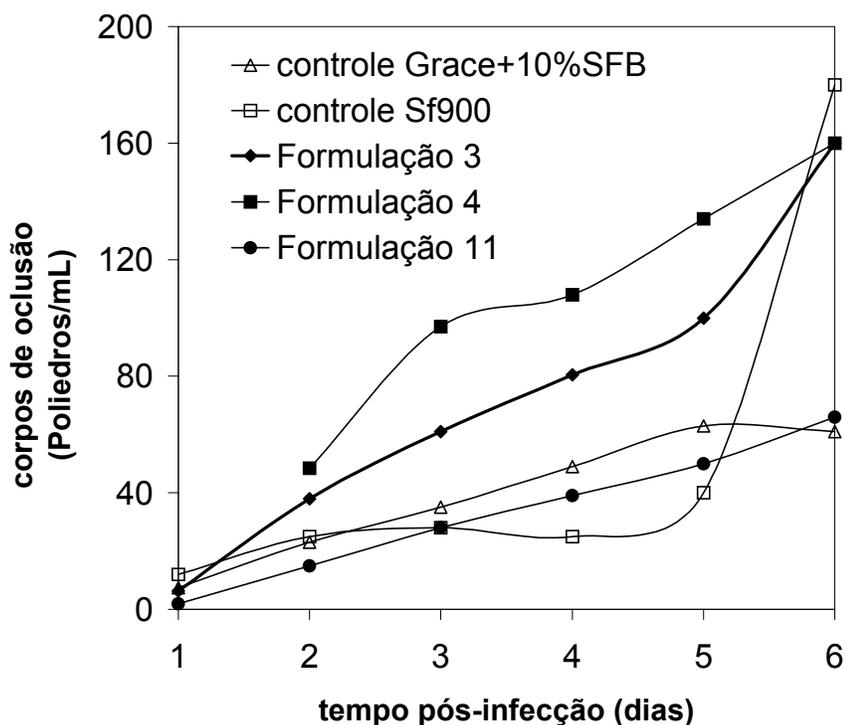


Figura 5.46: Cinética de produção de poliedros através das células Sf9 nas formulações 3, 4 e 11. Concentração do inóculo celular 3×10^5 células viáveis/mL. Multiplicidade de infecção 1.

A Figura 5.46 apresenta a produção de poliedros virais nas formulações de meio de cultivo selecionadas para infecção, formulações 3, 4 e 11. As culturas celulares foram infectadas na concentração de 1×10^6 células viáveis/mL. Pode-se observar que ocorre produção expressiva de corpos de oclusão nas formulações 3 e 4 ao longo de todo período, alcançando $1,6 \times 10^7$ poliedros/mL. Estas formulações apresentaram uma no sexto dia de cultivo uma produção de poliedros 2,6 vezes maior que a do ensaio controle em meio Grace acrescido de 10% de SFB e 1,1 vezes menor que a produção em meio Sf900II. A formulação 11 apresentou desempenho similar ao ensaio controle em meio Grace.

Uma vez que para a produção de 1 a 2 kg de CPSL processa-se cerca de 1000L de leite in natura, e estimando-se então que a maior parcela do custo do CPSL seja o próprio custo da matéria prima, pode-se supor que um grama deste suplemento, custaria em torno de R\$ 1,00 (US\$ 0,3). A Tabela 5.51 apresenta o custo dos materiais empregados na formulação dos meios de cultivo selecionados.

Tabela 5.51: Custo estimado dos materiais empregados nas formulações de meio de cultivo estudada.

Material	Preço (US\$/unidade de medida
Meio Grace*	15,6/L
Meio Sf900II*	50,3/L
Glicose*	17,4/kg
Pluronic F68 a 10%*	102,0/L
Extrato de levedura*	150,0/kg
Soro Fetal Bovino(1)	125,0/L

(Fonte: *Catálogo Sigma Chemical Co., 1999; 1Nutricel Nutrientes Celulares Ltda, Campinas - SP).

Aplicando-se uma abordagem similar para o permeado da ultrafiltração liofilizado e considerando os seguintes custos para os outros materiais envolvidos na formulação dos meios de cultura empregados neste trabalho, pode-se estimar o custo final dos meios selecionados como mais adequados. A Tabela 5.52 mostra esta estimativa.

Tabela 5.52: Estimativa do custo de obtenção dos meios dos meios de cultivo empregados neste estudo.

Meios de Cultivo	Custo/Unidade de volume	Custo/baculovírus
	US\$/Litro	US\$/1010poliedros
Grace	23,4	43,3
Sf900II	50,3	27,9
3	45,9	28,7
4	68,1	42,6
11	56,8	89,1

Verificou-se através da Tabela 5.52 que o custo de obtenção nos meios desenvolvidos neste trabalho mostrou-se bastante atraente, embora o emprego da formulação 11 do CPSL tenha proporcionado um aumento no custo de obtenção do baculovírus cerca de 2 vezes quando comparado ao ensaio controle em meio Grace.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1. Conclusões

Os estudos realizados com a finalidade de avaliar a influência da composição do meio de cultura no crescimento e na viabilidade das células Sf9 e na produção de baculovírus levaram às seguintes conclusões:

a) O cultivo das células Sf9 e a produção de baculovírus empregando-se reduzido percentual de soro fetal bovino mostrou-se possível quando o meio Grace é suplementado com os derivados de leite concentrado protéico de soro bovino ou permeado de soro de leite liofilizado, e simultaneamente por extrato de levedura. Portanto, o cultivo poderia ser realizado a uma baixa concentração de SFB, minimizando custos de produção e dificuldades nos processos de separação e purificação de quando da produção de proteínas recombinantes.

b) As variáveis que mais influenciaram a produção de células Sf9 foram as concentrações de CPSL, permeado liofilizado e extrato de levedura.

c) Nas faixas estudadas, as concentrações de glicose e Pluronic F68 não mostraram efeitos significativos sobre o crescimento celular e a produção de vírus.

d) O comportamento apresentado pelas células nos ensaios realizados sob a primeira passagem das células nas formulações propostas foi diferente daquele apresentado após as passagens consecutivas. Nos ensaios de melhores resultados 3 (2,7g/L de glicose; 0,1% de Pluronic F68; 8g/L de extrato de levedura, 3% de SFB ; 1% de permeado liofilizado)e 4 (2,7g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura, 1% de SFB ; 5% de CPSL) a duração da fase *lag* foi menor nos ensaios após a adaptação e a produção de células Sf9 foi maior após a adaptação para a

formulação 3 e menor para a formulação 4. A velocidade de crescimento específica máxima foi menor após a adaptação no ensaio 3 e maior para a adaptação do ensaio 4.

e) Nos ensaios após a adaptação celular nas formulações propostas, a maior produção de células e de baculovírus ocorreu empregando-se as formulações 3 e 4. Obteve-se a partir destas formulações $46,7 \times 10^5$ células viáveis/mL, $37,5 \times 10^5$ células viáveis/mL respectivamente, e $1,6 \times 10^7$ poliedros/mL.

6.2. Sugestões para Trabalhos Futuros

Para dar continuidade ao trabalho desenvolvido, sugere-se o estudo de alguns aspectos citados a seguir:

a) Verificação do efeito da concentração dos suplementos empregados para a produção de proteínas recombinantes através do emprego de baculovírus geneticamente modificados.

b) Monitoramento da concentração de outras fontes de carbono como frutose, lactose e sacarose, assim como de outros aminoácidos como alanina, treonina e leucina, dentre outros.

c) Ampliação da faixa de concentração de estudo para o emprego do permeado liofilizado, extrato de levedura, visando eliminar a necessidade de adição de soro fetal bovino.

d) O estudo do emprego de soro de leite total ou parcialmente hidrolisado.

Conclusões e Sugestões

e) Avaliação do comportamento celular e da produção de células Sf9 nos meios de cultura desenvolvidos em processos com biorreatores operando em modo de batelada e batelada alimentada.

f) Realização de bioensaios para verificar a infectividade dos poliedros produzidos em lagartas da soja *Anticarsia gemmatalis*.

g) Verificação da adição direta de lipídios no meio de cultivo de células de inseto na tentativa de redução parcial ou total do SFB.

h) Avaliação da produção de proteínas recombinantes a partir do sistema de expressão pelo vetor baculovírus (BEVs) em meio livre de proteínas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agathos, S.N. "Production Scale Insect Cell Culture". *Biotechnology Advances*, 9:51-68 (1991).
- Barros Neto, B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. "Planejamento e Otimização de Experimentos". 2. ed., Unicamp, Campinas (1995).
- Bérdard, C., Tom, R., Kamem, A. "Growth, Nutrient Consumption, and End Product Accumulation in Sf9 and BTI-EAA Insect Cell Cultures: Insights into Growth Limitation and Metabolism". *Biotechnology Progress*, 9:615-624 (1993).
- Borges, P.F.Z., Sgarbieri, V.C., Dias, N.F.G.P., Jacobucci, H.B., Pacheco, M.T.B., Baldini, V.L.S. "Produção Piloto de Concentrados de Proteínas de Leite bovino: Composição e Valor Nutritivo". *Brazilian Journal of Food Technology*, 4:1-8 (2001).
- Bury, D., Jelen, P., Kimura, K. "Whey Protein Concentrate as a Nutrient Supplement for Lactic Acid Bacteria". *International Dairy Journal*, 8:149-151 (1998).
- Catálogo Sigma Chemical Company, 2003.
- Cavallarro V., Dissertação de Mestrado "Efeitos de Peptídios da Caseína: Aspectos Bioquímicos, Farmacológicos e Imunológicos". Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT (1999).
- Cestari, A.N., Simões, L.C.G. In "Anais do Simpósio sobre Cultura de Células". São Paulo, ACIESP, nº 10, 143-191 (1978).
- Chisti, Y. "Animal-Cell Damage in Sparged Bioreactor". *Trends in Biotechnology*, 18: 420-432 (2000).
- Cruz, P.E., Cunha, A., Peixoto C.C, Clemente, J., Moreira, J.L.; Carrondo, M.J.T. "Optimization of the Production of Virus Like Particles in Insect Cells". *Biotechnology and Bioengineering*, 60:408-418 (1998).
- Doverskog, M., Betram, E., Ljunggre, J., Öhman, O., Sennerstam, R., Haggstrom, L. "Cell Cycle Progression in Serum Free Cultures of Sf9 Insect Cells:

- Modulation by Conditioned Medium Factors and Implications for Proliferation and Productivity". *Biotechnology Progress*, 16:837-846 (2000).
- Drews, M., Doverskog, M., Öhman, L., Chapmam, B.E., Jacobsson, U., Kuchel, P.W., Haggstrom, L. "Pathways of Glutamine Metabolism in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Insect Cell: Evidence for the Presence of the Nitrogen Assimilation System, and a Metabolic Switch by $1\text{H}/15\text{N}$ NMR". *Journal of Biotechnology*, 78:23-37 (2000).
- Drews, M., Paalme, T., Vilu, R. "The Growth and Nutrient Utilization of the Insect Cell Line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in Batch and Continuous Culture". *Journal of Biotechnology*, 40:187-198 (1995).
- Echalier, G. "Drosophila Cells in Culture". San Diego, Academic Press, 1-67 (1997).
- Embrapa Soja (1997).
- Frankel, A., Roberts, H., Gulik, H. Afrin, L., Vesely, J., Willingham, M. "Expression of Ricin B Chain in *Spodoptera frugiperda*". *Biochemical Journal*, 303:787-794 (1994).
- Freshney, R.I. "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique". New York, (1992).
- Freshney, R.I. "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique". New York, Wiley-Liss, 25-42 (1994).
- Globo Rural on Line, editora Globo, edição 197 (2002).
- Goddard, C., Francis, G.L., Belford, D.A., Regester, G.O., Copeland, A.C., De Silva, K.S., Smithers, G.W., Toneman, L.Z., Ballard, F.J. In "Whey", International Dairy Federation. Bélgica, 365-367 (1998).
- Grace, T.D.C. "Prolonged Survival and Growth of Insect Ovarian Tissue *In vitro* Conditions". *Annals of New York Academy of Sciences*, 77:275-282 (1959).

- Ikonomou, L., Bastin, G., Schneider, Y.J., Agathos, S.N. "Design of an Efficient Medium for Insect Cell Growth and Recombinant Protein Production". *In vitro Cellular and Developmental Biology; Animal*, 37:549-559 (2001).
- Ikonomou, L., Schneider, Y.J., Agathos, S.N. " Insect Cell Culture for Industrial Production of Recombinant Proteins". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 6:1-20 (2003).
- Kioukia, N., Nienow, A.W., Emery, A.N., Al-Rubeai, M. "Physiological and Environmental Factors Affecting the Growth of Insect Cell and Infection with Baculovirus". *Journal of Biotechnology*, 38:243-251 (1995).
- Maiorella, B., Inlow, D., Shauger, A., Harano, D. "Large scale insect Cell Culture for Recombinant Protein Production". *Bio/Technology*, 6:1406-1410 (1998).
- Maranga, L., Mendonça, R.Z., Bengala, A., Peixoto, C.C., Moraes, R.H.P., Pereira, C.A., Carrondo, M.J.T. "Enhancement of Cell Growth and Longevity Through Supplementation of Culture Medium with Hemolymph". *Biotechnology Progress*, 19:58-63 (2003).
- Massotte, D., Pereira, C.A., Pouliquen, Y., Pattus, F. "Parameters Influencing Human μ opioid Receptor over Expression in Baculovirus Infected Insect Cells". *Journal of. Biotechnology*, 69:39-45 (1999).
- McKenna, K.A., Hong, H., vanNunen, E., Granados, R.R. "Establishment of New *Trichoplusia ni* Cell Lines in Serum Free Medium for Baculovirus and Recombinant Protein Production". *Journal of Invertebrate Pathology*, 71: 82-90 (1998).
- McKenzezy, H.A. "Milk Proteins-Chemistry and Molecular Biology". Academic Press, 1 (1970).
- Mendonça, R.Z., Palomares, L.A., Ramírez, O.T. "An Insight into Insect Cell Metabolism Through Selective Nutrient Manipulation". *Journal of Biotechnology*, 72:61-75 (1999).
- Mitsuhashi, J. "Invertebrate Cell System Application", Boca Raton, CRC, 3-20 (1989).

- Montgomery, D.C., Runger, G.C. "Applied Statistics and Probability for Engineers". 2nd edn. Wiley, New York (1999).
- Moscardi, F. "Controle Biológico da *Lagarta da Soja*, *Anticarsia Gemmatalis*, por Baculovirus, In: Encontro Nacional de Fitossanitaristas, Florianópolis. Anais do Encontro Nacional de Fitossanitaristas. Brasília: Ministério da Agricultura, 93–101(1984).
- Moscardi, F., Corso, I.C. "Ação de Baculovirus *Anticarsia* sobre a *Lagarta da Soja* (*Anticarsia Gemmatalis* Hubner, 1818) e outros Lepidópteros In: II Seminário Nacional de Pesquisa de Soja, Brasília. Anais do II Seminário Nacional de Pesquisa de Soja. Londrina: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Soja, 51-57 (1981).
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K., Luckow, V.A. "Baculovirus Vectors: A Laboratory Manual". Freeman, New York (1992).
- Öhman, L., Alarcon, M., Ljunggren, J., Ramqvist, A.K, Haggstrom, L. "Glutamine is not an Essential Amino Acid for Sf9 Insect Cell". *Biotechnology Letters*, 18:756-770 (1996).
- Öhman, L., Ljunggren, J., Haggstrom, L. "Induction of a Metabolic Switch in Insect Cell by Substrate-Limited Fed Batch Cultures". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43:1006-1013 (1995).
- Palomares, L.A., Ramirez, O.T. " The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture". *Cytotechnology*, 22: 225-237 (1996).
- Palomares, L.A., Gonzáles, M., Ramírez, O.T. "Evidence of Pluronic F-68 Direct Interaction with Insect Cell: Impact on Shear Protection, Recombinant Protein, and Baculovirus Production". *Enzyme and Microbial Technology*, 26:324-331 (2000).
- Park, J.H., Kim, H.Y., Han, K. H., Chung, I.S. "Optimization of Transfection Conditions for Expression of Green Fluorescent Protein in *Drosophila Melanogaster* S2 Cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 558-563 (1999).

- Pereira, C.A., Pouliquen, Y., Roda, V, Massotte, D, Mortensen, C, Sogayar, M.C., Ménissier-de Murcia, J. "Optimized Insect Cell Culture for the Production of Recombinant Heterologous Proteins and Baculovirus Particles". *BioTechniques*, 31:1262-1268 (2001).
- Power, J.F., Reid, S., Radford, K.M., Greenfield, P.F., Nielsen, L.K. "Modeling and Optimization of the Baculovirus Expression Vector System in Batch Suspension Culture". *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 710-719 (1994).
- Reuveny, S., Kemp, C.W., Eppstein, L., Shiloach, J. "Carbohydrate Metabolism in Insect Cell Cultures during Cell Growth and Recombinant Protein Production". *Annals of New York Academy of Sciences*, 665: 230-237 (1992).
- Rhiel, M., Mitchell-Logean, C.M., Murhammer, D.W. "Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High Five TM) and *Spodoptera frugiperda* Sf9 Insect Cell Line Metabolism in Suspension Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 55:909-920 (1997).
- Sanderson, C.S., Barford, J.P., Barton, G.W., Wong, T.K.K., Reid, S. "A Structure, Dynamic Model for Animal Cell Culture: Application to Baculovirus/Insect Cell System". *Biochemical Engineering Journal*, 3:219-229 (1999).
- Sarom, M.L.G., Dissertação de Mestrado "Aproveitamento do Permeado de Soro de Leite Bovino através da Transformação de Lactose em Lactulose e como Ingrediente para Meios de Cultura de Bactérias Probióticas". Faculdade de Engenharia de Alimentos/ UNICAMP (2003).
- Schlaeger, E.J. "The Protein Hydrolysate, Primatone RL, is a Cost-Effective Multiple Growth Promoter of Mammalian Cell Culture in Serum-Containing and Serum-Free Media and Displays Anti-Apoptosis Properties". *Journal of Immunological Methods*, 194:191-199 (1996b).
- Sereni, A., Baserga, R. "Routine Growth of Lines in Medium Supplemented with Milk instead of Serum". *Cell Biology International Reports*, 5:339-345 (1981).
- Sgarbieri, V.C., Alvim, I.D., Vilela, E.S., Baldini, V.L., Bragagnolo, N. "Produção Piloto de Derivados de Levedura (*Saccharomyces* sp) para Uso como

- Ingrediente na Formulação de Alimentos”. Brazilian Journal of Food Technology, 21:119-125 (1999).
- Sommer, R., “In: 9th International Symposium on Yeasts”. Sydney (1996).
- Taticek, R.A., Choi, C., Phan, S.E., Palomares, L.A., Schuler, M.L. “Comparison of Growth and Recombinant Protein Expression in two Different Insect Cell Lines in Attached and Suspension Culture”. Biotechnology Progress, 17: 676-684 (2001).
- Tonso, A. Tese de Doutorado “Monitoramento e Operação de Cultivos de Células Animais em Sistemas de Perfusão”. Escola Politécnica/ Engenharia Química/USP (2000).
- van der Pol, L., Tramper, J. “Shear Sensitivity of Animal Cells from a Culture Medium Perspective”. Trends in Biotechnology, 16:323-328 (1998).
- Vardar-Sukan, F., Sukan, S.S. “Recent Advances in Biotechnology”. Dordrecht :Kluwer, 263-284 (1992).
- Vaughn, J.L., Fan, F. “Differential Requirements of two Insect Cell Lines for Growth in Serum-Free Medium”. *In vitro*; Cellular and Developmental Biology, 33:479-482 (1997).
- Veredas, V. Dissertação de Mestrado “Purificação de alfa-Lactoalbumina a partir do Soro de Leite em Leito Fixo e Expandido de Resinas”. Departamento de Processos Biotecnológicos/ FEQ/ UNICAMP (1999).
- Verma, R., Boleti, E., George, A.J.T. “Antibody Engineering: Comparison of Bacterial, Yeast, Insect and Mammalian Expression System”. Journal of Immunological Methods, 216: 165-181 (1998).
- Wang, M.Y., Vakharia, V., Bentley, W.E. “Expression of Epoxide Hydrolase in Insect Cell: a Focus on the Infected Cell”. Biotechnology and Bioengineering, 42:240-243 (1993b).

Referências Bibliográficas

- Wang, M.Y., Kmong, S., Bentley, W.E. "Effects of Oxygen/Glucose/Glutamine Feeding on Insect Cell Baculovirus Protein Expression: a Study on Epoxide Hydrolase Production." *Biotechnology Progress*, 9:355-361 (1993a).
- Wilkie G.E.I., Stockdale, H., Pirt, S.V. "Chemically Defined Media for Production of Insect Cells and Viruses *in vitro*. *Developments in Biological Standardization*, 46:29-37 (1980).
- Wu. J., Ruan, Q., Lam, H.Y.P. "Evaluation of Spent Medium Recycle and Nutrient Feeding Strategies for Recombinant Protein Production in the Insect Cell Baculovirus Process". *Journal of Biotechnology*, 66:109-116 (1998).
- Wyatt, G.R. "The Biochemistry of Insect Hemolymph". *Annual Review of Entomology*, 6:75-102 (1961).

Apêndice A

A-1: Crescimento e Viabilidade Celular e Consumo de Glicose, Glutamina e Evolução de Lactato para o Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1}

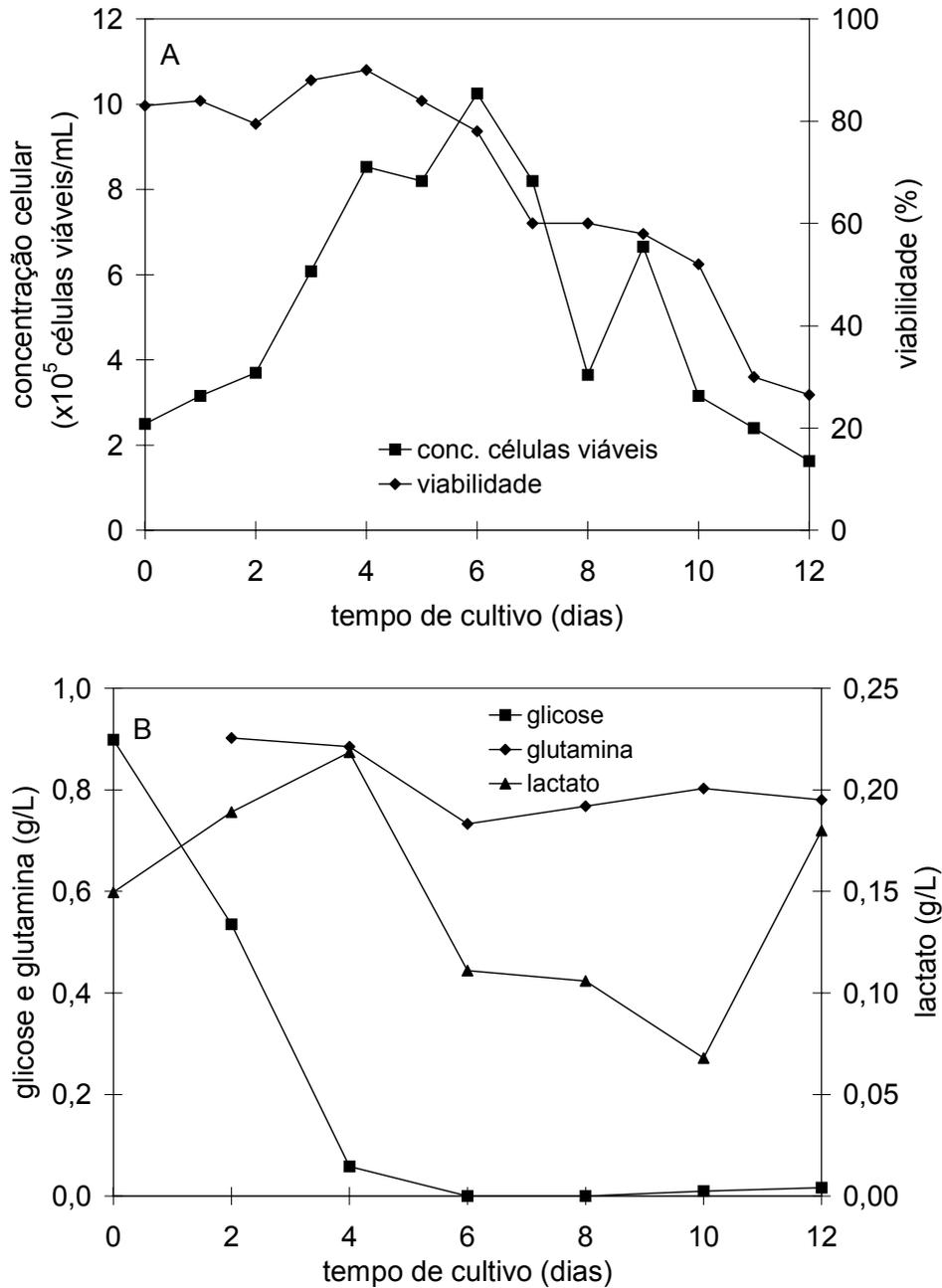


Figura A1: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Grace +10% de SFB. A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

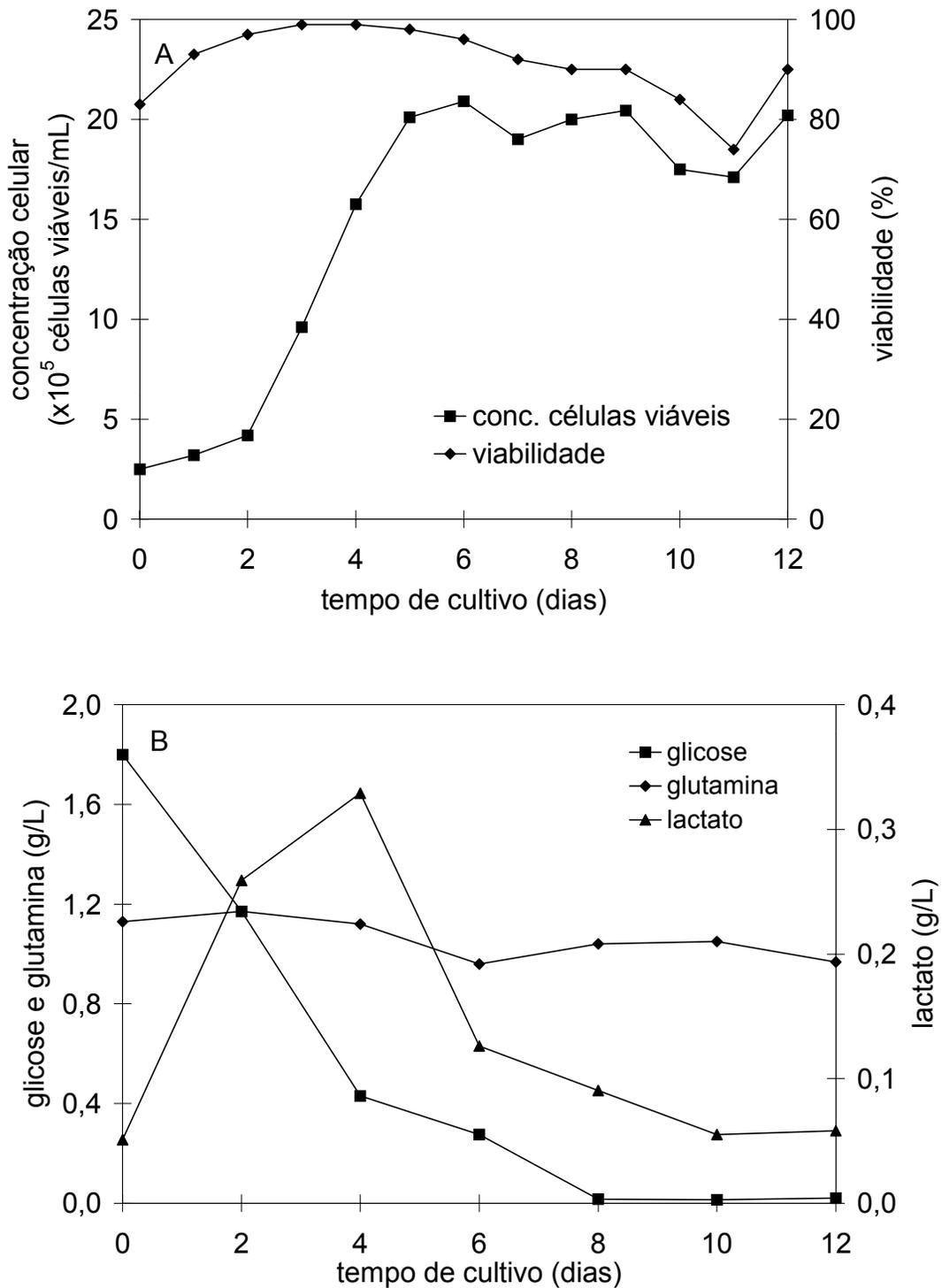


Figura A2: Parâmetros cinéticos para o ensaio 1 (1,8g/L de glicose; 1% SFB e 5 % de CPSL). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

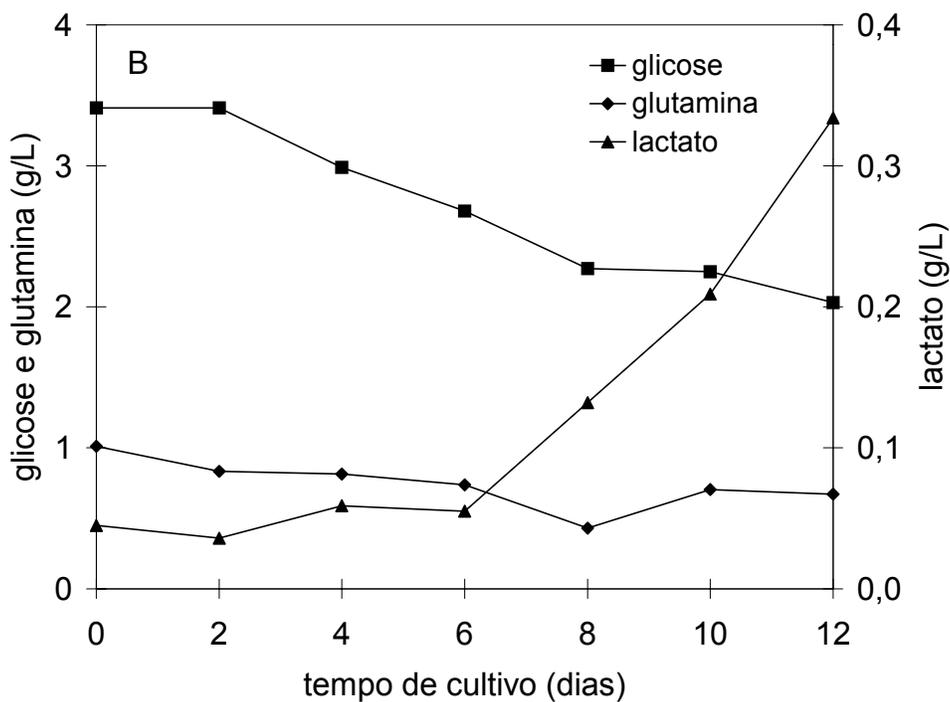
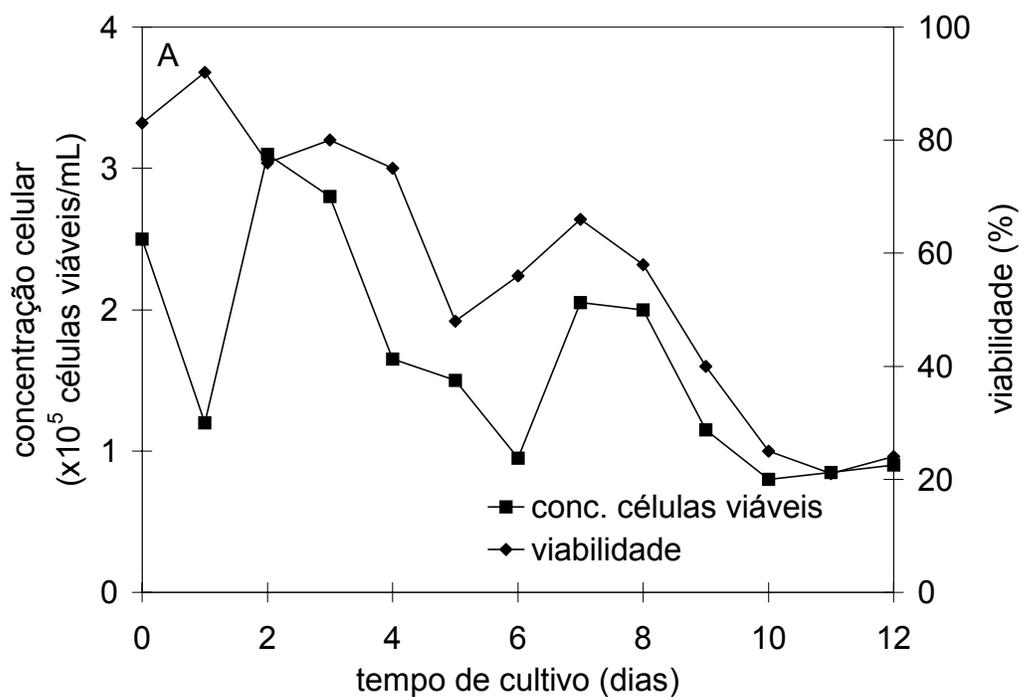


Figura A3: Parâmetros cinéticos para o ensaio 2 (2,7g/L de glicose e 1% SFB). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

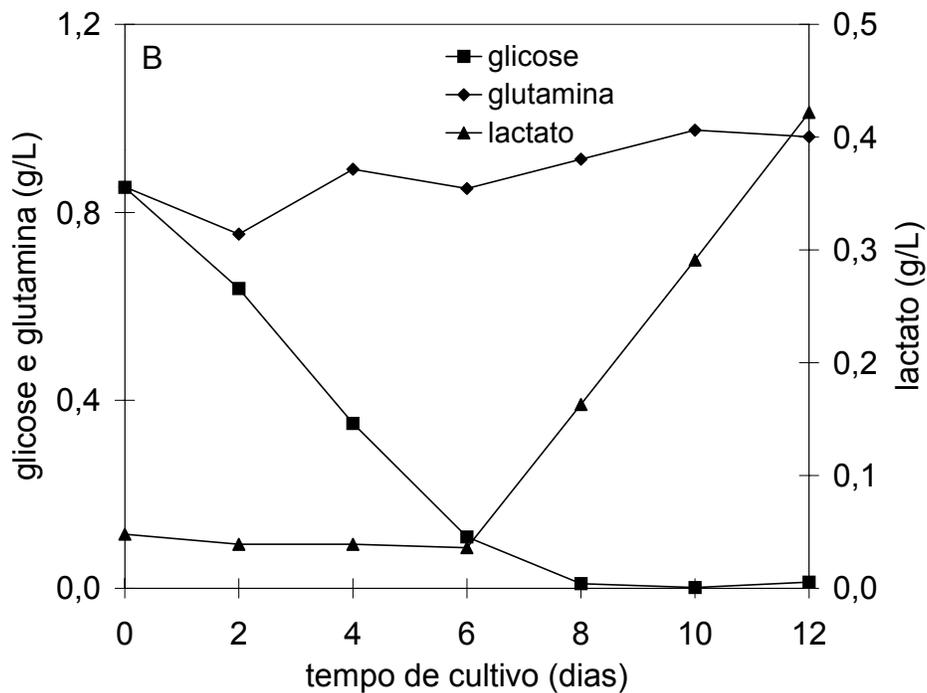
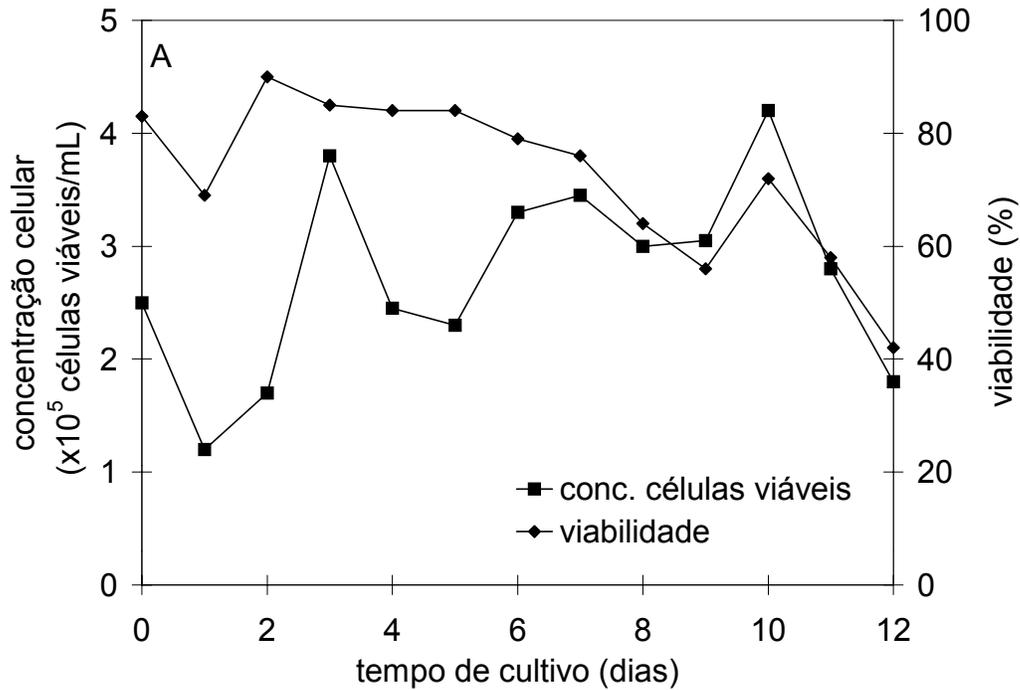


Figura A4: Parâmetros cinéticos para o ensaio 5 (1,8g/L de glicose; 0,2% de PF68 e 1% SFB). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

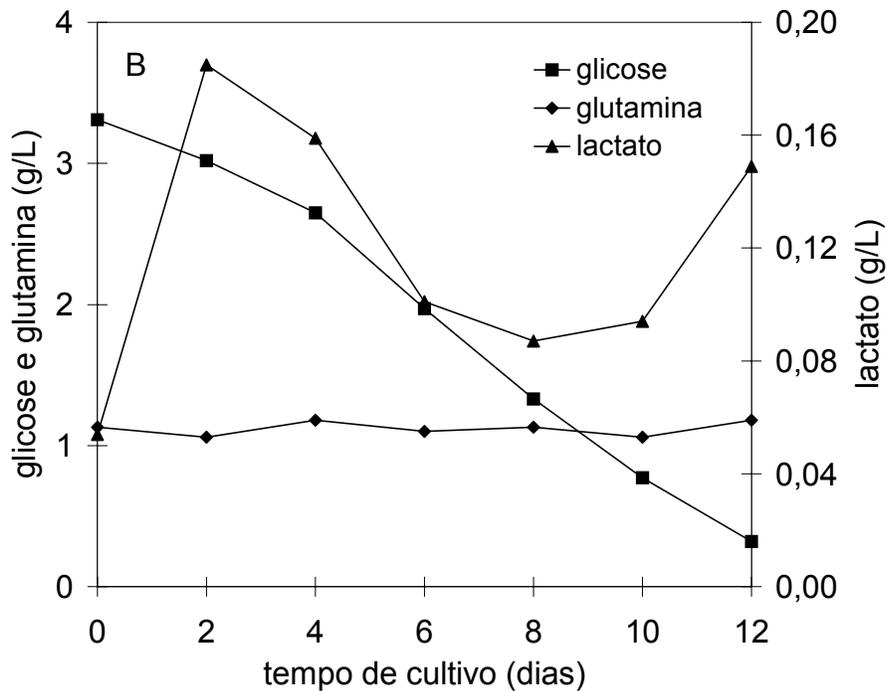
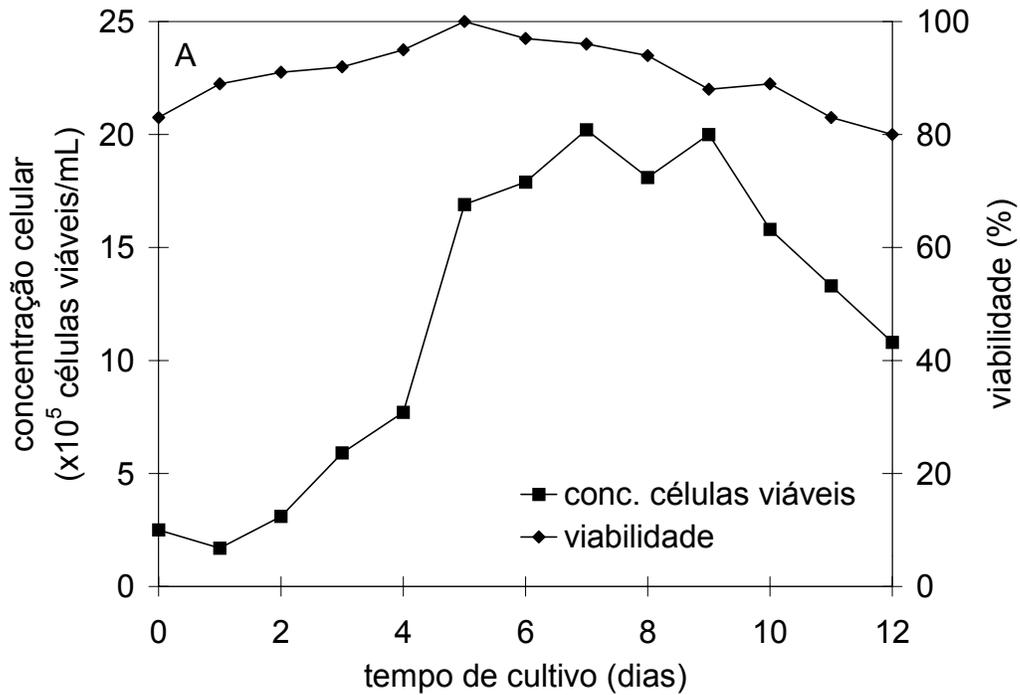


Figura A5: Parâmetros cinéticos para o ensaio 6 (2,7g/L de glicose; 0,2% de PF68; 1% SFB e 5% de CPSL). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

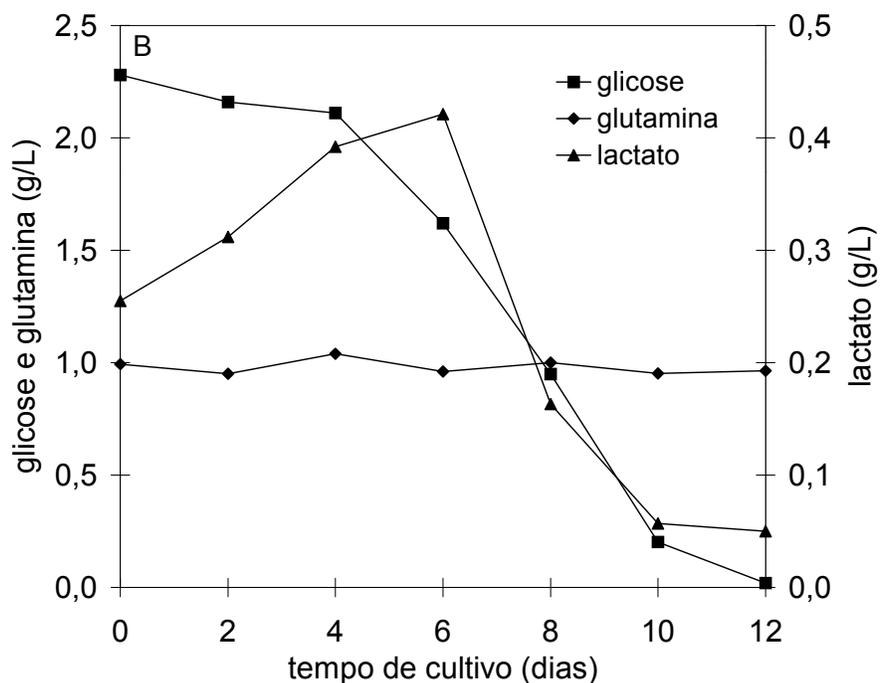
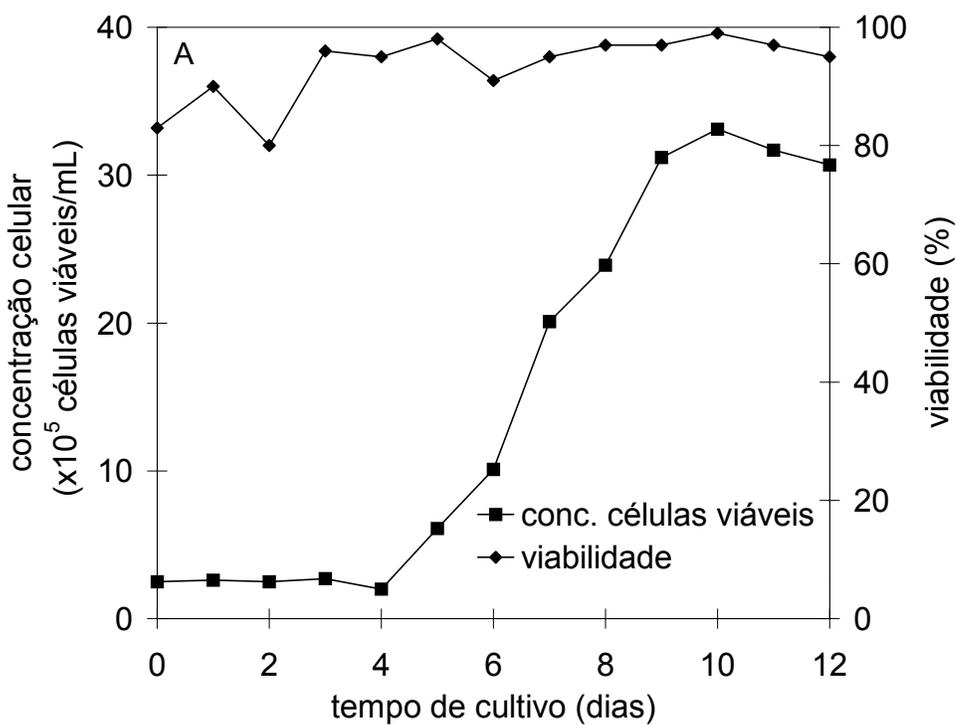


Figura A6: Parâmetros cinéticos para o ensaio 7 (1,8g/L de glicose; 8g/L de extrato de levedura; 0,2% de PF68; 1% SFB e 5% de CPSL). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

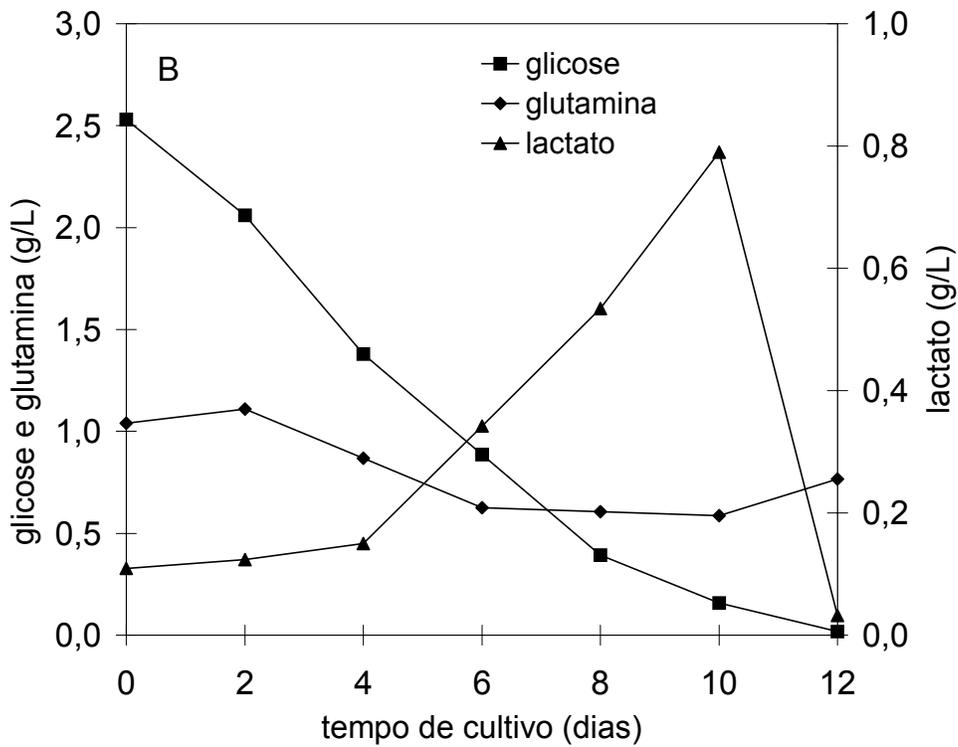
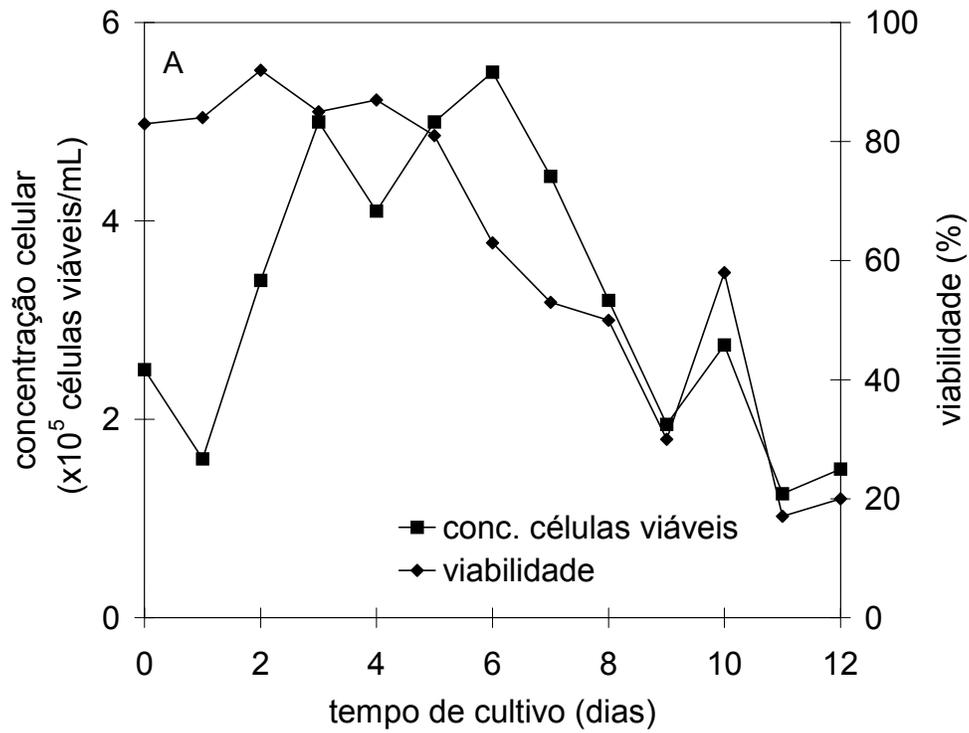


Figura A7: Parâmetros cinéticos para o ensaio 9 (1,8g/L de glicose e 3% SFB). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

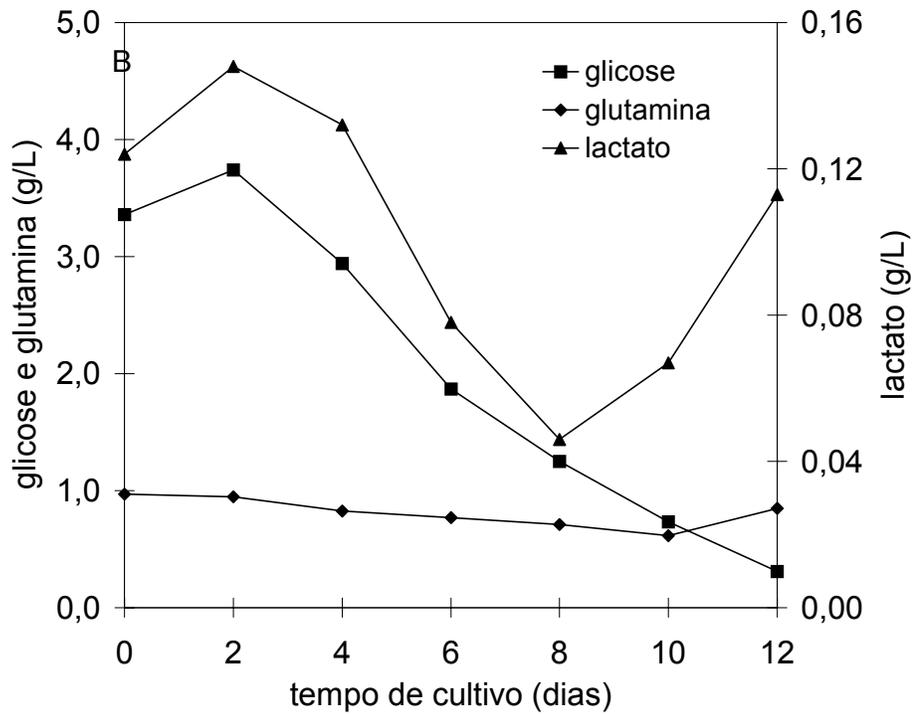
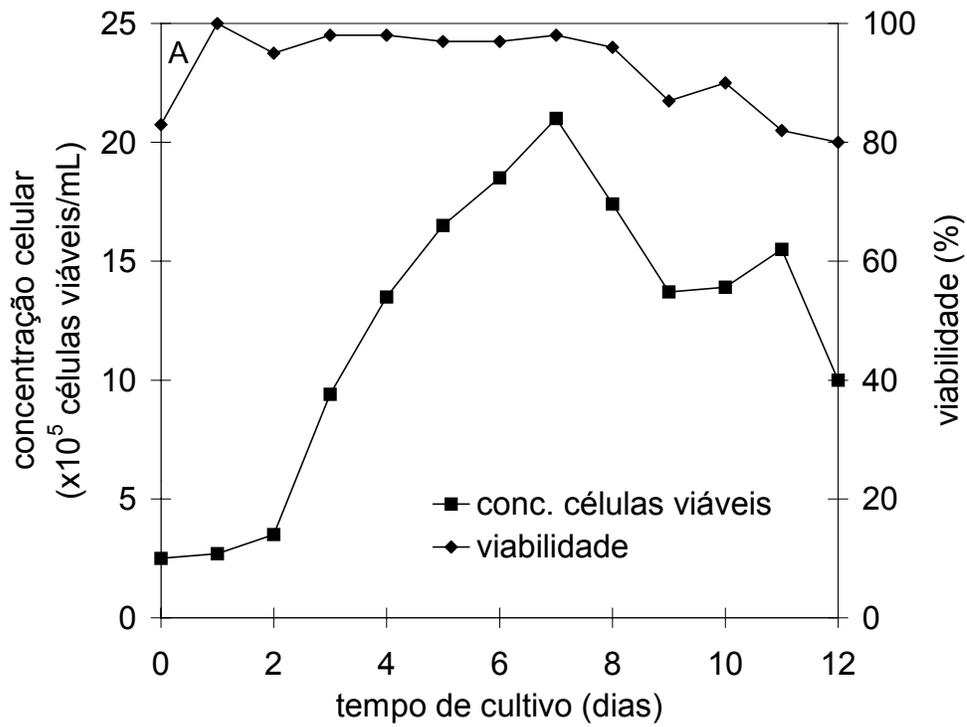


Figura A8: Parâmetros cinéticos para o ensaio 10 (2,7g/L de glicose; 3% SFB e 5% de CPSL). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

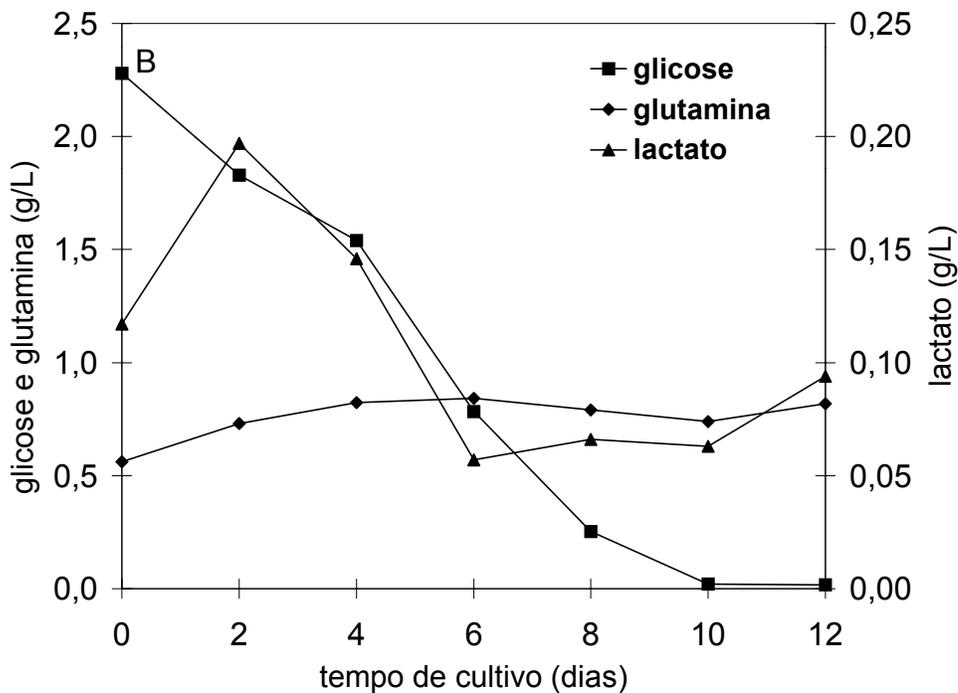
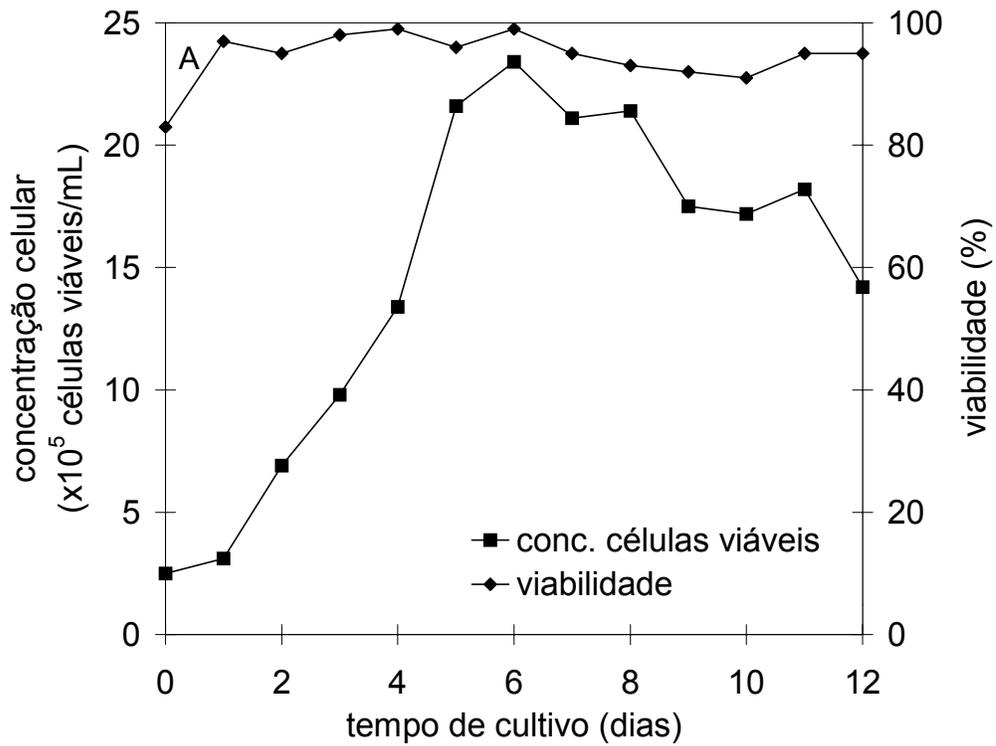


Figura A9: Parâmetros cinéticos para o ensaio 13 (1,8g/L de glicose; 0,2% de PF68; 3% SFB e 5% de CPSL). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

A-2: Crescimento e Viabilidade Celular e Consumo de Glicose, Glutamina e Evolução de Lactato para o Planejamento Fatorial Completo 2³ com Inóculo Proveniente do Meio Grace Acrescido de 10% de SFB

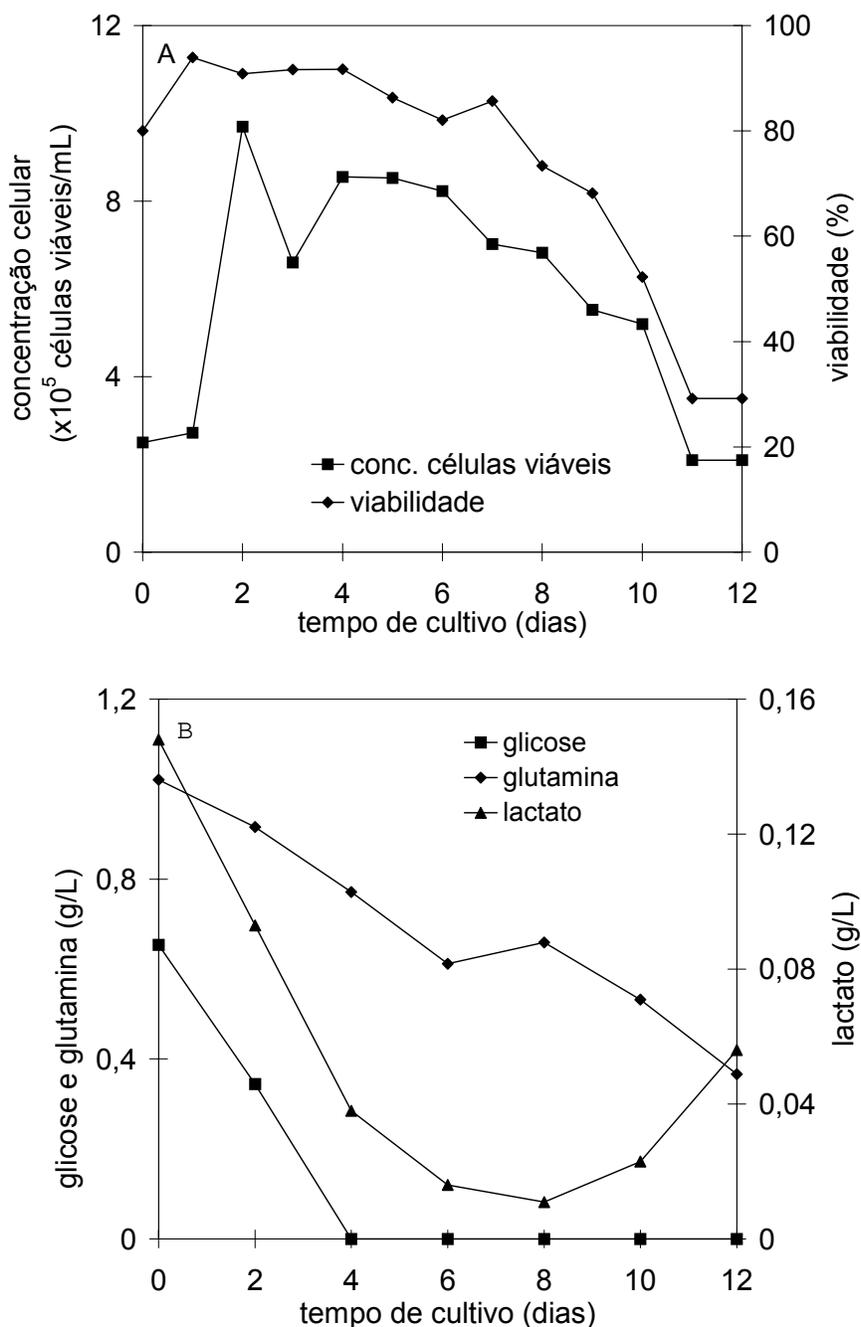


Figura A10: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Grace +10% de SFB. A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

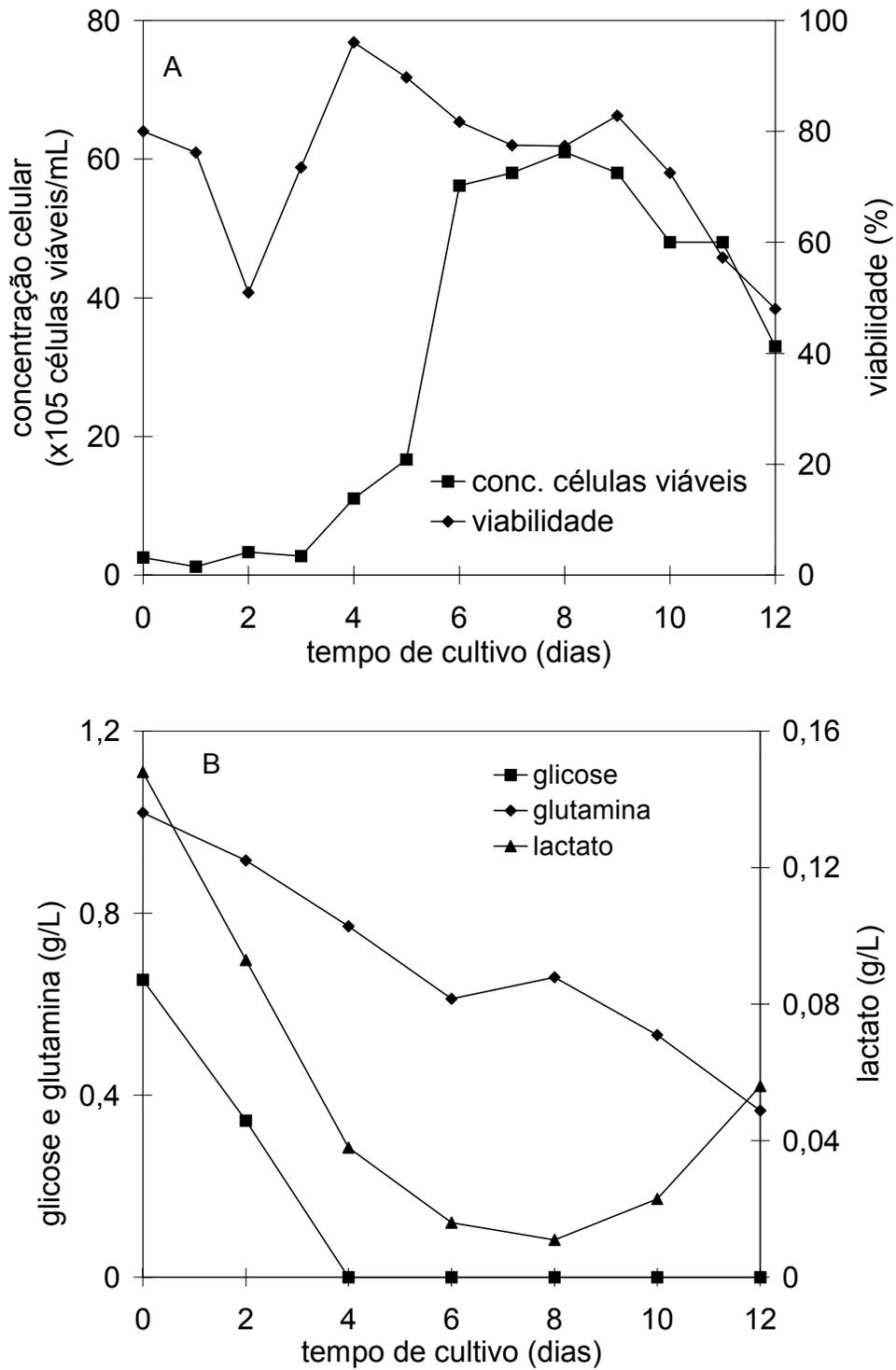


Figura A11: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Sf900II. A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

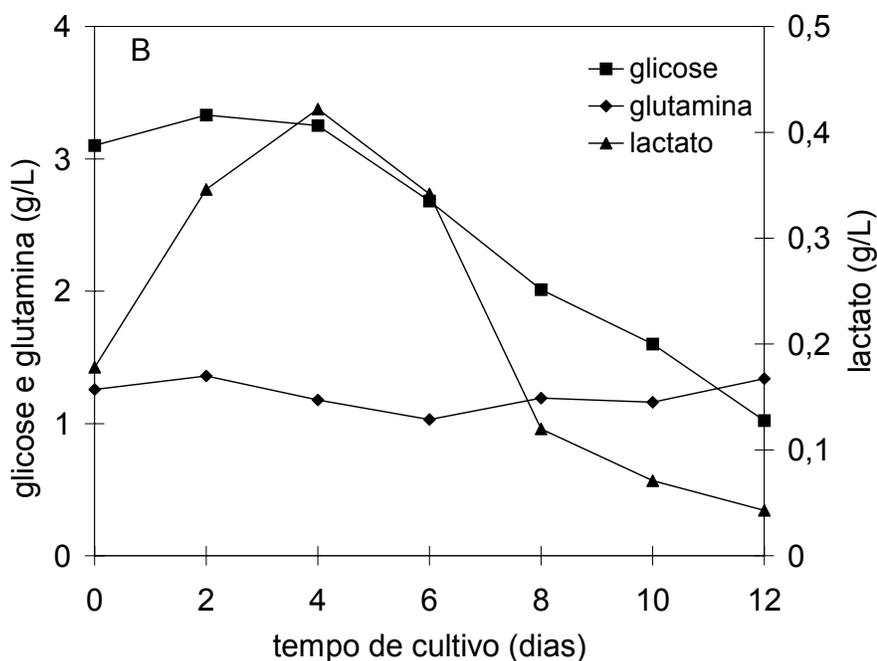
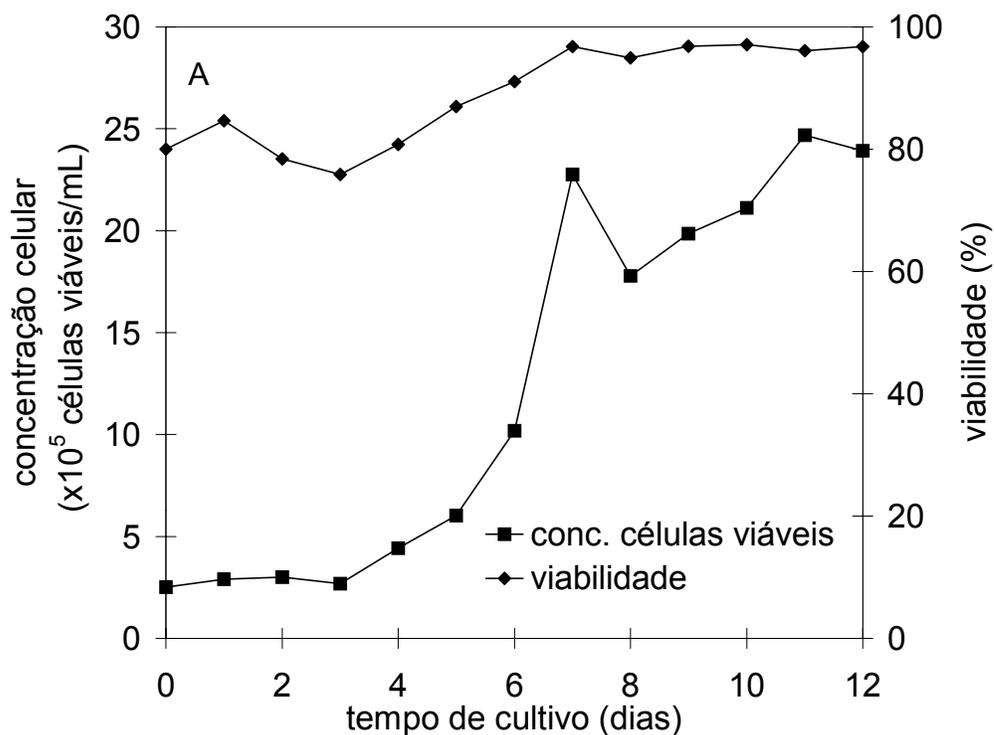


Figura A12: Parâmetros cinéticos para o ensaio 1 (4g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

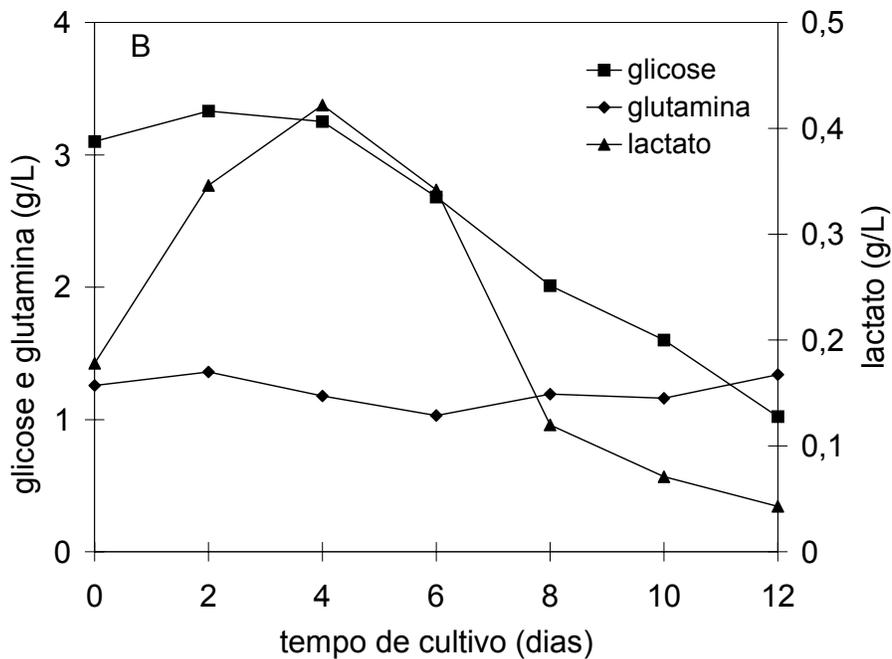
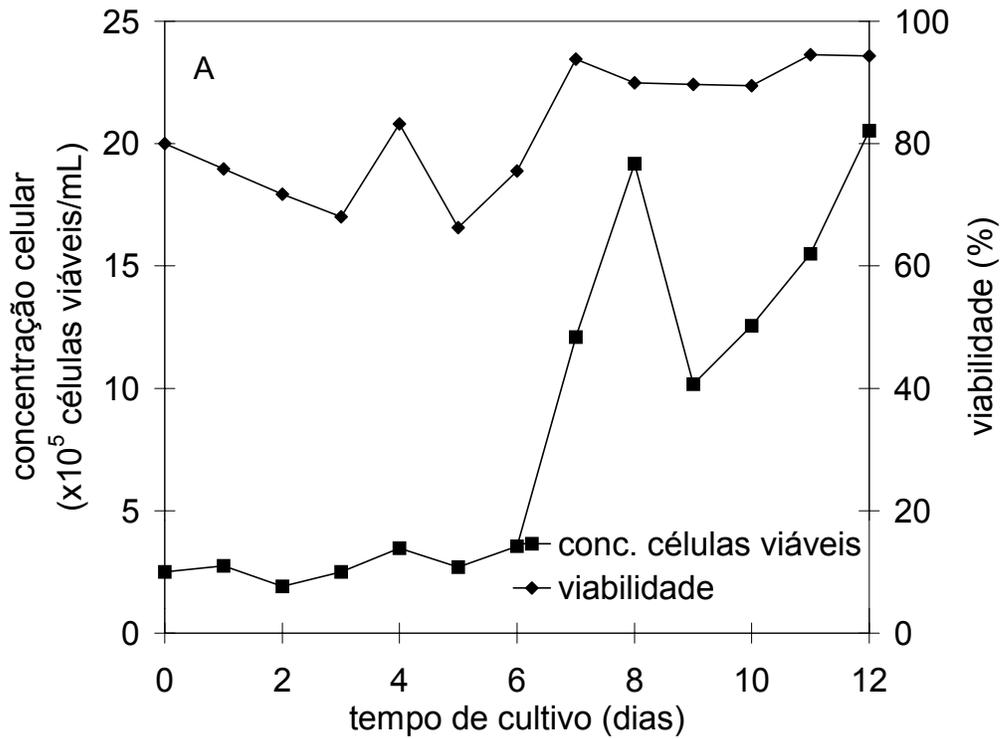


Figura A13: Parâmetros cinéticos para o ensaio 2 (8g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

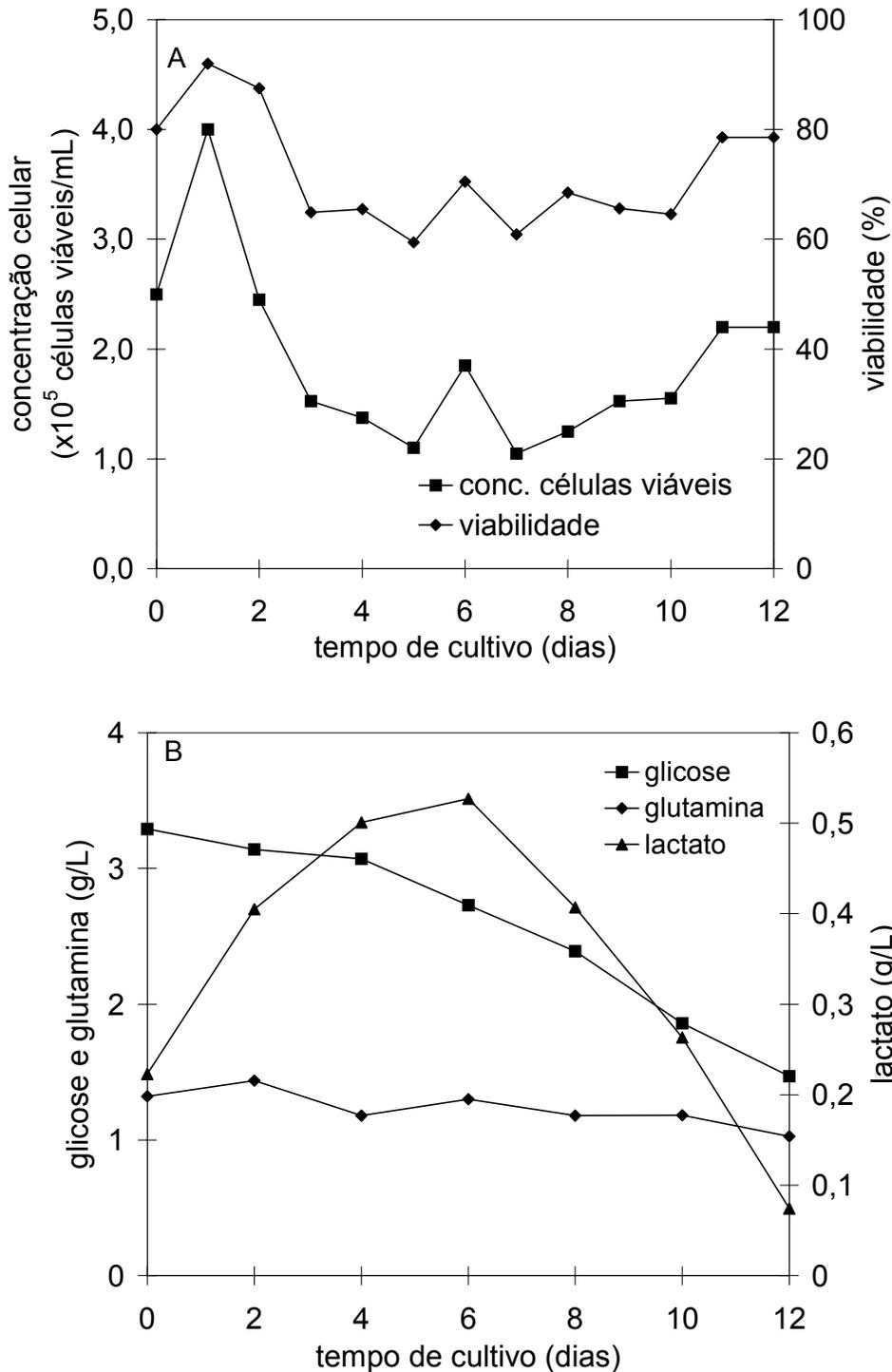


Figura A14: Parâmetros cinéticos para o ensaio 3 (4g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

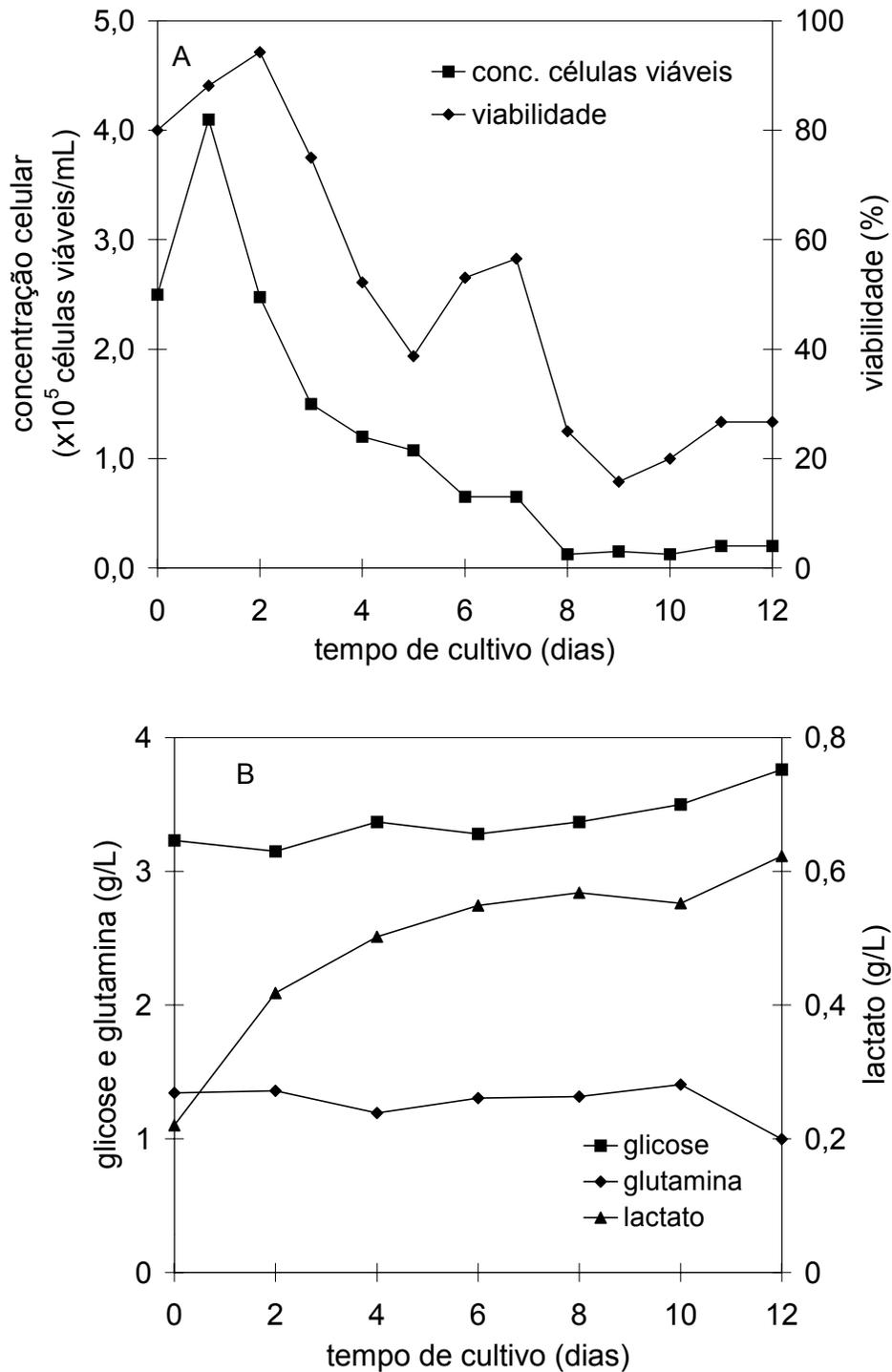


Figura A15: Parâmetros cinéticos para o ensaio 4 (8g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

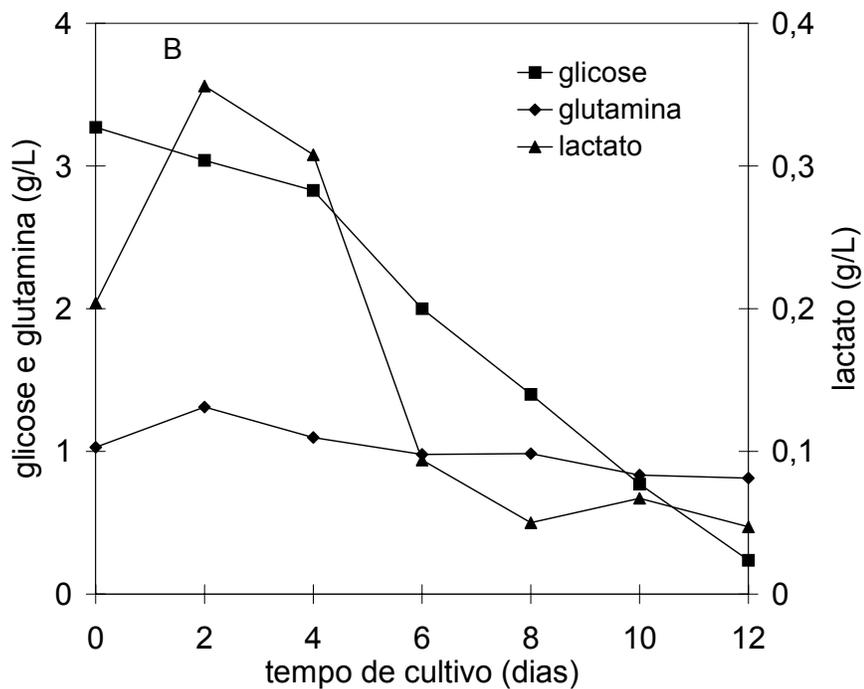
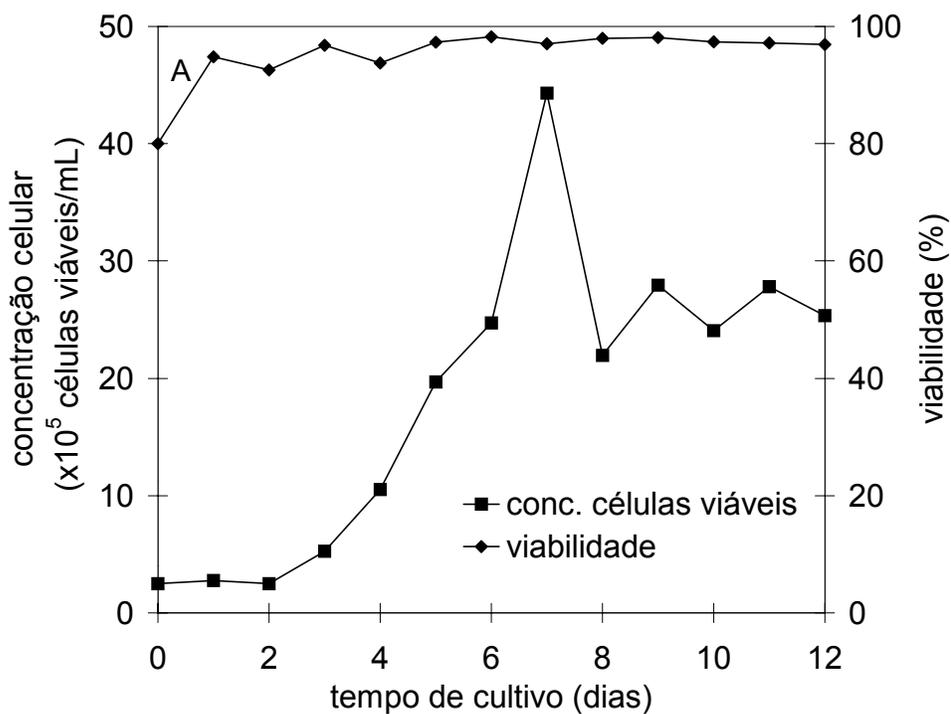


Figura A16: Parâmetros cinéticos para o ensaio 5 (4g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

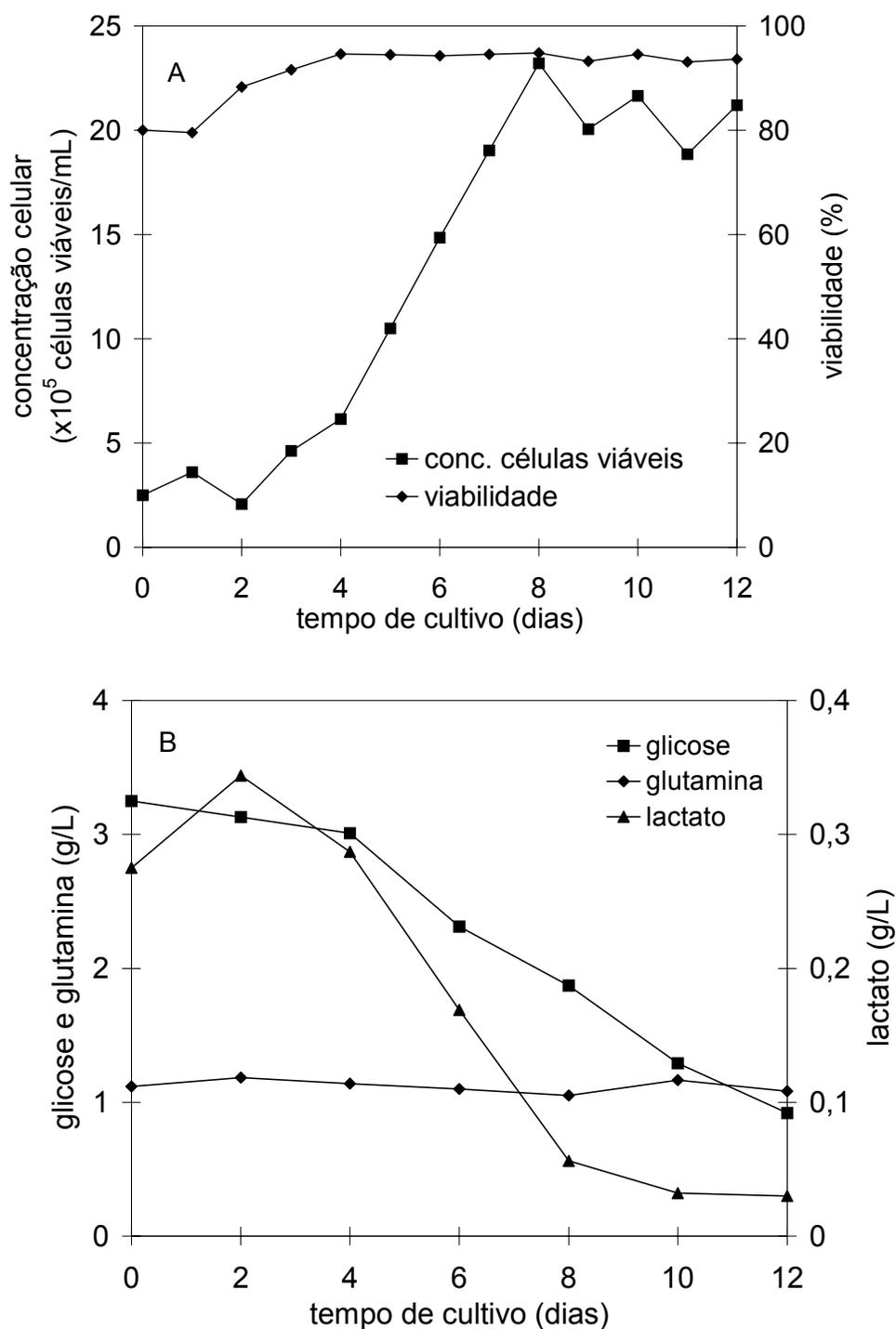


Figura A17: Parâmetros cinéticos para o ensaio 6 (8g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

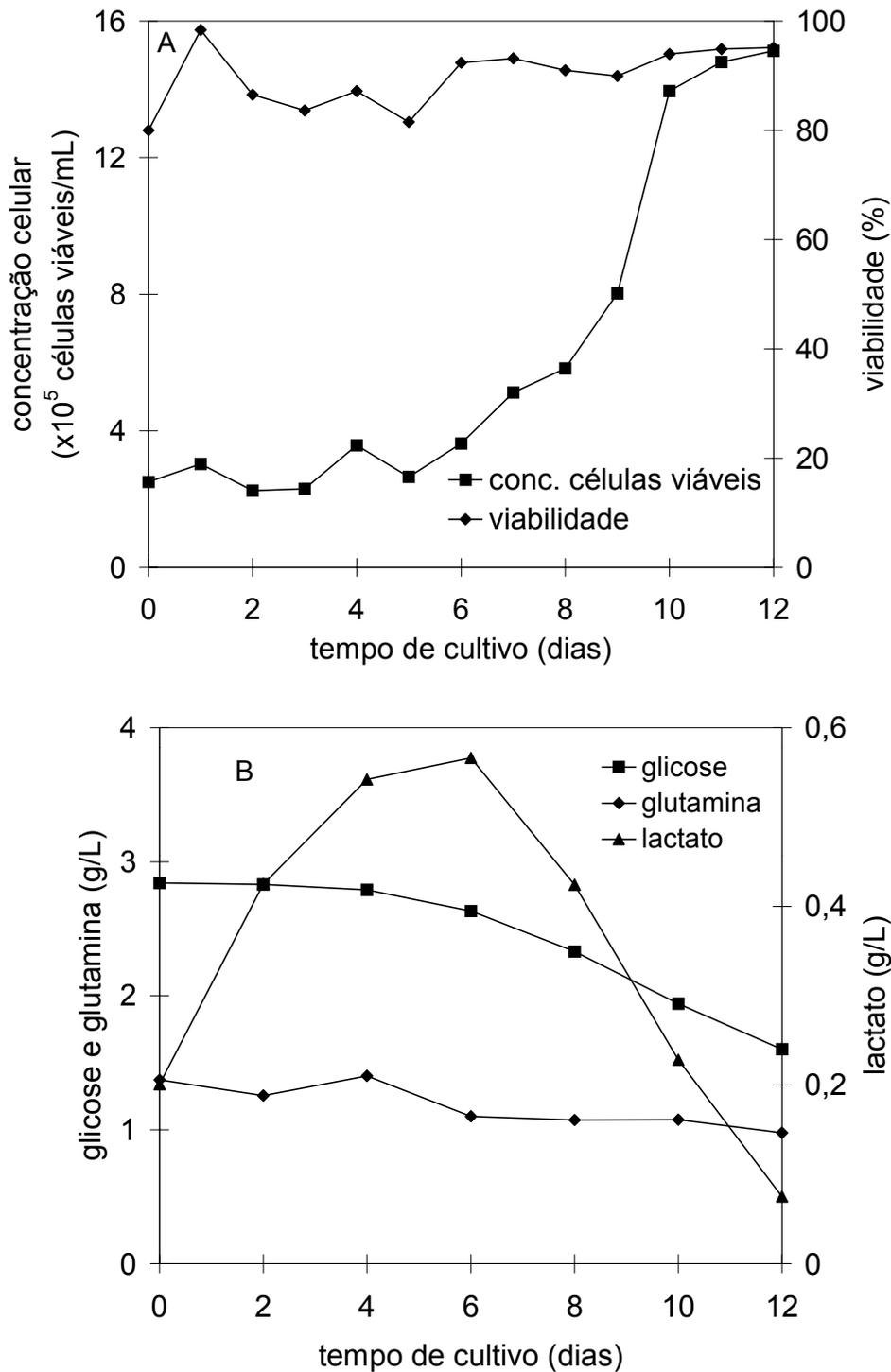


Figura A18: Parâmetros cinéticos para o ensaio 7 (4g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

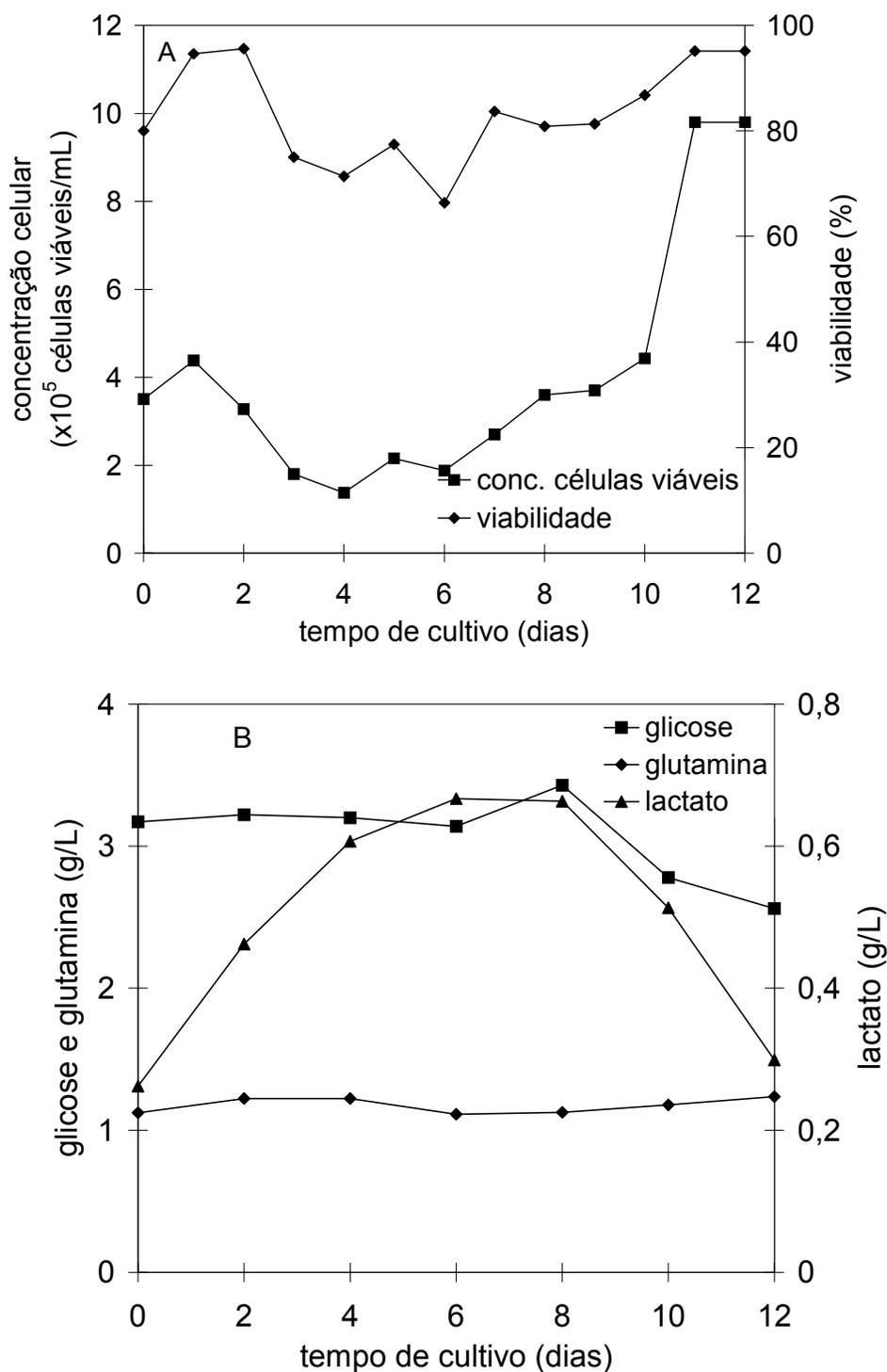


Figura A19: Parâmetros cinéticos para o ensaio 8 (8g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

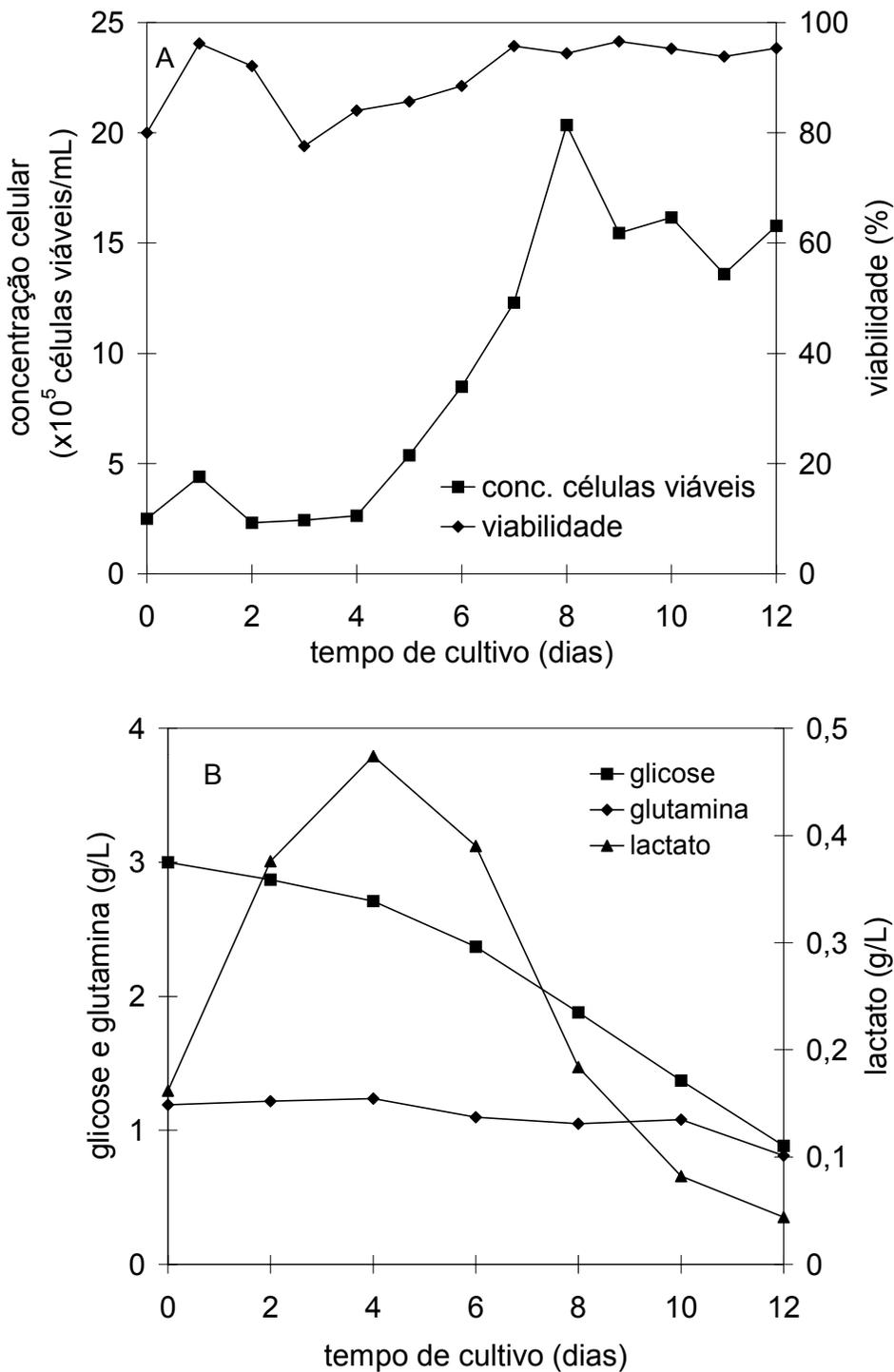


Figura A20: Parâmetros cinéticos para o ensaio 9 (2,6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

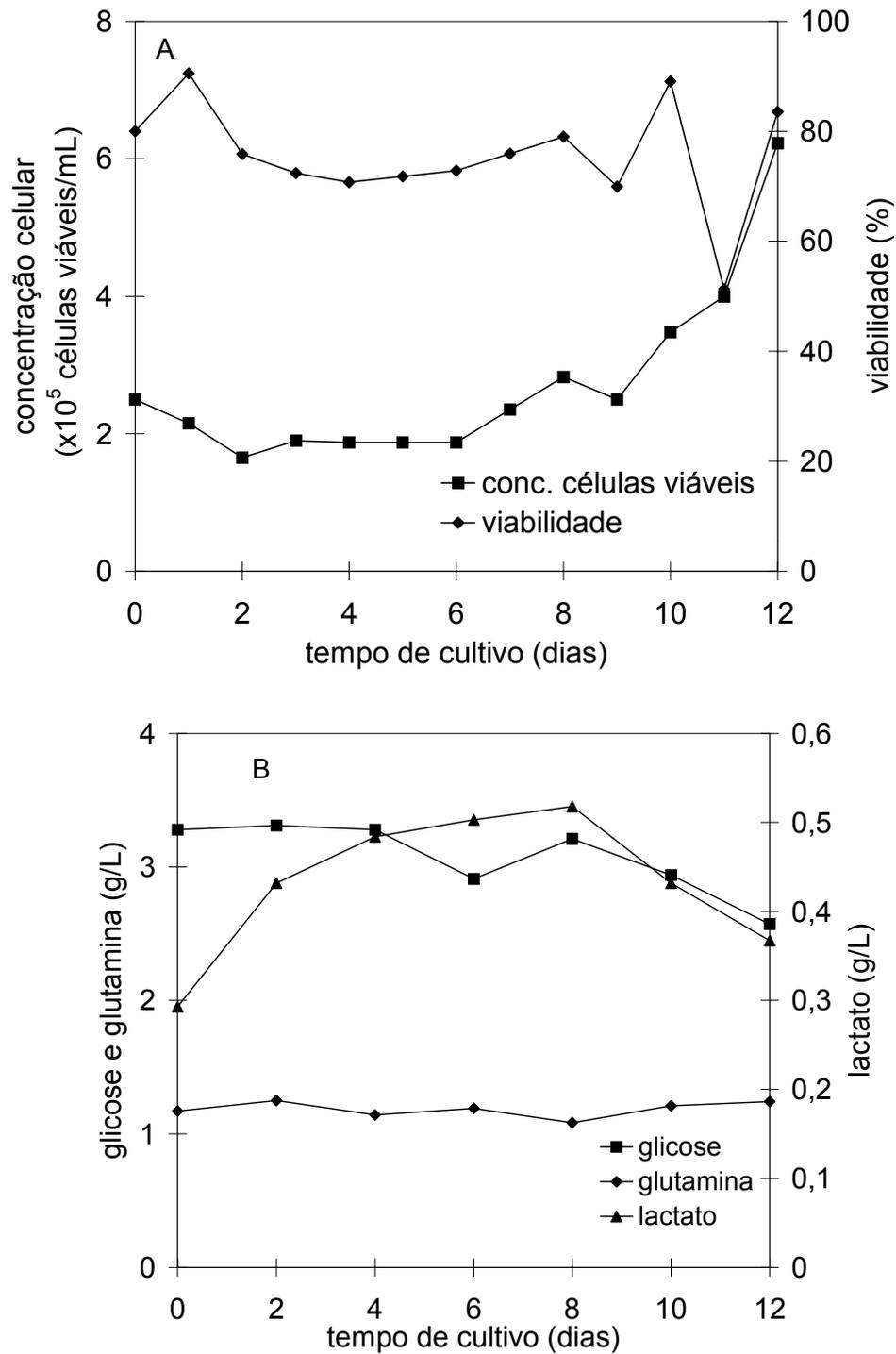


Figura A21: Parâmetros cinéticos para o ensaio 10 (9,4g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

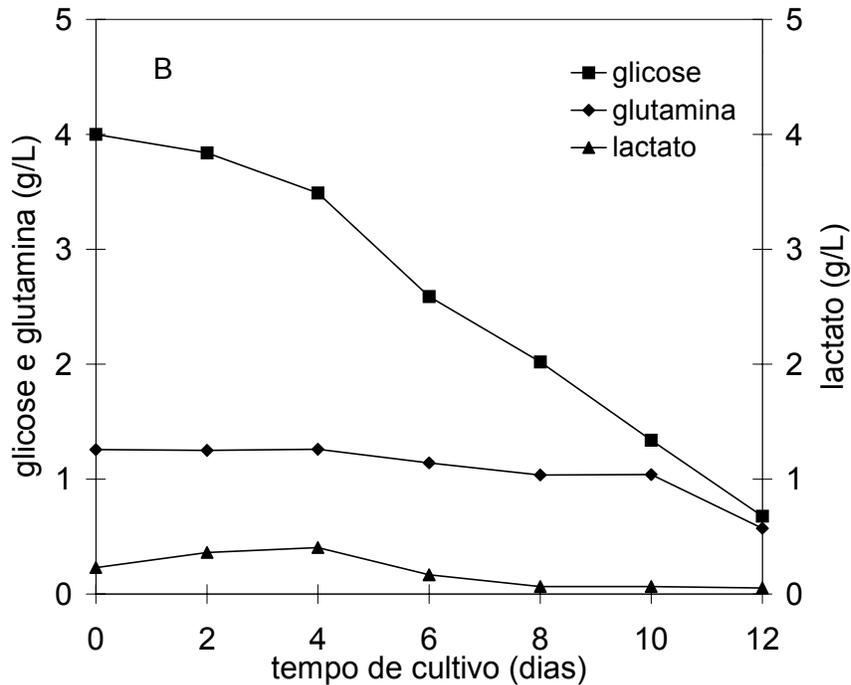
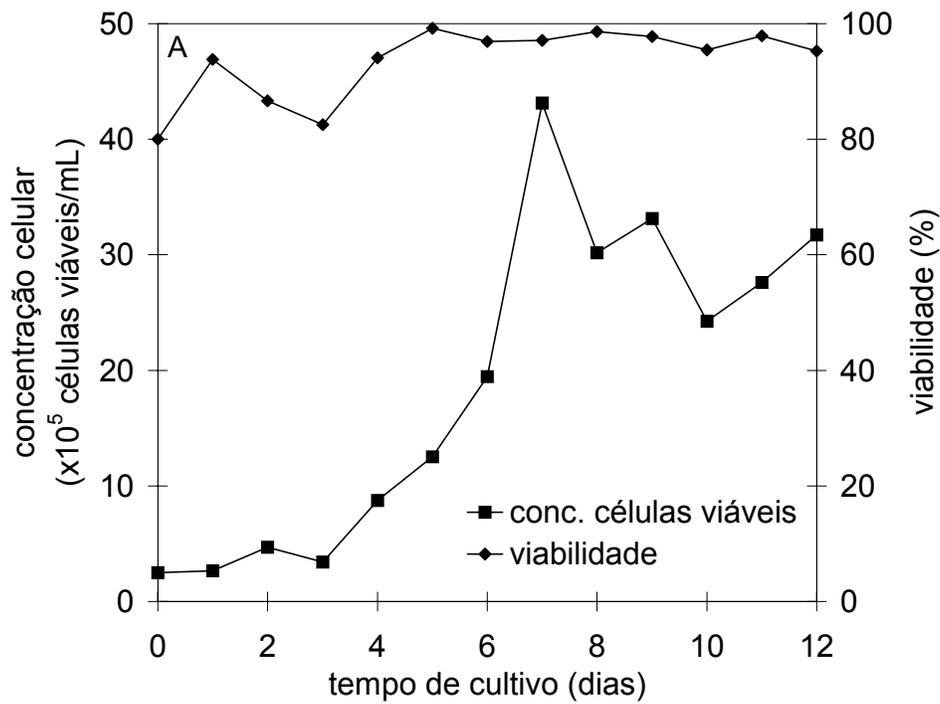


Figura A22: Parâmetros cinéticos para o ensaio 11 (6g/L de extrato de levedura; 2,3% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

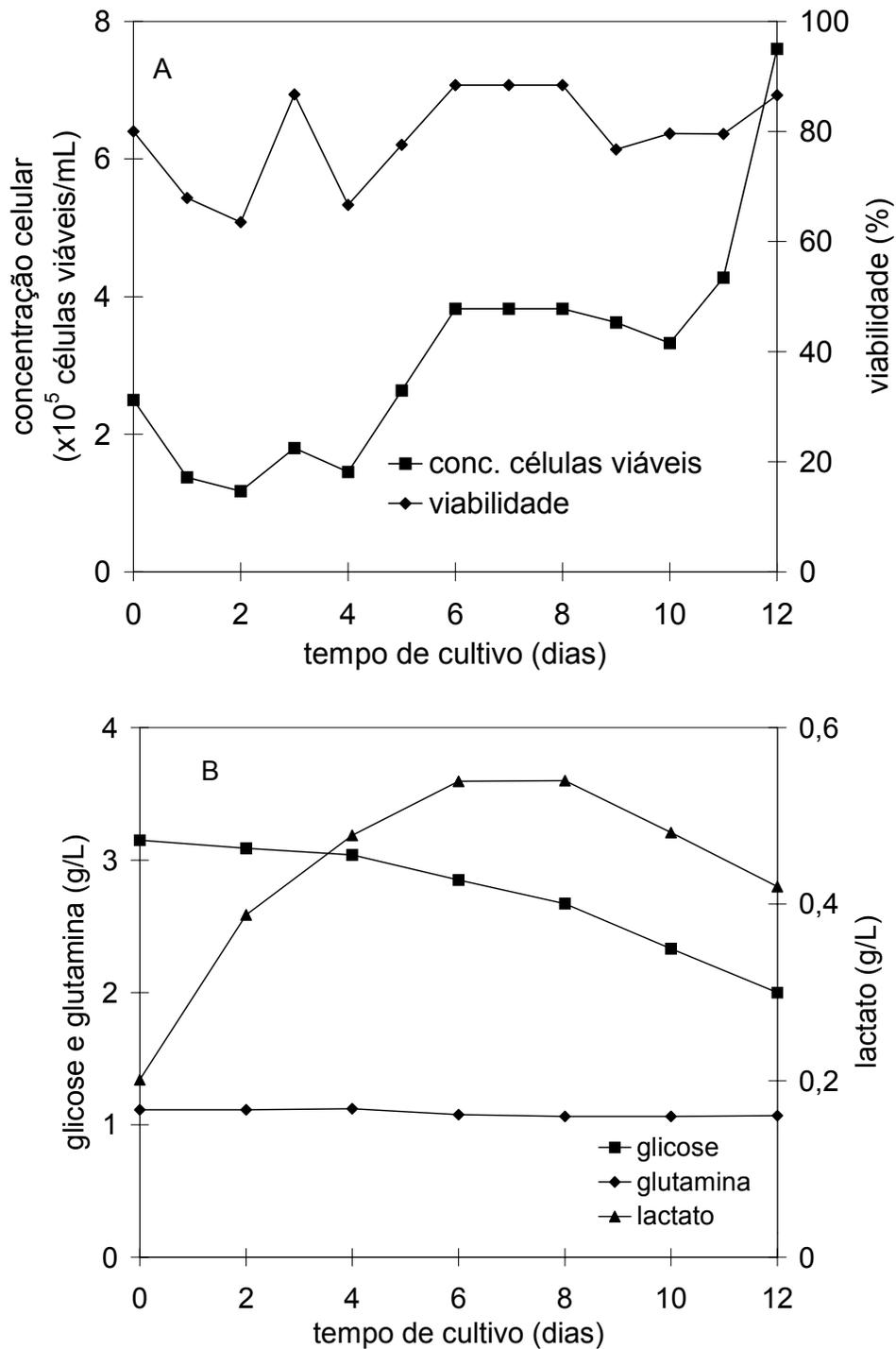


Figura A23: Parâmetros cinéticos para o ensaio 12 (6g/L de extrato de levedura; 5,7% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

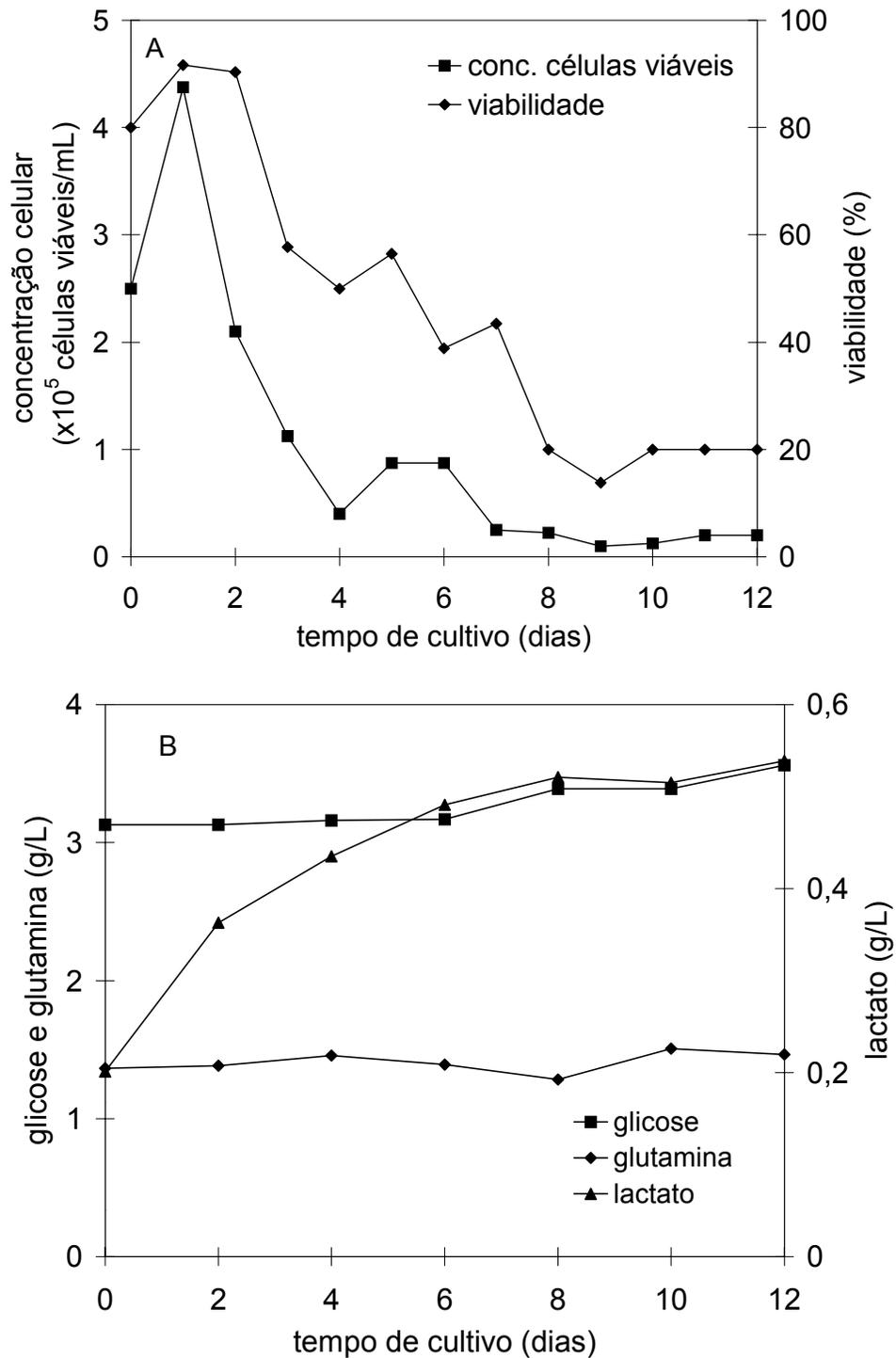


Figura A24: Parâmetros cinéticos para o ensaio 13 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 0,3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

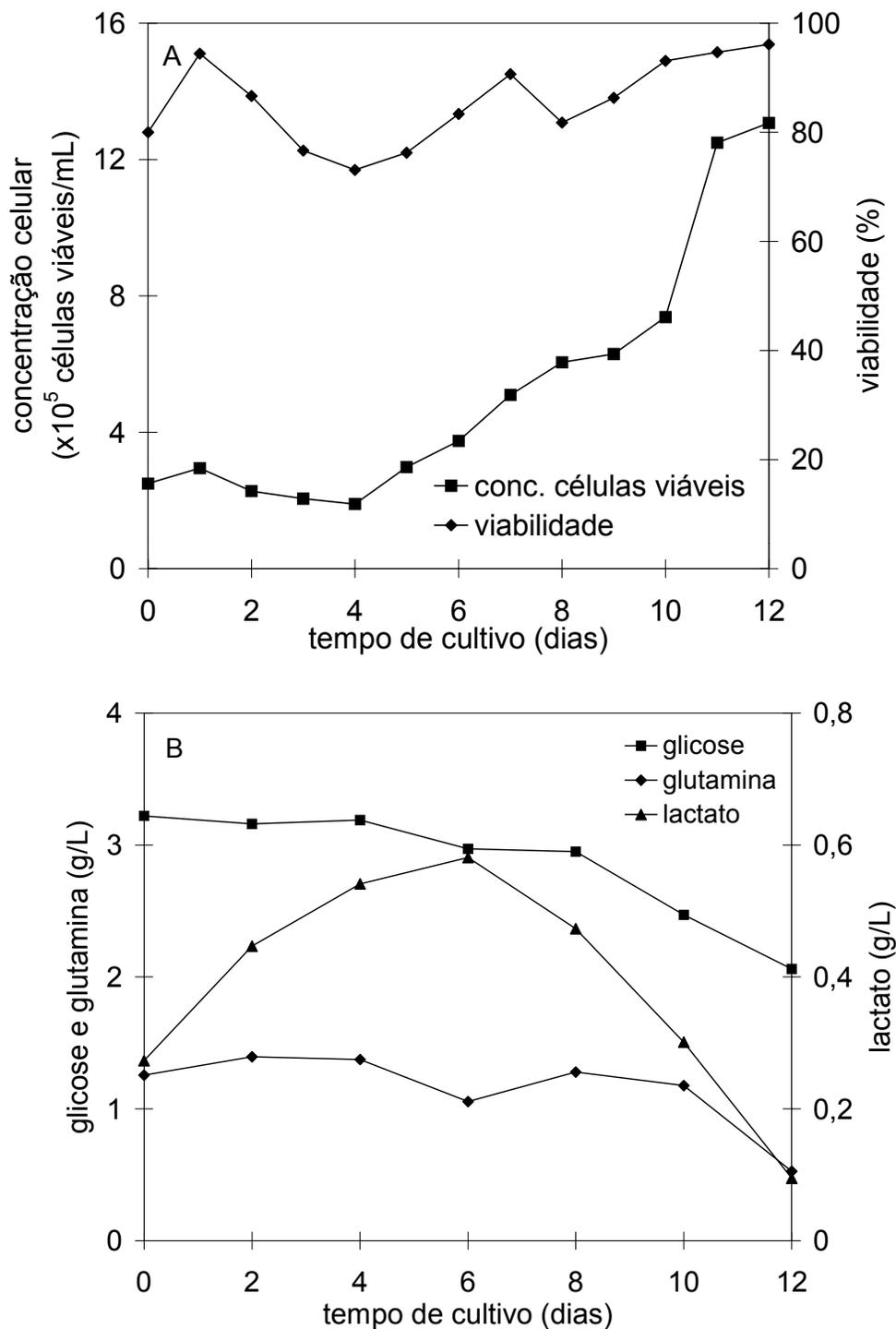


Figura A25: Parâmetros cinéticos para o ensaio 14 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 3,4% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

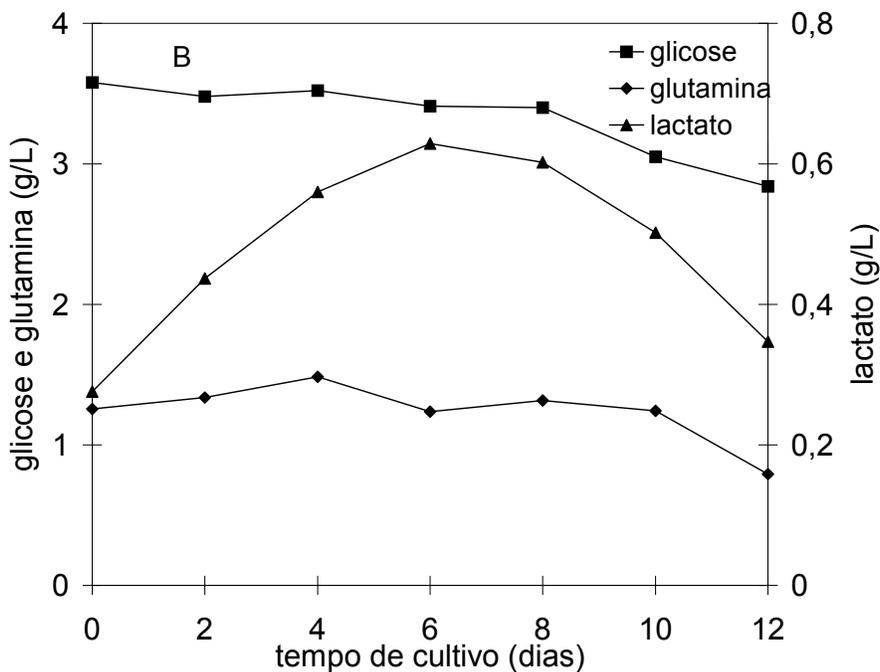
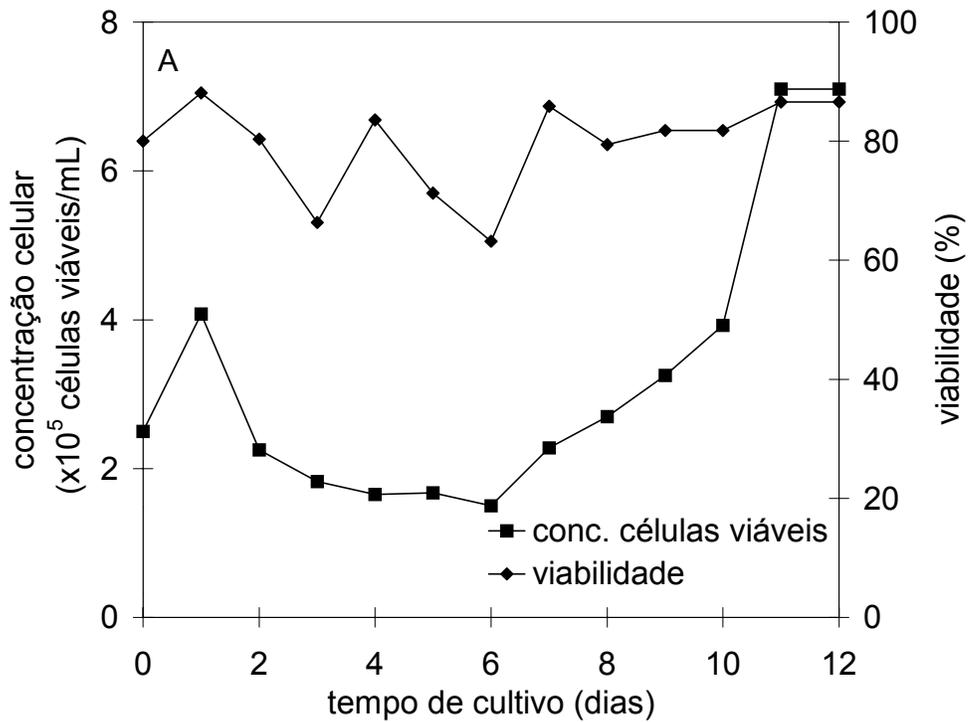


Figura A26: Parâmetros cinéticos para o ensaio 15 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

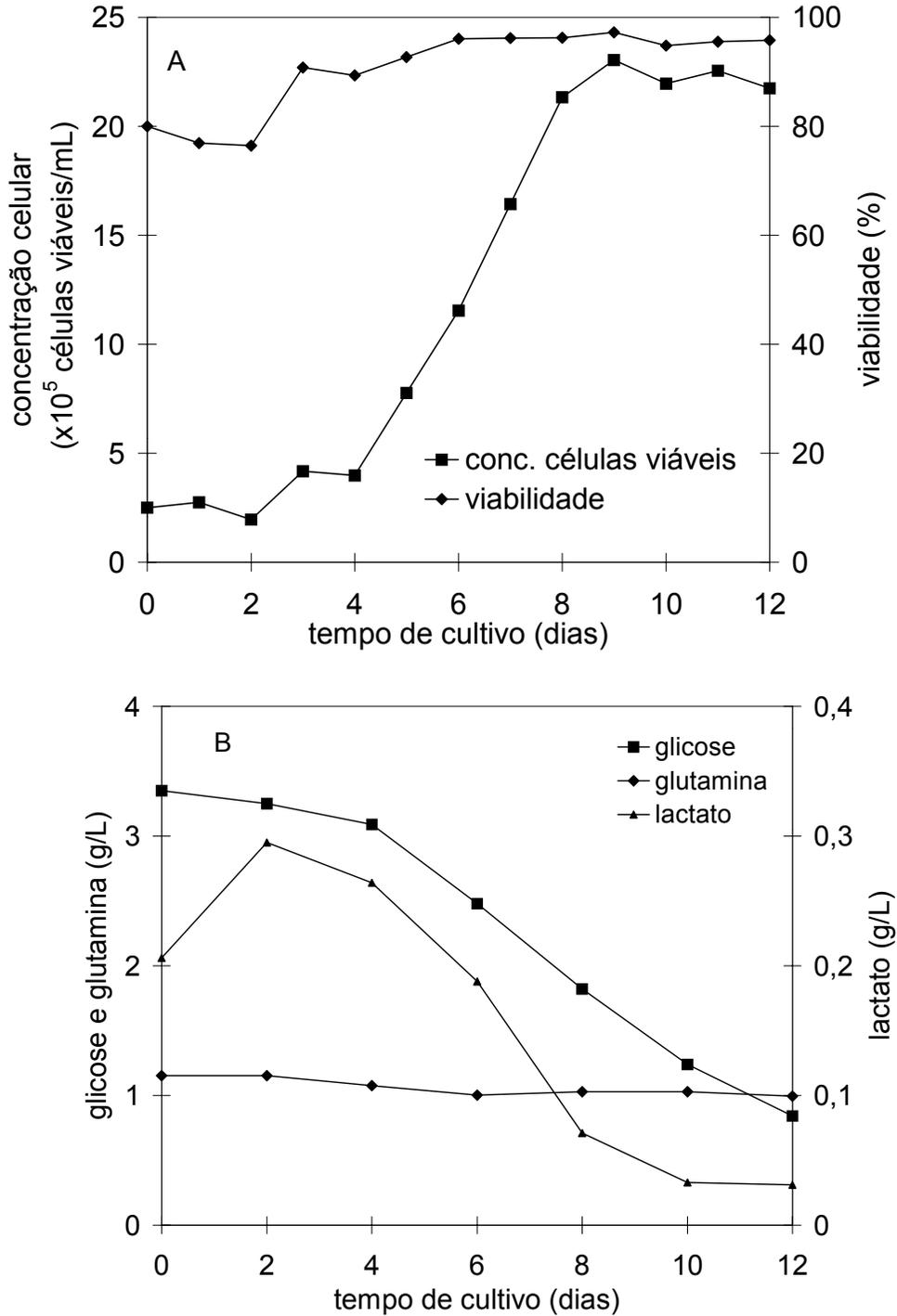


Figura A27: Parâmetros cinéticos para o ensaio 16 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

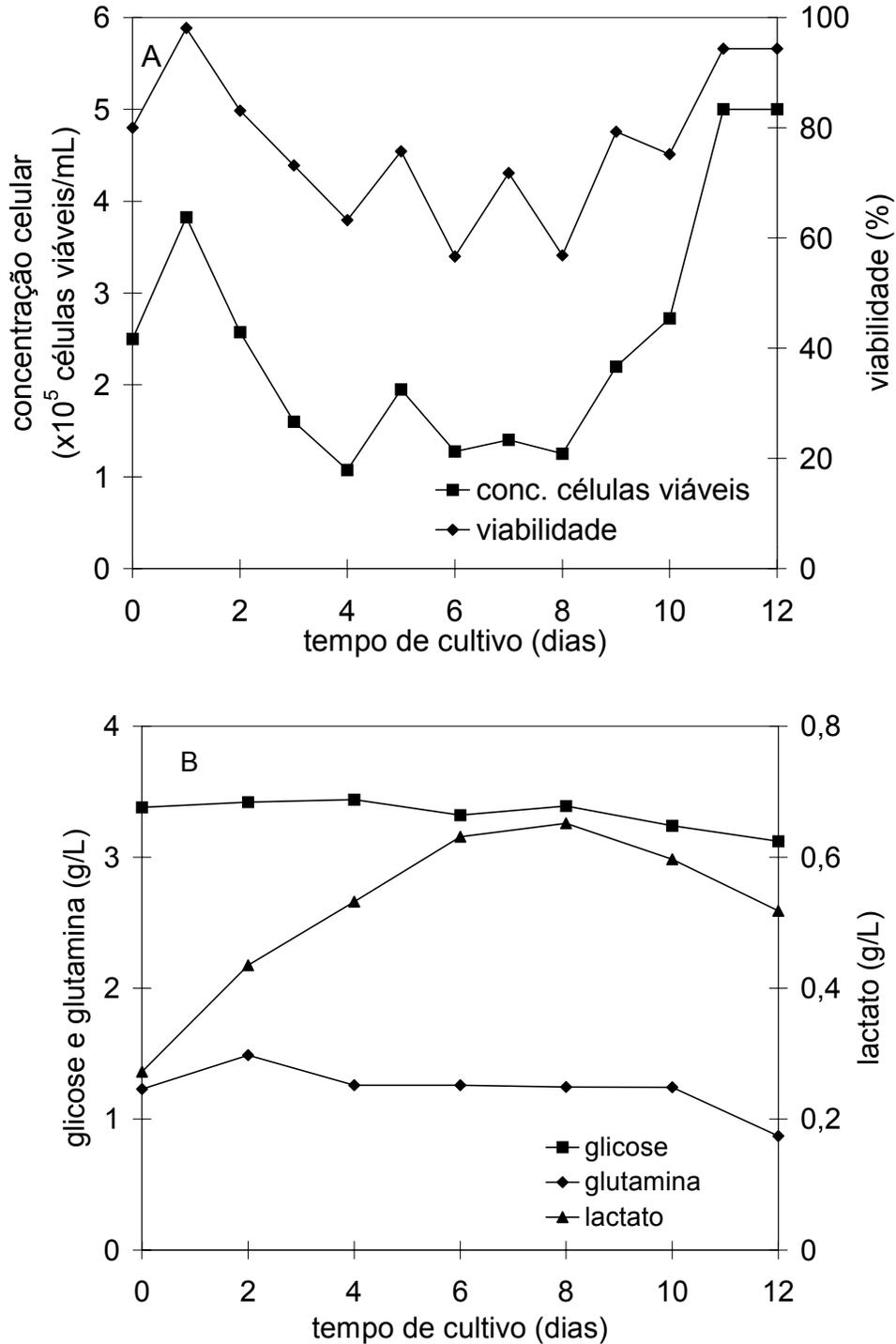


Figura A28: Parâmetros cinéticos para o ensaio 17 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

A-3: Crescimento e Viabilidade Celular e Consumo de Glicose, Glutamina e Evolução de Lactato para o Planejamento Fatorial Completo 2^3 com Inóculo Proveniente do Meio Sf900II

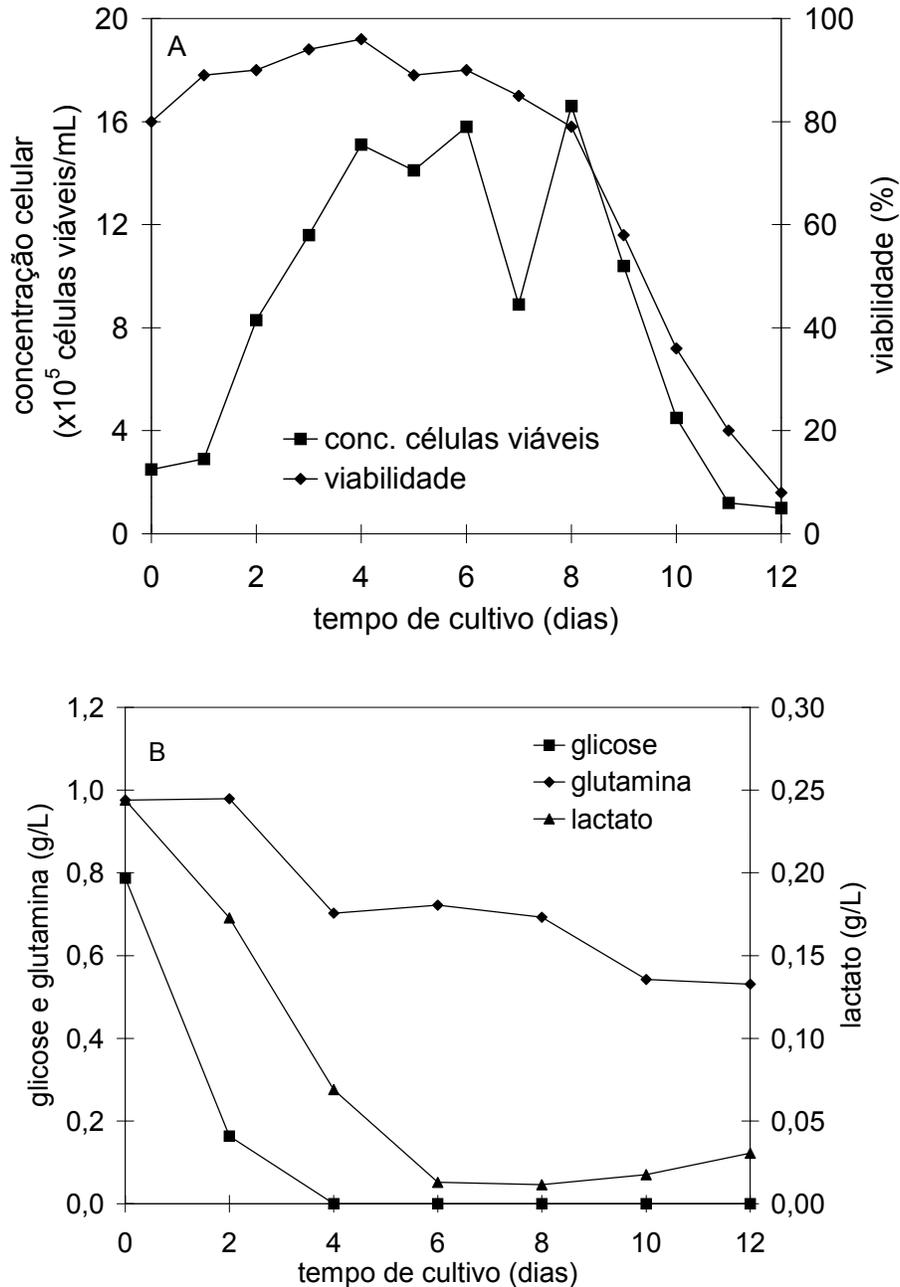


Figura A29: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Grace +10% de SFB. A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

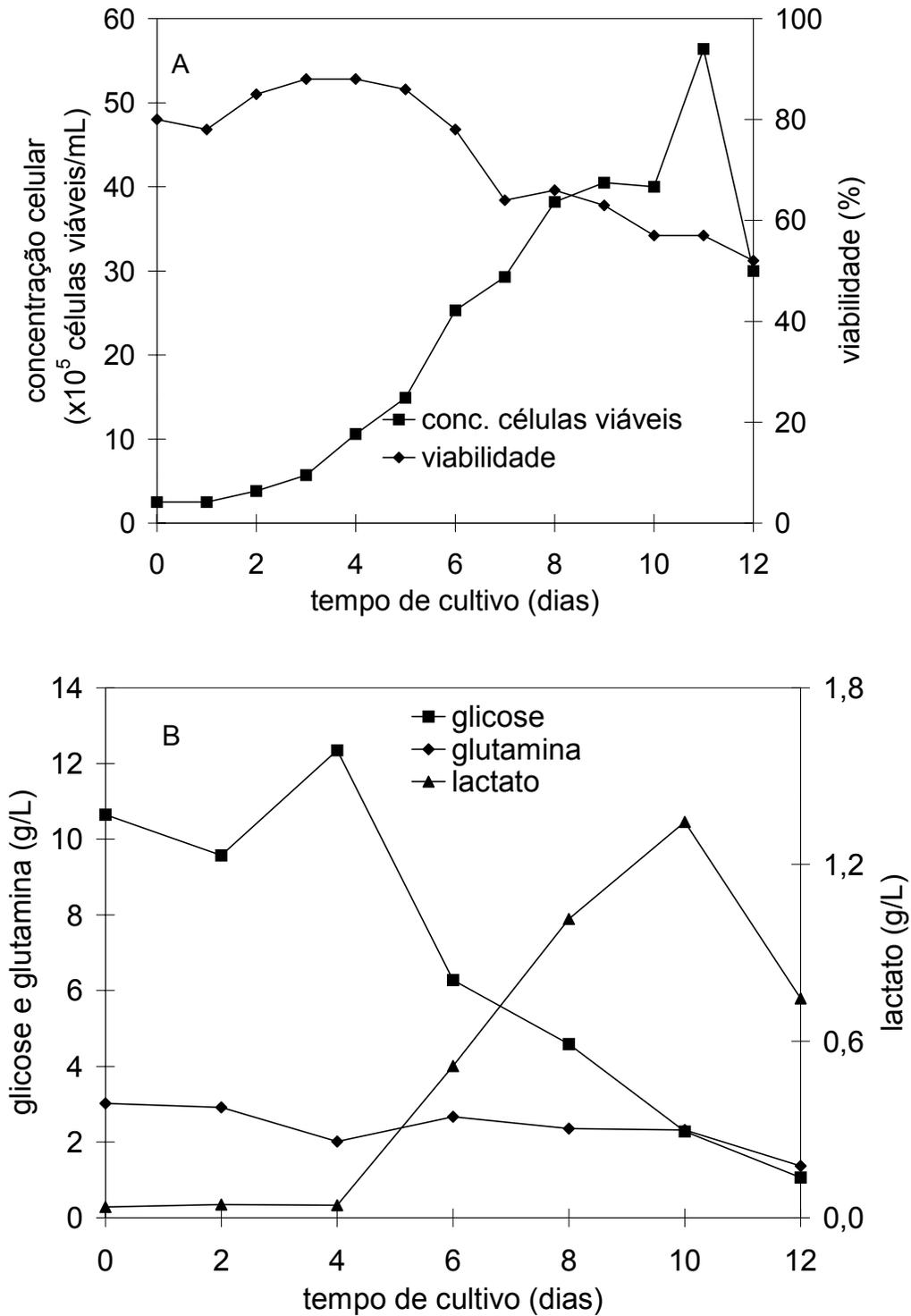


Figura A30: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Sf9000II. A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

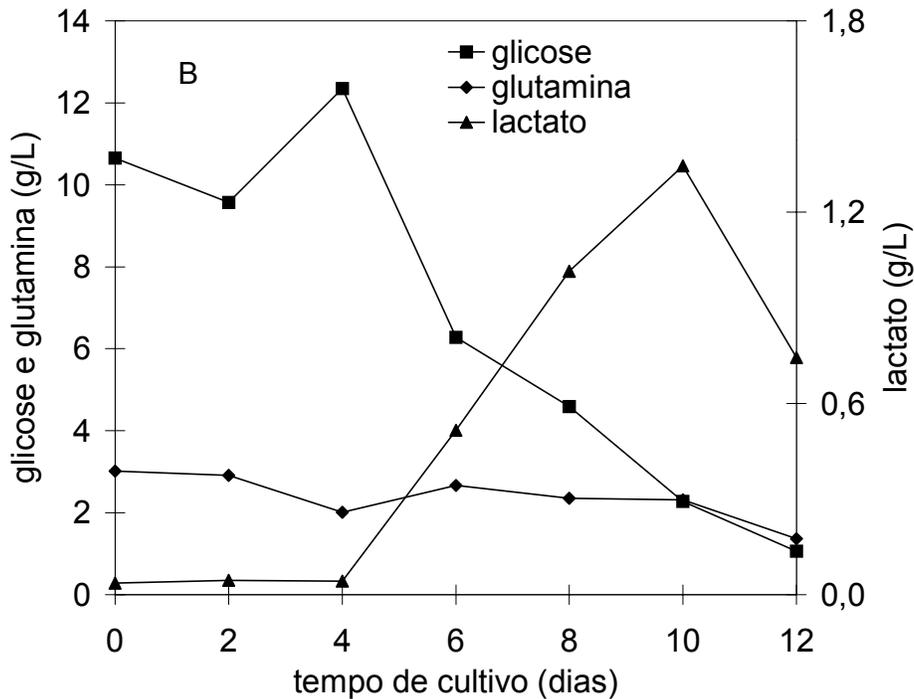
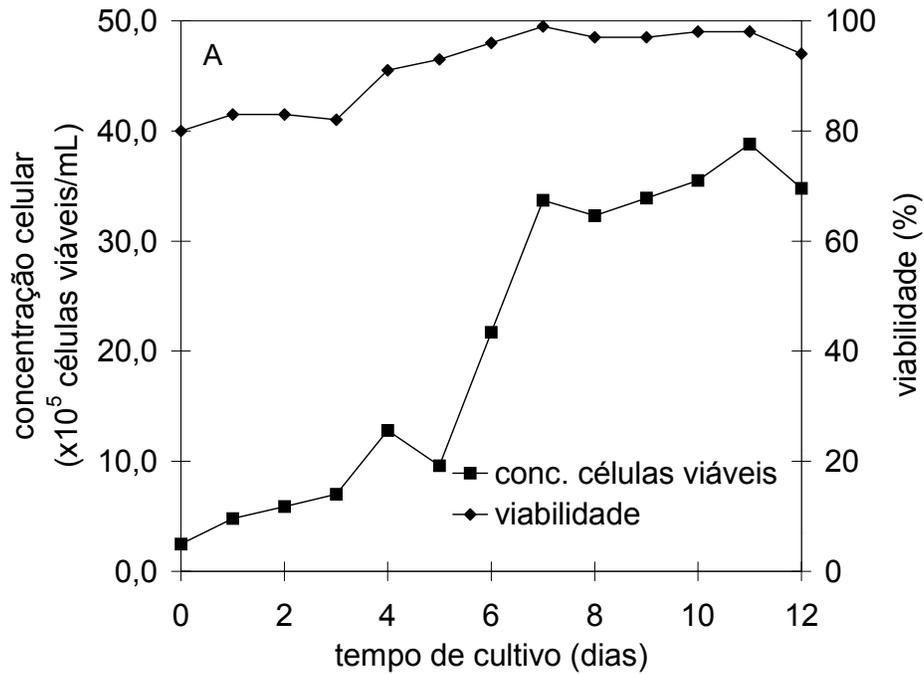


Figura A31: Parâmetros cinéticos para o ensaio 1 (4g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

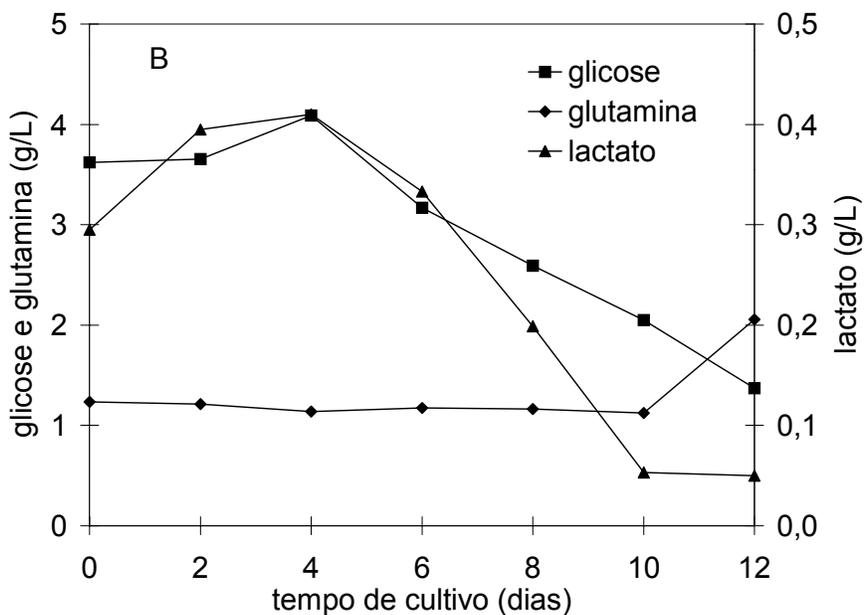
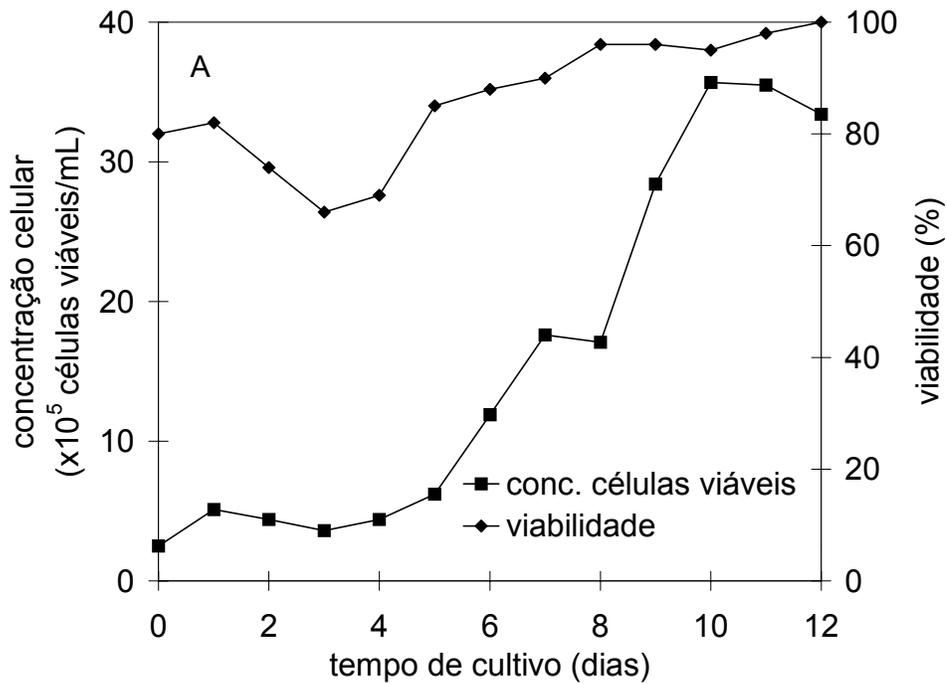


Figura A32: Parâmetros cinéticos para o ensaio 2 (8g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

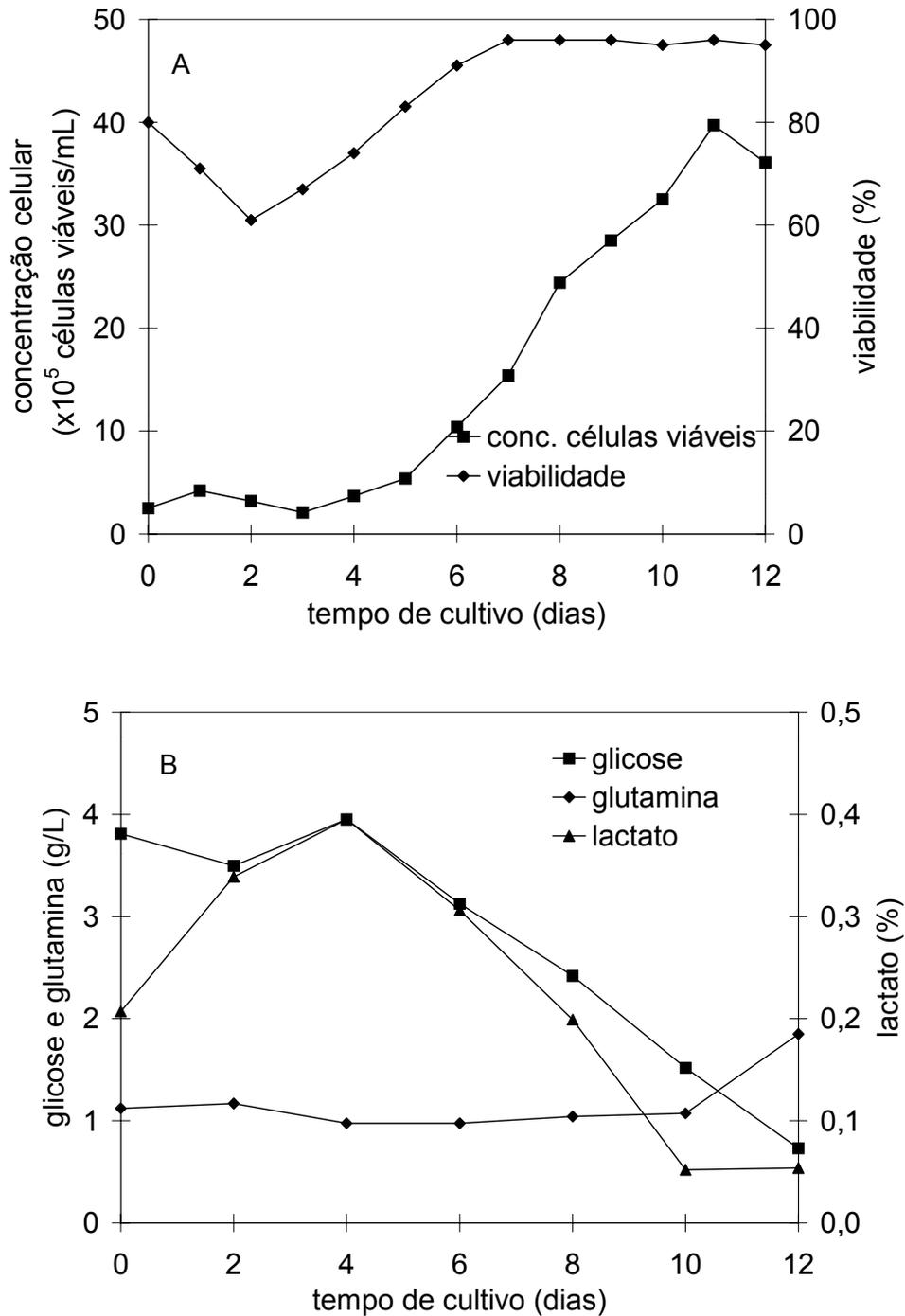


Figura A33: Parâmetros cinéticos para o ensaio 3 (4g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

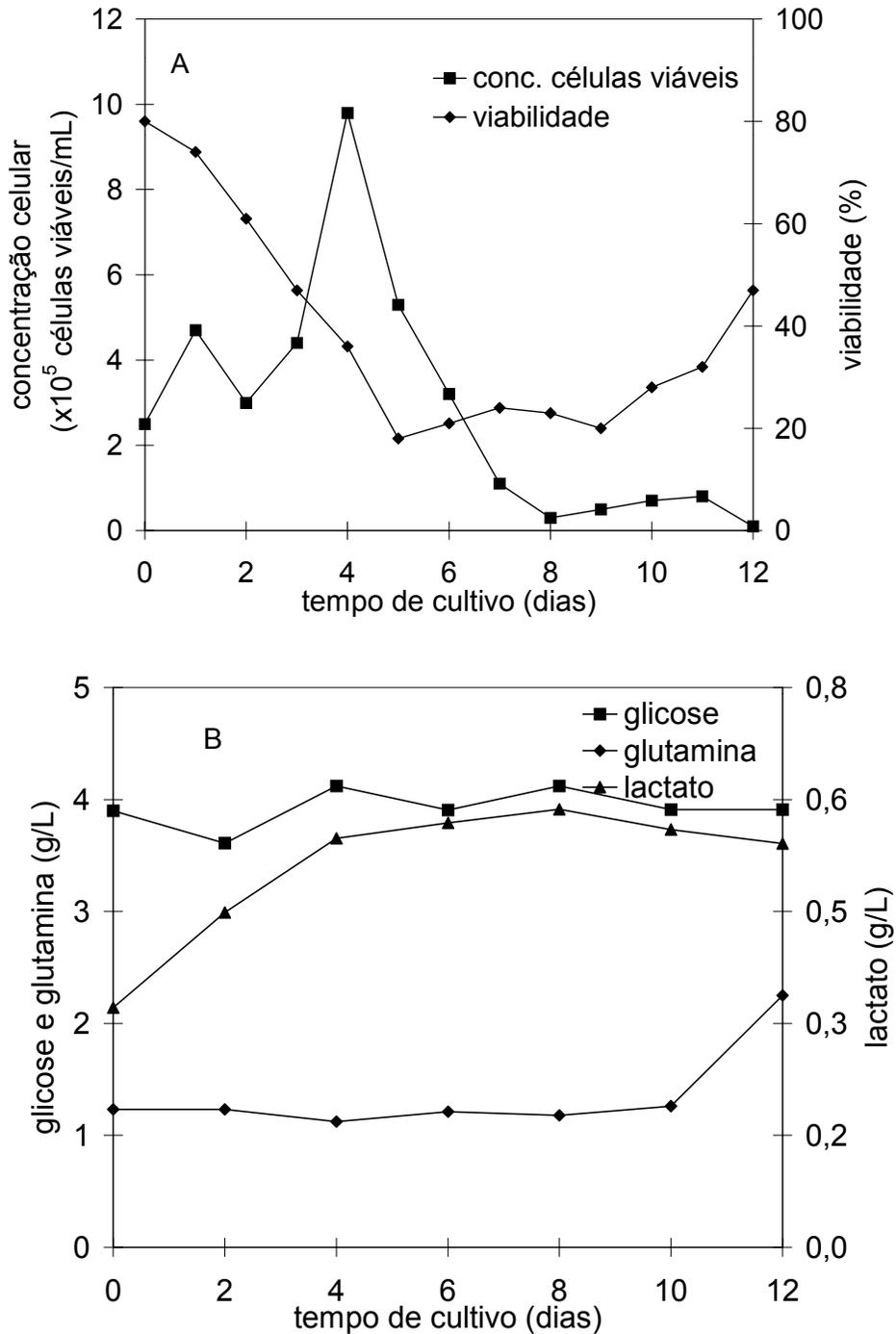


Figura A34: Parâmetros cinéticos para o ensaio 4 (8g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

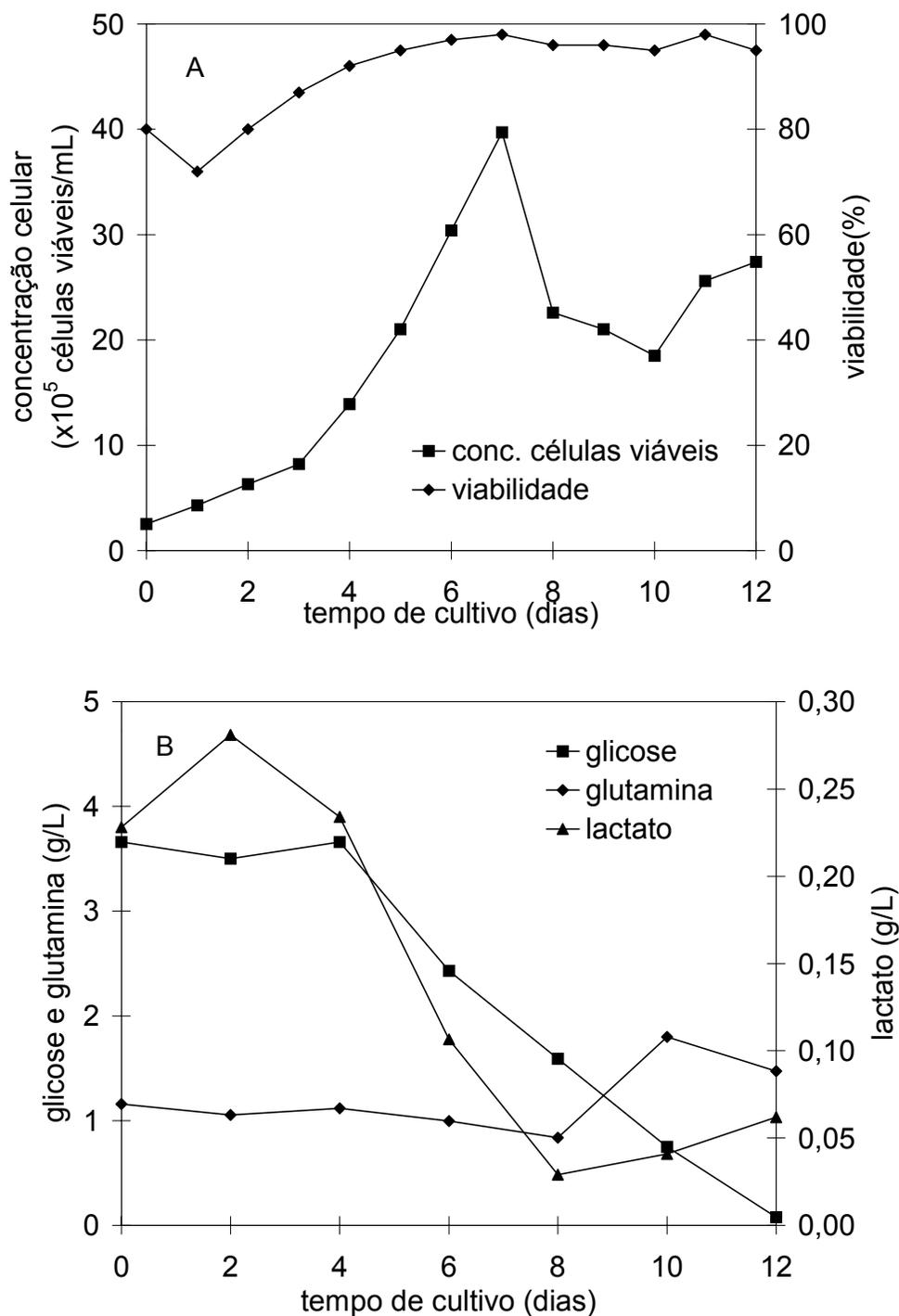


Figura A35: Parâmetros cinéticos para o ensaio 5 (4g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

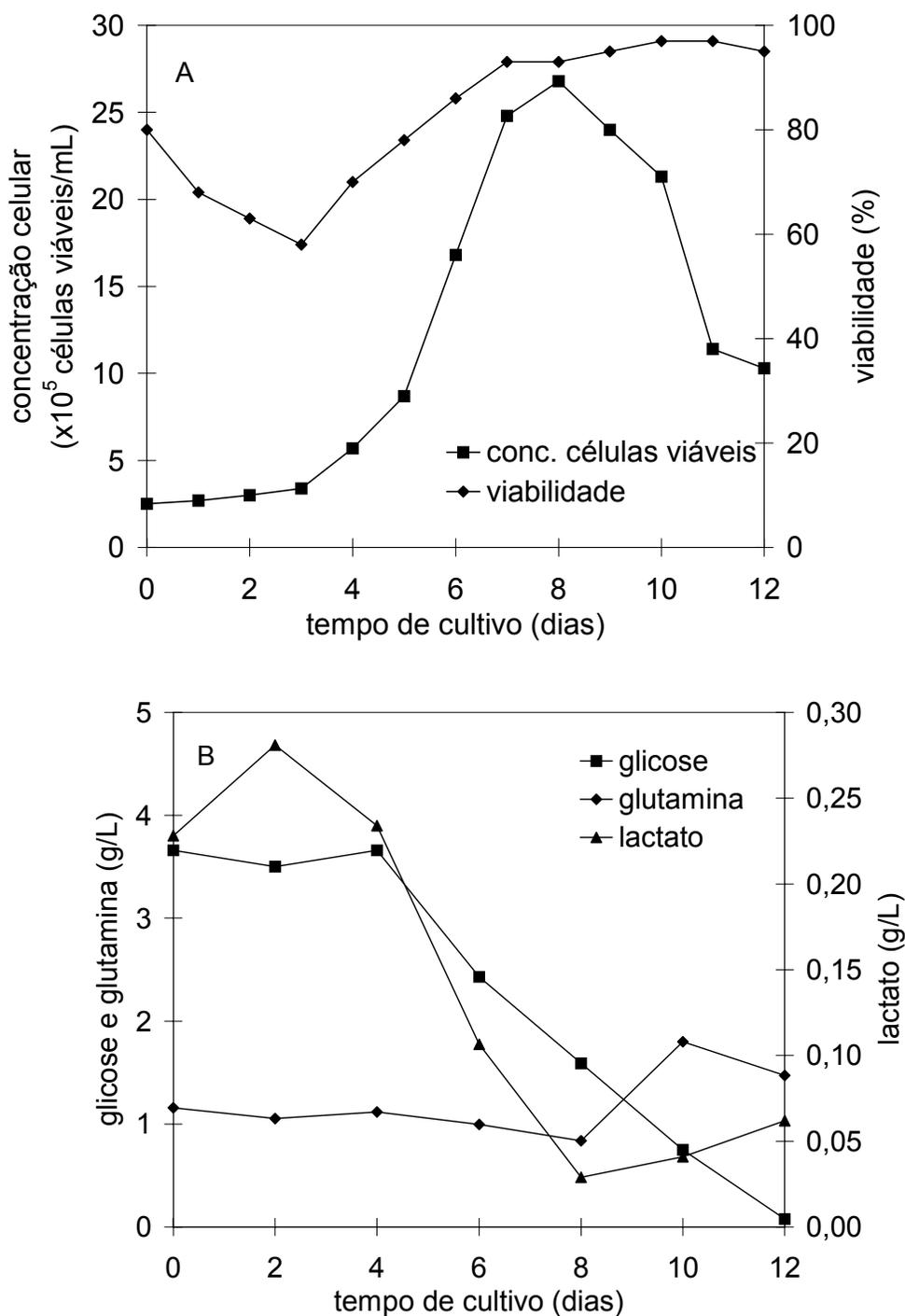


Figura A36: Parâmetros cinéticos para o ensaio 6 (8g/L de extrato de levedura; 3% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

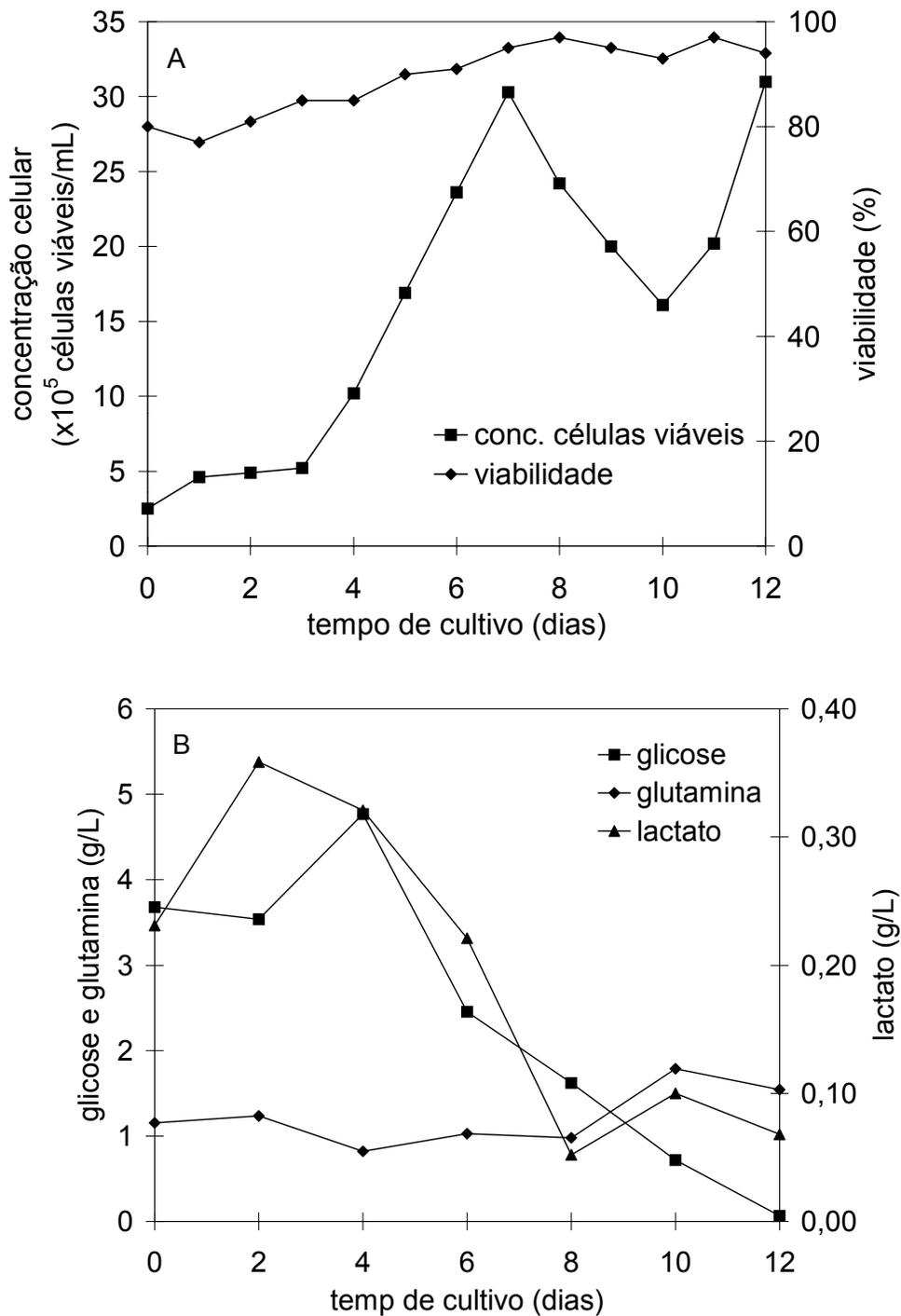


Figura A37: Parâmetros cinéticos para o ensaio 7 (4g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

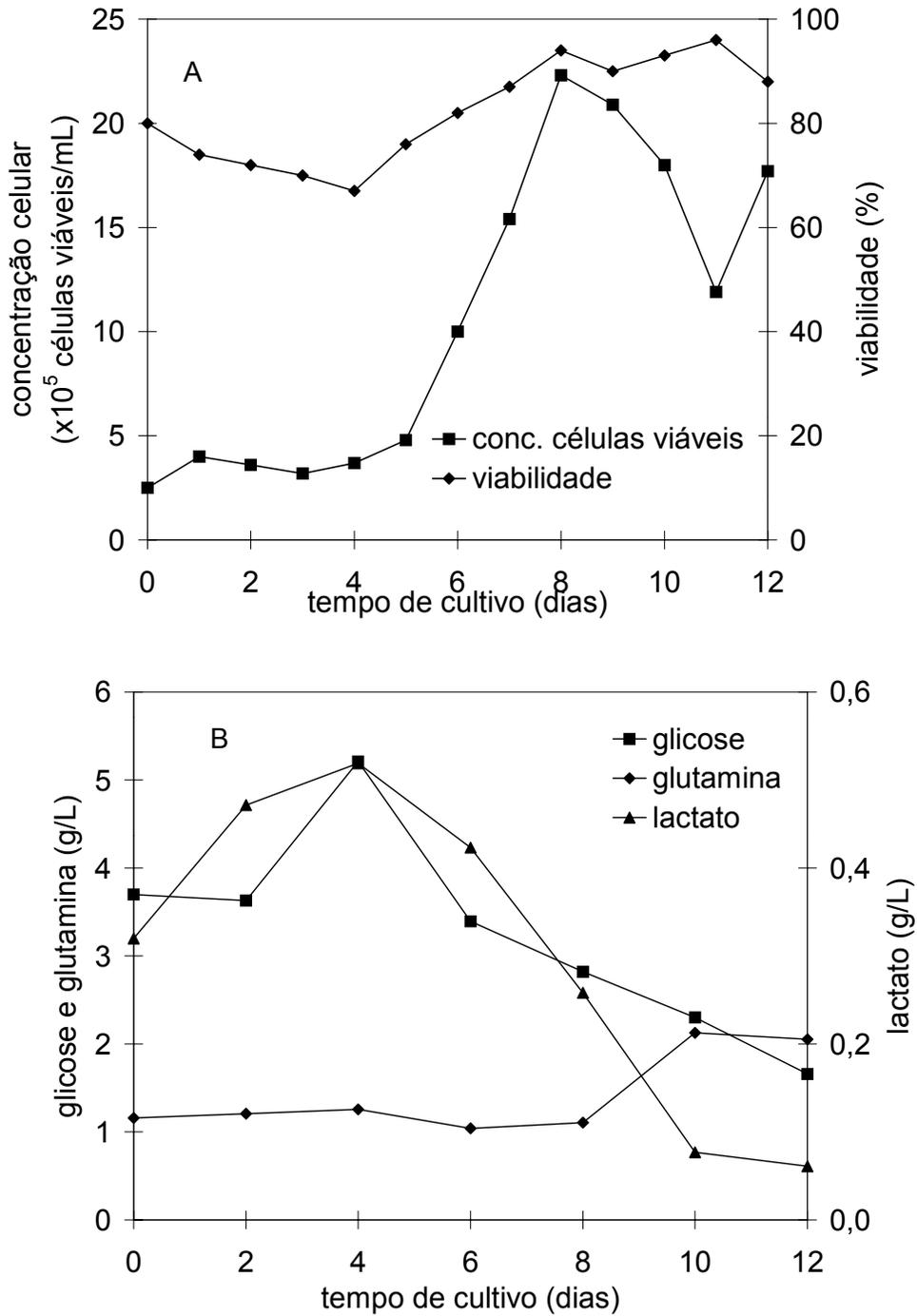


Figura A38: Parâmetros cinéticos para o ensaio 8 (8g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

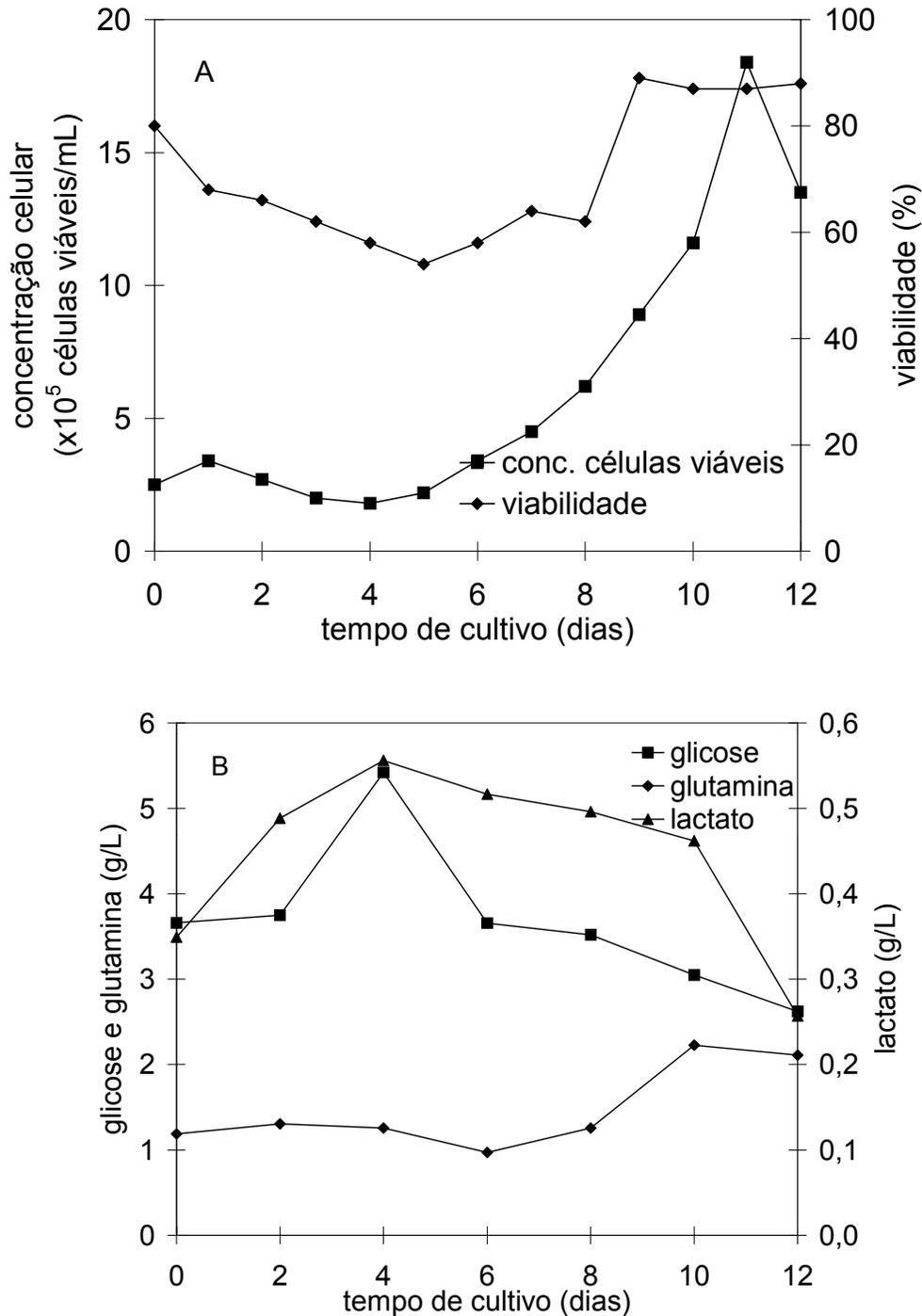


Figura A39: Parâmetros cinéticos para o ensaio 10 (9,4g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

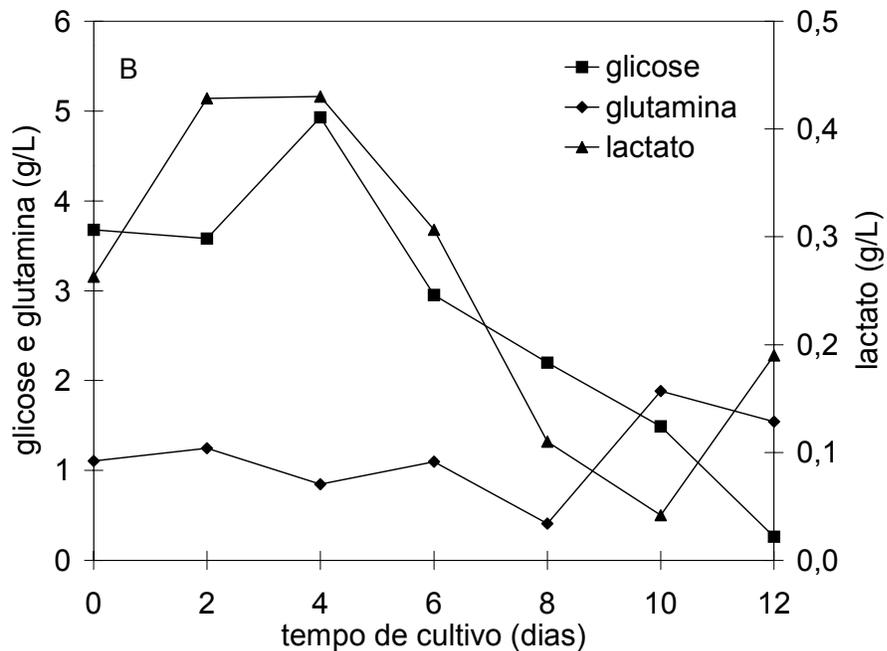
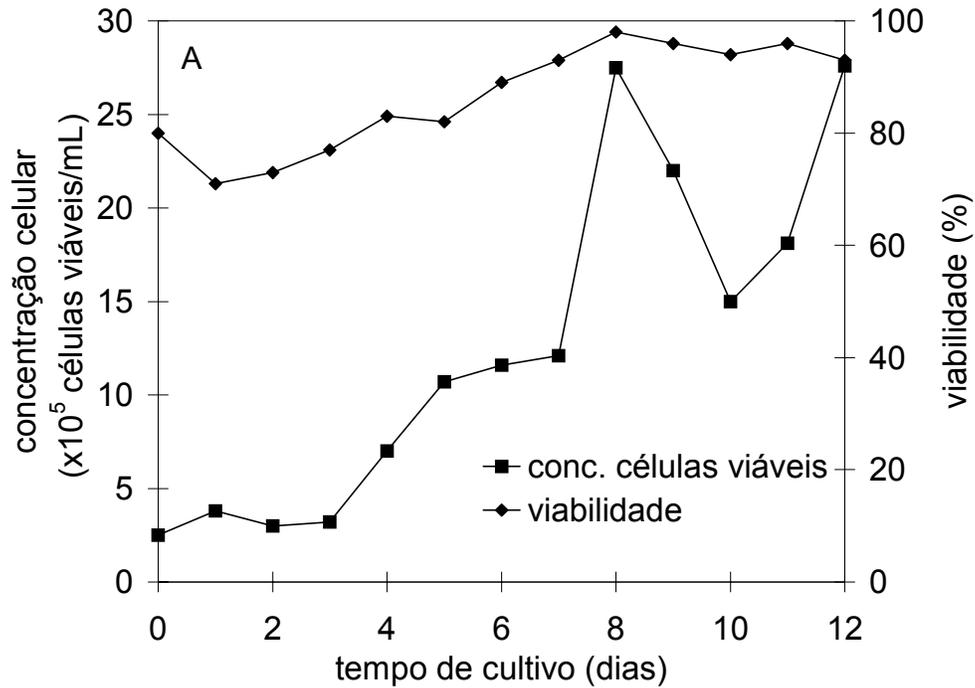


Figura A40: Parâmetros cinéticos para o ensaio 12 (6g/L de extrato de levedura; 5,7% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

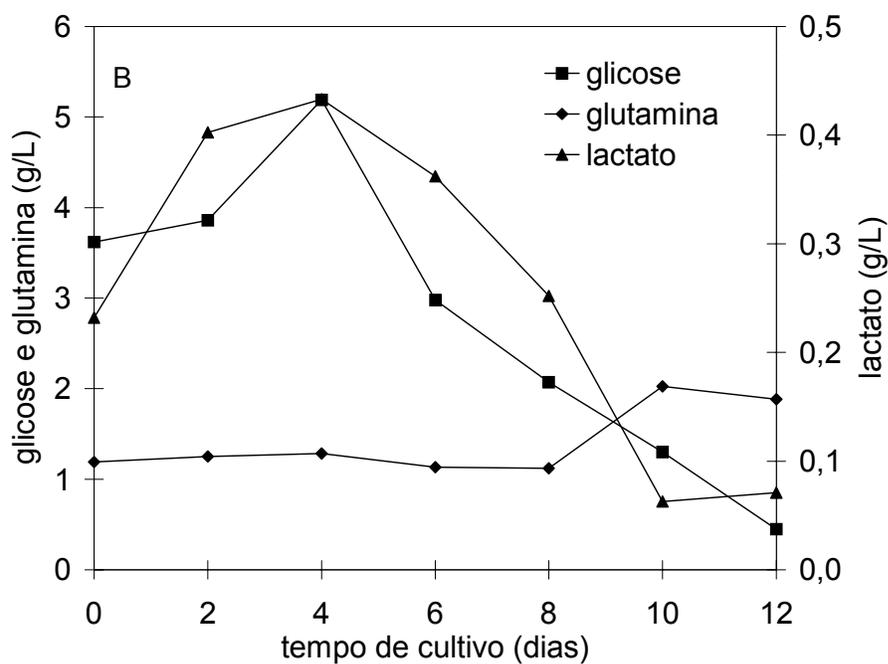
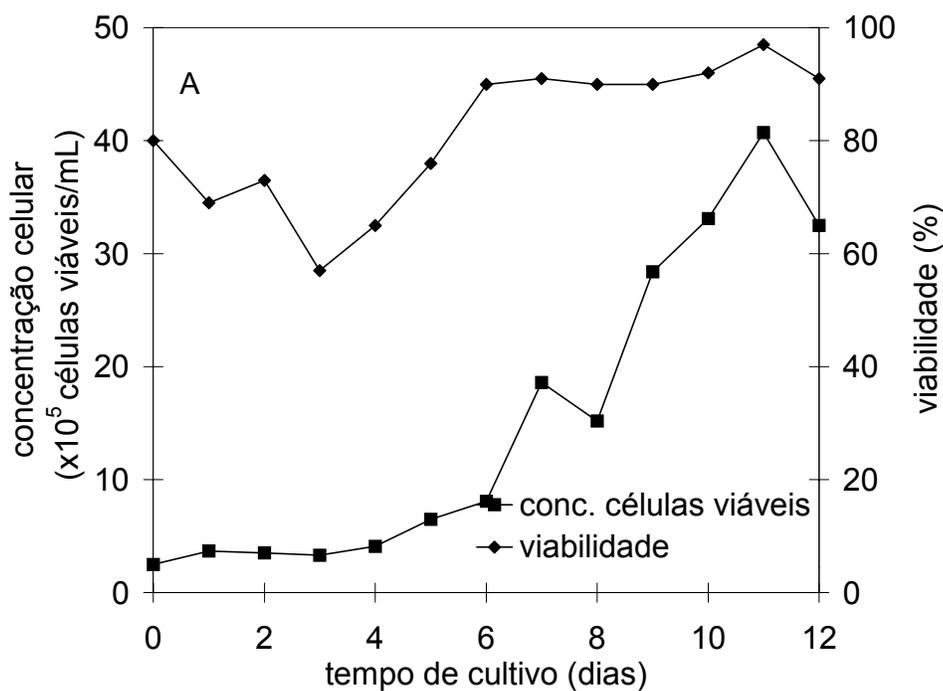


Figura A43: Parâmetros cinéticos para o ensaio 13 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 0,3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

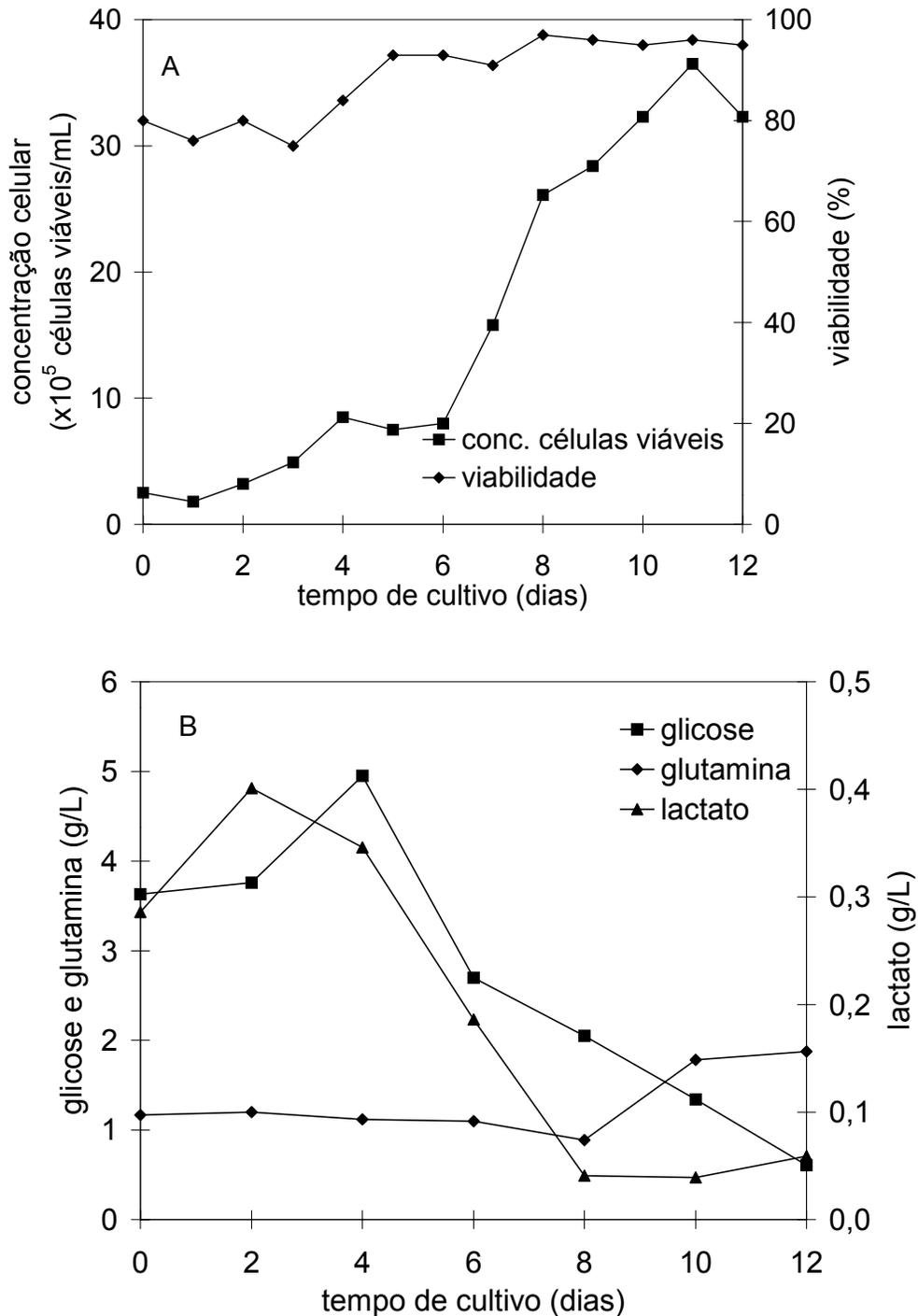


Figura A44: Parâmetros cinéticos para o ensaio 14 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 3,4% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

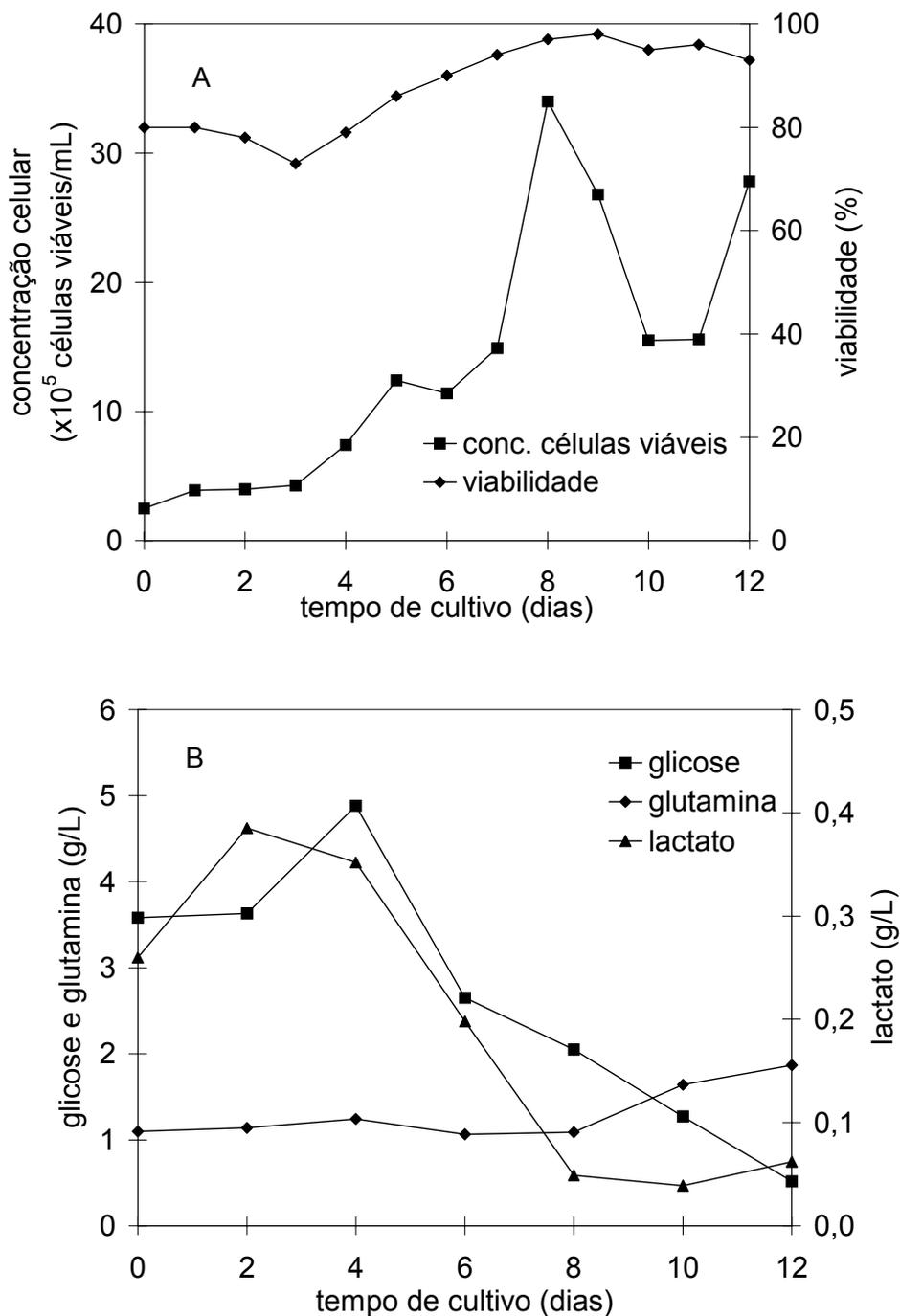


Figura A45: Parâmetros cinéticos para o ensaio 15 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

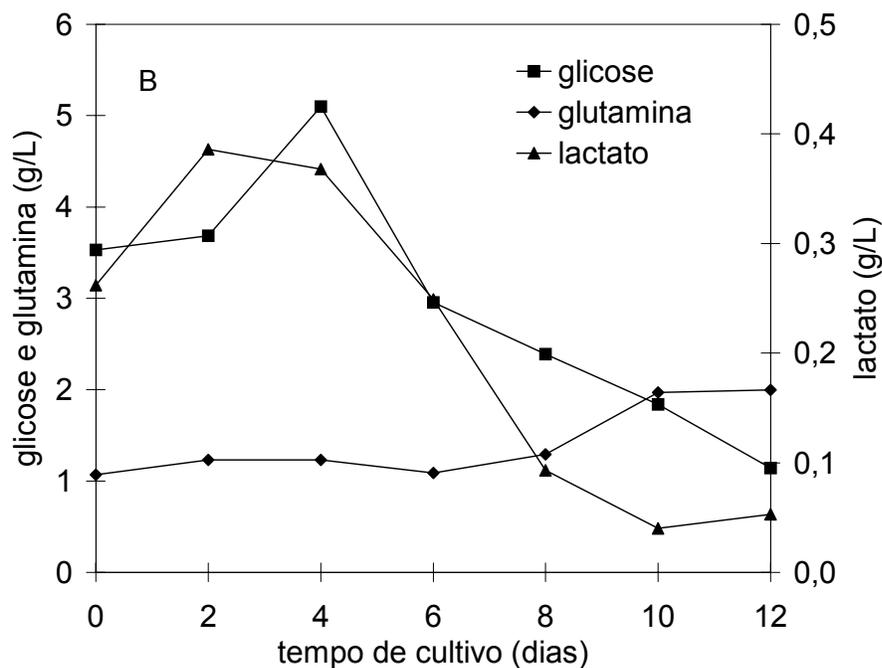
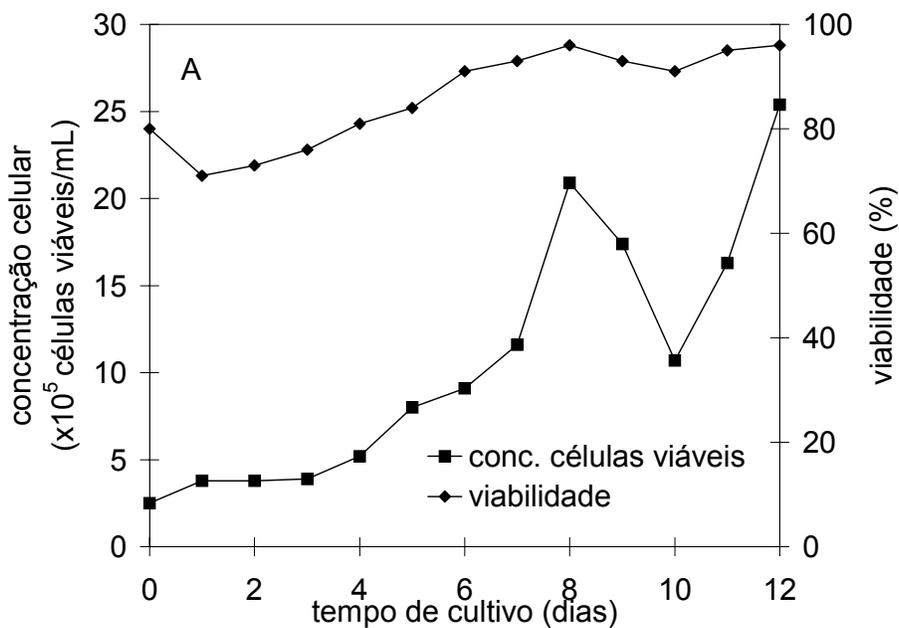


Figura A46: Parâmetros cinéticos para o ensaio 16 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

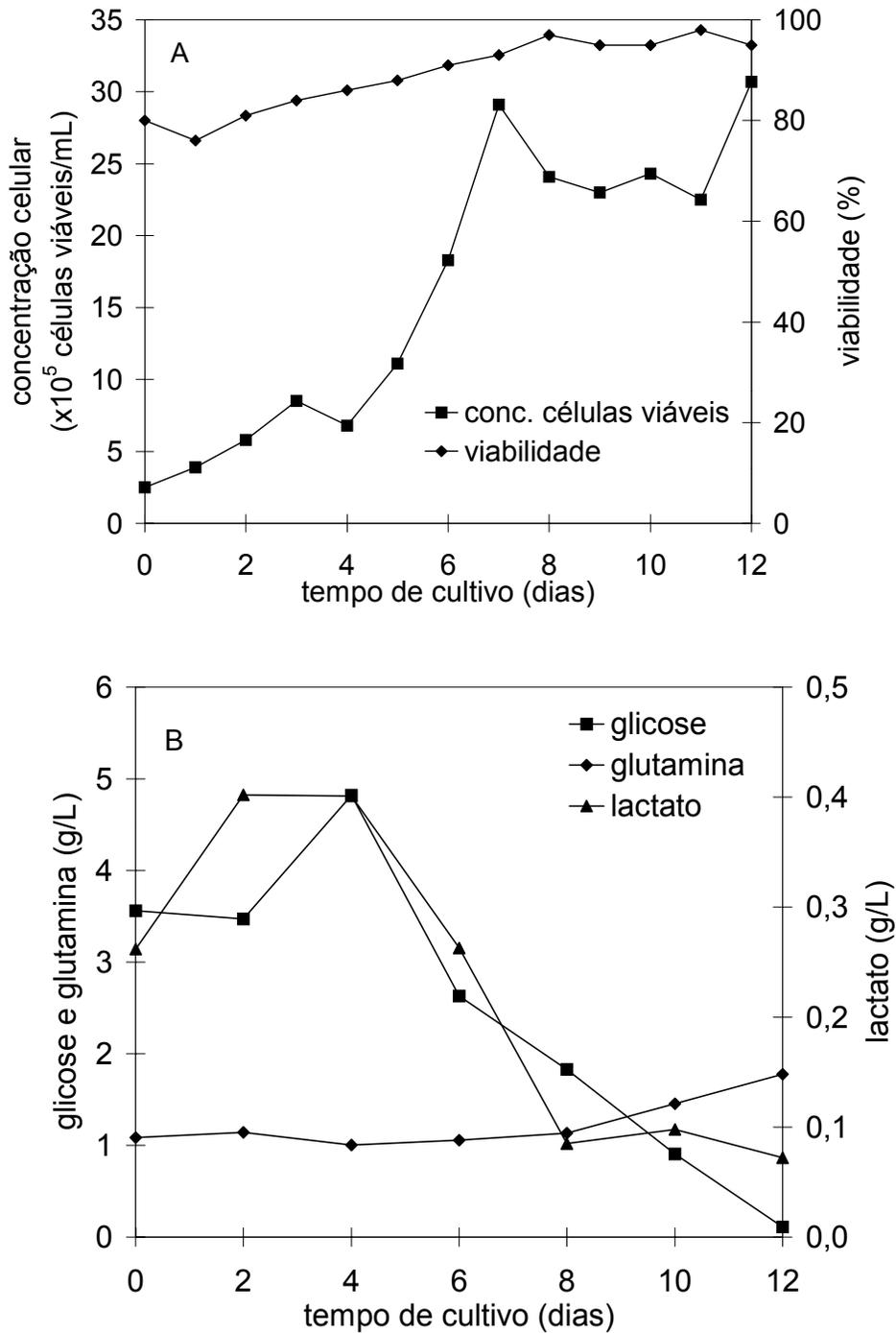


Figura A47: Parâmetros cinéticos para o ensaio 17 (6g/L de extrato de levedura; 4% de CPSL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

A-4: Crescimento e Viabilidade Celular e Consumo de Glicose, Glutamina e Evolução de Lactato para o Planejamento Fatorial Completo 2² com Inóculo Proveniente do Meio Grace Acrescido de 10% de SFB

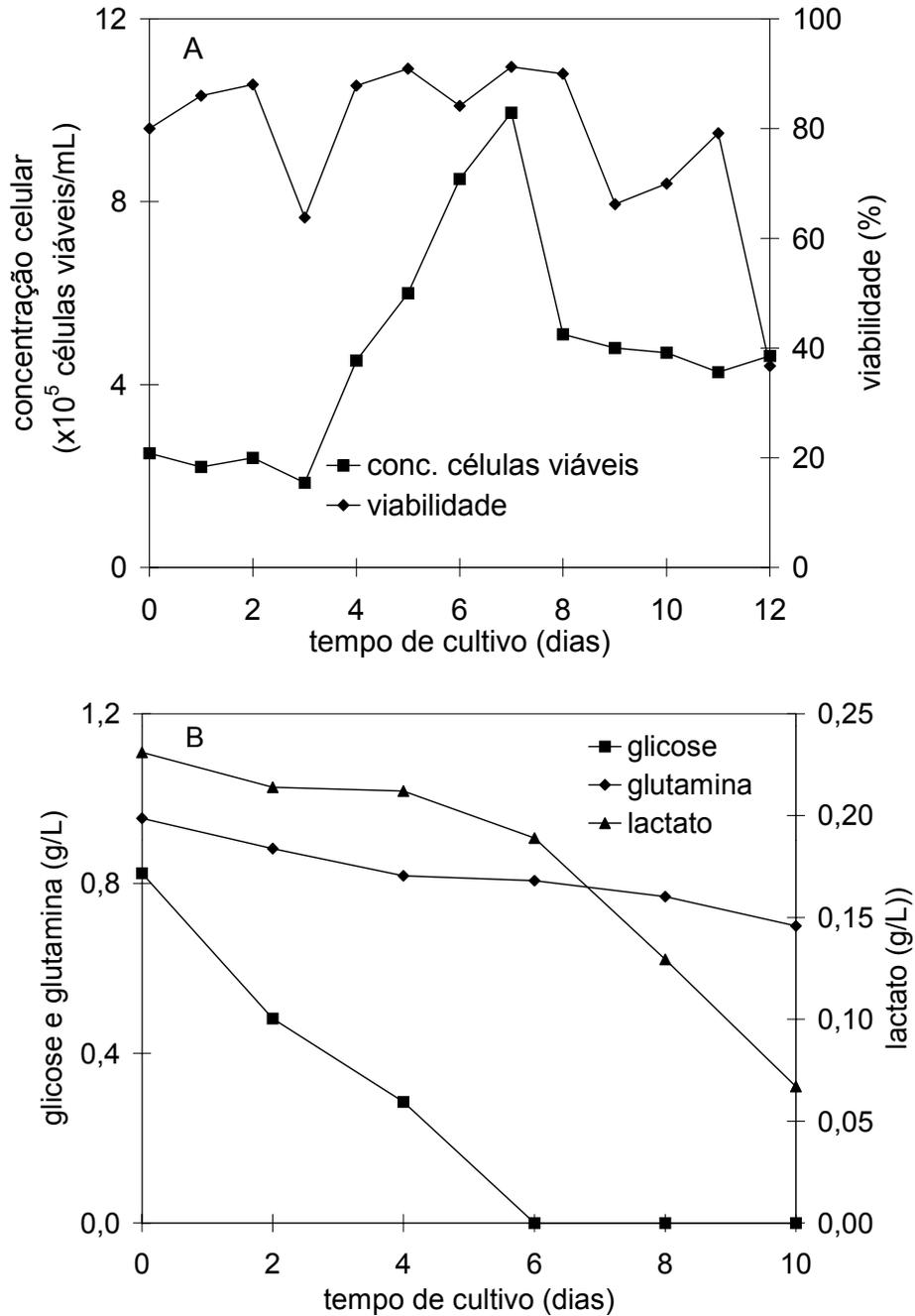


Figura A48: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Grace +10% de SFB. A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

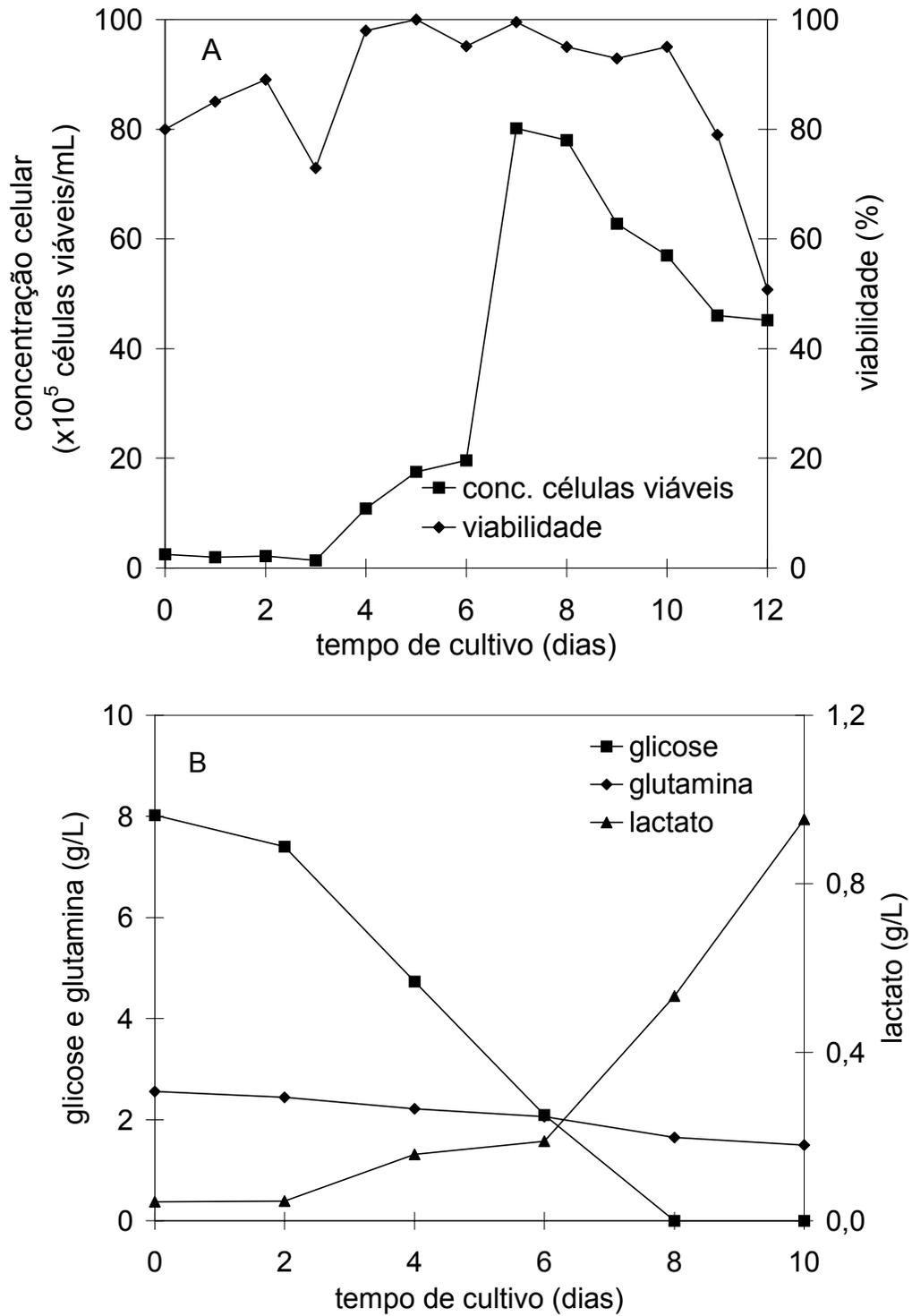


Figura A49: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meios Sf900II. A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

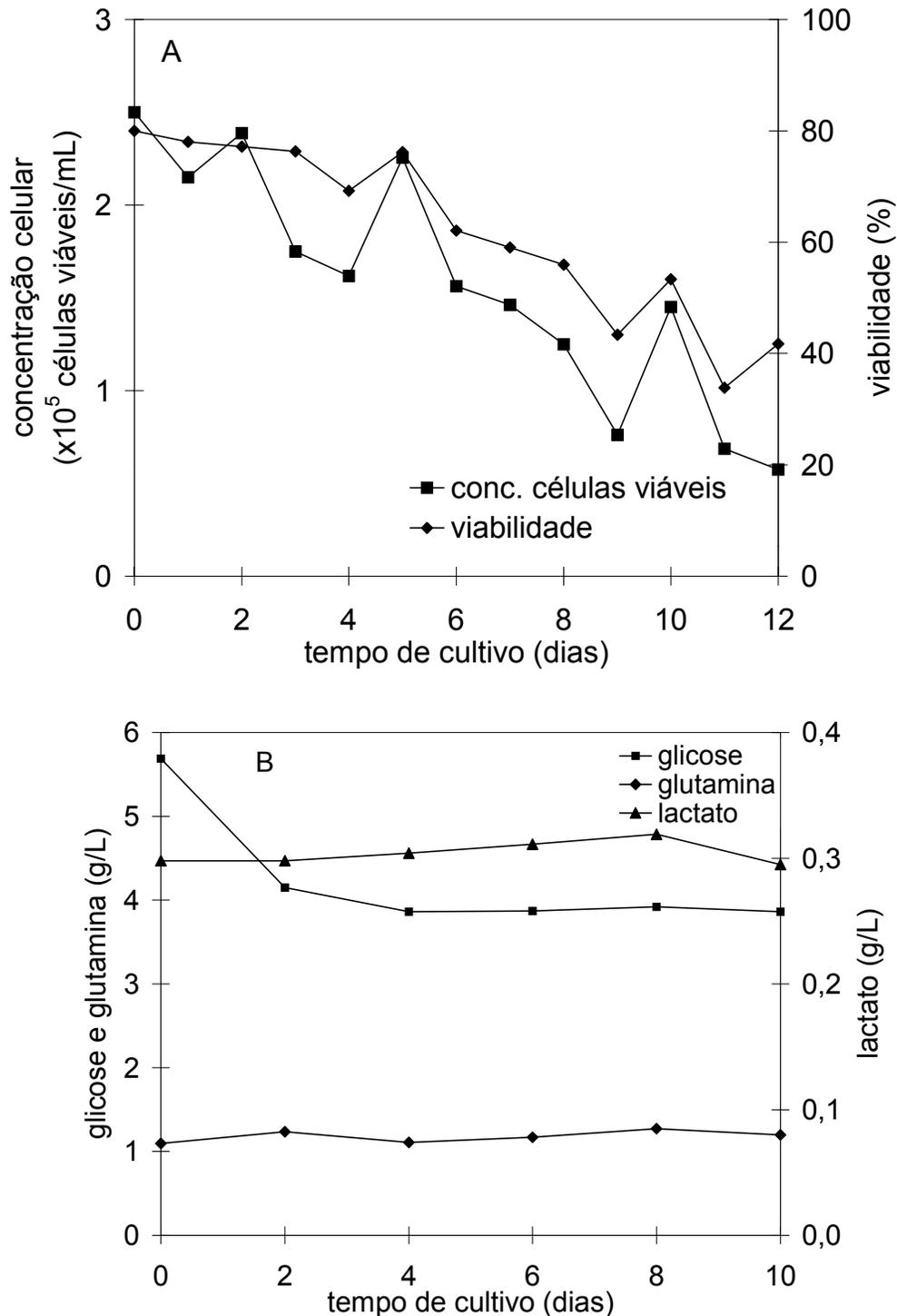


Figura A50: Parâmetros cinéticos para o ensaio 2 (8g/L de extrato de levedura; 5% de PL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

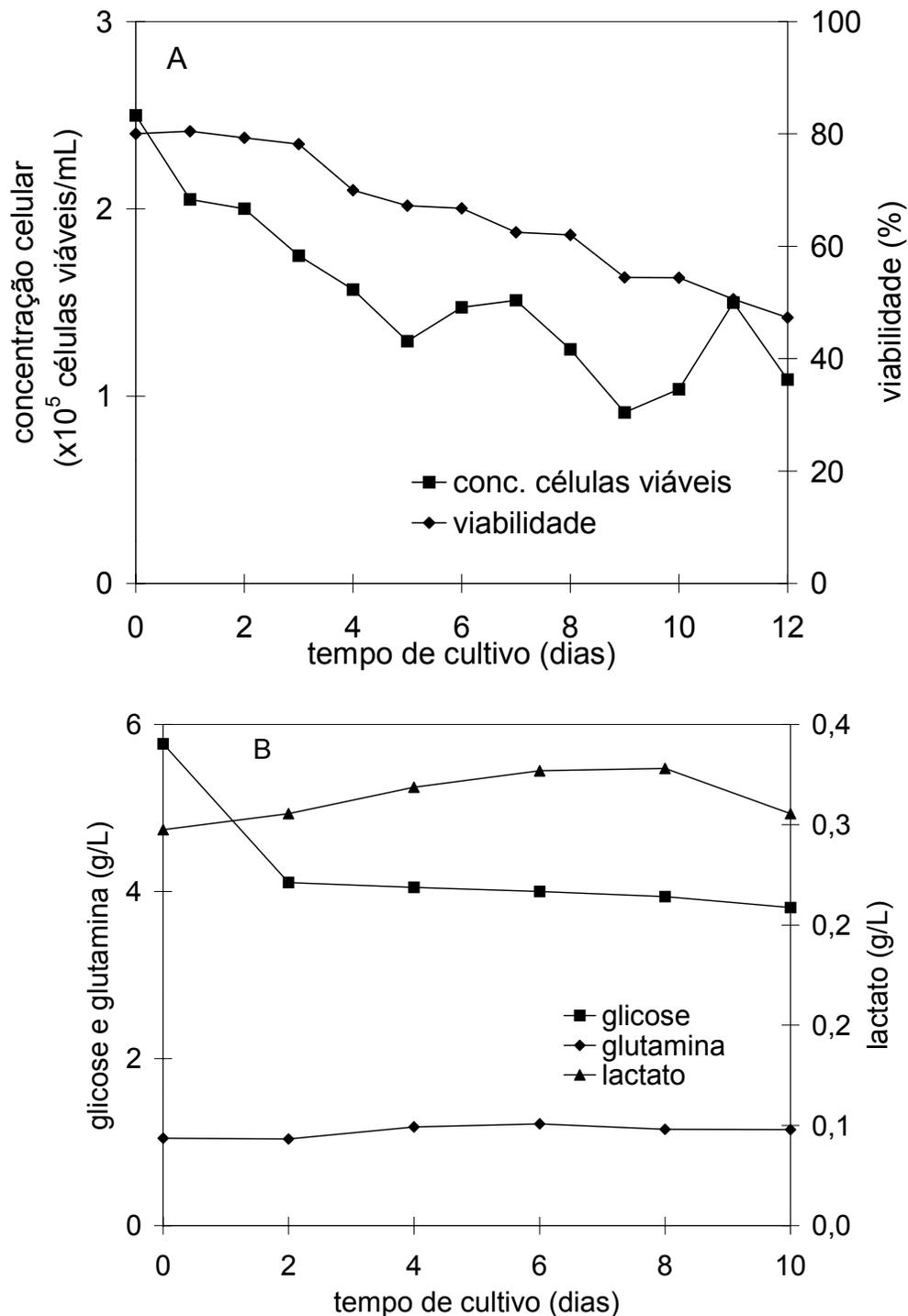


Figura A51: Parâmetros cinéticos para o ensaio 4 (8g/L de extrato de levedura; 5% de PL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

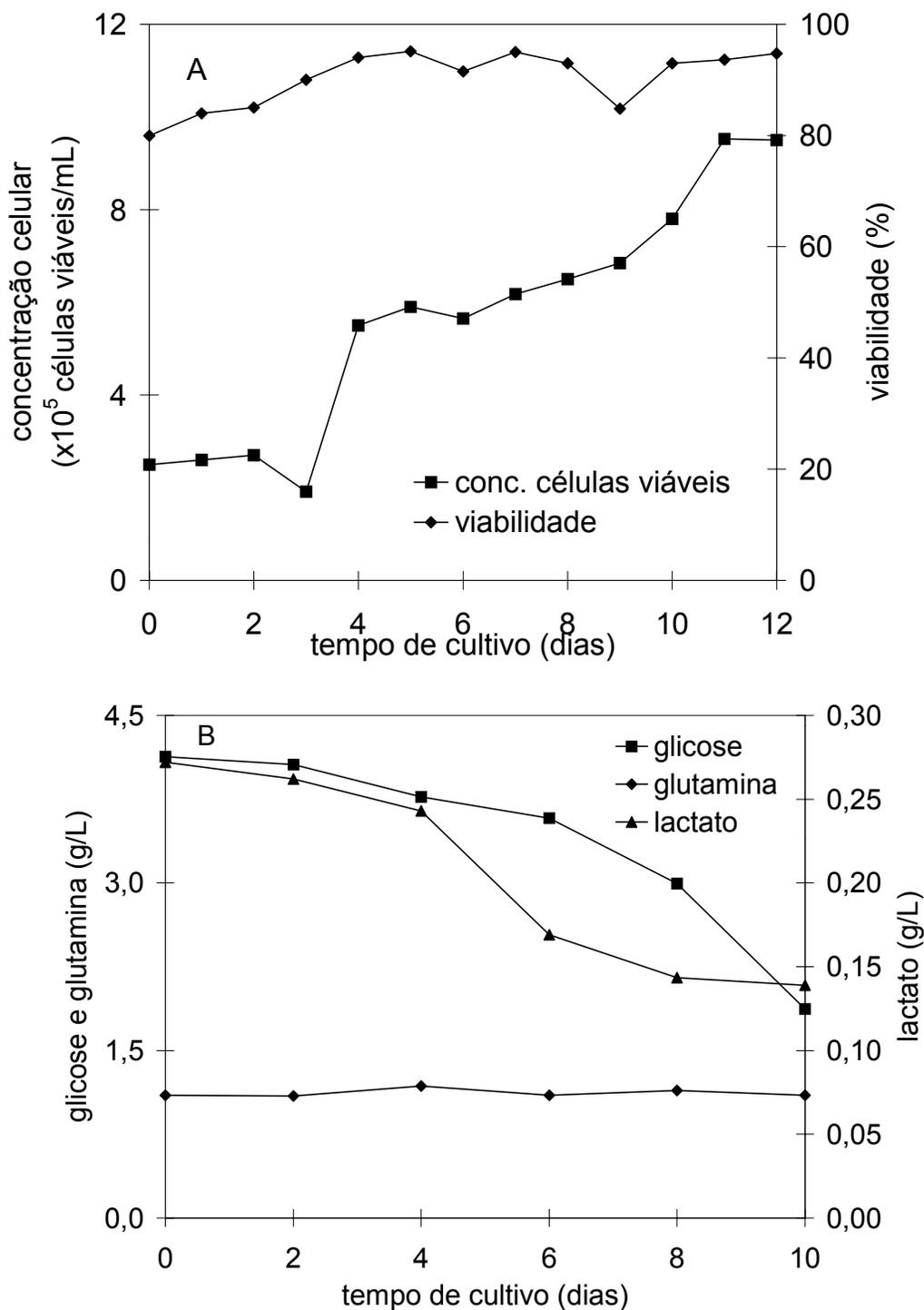


Figura A52: Parâmetros cinéticos para o ensaio 5 (8g/L de extrato de levedura; 2,5% de PL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

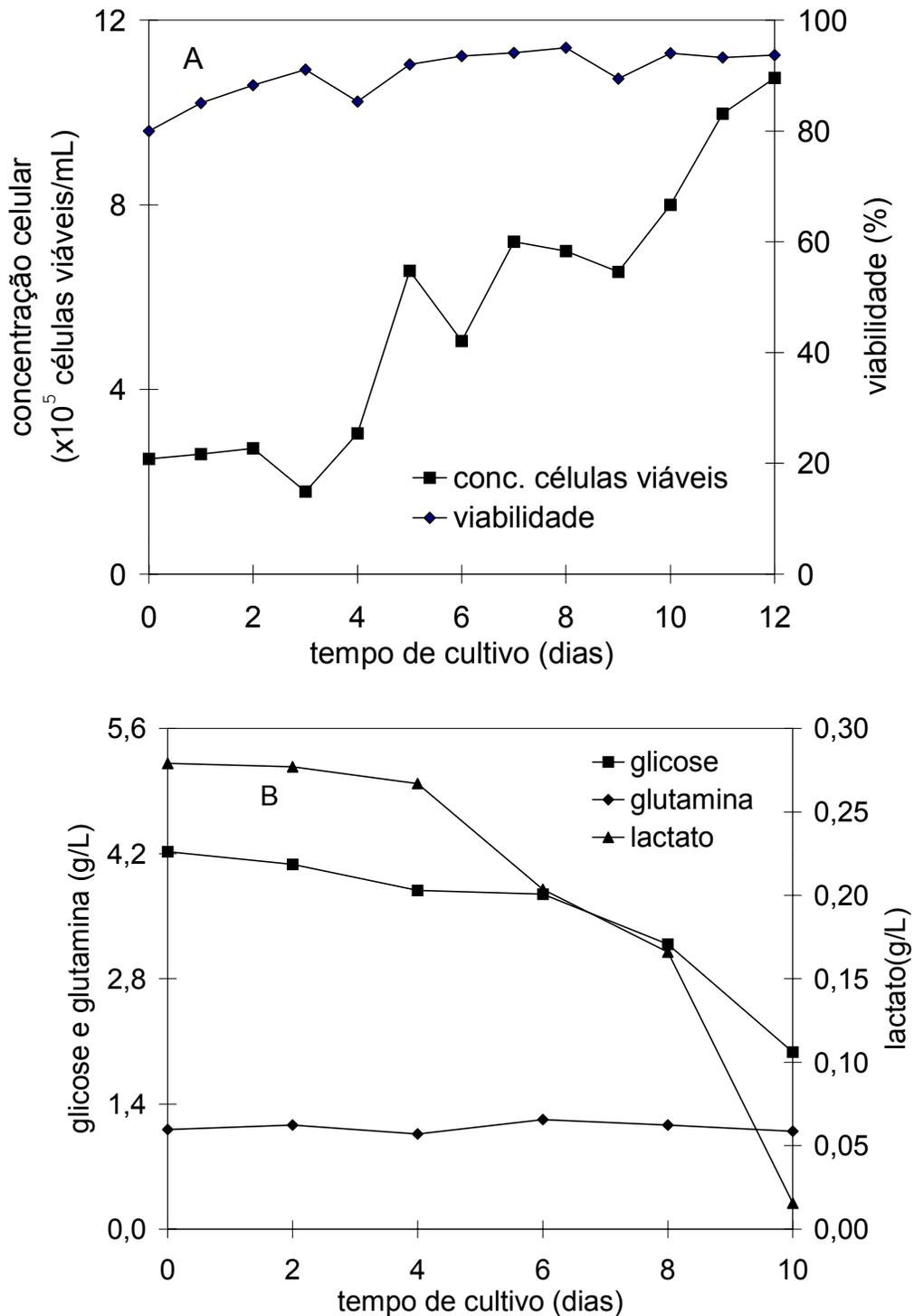


Figura A53: Parâmetros cinéticos para o ensaio 6 (8g/L de extrato de levedura; 2,5% de PL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

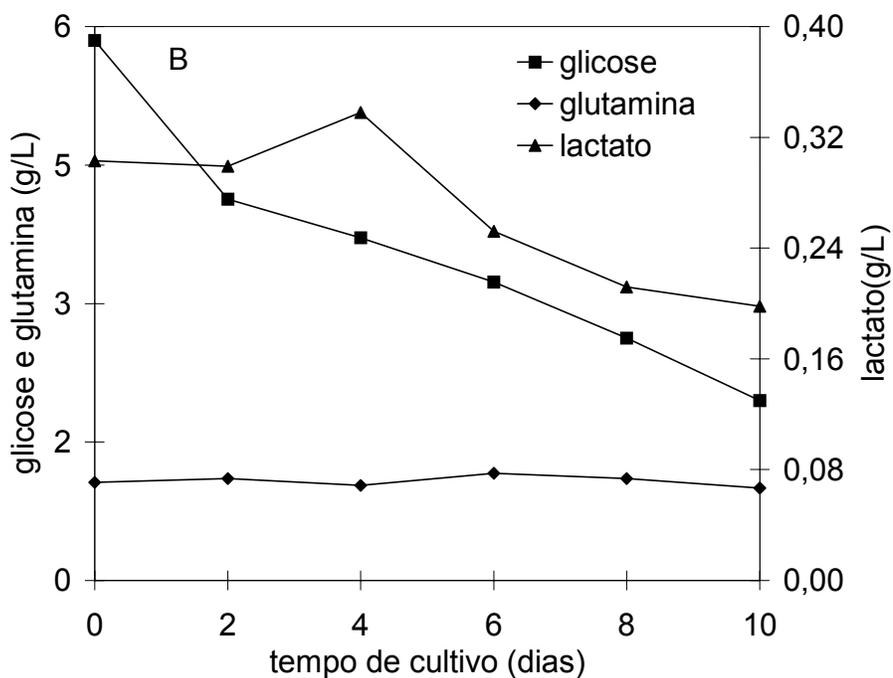
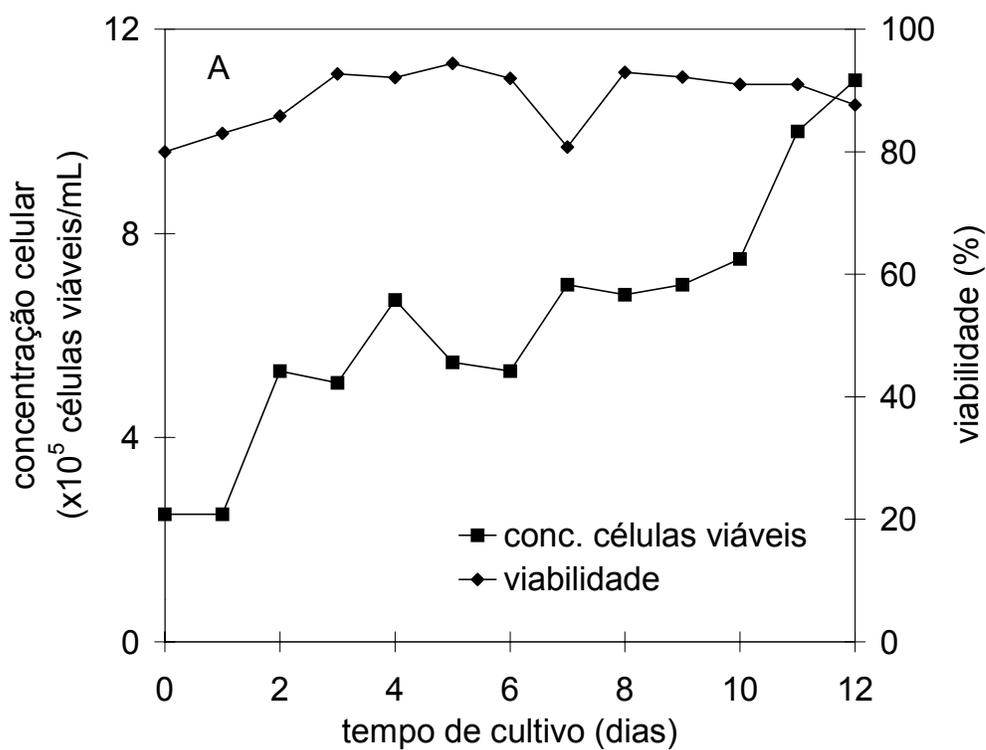


Figura A54: Parâmetros cinéticos para o ensaio 7 (8g/L de extrato de levedura; 2,5% de PL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

A-5: Crescimento e Viabilidade Celular e Consumo de Glicose, Glutamina e Evolução de Lactato para o Planejamento Fatorial Completo 2² com Inóculo Proveniente do Meio Sf900II

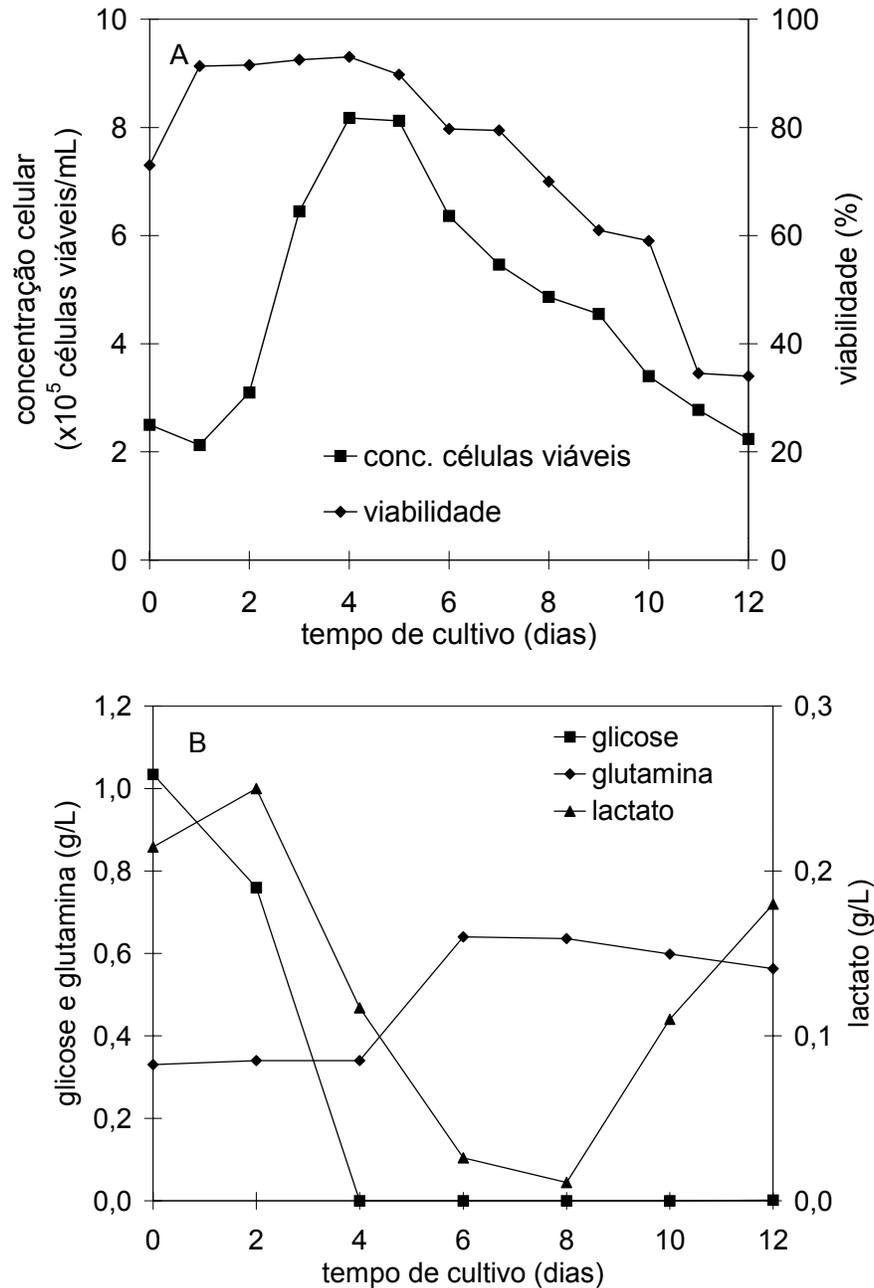


Figura A55: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Grace +10% de SFB. A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

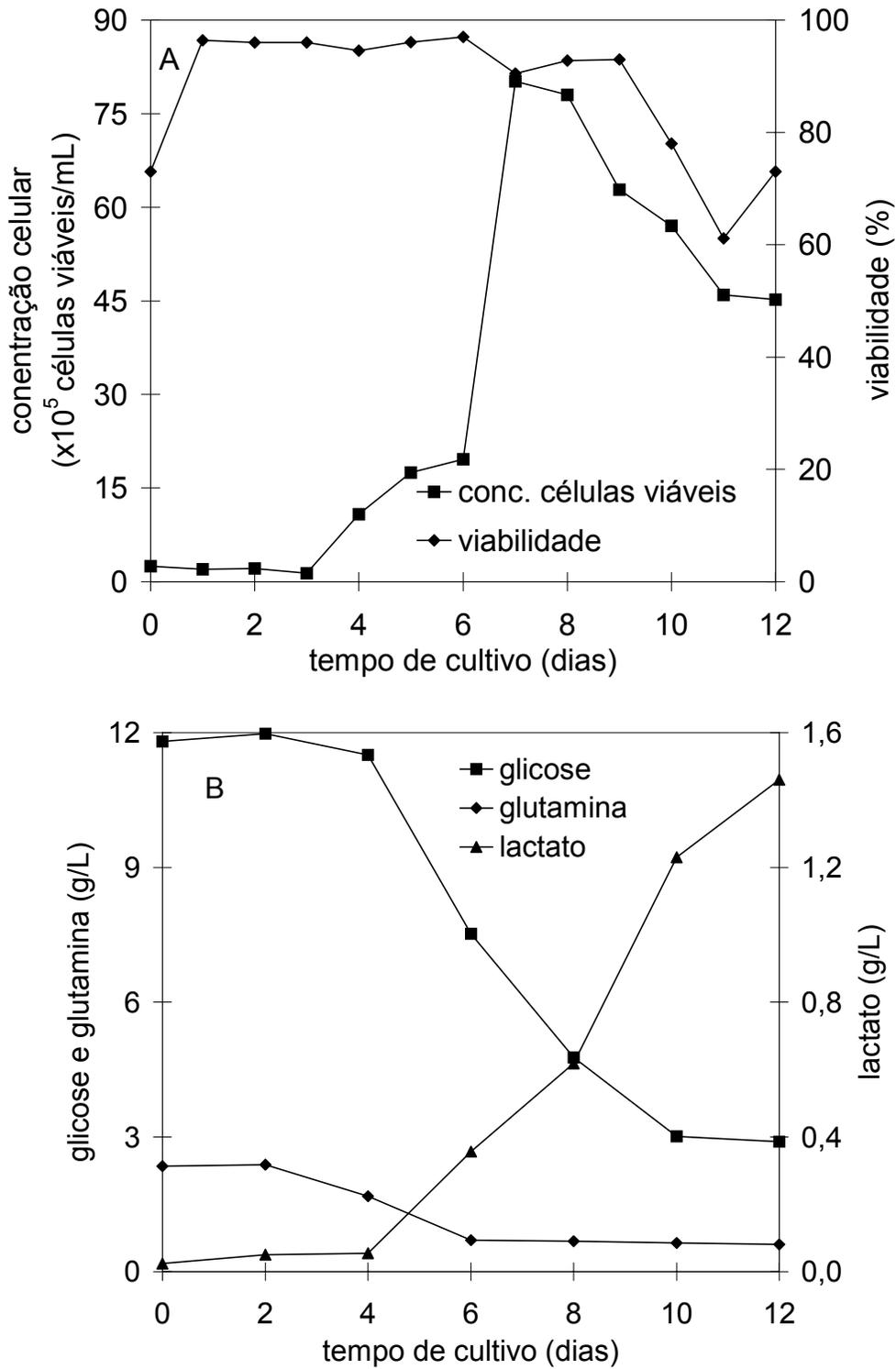


Figura A56: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Sf900II. A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

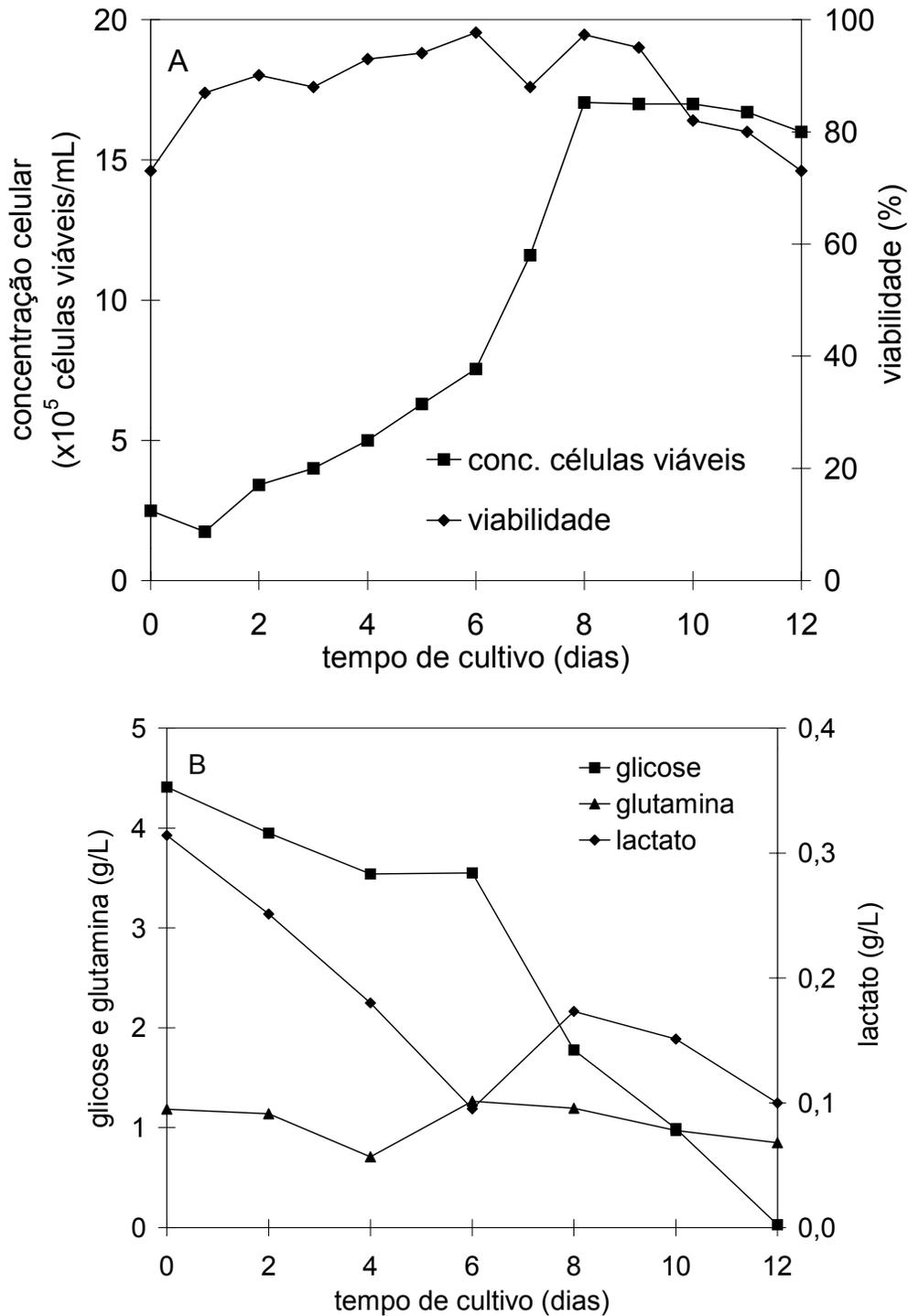


Figura A57: Parâmetros cinéticos para o ensaio 2 (8g/L de extrato de levedura; 2,5% de PL; 1% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

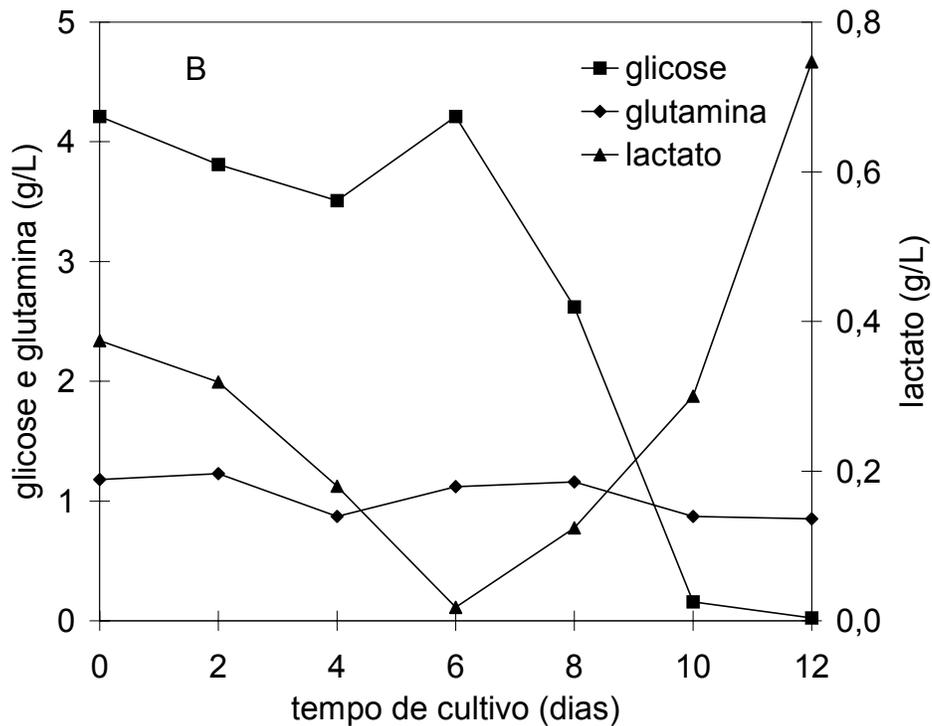
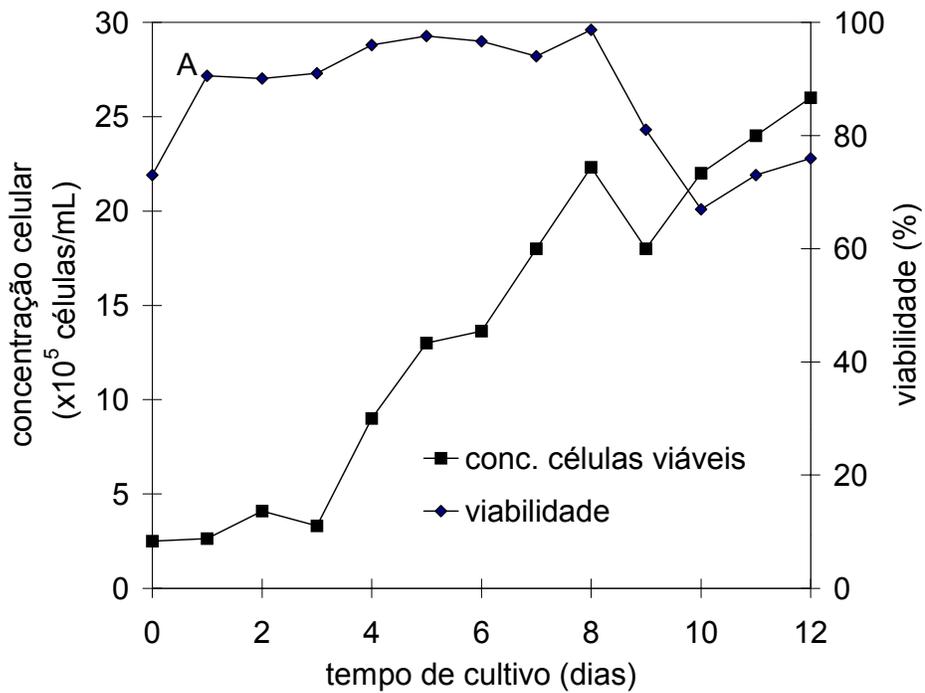


Figura A58: Parâmetros cinéticos para o ensaio 4 (8g/L de extrato de levedura; 2,5% de PL; 3% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

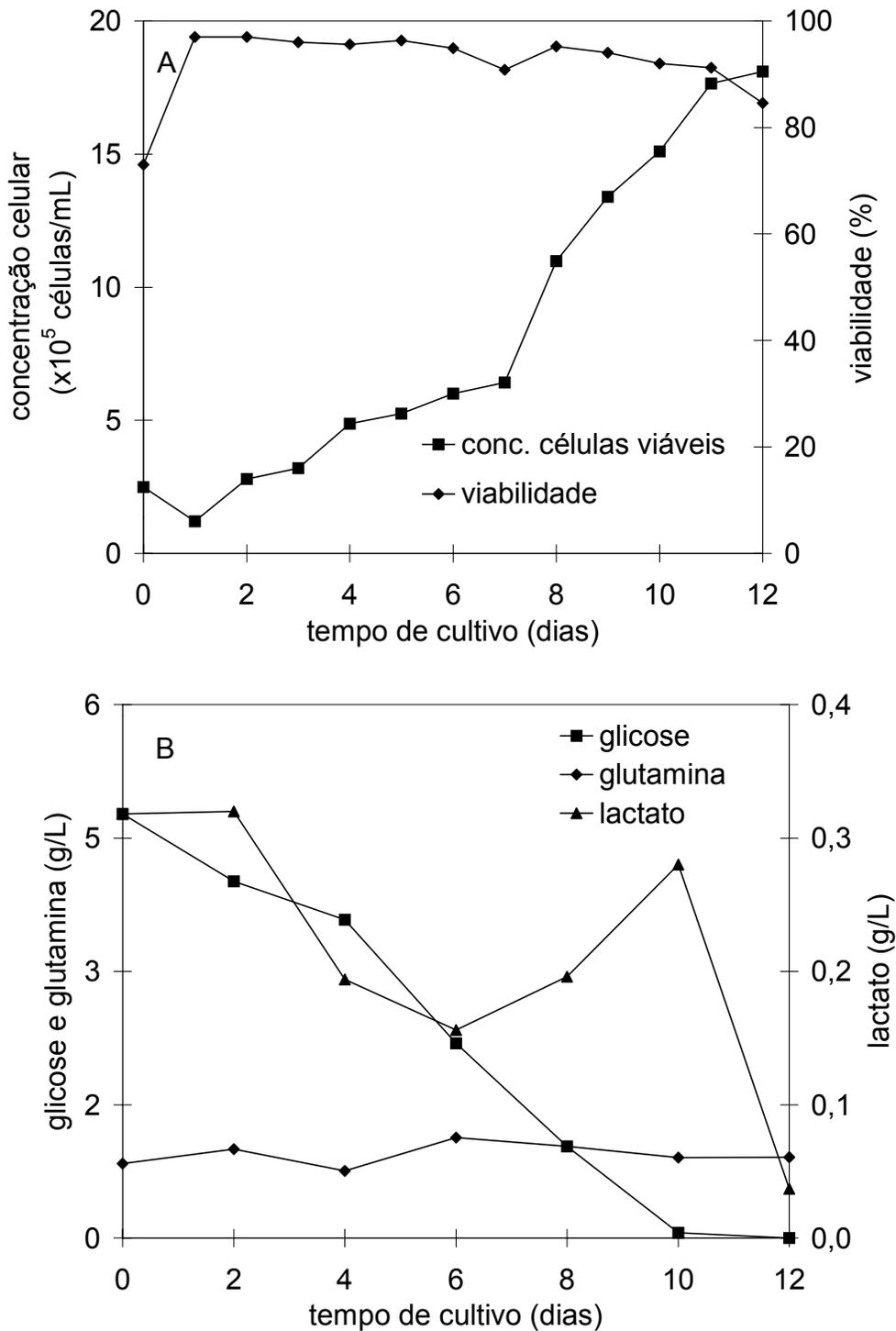


Figura A59: Parâmetros cinéticos para o ensaio 5 (8g/L de extrato de levedura; 1,75% de PL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

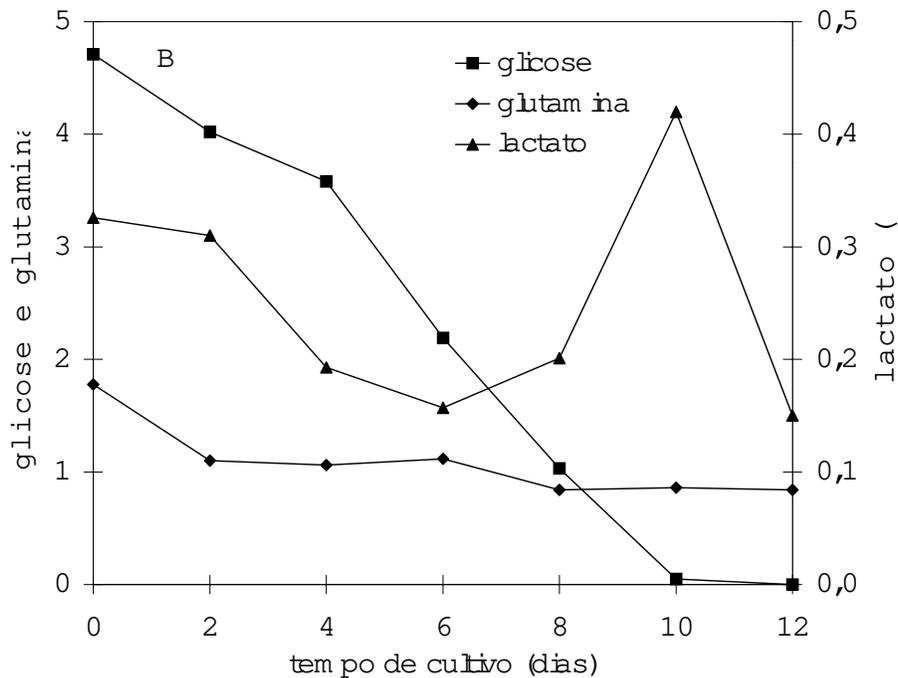
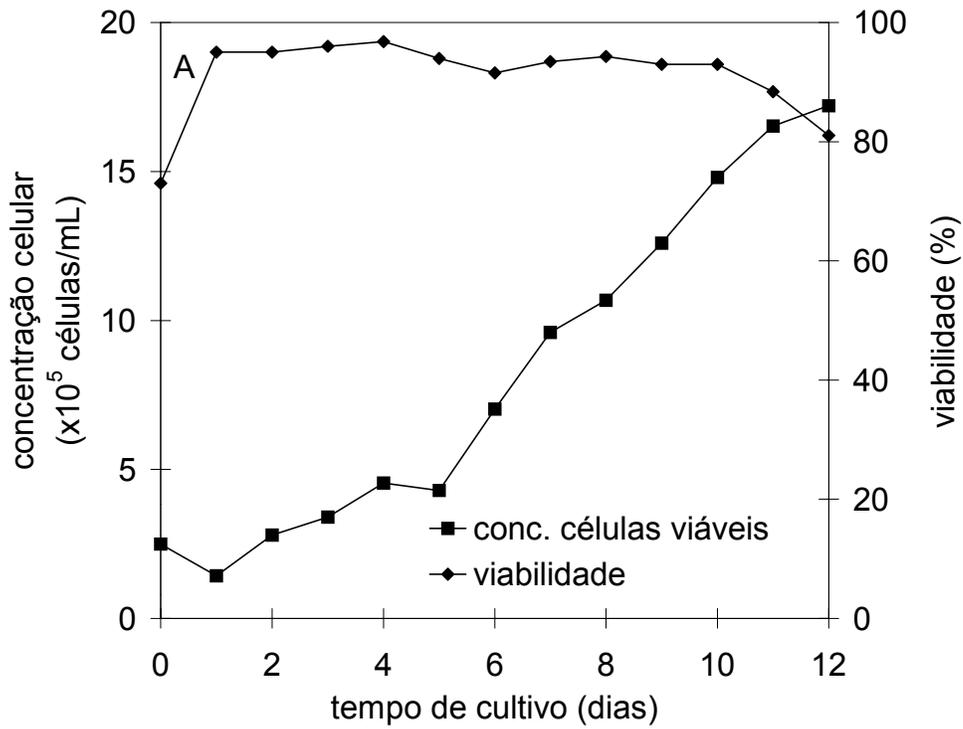


Figura A60: Parâmetros cinéticos para o ensaio 6 (8g/L de extrato de levedura; 1,75% de PL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

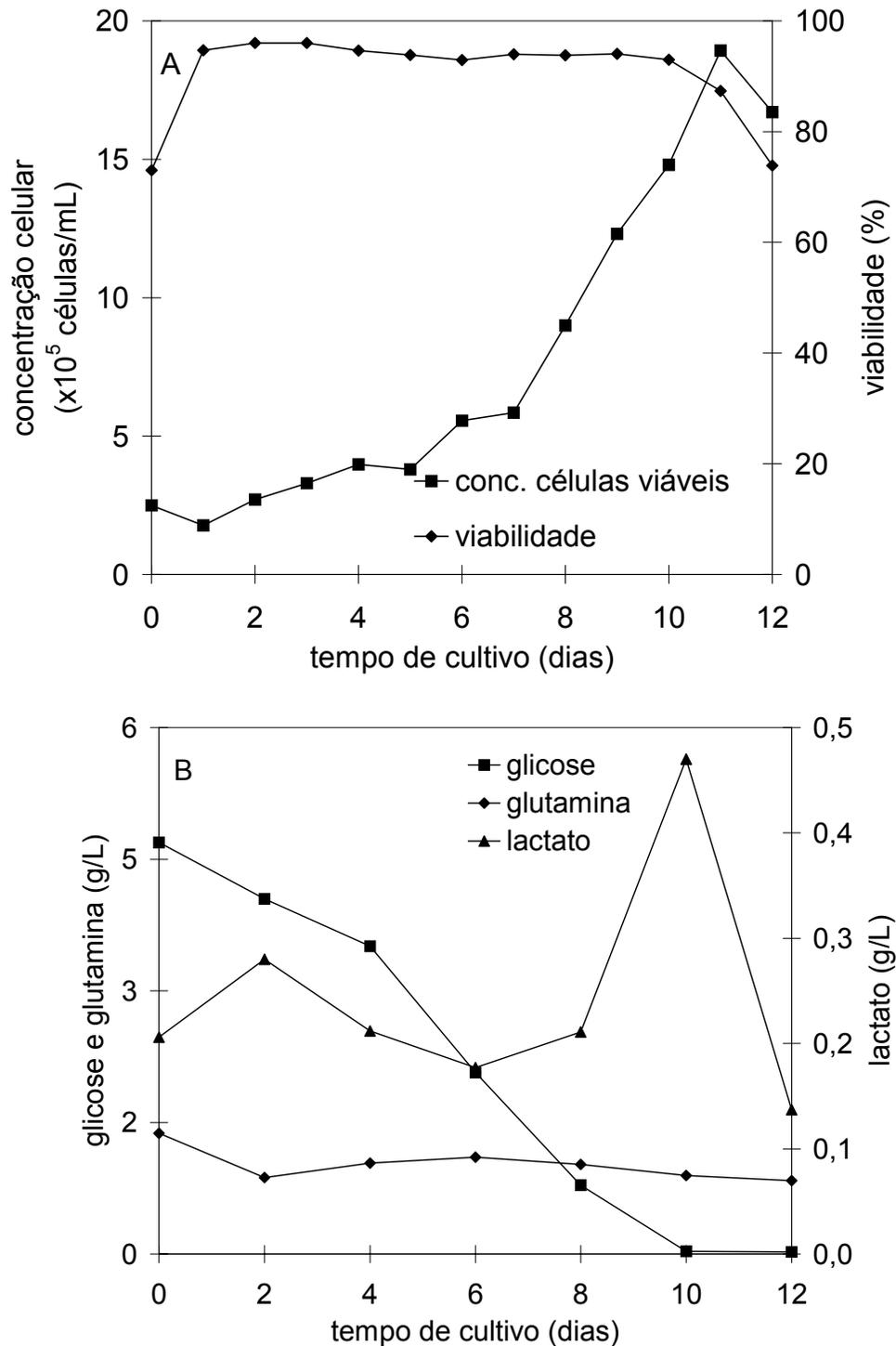


Figura A61: Parâmetros cinéticos para o ensaio 7 (8g/L de extrato de levedura; 1,75% de PL; 2% de SFB; 2,7g/L de glicose e 0,1% de PF68). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

A-6: Crescimento e Viabilidade Celular e Consumo de Glicose, Glutamina e Evolução de Lactato para os Ensaios de Adaptação Celular, Inóculo 3×10^5 células Viáveis/mL

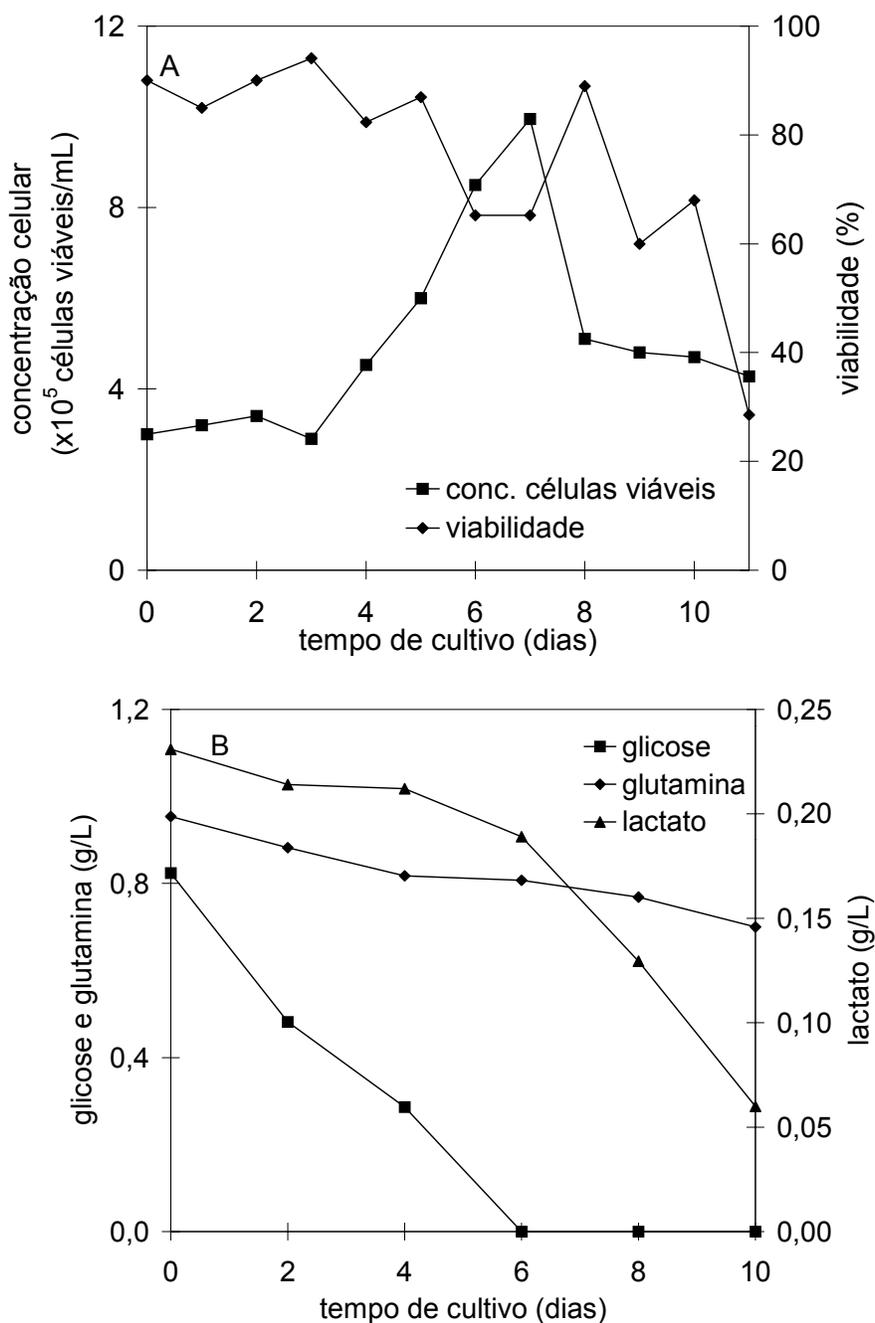


Figura A62: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Grace +10% de SFB. A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

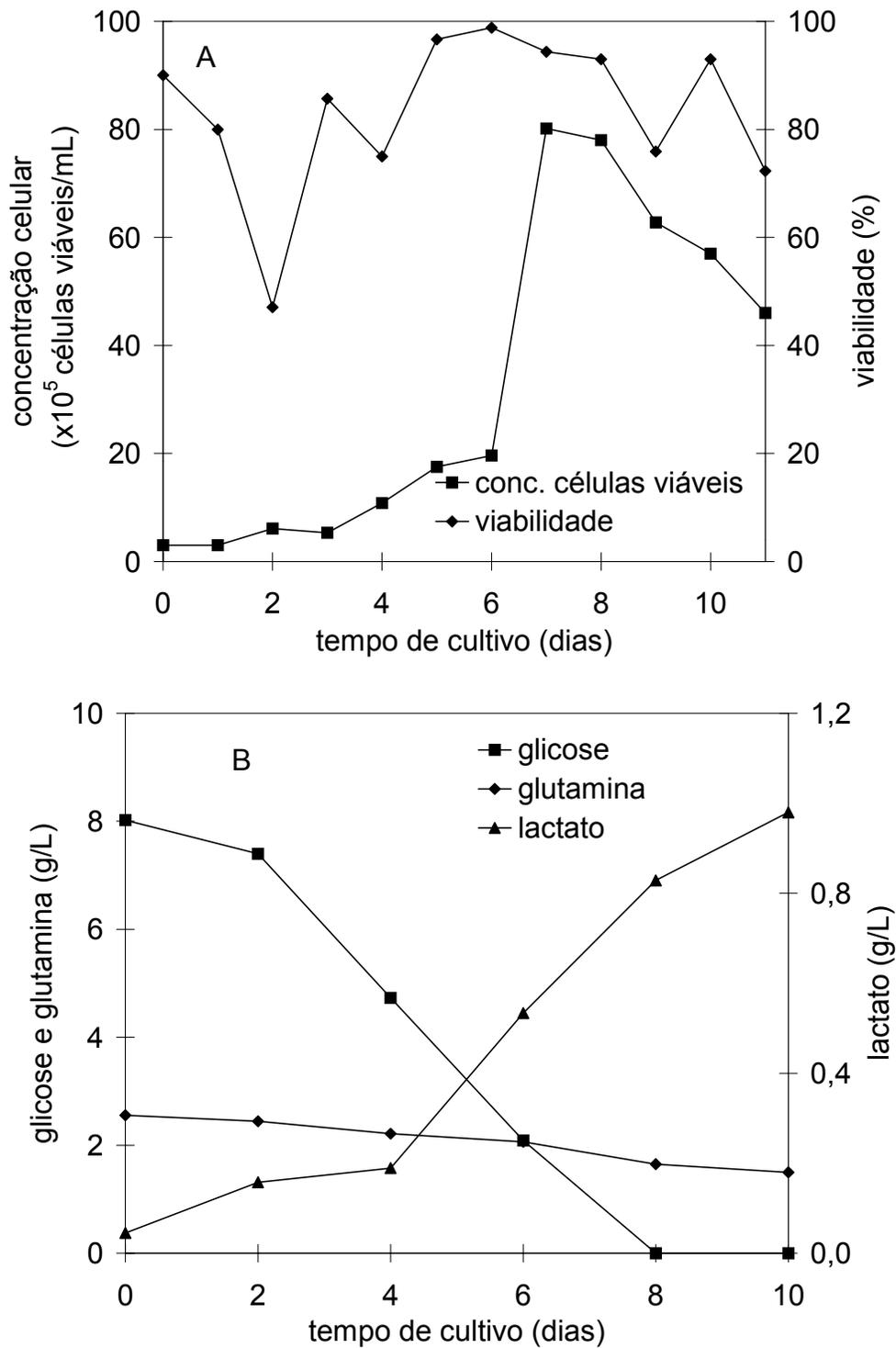


Figura A63: Parâmetros cinéticos para o ensaio controle em meio Sf900II. A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

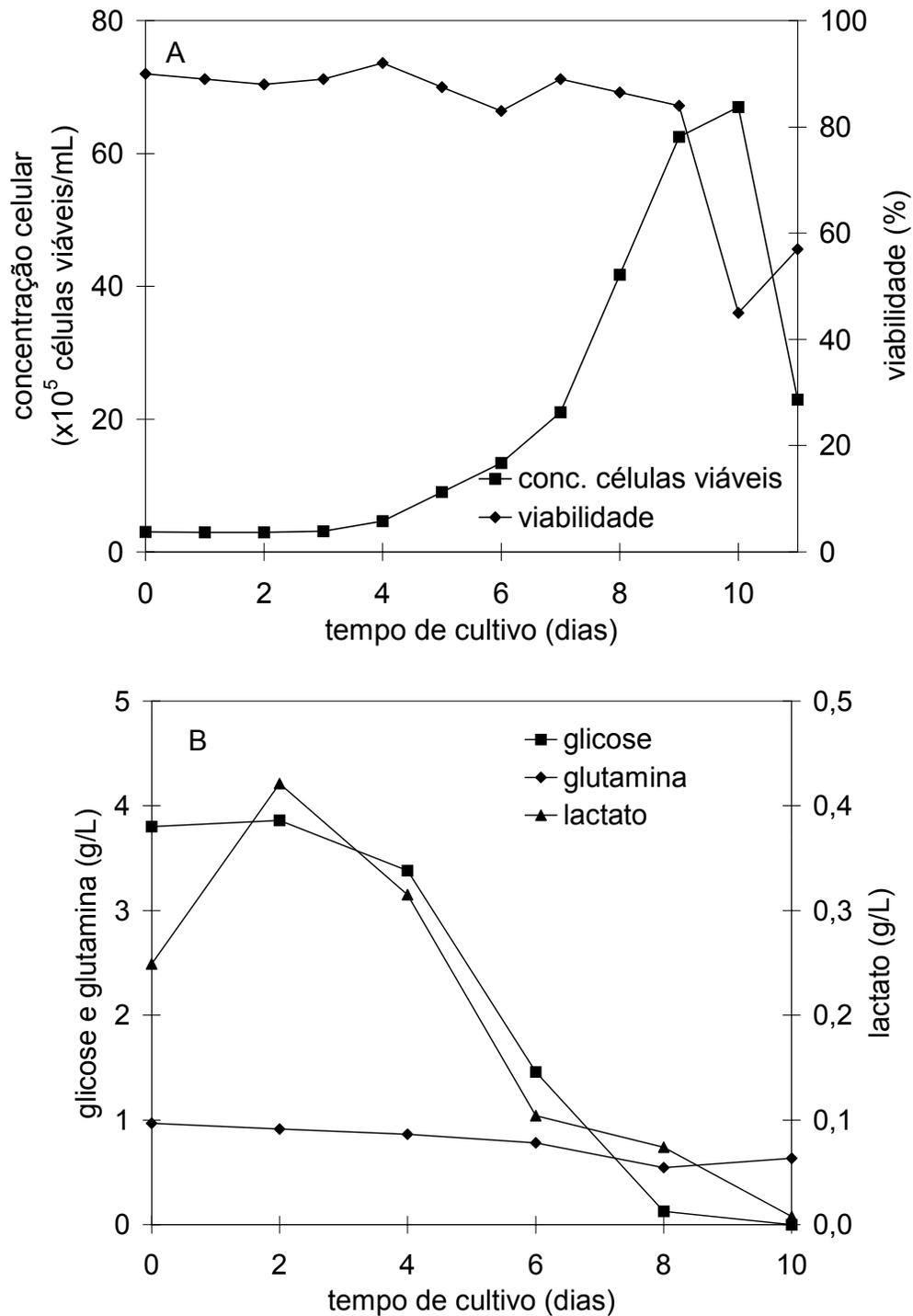


Figura A64: Parâmetros cinéticos para o ensaio 4 (8g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 1% de SFB e 2,7g/L de glicose). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

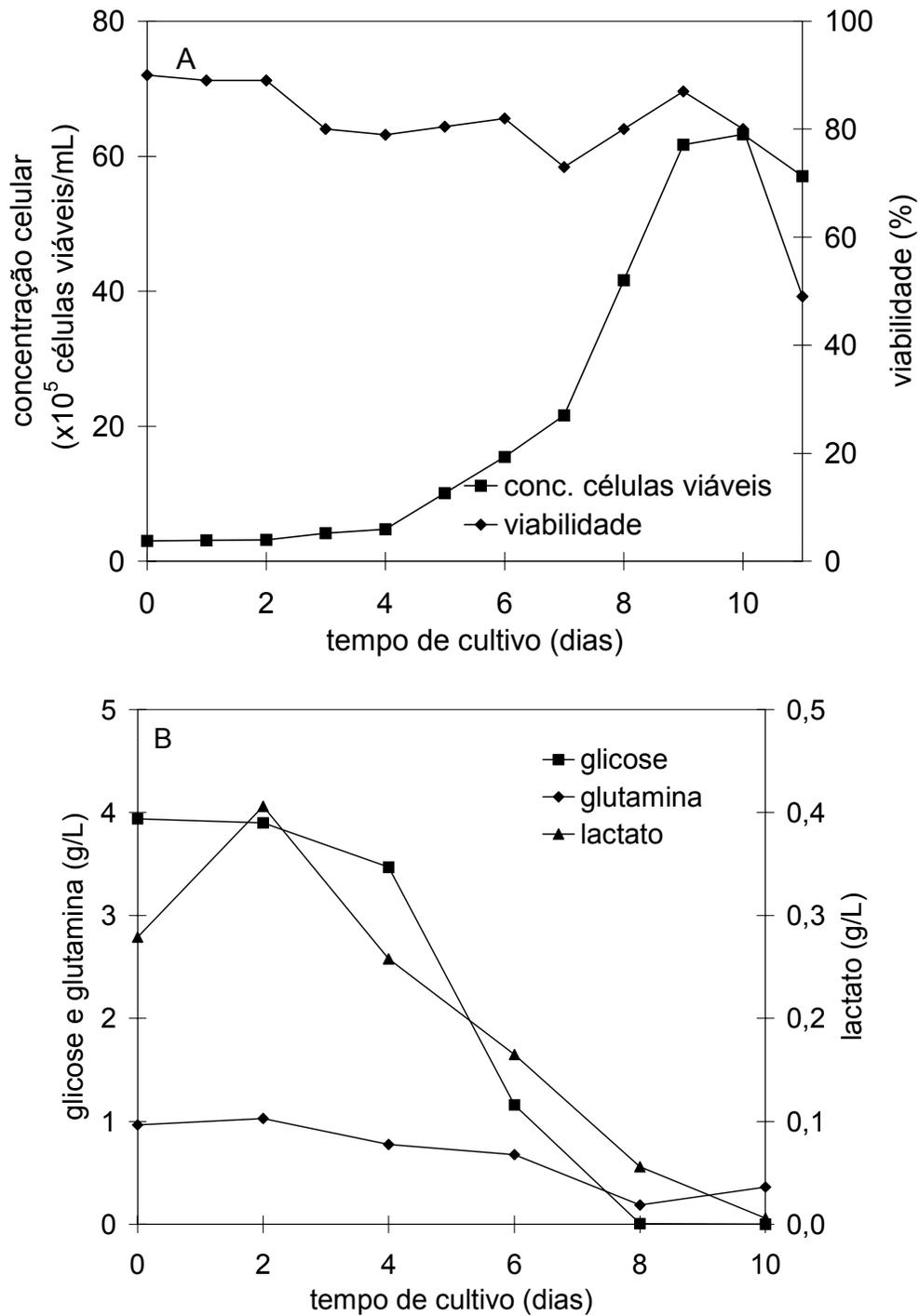


Figura A65: Parâmetros cinéticos para o ensaio 16 (8g/L de extrato de levedura; 5% de CPSL; 3% de SFB; 0,2% de PF68 e 2,7g/L de glicose). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

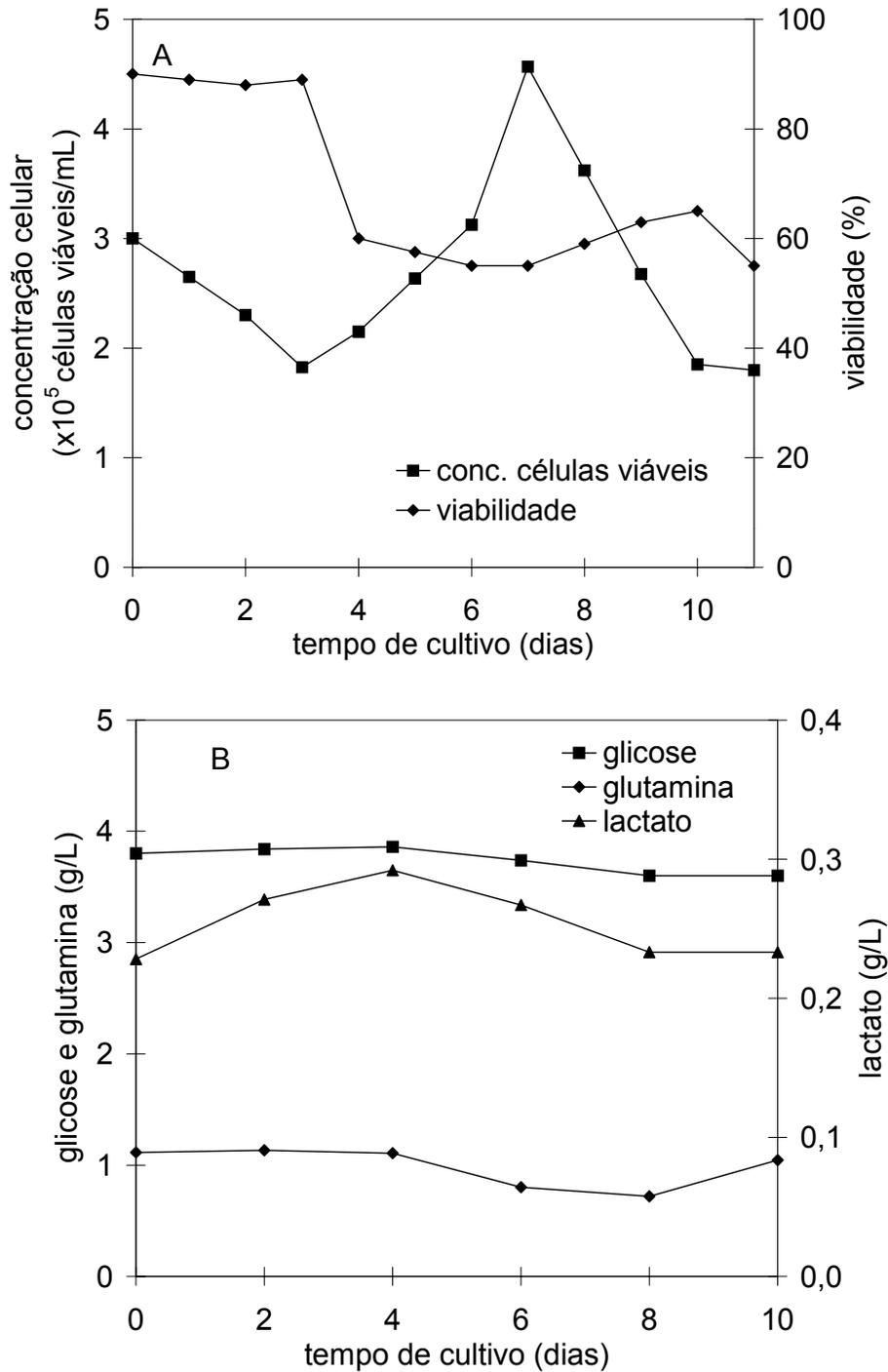


Figura A66: Parâmetros cinéticos para o ensaio 1 (8g/L de extrato de levedura; 1% de PL; 1% de SFB; 0,1% de PF68 e 2,7g/L de glicose). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

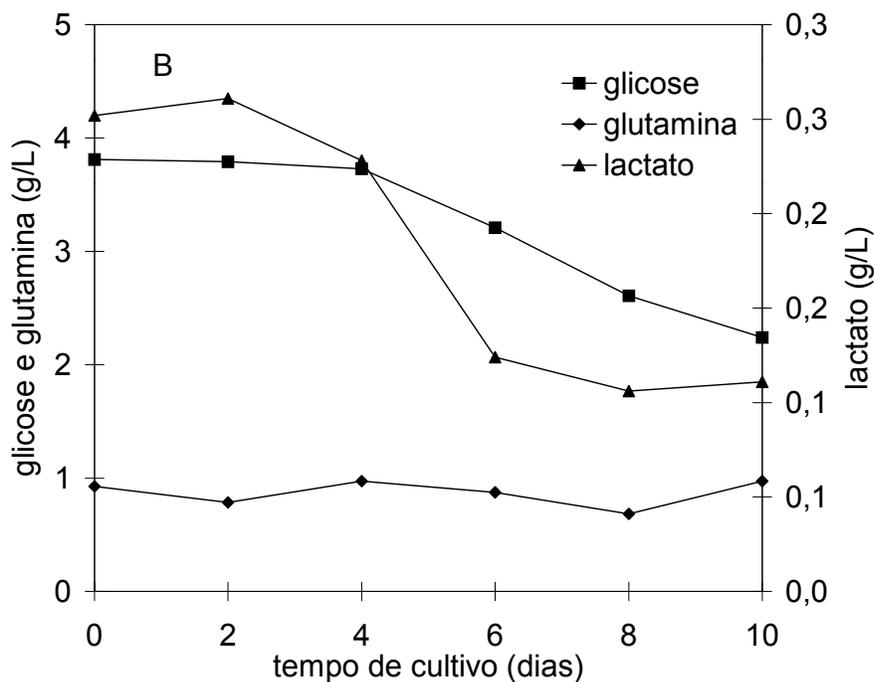
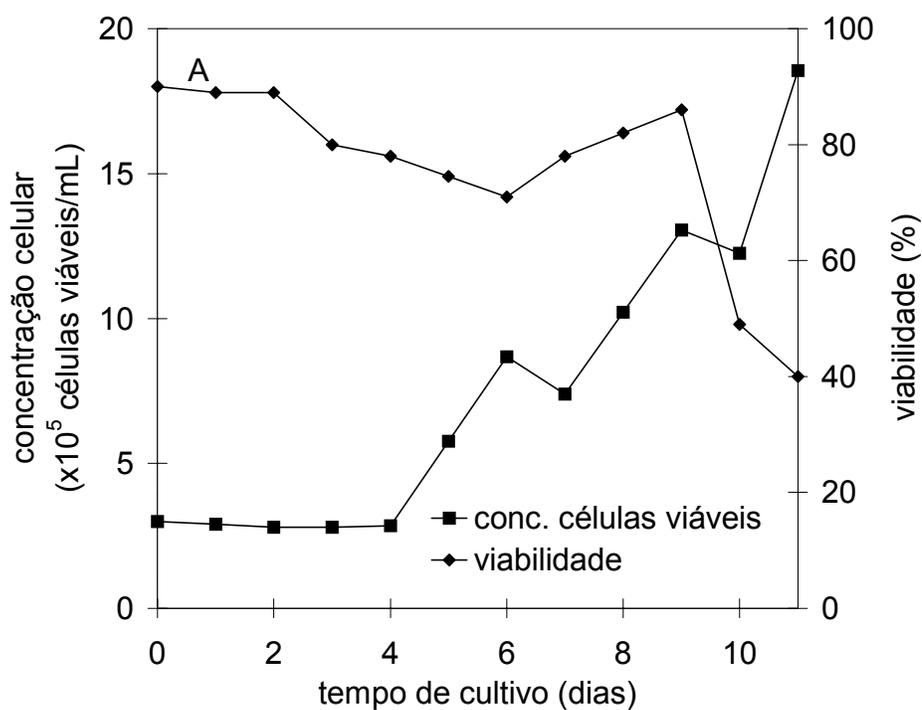


Figura A67: Parâmetros cinéticos para o ensaio 3 (8g/L de extrato de levedura; 1% de PL; 3% de SFB; 0,1% de PF68 e 2,7g/L de glicose). A: Monitoramento da concentração e viabilidade celular; B: Consumo de glicose, glutamina e formação de lactato.

Tabela A-1: Comparação do desempenho dos ensaios controle empregados no desenvolvimento deste trabalho.

	Planejamento Fatorial									
	Inóculo Sf900II						Inóculo Grace + 10% de SFB			
	2^{5-1}		2^3		2^2		2^3		2^2	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
$X_{me}^{(1)}$ ($\times 10^5$ cél. Viáveis/mL)	4,0	-	8,1	14,6	4,8	16,6	6,4	11,0	9,1	17,0
$X_{vs}^{(2)}$ ($\times 10^5$ cél. Viáveis/mL)	9,0	-	14,7	41,0	8	77,2	9,6	60,0	10,4	78,0
$Viab_{me}^{(3)}$ (%)	80	-	96	66	93	91	92	82	88	95
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	0,026	-	0,023	0,019	0,023	0,030	0,018	0,030	0,013	0,034
td (h)	26	-	30	35	29	23	38	23	53	20

⁽¹⁾ Concentração de células viáveis na fase média exponencial; ⁽²⁾ Concentração de células viáveis na fase estacionária; ⁽³⁾ Viabilidade na fase média exponencial; C1: Ensaio controle em meio Grace + 10% de SFB; C2:Ensaio controle em meio Sf900II.

Apêndice B

B1: Identificação da Morte Celular Usando Corantes Fluorescentes em Microscopia de Fluorescência

O método empregado tradicionalmente no acompanhamento da viabilidade celular é o método de exclusão por Trypan. Neste método as células mortas absorvem o corante devido a falhas da membrana celular, enquanto que as células vivas impedem sua entrada, permanecendo descoloridas (Freshney, 1994). Contudo, este método não possibilita a distinção entre as células realmente capazes de se reproduzir (definidas como viáveis) e as células com a membrana celular intacta, que podem estar em processo de apoptose ou morte celular programada.

Com a finalidade de identificar as células realmente viáveis e passíveis de infecção, empregam-se os corante brometo de etídio e laranja de acridina. Este procedimento foi empregado nos ensaios de adaptação celular. O brometo de etídio e o laranja de acridina, corantes que se intercalam ao DNA celular, fluorescem sob excitação com luz ultravioleta. O laranja de acridina possui a característica de penetrar no interior celular, independente da integridade da membrana, enquanto que o brometo de etídio somente penetra em células que apresentem danos na membrana celular.

Através de um filtro azul e luz ultravioleta, as células coradas com o laranja de acridina são visualizadas em verde, enquanto que as células coradas com o brometo de etídio são visualizadas em laranja. Como o brometo de etídio é um corante mais potente, sua coloração encobre a coloração do laranja de acridina quando ambos estão no interior das células, tornando as células totalmente coradas em laranja. Com a utilização destes corantes, pode-se observar as populações de células coradas totalmente em verde, apresentando núcleo não fragmentado, as células apoptóticas recentes coradas em verde e apresentando

vários grânulos corados em verde brilhante na região nuclear. Estes grânulos correspondem à cromatina condensada e fragmentada, indicando que a célula já entrou em apoptose, mas ainda mantém a integridade de sua membrana. Nesta fase observa-se a formação de corpos apoptóticos, que são corpúsculos celulares contendo material celular eliminados pela célula. Observam-se ainda as células apoptóticas tardias coradas em verde, com os grânulos na parte nuclear corados em laranja. Esta coloração dos grânulos indica que as células começaram a perder a integridade de sua membrana, tornando-se permeáveis ao brometo de etídio.

Em uma fase mais avançada observa-se que toda a célula se cora em laranja. Outra característica desta fase é a redução do tamanho celular, devido à perda de material por meio da eliminação dos corpos apoptóticos. Também é observada uma grande contração nuclear, originando a formação de inúmeros corpos celulares altamente condensados.

Não obstante, observam-se as células necróticas coradas totalmente em laranja, indicando perda da integridade da membrana. As características que diferenciam estas células das anteriores é que células necróticas não têm seu tamanho reduzido, ao contrário, há uma tendência de aumento de volume, não apresentando núcleo fragmentado nem condensação da região nuclear. Não observa-se a formação de corpos apoptóticos saindo das células. Este estágio é muito curto, ocorrendo a lise rapidamente.

Apêndice C

C1: Titulação Viral através do Método da Diluição Final

1. Fazer diluições seriadas do vírus a ser titulado (10^{-1} a 10^{-12}) utilizando 12 frascos eppendorfs de 1,5mL de capacidade, empregando 0,9mL do meio de cultura Sf900II e 0,1mL de suspensão viral a partir da maior diluição.
2. Marcar numa placa do tipo ELISA com 96 cavidades uma diluição por coluna.
3. Semear as células a serem utilizadas (Sf9) na concentração de 1×10^5 células viáveis/mL em todas as cavidades da placa. Colocar 0,1 μ L de cultura por cavidade.
4. Imediatamente, começando com a menor diluição viral (10^{-12}), adicionar 0,1 μ L de amostra viral nas 6 cavidades da fileira marcada para aquela diluição. As 6 cavidades serão utilizadas como ensaios controle (sem infecção).
5. Repetir o procedimento para as outras diluições virais.
6. Incubar a microplaca, em frasco com ambiente úmido, em estufa a 28°C. Verificar as células infectadas através da presença de poliedros de vírus no núcleo.
7. Calcular a titulação viral segundo *Reed e Muench* (1938), descrito no exemplo a seguir, apresentado na Tabela C1:

Tabela C1: Exemplo do cálculo de *Reed and Muench* (1938)

Diluição	Cavidades Com Pelo Menos 50% Das Células Infectadas (+) Ou Não (-)				
10^{-1}	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	-	+	+	+
10^{-6}	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-
10^{-10}	-	-	-	-	-
10^{-11}	-	-	-	-	-
10^{-12}	-	-	-	-	-

A Tabela C1 mostra os resultados obtidos de uma titulação realizada em microplaca com 96 cavidades. As diluições virais foram realizadas em quintuplicatas. As demais cavidades foram empregadas como controle, ou seja, sem a infecção celular por baculovírus.

Para a determinação da percentagem de células infectadas as seguintes variáveis foram definidas: DP (distância proporcional), A (% com resposta acima de 50% de infecção) e B (% com resposta abaixo de 50% de infecção). Contabilizam-se as cavidades nas quais pelo menos 50% das células foram infectadas. A Tabela C2 apresenta os resultados obtidos da infecção.

Tabela C2: Determinação das cavidades com pelo menos 50% das células infectadas

Diluição	Cavidades Infectadas	Cavidades Não Infectadas
10 ⁻⁴	6	0
10 ⁻⁵	4	1
10 ⁻⁶	0	6

Através do exemplo citado acima e os dados apresentados na Tabela C2 é possível calcular a porcentagem de infecção, mostrada na Tabela C3.

Tabela C3: Determinação da porcentagem de infecção

Diluição	Cavidades Infectadas	Cavidades Não Infectadas	% Infectada
10 ⁻⁴	10	0	100
10 ⁻⁵	4	1	80
10 ⁻⁶	0	7	0

A partir dos dados apresentados na Tabela C3 calcula-se a distância proporcional (DP) através da Equação C1:

$$DP = (A - 50) / (A - B) \quad \text{Equação C1, na qual}$$

$$DP = (80 - 50) / (80 - 0) = 0,375 \quad \text{Equação C2}$$

A dose que fornece 50% de resposta, a TCID₅₀, é então calculada empregando-se a Equação C3:

$$\log \text{TCID}_{50} = D_R - DP \quad \text{Equação C3}$$

na qual, D_R é o log da diluição que fornece resposta maior que 50% de infecção.

$$\text{Então : } \log \text{TCID}_{50} = -5 - 0,375 = -5,375 \quad \text{Equação C4}$$

$$\text{Obtém-se com isso } \text{TCID}_{50} = 10^{-5,375} \quad \text{Equação C5}$$

Assim, o título viral é dado por: $2,4 \times 10^5 \text{ TCID}_{50} / 100 \mu\text{L} = 2,4 \times 10^6 \text{ TCID}_{50} / \text{mL}$.