



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE INSETO, LINHAGEM SF21, NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE BIOINSETICIDAS VIRAIS PARA O CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS

PAULO EDUARDO DA SILVA CAVALCANTE

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Farias de Almeida

JOÃO PESSOA - PB

2018

PAULO EDUARDO DA SILVA CAVALCANTE

Utilização de células de inseto, linhagem Sf21, na produção *in vitro* de bioinseticidas virais para o controle de pragas agrícolas

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Farias de Almeida

JOÃO PESSOA - PB

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C376u Cavalcante, Paulo Eduardo da Silva.

Utilização de células de inseto, linhagem Sf21, na produção in vitro de bioinseticidas virais para o controle de pragas agrícolas / Paulo Eduardo da Silva Cavalcante. - João Pessoa, 2018.

53 f. : il.

Orientação: Andréa Farias de Almeida.
Monografia (Graduação) - UFPB/Biotecnologia.

1. Baculovirus. 2. Sf21. 3. SfMNPV. 4. OB. 5. ODV. 6. Cultivo em suspensão. 7. BV. I. Almeida, Andréa Farias de. II. Título.

UFPB/BC

PAULO EDUARDO DA SILVA CAVALCANTE

**UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE INSETO, LINHAGEM SF21, NA PRODUÇÃO
IN VITRO DE BIOINSETICIDAS VIRAIS PARA O CONTROLE DE PRAGAS
AGRÍCOLAS**

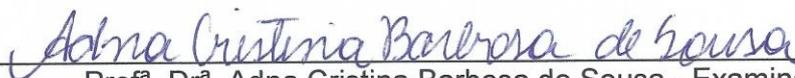
Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em 29 de outubro de 2018.

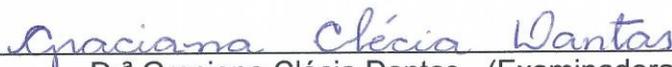
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª. Dr.ª. Andréa Farias de Almeida - Orientadora



Prof.ª. Dr.ª. Adna Cristina Barbosa de Sousa - Examinadora



Dr.ª. Graciana Clécia Dantas - (Examinadora)

Dedico este trabalho a minha família, por todo o apoio a mim concedido, pelo amor incondicional e por essa vida que vivi até aqui, sem vocês eu nada seria.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pois através de suas sutilezas, trouxe-me a este momento, colocou várias pessoas em meu caminho, estive sempre comigo e proporcionou a vida que levei até aqui.

Agradeço aos meus pais, que sempre me deram o melhor que puderam, educaram-me, ensinaram-me e fizeram-me andar pelo Brasil. À minha mãe Tchesca, agradeço por toda a cumplicidade, paciência e por sempre me apoiar. Ao meu pai Rony, agradeço por todos os ensinamentos, conselhos, correções e o carinho que sempre me deu.

Ao meu irmão João Pedro, agradeço pela amizade e carinho que sempre teve por mim, incentivando-me e fazendo-me sair um pouco da seriedade que normalmente tenho.

Ao resto da minha família, que por conta da profissão do meu pai, sempre estivemos longe, agradeço pelo apoio dado, mesmo que à distância. O amor de vocês nunca foi uma dúvida.

Aos meus “tios postigos” que tiveram papel significativo ao longo da minha vida e foram a família presente enquanto a minha estava longe.

Aos meus colegas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, meu profundo agradecimento pelo apoio, companheirismo, risadas, conversas. Ir ao laboratório não chegou nem perto de ser uma obrigação, graças à boa convivência. Sei que caí de “paraquedas”, mas mesmo assim fui muito bem acolhido, muito obrigado a todos vocês.

Um agradecimento especial aos meus amigos do LABIDIC. Vocês me receberam de uma maneira a qual eu nunca tinha visto. Mostraram-me uma nova forma de convivência em laboratório e certamente foram uma força de guinada em minha vida, fazendo com que eu mudasse vários paradigmas.

Aos meus amigos de sala, meu sincero obrigado. Vocês fizeram parte desse tempo e certamente a graduação foi mais prazerosa com a companhia de vocês. Em especial, um agradecimento a Bruna, Ícaro e Maria Luiza. A simples companhia de vocês, já era o suficiente para fazer o meu dia melhor. Certamente vocês me influenciaram muito e me fizeram uma pessoa melhor preparada, tanto mentalmente, quanto academicamente.

Aos meus amigos fora do curso, um agradecimento imenso. Seria impossível listar todos, mas, de maneira geral citarei três: Rossandro, Raphael e Marco Aurélio. Três grandes irmãos que a vida me deu. Obrigado por tudo.

À minha orientadora, Professora Andréa, meu mais sincero agradecimento. A senhora me acolheu num momento conturbado, onde eu não sabia para onde iria, e confiou em mim para a realização deste trabalho. Sem a senhora nada disso seria possível.

Ao Centro de Biotecnologia e a todos os meus professores, expresso minha gratidão. Graças a todos, fui preparado e formado para enfrentar novos desafios. Vocês com certeza são uma parte de mim.

Aos membros da banca, agradeço pelo tempo disponibilizado, contribuições e correções feitas a este trabalho.

À EMBRAPA Soja que realizou a doação dos baculovírus e à EMBRAPA CENARGEN pela doação das células, meu muito obrigado.

Agradeço também ao CNPq pelo recurso financeiro do projeto Universal 455770/2014-0, que proporcionou a realização deste TCC.

*“Sucesso não é o final, fracasso não é fatal: é a
coragem para continuar que conta”*

Winston Churchill

Resumo

A produção agrícola nacional é responsável por grande parte do PIB brasileiro, assim, a qualidade necessária para satisfazer os produtores e os consumidores é elevada. Essa demanda é acompanhada de um aumento do uso de agrotóxicos em plantações, estes que comprovadamente causam danos à saúde humana e ambiental. Os biopesticidas virais podem ser uma alternativa ao uso destes agrotóxicos para o controle de pragas agrícolas. Os baculovírus são vírus isolados de artrópodes que não apresentam risco ao meio ambiente ou ao homem devido sua seletividade. Estes apresentam dois fenótipos durante o processo de infecção: o *budded virus* (BV) e o *occlusion-derived virus* (ODV). Devido a demanda de produtos para o biocontrole de pragas, a produção *in vitro* de baculovírus e em suspensão são uma boa alternativa de mercado. Portanto, este trabalho teve como objetivo a produção do biopesticida *Spodoptera* em células de inseto, linhagem Sf21, cultivadas em suspensão utilizando meio SF900II. Para os processos de infecção, as células Sf21 foram adaptadas ao meio SF900II e às condições de cultivo. Os processos de infecção foram conduzidos em incubadora rotativa orbital a 120 rpm e 28 °C, utilizando como inóculo viral BV ou ODV de SfMNPV. Infecções com BV a 10 ou 15% (v/v) foram realizadas em três passagens diferentes e uma passagem com ODV obtido de poliedros (OB) da 5ª passagem do processo *in vitro* de infecção. A adaptação das células foi estabelecida quando a viabilidade era superior a 95% e sua concentração elevada nos subcultivos. Os processos de infecção apresentaram alta produção de OB, infecção realizada com o BV de terceira passagem alcançou produção volumétrica de $3,9 \cdot 10^8$ OB/mL e produção específica de 430 OB/célula. Já a infecção com o ODV, apresentou uma produção específica de 90 OB/célula. Os valores obtidos durante os processos de infecção foram satisfatórios, atingindo uma produção de OB relativamente maior quando comparada com os dados da literatura. Entretanto, o sistema de produção *in vitro* deve ser otimizado de modo a garantir a produtividade e redução do efeito de passagem observado nesse sistema de infecção.

Palavras-chave: Baculovírus, Sf21, SfMNPV, OB, ODV, cultivo em suspensão, BV

Abstract

The National agricultural production is responsible for a large part of the Brazilian GDP, so the quality needed to satisfy producers and consumers is high. This demand is accompanied by an increase in the use of pesticides in plantations, which are proven to cause harm to human and environmental health. Viral biopesticides may be an alternative to the use of these pesticides for the control of agricultural pests. Baculoviruses are isolated arthropod viruses that do not present a risk to the environment or to humans due to their selectivity. These present two phenotypes during the infection process: the *budded virus* (BV) and the *occlusion-derived virus* (ODV). Due to the demand for pest biocontrol products, *in vitro* baculovirus and suspension production are a good market alternative. Therefore, this study aimed to produce biopesticide *Spodoptera* in insect cells, lineage Sf21, cultivated in suspension using SF900II medium. For the infection processes, the Sf21 cells were adapted to the SF900II medium and to the cultivation conditions. The infection processes were conducted in an orbital rotating incubator at 120 rpm and 28 ° C, using as viral Inoculum bv or ODV of SFMNPV. Infections with BV 10 or 15% (V/V) were performed in three different passages and one passage with ODV obtained from polyhedra (OB) Of the 5th passage of the *in vitro* infection process. The adaptation of the cells was established when the viability was higher than 95% and its high concentration in the subcrops. The infection processes presented high OB production, infection performed with the third pass BV achieved volumetric production of $3,9 \cdot 10^8$ OB/mL and specific production of 430 OB/cell. The infection with the ODV presented a specific production of 90 OB/cell. The values obtained during the infection processes were satisfactory, reaching a relatively higher OB production when compared with the literature data. However, the *in vitro* production system should be optimized in order to guarantee the productivity and reduction of the passage effect observed in this infection system.

Keywords: baculovirus, Sf21, SFMNPV, OB, ODV, suspension cultivation, BV

Lista de ilustrações

Figura 1 – Microscopia eletrônica de OpMNPV	18
Figura 2 – Morfologia dos corpos de oclusão	19
Figura 3 – Fenótipos dos baculovírus.....	20
Figura 4 – Ciclo de infecção do baculovírus	21
Figura 5 – Adaptação e manutenção das células Sf21 ao longo do tempo.....	29
Figura 6 – Gráfico da infecção utilizando vírus - P3.....	30
Figura 7 – Diferentes estágios de modificações morfológicas. A: Célula controle com 3 dias de cultivo. B: célula infectada, 3 d.p.i., estroma virogênico visível. C células infectadas 7 d.p.i	31
Figura 8 – Gráfico da infecção utilizando vírus - P4.....	32
Figura 9 – Gráfico da infecção utilizando vírus - P5.....	33
Figura 10 – Gráfico da infecção utilizando - ODV	34
Figura 11 – Gráfico da produção de OB - P3	36
Figura 12 – Gráfico da produção de OB - P4	37
Figura 13 – Gráfico da produção de OB - P5	38
Figura 14 – Gráfico da produção de OB - ODV.....	39
Figura 15 – Gráfico de visualização do efeito de passagem.....	40
Figura 16 – Ln (concentração celular) versus tempo - P3	50
Figura 17 – Ln (concentração celular) versus tempo - P4	51
Figura 18 – Ln (concentração celular) versus tempo - P5	52
Figura 19 – Ln (concentração celular) versus tempo - ODV.....	53

Lista de tabelas

Tabela 1 – Quadro 1 35

Lista de abreviaturas e siglas

BV Budded Virus

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento

DNA Ácido desoxirribonucleico

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

H₂O Água

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

OB Occlusion Body

PIB Produto Interno Bruto

SDS Dodecil Sulfato Sódico

SFB Soro Fetal Bovino

WHO World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1	Cultura de células de inseto	17
2.2	Baculovírus	17
2.3	Ciclo de infecção	20
2.4	Produção do baculovírus.....	21
2.4.1	Produção <i>in vivo</i> do baculovírus.....	22
2.4.2	Produção <i>in vitro</i> do baculovírus	22
2.5	Passagem seriada	22
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos específicos	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	Meio de cultura	25
4.2	Linhagem celular	25
4.3	Adaptação e manutenção	25
4.4	Contagem de células	25
4.5	Cinética de crescimento celular	26
4.6	Baculovírus	27
4.7	Obtenção do ODV	27
4.8	Infecção <i>in vitro</i> com SfMNPV	27
4.8.1	Processos de infecção e quantificação de OB.....	27
4.9	Gráficos.....	28
5	RESULTADOS.....	29
5.1	Adaptação da célula Sf21	29
5.2	Infecções realizadas em série.....	29
5.3	Análise cinética de crescimento.....	34
5.4	Produção de OB	35
5.5	Efeito de passagem e das partículas virais.....	39
6	DISCUSSÃO	41
7	CONCLUSÕES	43

	Referências	44
	GLOSSÁRIO	47
	Glossário	48
	ANEXOS	49
	Anexos	50
.1	Anexo A	50
.2	Anexo B	51
.3	Anexo C	52
.4	Anexo D	53

1 INTRODUÇÃO

A importância da agricultura sustentável é algo de amplo consenso. Órgãos como a Organização Mundial da Saúde (WHO) enfatizam que uma agricultura produtiva, sustentável, diversa, ecológica é a chave para um desenvolvimento na saúde acarretando no avanço nutricional da população (JONES; EJETA, 2016). Desta forma, a pesquisa científica nessa área é de grande importância e possui um grande número de possibilidades, indo do melhoramento genético vegetal até maneiras mais eficientes de se defender o produto.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), nos próximos 10 anos a produção agrícola mundial deve crescer 20% e um dos pontos necessários para tal feito será a segurança alimentar (AGÊNCIA BRASIL, 2018), algo que se mostra cada vez mais relevância.

O Brasil se destaca no cenário internacional pela sua grande produção agrícola. O aumento de 1% do PIB brasileiro de 2016 para 2017 foi em decorrência da agricultura, esta contribuindo positivamente com 13% do valor total, com ênfase para as culturas da soja e do milho (IBGE, 2018). Segundo o boletim 11 da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), estima-se que a produção total de grãos ao longo do ano de 2018 será de 226,8 milhões de toneladas, ressaltando-se mais uma vez para as produção de milho e soja, com as significativas cifras de 82,2 e 119 milhões de toneladas, respectivamente (CONAB, 2018).

Diante disto, observa-se que para manter a qualidade e a quantidade das produções, o uso de técnicas de controles de pragas necessita ser eficiente. No Brasil, o que mais se utiliza para defender as plantações são os agrotóxicos, que comprovadamente causam diversos danos ao meio ambiente e à saúde humana e animal (SIQUEIRA, 2006). Entretanto, por causa dos malefícios dos agrotóxicos, metodologias menos nocivas, biodegradáveis e que não causam nenhum dano ao meio ambiente começam a ser uma demanda da sociedade (MAZID, 2011), tais como biopesticidas virais, fúngicos e bacterianos; inseticidas botânicos, etc.

Nesse sentido, os biopesticidas virais podem ser uma alternativa aplicável para vários tipo de cultura, como, Moscardi (1999) já demonstrou a viabilidade dessa alternativa no Brasil, fazendo o controle biológico da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) numa área de 1,6 milhão de hectares com o baculovírus *Anticarsia* (ALMEIDA, 2005).

Os baculovírus são vírus isolados de invertebrados, principalmente de lepidópteros, que possuem alta especificidade e não oferecem riscos ao homem e ao ambiente, pois não se replicam em vertebrados e em plantas, características que os tornam excelentes agentes de biocontrole de pragas agrícolas (ALMEIDA, 2010, p. 8).

Atualmente, os bioinseticidas são produzidos, de maneira geral, na forma *in vivo* e diversas empresas ao redor do mundo já vendem baculovírus para ser utilizado nas plantações como o SPOD-X™ (Estados Unidos), Granusal™ (Alemanha) e o Carpovirusine™ (França).

Entretanto, essa produção *in vivo* acarreta alguns entraves, tais quais: necessidade de espaços amplos para a criação dos insetos; alto custo de manutenção; o mercado não é totalmente suprido; além de que dependendo da época do ano as lagartas não se desenvolvem tão bem.

Por conta disso, investimentos e pesquisas na produção *in vitro*, assim como seu escalonamento industrial são altamente relevantes para a busca de padronização e eficiência na produção (BEAS-CATENA et al., 2014; PADRE, 2015; ALMEIDA, 2005; MOSCARDI et al., 2011).

Considerando-se a importância de um controle biológico mais eficaz em plantações, juntamente com uma diminuição do uso de agrotóxicos em grandes quantidades a necessidade de pesquisas envolvendo o escalonamento de biopesticidas virais possui alta relevância. Por conta disso, a produção *in vitro* do baculovírus, é algo que tem voltado a ganhar vez mais atenção por sua gama de possibilidades. Logo, a fim de se analisar os padrões cinéticos desse processo, foram utilizadas células Sf21 para se verificar os níveis de produção do biopesticida viral, assim como a capacidade do isolado de manter a própria estabilidade.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Cultura de células de inseto

Os primeiros passos para o cultivo de células de inseto começaram em 1915, mas somente no ano de 1962 foi estabelecida a primeira linhagem capaz de se replicar indefinidamente, a qual teve origem no tecido ovariano de uma mariposa, *Antheraea eucalypti* (SOARES; AUGUSTO; CASTILHO, 2007). Atualmente existem diversas linhagens isoladas advindas de insetos como a Sf21, isolada por Vaughn et al. (1977), do tecido ovariano da lagarta *Spodoptera frugiperda*. Essa linhagem já vem sendo utilizada para a produção de biopesticidas, devido ao fato de poderem ser cultivadas em suspensão com altas taxas de crescimento (ALMEIDA, 2005).

Por ter menor complexidade de manipulação, o domínio desta técnica garantiu que os estudos com vírus *in vitro* pudessem ser realizados de maneira mais eficiente. Células de inseto são de fácil cultivo, são mais resistentes que células de mamíferos. Dependendo da célula, não se faz necessário o uso de uma estufa de CO₂, havendo a necessidade unicamente da manutenção da temperatura em torno de 25-30°C (KING; POSSEE, 1992).

Entretanto, somente o fato de serem células de inseto não garante um bom crescimento, já que a demanda nutricional é muito importante para permitir uma boa estabilidade na cultura e ao longo do tempo. Os meios de cultivo devem ser cada vez mais específicos, possuindo boas características, tais como: pH, osmolaridade, quantidade e razão dos sais inorgânicos, glicose, aminoácidos, fontes de carbono e viscosidade (ALMEIDA, 2005).

Outro componente muito utilizado para manter as culturas de inseto é o soro fetal bovino (SFB), que já foi considerado um componente padrão em diversas culturas de células, pois seu uso traz alguns benefícios, como: hormônios de crescimento, fatores anti-apoptóticos, fonte de lipídeos e fatores de ligação. Entretanto, seu uso possui alguns problemas, uma vez que (1) cada lote é diferente do outro, impedindo uma padronização específica e (2) o soro pode conter alguns contaminantes como *mycoplasmas*, príons ou *retrovírus* (TAPPARO, 2009). Outro problema é que seu uso aumenta consideravelmente o custo da cultura, além de dificultar métodos de purificação.

Desta forma, a demanda por meios de cultura que consigam suprir o uso do SBF é altamente necessária. Já são encontrados alguns meios no mercado que não necessitam dessa suplementação, como o SF900II, SF900III e o ExCell 401.

2.2 Baculovírus

Os baculovírus são vírus envelopados em forma de bastonete (do latim *baculum*) (OLIVEIRA, 2010) (Figura 1) da família *Baculoviridae* que infectam artrópodes, principalmente insetos das ordens Lepidóptera, Himenóptera e Díptera (PADRE, 2015). São vírus de DNA

circular de fita dupla, com tamanho entre 80 e 200kb que são envoltos em um capsídeo proteico com tamanho entre 30 e 60 nm e com diâmetro entre 250 a 300nm de comprimento (CASTRO et al., 1999). Os capsídeos são encontrados dentro de uma matriz proteica, que forma o denominado corpo de oclusão (*Occlusion Body* – OB), que pode ser constituído por poliedrina ou por granulina, cujo tamanho varia de 0,15 a 15µm de diâmetro (CASTRO et al., 1999). Além disso, são encontradas diferenças entre esses OB, que já foram utilizadas como forma de separação dos diferentes tipos de baculovírus (Figura 2.).

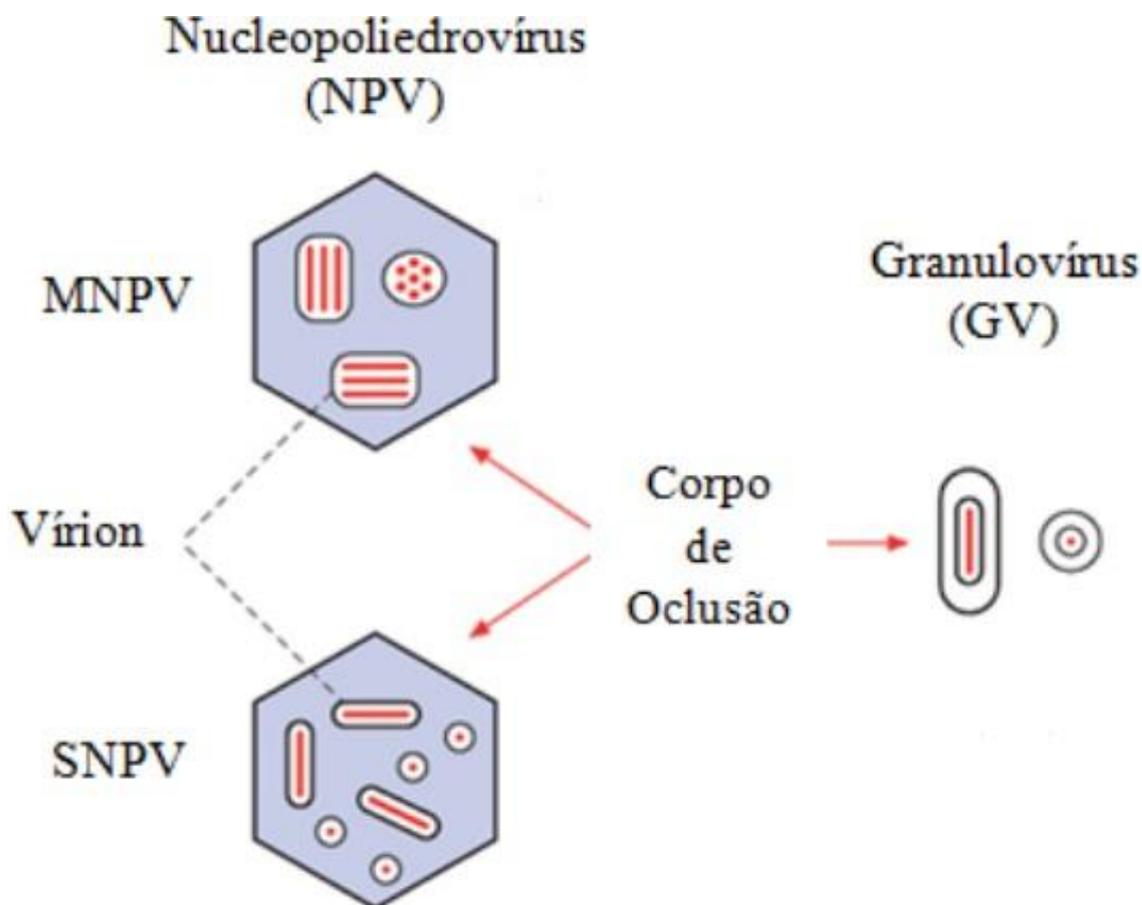
Os OB constituídos de poliedrina, são chamados de Nucleopoliedrovirus (*Nuclear Polyhedra Virus* - NPV), que podem ser encontrados como: Nucleopoliedrovírus Simples (*Single Nuclear Polyhedra Virus* - SNPV) e Nucleopoliedrovírus Múltiplo (*Multiple Nuclear Polyhedra Virus* - MNPV) em que a diferença se encontra no número de capsídeos encontrados do OB (ALMEIDA, 2010). Os OB constituídos por granulina, são chamados de Granulovírus (GV), possuem forma ovocilíndrica com tamanho entre 0,3 x 0,5 µm e dentro de cada corpo de oclusão há somente 1 vírus (OLIVEIRA, 2010). As principais funções do OB são: garantir a sobrevivência da partícula viral no ambiente externo e aumentar a chance de dispersão do vírus.

Figura 1 – Microscopia eletrônica de OpMNPV



Fonte: Rohrmann (2013)

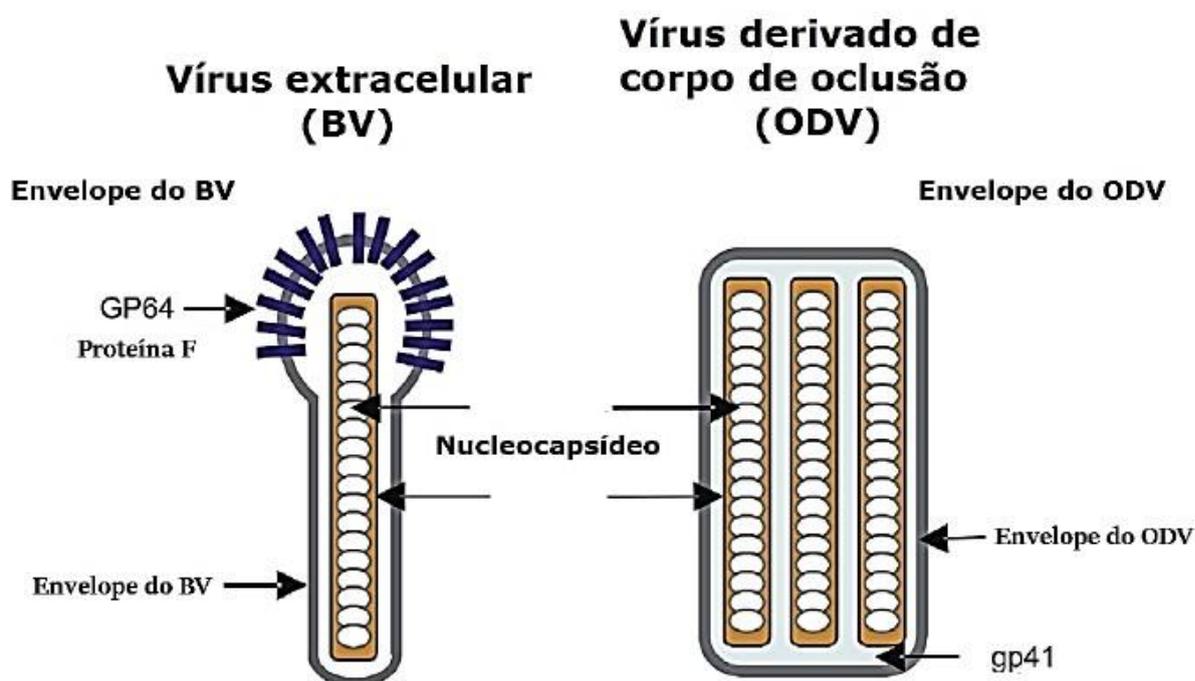
Figura 2 – Morfologia dos corpos de oclusão



Fonte: Pereira (2013).

Durante a infecção do baculovírus no hospedeiro, observa-se dois fenótipos diferentes, com o mesmo genoma: o vírus extracelular (*budded vírus* – BV) e o vírus derivado do corpo de oclusão (*occlusion derived vírus* – ODV) (Figura 3). Eles diferem entre si nas proteínas virais encontradas em seus envelopes, função e momento do ciclo de infecção (PADRE, 2015). Os BVs são produzidos durante a fase tardia da infecção e apresentam em seu envelope a proteína GP-64 ou proteína F, que irão promover a entrada do vírus por endocitose adsortiva (CASTRO et al., 1999). Os ODVs são os vírus que se encontram dentro do OB, que são produzidos na fase muito tardia, e são liberados em ambiente alcalino presente no intestino médio de seu hospedeiro no processo *in vivo* de infecção. A proteína viral que pode estar envolvida no processo de entrada do ODV é a GP-41, que promove a fusão do vírus nas células (CASTRO et al., 1999). Além disso, Volkman, Summers e Hsieh (1976) constataram que o BV é cerca de 1.900 vezes mais infeccioso do que o ODV, verificando-se assim, a alta virulência do BV.

Figura 3 – Fenótipos dos baculovírus.



Fonte: PADRE, G. A. del. (2015).

Atualmente a elaboração da classificação dos baculovírus é realizada através de técnicas de sequenciamento e de biologia molecular. Observa-se quatro gêneros encontrados na família *Baculoviridae*, que são classificados por suas proteínas de membrana, proteína formadora de capsídeo e na comparação dos genes. Sendo assim, os quatro gêneros são: os *Alfabaculovirus*, onde se encontram MNPV e SNPV que infectam Lepidópteros; os *Betabaculovirus*, onde se encontram GV que infectam Lepidópteros; os *Gamabaculovirus*, onde se encontram SNPV que infectam Himenópteros; e os *Deltabaculovirus*, onde se encontram NPV que infectam Dípteros (JEHLE et al., 2006).

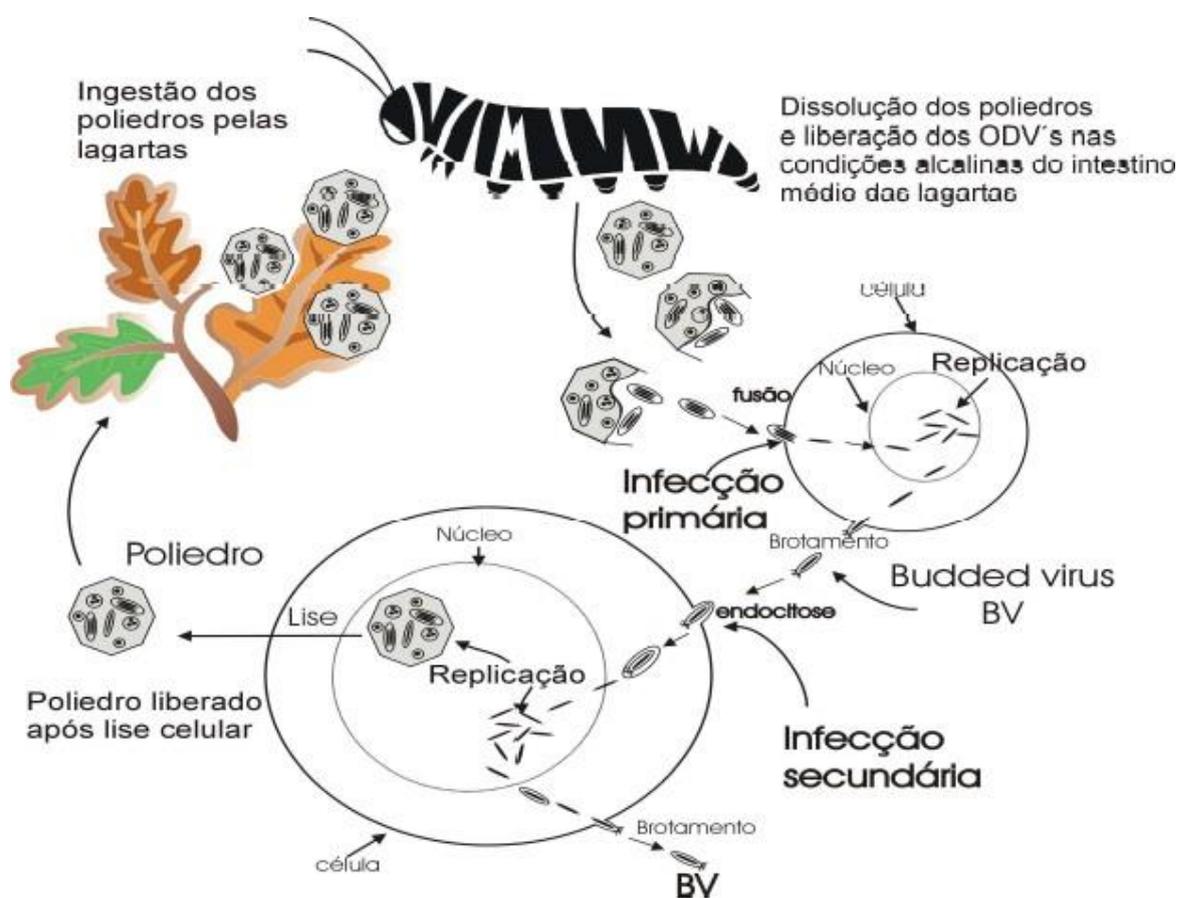
2.3 Ciclo de infecção

Para se entender como os baculovírus são obtidos, o entendimento do seu ciclo de infecção se faz necessário, pois este conhecimento permitirá a visualização das metodologias de produção *in vivo* e *in vitro*.

A Figura 4 demonstra de forma completa todo o ciclo de infecção de um hospedeiro. A infecção sempre começa com a ingestão dos OB pela lagarta, os quais foram adquiridos após a mesma consumir alimento infectado. Quando o OB chega no intestino médio da lagarta e entra em contato com o pH alcalino do ambiente (DOW, 1992), ocorrerá então a dissolução dos OB para em seguida ocorrer a liberação dos ODVs, que irão começar a infecção primária, penetrando nas células epiteliais do intestino médio, via fusão de membrana, por intermédio de receptores específicos (DANTAS, 2010). Depois que a infecção primária se estabelecer, a célula

começará a mudar seu metabolismo para a produção viral do BV. Este será responsável pela infecção secundária, adentrando às células do hospedeiro, via endocitose adsortiva (IKEDA; HAMAJIMA; KOBAYASHI, 2015), após o quê, os vírus terão sido espalhados de maneira sistêmica. Na fase final da infecção, o inseto terá uma alta produção de OB e como o baculovírus é um vírus de ciclo lítico, ele levará a lagarta à morte, causada também pela produção de proteases e quitinases que irão dissolver o hospedeiro (GRAMKOW, 2013), espalhando assim o vírus pela planta.

Figura 4 – Ciclo de infecção do baculovírus



Fonte: (SOARES; AUGUSTO; CASTILHO, 2007)

2.4 Produção do baculovírus

A produção de baculovírus pode ser realizada por dois sistemas: produção *in vivo* que é a forma mais empregada e a produção *in vitro* onde se concentra a maioria dos estudos, relacionados com a biologia do baculovírus e o processo de infecção em células de inseto.

2.4.1 Produção *in vivo* do baculovírus

No processo de produção *in vivo*, a lagarta é criada em laboratório e a infecção acontece a partir da alimentação com OB. Uma vez que o ODV foi liberado e conseguiu adentrar à célula, o capsídeo migra para o núcleo para que seu DNA seja incorporado pela célula hospedeira. Assim que a incorporação for feita, a produção de BV se inicia acarretando uma produção escalar, que infectará toda a lagarta (CASTRO et al., 1999).

A fim de se verificar que a infecção aconteceu, devem-se observar modificações comportamentais na lagarta, tais como canibalismo, inchaço, mudança de cor e um aumento na alimentação da mesma.

Ao se constatar o estado tardio da infecção, haverá a extração do vírus, podendo ocorrer de duas maneiras: a extração da hemolinfa do inseto (extração de BV), mais usada em laboratório, e a maceração do inseto com um pouco de água, para em seguida coar o resultante dessa mistura (ALMEIDA, 2010; BARBOSA, 2016; MACHADO, 2016).

A produção *in vivo* possui um custo muito elevado, pois a alimentação artificial das lagartas gera muitas despesas. Além disso, se faz necessário o uso de espaços maiores, para que se obtenha uma produção mínima de biopesticida (MOSCARDI, 1999).

2.4.2 Produção *in vitro* do baculovírus

A metodologia *in vitro* faz uso de cultura de células, contendo principalmente células advindas de lepidópteros, sendo as mais utilizadas as: *Bombyx mori* (bicho-da-seda), *Mamestra brassicae* (mariposa do repolho), *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho), *Trichoplusia ni* (lagarta-medede-palmo) e de *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja) (PADRE, 2015).

Este método de produção pode acontecer de duas maneiras. Na primeira pode-se infectar uma cultura de células saudáveis com o BV, e quando se perceber diminuição da concentração e viabilidade celular, coleta-se BV e no estágio final de infecção obterá o OB. Na outra forma, começa-se a infecção com ODV, extraído do OB após simulação do ambiente alcalino do “intestino médio” da lagarta, para assim iniciar a infecção. A primeira forma é mais rápida, pois o BV possui proteínas de membrana diferentes do ODV, o que permite a entrada no mesmo de maneira mais eficiente na célula (KING; POSSEE, 1992).

2.5 Passagem seriada

A passagem seriada é constituída de uma sequência seriada de infecções virais em que, para cada nova infecção, utiliza-se um inóculo advindo de uma infecção anterior (DANTAS, 2015). Entretanto, ao se utilizar sucessivas passagens, pode ocorrer o chamado “efeito de passagem”, caracterizado pelo acúmulo de alterações genéticas que podem resultar no encurtamento do DNA e na diminuição da produção do OB.

Estudos como o de Almeida (2005) e o de Dantas (2010), demonstram que o baculovírus SMNPV, Isolado-18, cultivado *in vitro* e em suspensão, apresentou diminuição na concentração de poliedros a partir da terceira passagem. Atualmente, o efeito de passagem é um grande gargalo na escalonagem da produção industrial de biopesticidas virais.

O fenótipo mais comum visualizado no efeito de passagem é o *few polyhedra* (FP), ou poucos poliedros. Como o próprio nome já diz, no fenótipo FP há pouca produção OB e se a passagem seriada continuar, não haverá mais a existência de vírus dentro destes poliedros (SLAVICEK et al., 1995). Outra característica desse fenótipo é a alta produção de BV durante a infecção, o que acarretará na prevalência desse fenótipo (DANTAS, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a influência das diferentes partículas virais na produção de bioinseticida em sistema *in vitro*, utilizando-se células Sf21 adaptadas a cultivo em suspensão sem a suplementação de SFB.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar cultivos, em suspensão, do baculovírus SfMNPV utilizando a linhagem Sf21;
- Realizar infecções com BV e ODV;
- Analisar padrão cinético da velocidade específica máxima de crescimento celular
- Quantificar os biopesticidas virais, OB's, obtidos no processo;
- Visualizar o efeito de passagem ao longo das infecções

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Meio de cultura

Utilizou-se o meio de cultura SF900™ II (Gibco) sem suplementação de SFB, adquirido da empresa Thermo Fisher.

4.2 Linhagem celular

A linhagem de célula utilizada foi a Sf21, isolada por Vaughn et al. (1977) , cedida gentilmente pela EMBRAPA – Recursos genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

4.3 Adaptação e manutenção

A adaptação da linhagem Sf21 foi realizada de maneira gradual, em que primeiro adaptou-se a célula ao meio de cultura SF900™ II, seguido do desmame do SFB. Posteriormente, as células foram adaptadas ao cultivo em suspensão, com agitação aumentada gradualmente a partir de 70 rpm até chegar à agitação padrão de 120 rpm.

Após a adaptação, as células foram mantidas em culturas de suspensão em *shaker* (120 rpm e 28°C) com 20 mL de volume de trabalho em Erlenmeyers de 50 mL ou 100 mL, com razão de aeração de 0,4 e 0,2, respectivamente. Os subcultivos foram realizados por 3 a 4 dias, com amostras sendo coletadas para contagem e diluídas a uma concentração de 5×10^5 células/mL. Esta diluição era realizada a fim de que as células não entrassem na fase estacionária e/ou morte, mantendo-as, assim, na fase de exponencial de crescimento.

4.4 Contagem de células

As células foram contadas com auxílio de um microscópio óptico e hemocitômetro, modelo Neubauer. A contagem foi realizada em triplicata, conforme a Equação Eq.(1), em que: C é a concentração de células por mL; N é média do número de células; D é o fator de diluição e 8×10^{-4} é o volume de quatro quadrantes do hemocitômetro. O método utilizado foi o de exclusão por azul de tripan (0,1% v/v), em que as células mortas ou com membrana rompida apresentaram coloração azul (ALMEIDA, 2005). A viabilidade celular era definida como porcentagem de células viáveis em relação à quantidade total de células (células vivas e células mortas).

$$\text{Eq. (1)} \quad C_c \left(\frac{\text{Células}}{\text{mL}} \right) = \frac{N.D}{8.10^{-4}}$$

4.5 Cinética de crescimento celular

A velocidade de variação de crescimento foi determinada pela Eq. (2). Entretanto, o μ (velocidade exponencial de crescimento) utilizado na Eq. (2) é advindo do cultivo microbiano, onde a taxa de morte não é considerada. Todavia, no cultivo de células animais a taxa de morte deve ser considerada e mensurada a partir do cálculo, descrito no ‘item’ anterior. Power et al. (1994) desenvolveu um modelo cinético que representa a dinâmica da população de células (viáveis e mortas) e a cinética de produção de baculovírus que descreve o modelo dinâmico não estruturado com ênfase no processo de infecção. Portanto, para o cultivo de células animais, o valor de μ obtido a partir do crescimento de células viáveis é chamado de velocidade de crescimento “aparente” (μ_{ap}), que é a diferença entre a velocidade específica de crescimento (μ) e a taxa de mortalidade ou velocidade específica de morte celular (K_d), representados na Eq. (3). A velocidade específica aparente (μ_{ap}) foi calculada a partir da linearização das concentrações de células viáveis durante a fase exponencial de crescimento, encontradas nos anexos.

$$\text{Eq. (2)} \quad \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

$$\text{Eq. (3)} \quad \mu_{ap} = \mu - K_d$$

Ao se substituir a Eq. (2) na Eq. (3) obtém-se a equação para o crescimento de células viáveis não infectadas (X_{vni}) antes da inoculação com o baculovírus, conforme Eq. (4).

$$\text{Eq. (4)} \quad \frac{dX_{vni}}{dt} = (\mu - K_d) \cdot X_{vni}$$

Correspondentemente à concentração de células não viáveis não infectadas (X_{nvni}) depende da concentração de células viáveis não infectadas e é dado pela Eq. (5).

$$\text{Eq. (5)} \quad \frac{dX_{nvni}}{dt} = K_d \cdot X_{vni}$$

K_d é uma constante de mortalidade de 1ª Ordem, podendo conseqüentemente ser considerada a velocidade específica de morte celular. Valores de μ e K_d são obtidos com base na quantificação do número de células e viabilidade retirados durante os experimentos de crescimento celular. A fim de se determinar a concentração de células mortas utilizou-se o método por exclusão por corante, e não se aplica quando a lise celular é significativa (no caso, quando a infecção é estabelecida). A velocidade específica de morte celular pode ser calculada conforme indica a Eq. (6). Para a realização do cálculo de K_d pela Eq. (6), o número de células viáveis não infectadas do começo ($X_{vni(0)}$) foi normalizado em relação ao número de células não viáveis não infectadas (X_{nvni}) - Anexo.

$$\text{Eq. (6)} \quad K_d = \frac{(X_{nvni} - X_{nvni(0)}) \cdot \mu_{ap}}{(\rho^{\mu_{ap} \cdot t} - 1) \cdot X_{vni(0)}}$$

4.6 Baculovírus

O baculovírus utilizado foi o vírus extracelular (BV) do *Spodoptera frugiperda Multiple Nucleopolyhedrovirus* – SfMNPV (Isolado 18), cedido pelo pesquisador Dr. Fernando Valicente da Embrapa Soja. Entretanto, o baculovírus manipulado, neste trabalho, foi advindo de processos *in vitro* de trabalhos anteriores do grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp) da CBiotec da UFPB.

4.7 Obtenção do ODV

O OB obtido para que houvesse a liberação do ODV, foi advindo da infecção do vírus de passagem 5. Para a liberação do ODV utilizou-se o método estabelecido por Lynn (1994), que consiste dos seguintes passos: inicialmente tomou-se 1mL de uma solução contendo OB; em seguida se misturava com 700 µL de H₂O (destilada e esterilizada) e 100µL da solução álcali, em seguida, deixou-se essa mistura incubando por 30 minutos em temperatura ambiente, para logo depois se adicionar 200 µL de sais ácidos + 200 µL da solução de tripsina (1,0mg/mL). Posteriormente, após 2 horas para se realizar uma filtração utilizando-se um filtro de 0,22 µm estéril; e, por fim, armazenou-se esse filtrado a 4°C em um tubo esterilizado.

4.8 Infecção *in vitro* com SfMNPV

Os dois fenótipos do vírus foram utilizados neste estudo: BV produzido em cultivo de células em suspensão e ODV, advindo do estágio tardio de infecções com o BV.

4.8.1 Processos de infecção e quantificação de OB

Os processos de infecção foram realizados em frascos erlenmeyers de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL e 40 mL de volume total, obedecendo à razão de aeração de 0,2 e 0,4, respectivamente, e mantidos sob agitação de 120 rpm e temperatura controlada de 28°C. O tempo de infecção utilizado foi de 5×10^5 células viáveis por mL, com viabilidade igual ou superior a 95%. Utilizou-se como inóculo viral inicial os BVs da terceira passagem (P3) seriada do SfMNPV em células Sf21, na concentração de 15% (v/v), enquanto nas passagens seguintes se utilizou 10% (v/v).

Para cada dia de infecção, determinou-se a concentração das células saudáveis (controle) e das células infectadas, de modo a se visualizar as mudanças morfológicas que ocorreram nas células, tais como aumento do volume celular, núcleo aparente, além de se observar o decréscimo do crescimento celular em decorrência da ação do vírus, e por fim, a visualização dos poliedros (OB) dentro das células na fase muito tardia do processo de infecção.

Para o acompanhamento do processo de infecção, foi utilizado como cultivo controle (sem presença do vírus) uma suspensão celular advinda do mesmo subcultivo, de modo a se ter as mesmas condições fisiológicas das células utilizadas no processo.

Durante o processo de infecção, acompanhou-se o momento em que houve a intensa produção de vírus extracelular (BV), que é caracterizado pelo decréscimo da concentração de células infectadas e, ainda, viáveis. Para tanto, a coleta de BV foi realizada por meio de centrifugação (1000rpm por 10 minutos, Rotor F-45-12-11 MiniSpin plus) da metade do volume da suspensão celular. Esse BV foi utilizado para infecções em série, realizando assim os vírus de passagem 4 e 5.

O restante do volume da suspensão foi destinado à produção de OB. Os OB foram quantificados por meio da ação de dodecil sulfato de sódio (SDS) para liberação do interior das células infectadas. 100µL de suspensão celular adicionados a 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1% por 2 horas de contato. Após o tempo para liberação dos OB, determinou-se a concentração de OB, por contagem em hemocítmetro, em cada dia do processo de infecção (ALMEIDA, 2010). Cada amostra foi contada em triplicata.

A equação utilizada para a produção volumétrica de OB foi a Eq. (7), em que:

$$\text{Eq. (7)} \quad C_{ob} \left(\frac{OB}{mL} \right) = \frac{5 \cdot D \cdot M_{OB}}{1 \cdot 10^{-4}}$$

- C_{OB} é a concentração de OB;

- D é o fator de diluição;

- M_{OB} é a média de contagem de OB e 1×10^{-4} é volume de um quadrante do hemocítmetro.

Já a produção específica de OB (OB/célula) foi calculada pela Eq. (8), em que:

$$\text{Eq. (8.)} \quad PE_{OB} \left(\frac{OB}{mL} \right) = \frac{C_{ob}}{C_{CTinfec}}$$

- PE_{OB} é a produção específica de OB;

- C_{OB} é a concentração de OB;

- $C_{CTinf.}$ é a concentração de células infectadas totais.

4.9 Gráficos

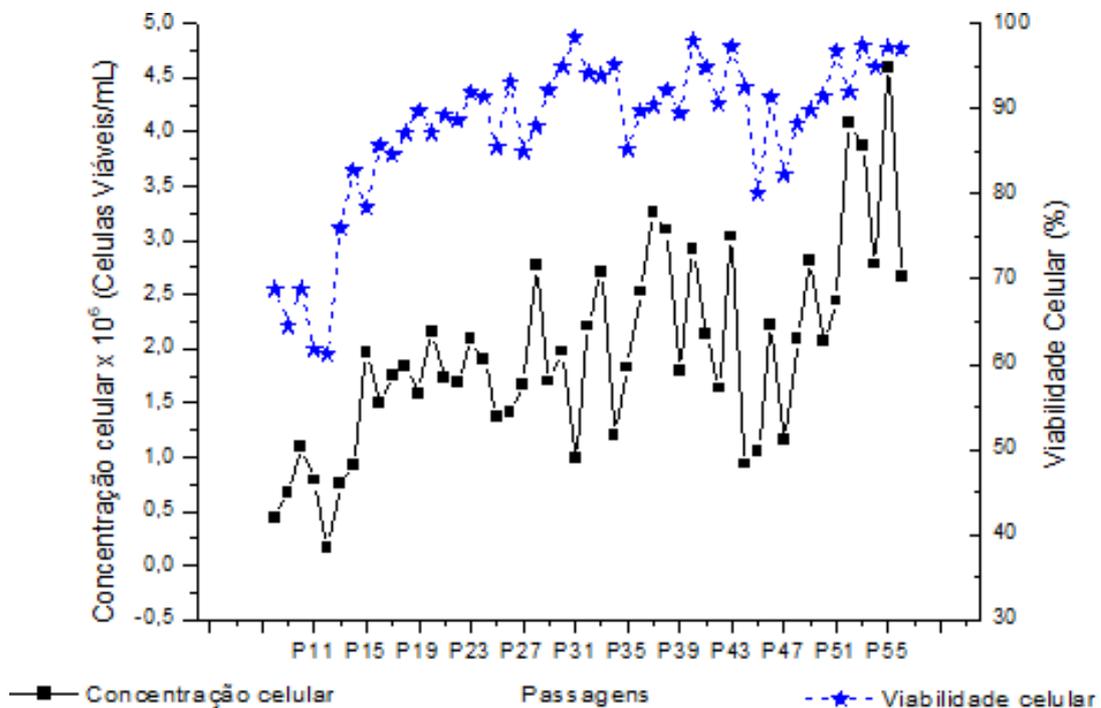
Todos os gráficos foram realizados e plotados com o software Origin 6.0.

5 RESULTADOS

5.1 Adaptação da célula Sf21

A figura 5 mostra a curva de adaptação e manutenção da cultura, mostrando que ao longo do tempo, essas células foram se adaptando completamente ao meio de cultura e ao cultivo em suspensão, conseguindo viabilidade e concentrações celulares cada vez maiores. As quedas bruscas na viabilidade e na concentração celular são causadas em geral por quedas de luz no campus da UFPB.

Figura 5 – Adaptação e manutenção das células Sf21 ao longo do tempo



Fonte: Autor.

5.2 Infecções realizadas em passagem seriada

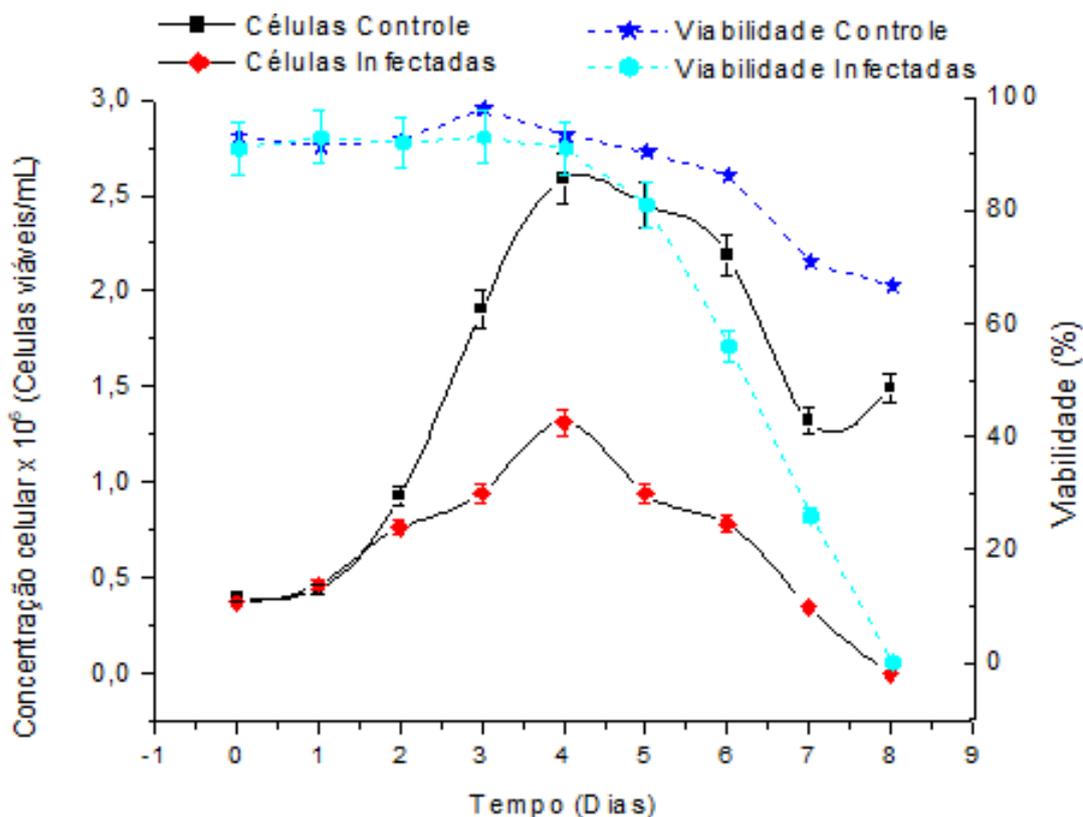
As infecções começaram a ser realizadas com o vírus de passagem 3 SfMNPV - 18, seguindo com passagens seriadas dos BV.

Na primeira infecção (Figura 6), percebeu-se a clara diferença entre as células controle e as células infectadas, observando-se nas primeiras uma alta concentração celular e uma viabilidade muito maior. Esse resultado nitidamente demonstra a capacidade do Isolado-18 de SfMNPV em infectar essas células, realizando todo o seu ciclo lítico.

Nota-se que a partir do segundo dia pós-infecção (d.p.i.) o crescimento celular da célula

infectada começou a diminuir e no terceiro d.p.i., a viabilidade também começa a cair. Ao se perceber essa queda da viabilidade, retirou-se metade do sobrenadante o qual continha BV, que, neste momento encontrava-se com um pico de produção. Esse BV contido no sobrenadante foi utilizado na infecção seguinte, P4.

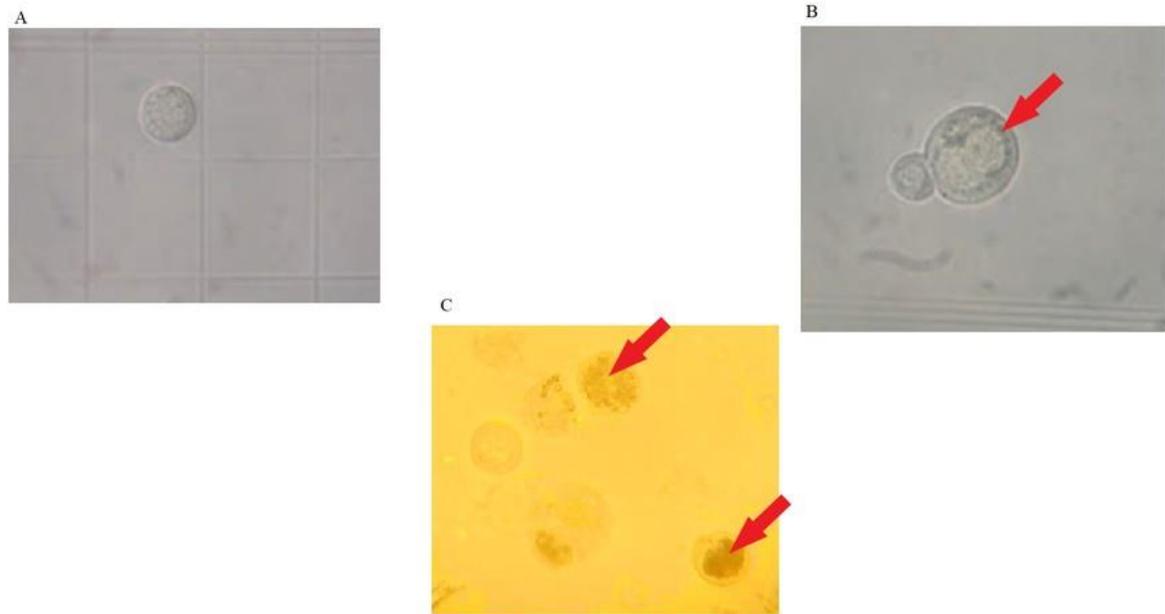
Figura 6 – Gráfico da infecção utilizando vírus - P3



Fonte: Autor.

A partir do terceiro d.p.i., modificações morfológicas começaram a se tornar cada vez mais visíveis, tais como formação do estroma virogênico e na fase final, conseguiu-se visualizar os OB dentro das células (Figura 7). Este comportamento foi visualizado em todas as outras passagens.

Figura 7 – Diferentes estágios de modificações morfológicas. A: Célula controle com 3 dias de cultivo. B: célula infectada, 3 d.p.i., estroma virogênico visível. C células infectadas 7 d.p.i

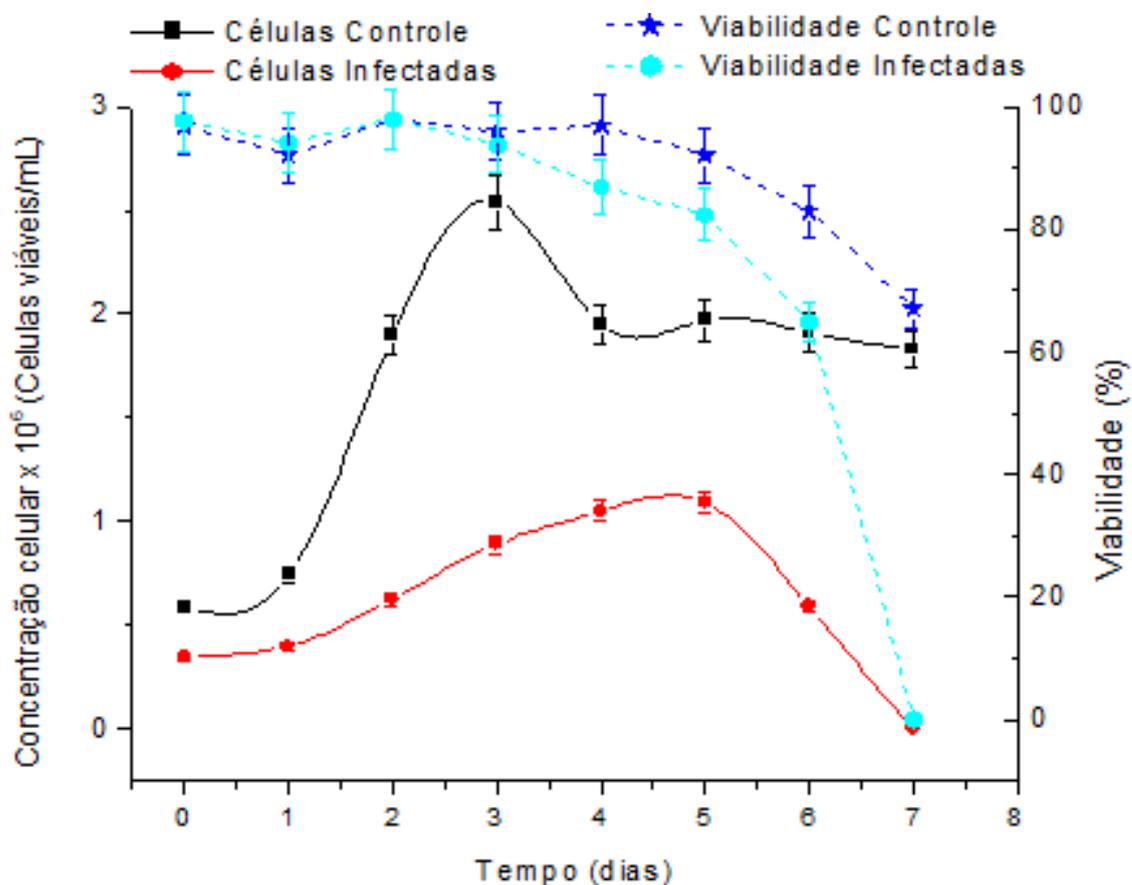


Fonte: Autor

Na infecção utilizando-se o vírus de passagem 4 (Figura 8), notou-se que o vírus ainda possuía capacidade de infecção, agindo da mesma maneira que o de passagem 3. Entretanto, observa-se um baixo crescimento da célula infectada e isso provavelmente se deve a dois fatores: um pequeno erro de repasse na hora de preparação da cultura, que consegue ser observada na diferença de concentração de células no Dia 0 (D0); outro fator, que pode estar relacionado à possível alta concentração de BV no inóculo viral, que adveio de uma passagem 3, cuja a produção alta de BV era esperada.

Nota-se a interferência no crescimento do vírus já no D2, assim como o decaimento da viabilidade no D3. O D3 foi o ponto onde se retirou o sobrenadante para a próxima infecção.

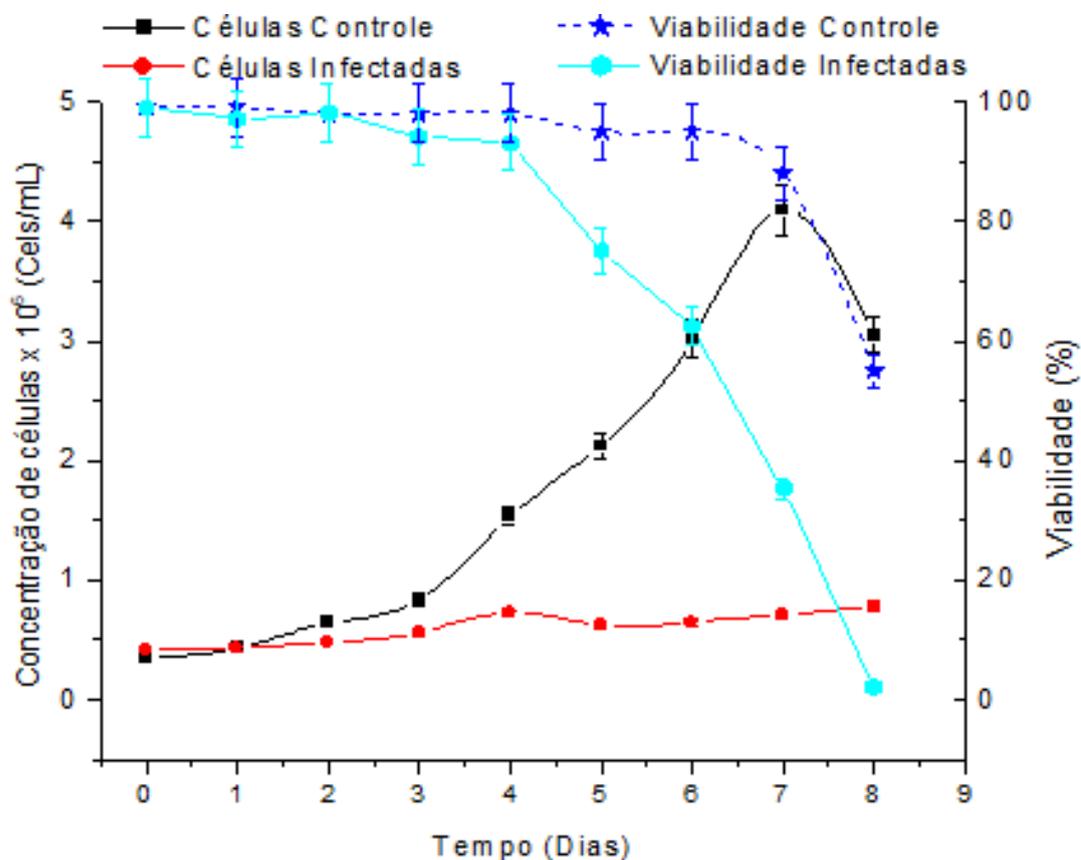
Figura 8 – Gráfico da infecção utilizando vírus - P4



Fonte: Autor.

A terceira infecção, realizada com a P5, teve um volume de trabalho diferente das outras duas infecções, sendo este de 40mL. Por conta disso, ao analisar seu gráfico isso deve ser levado em consideração.

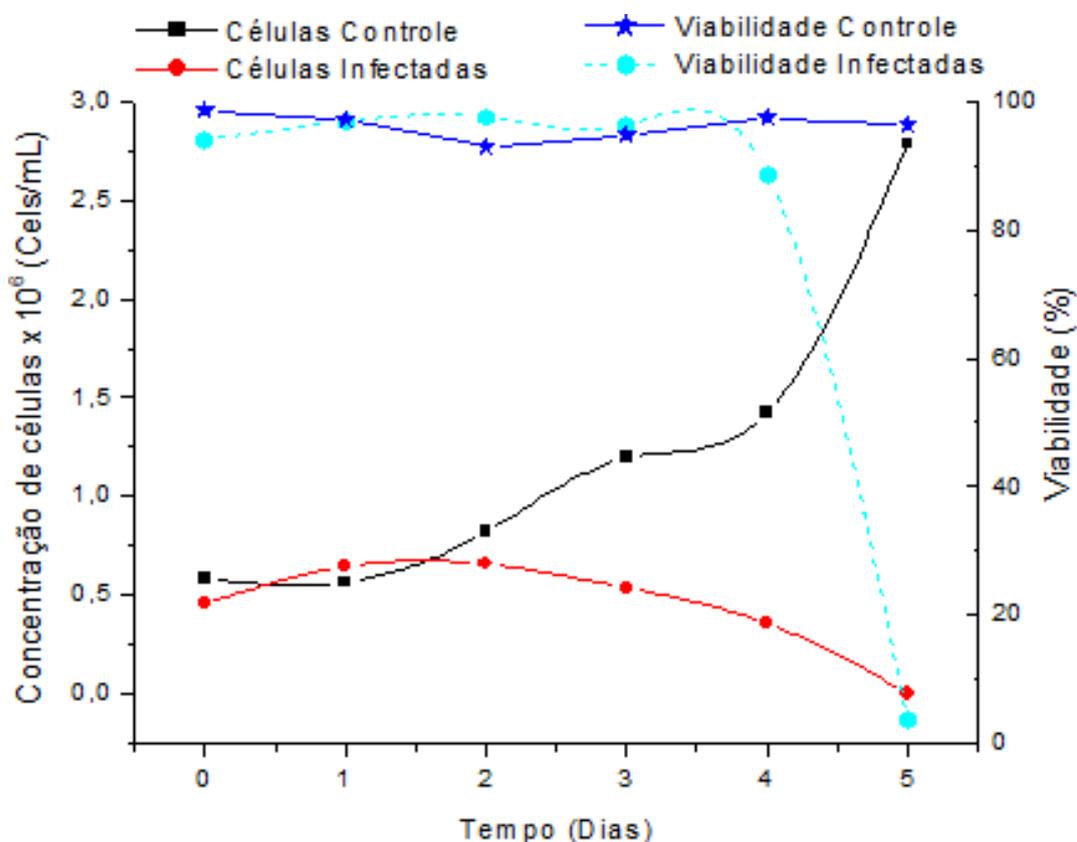
Figura 9 – Gráfico da infecção utilizando vírus - P5



Fonte: Autor.

A última infecção foi realizada com o ODV retirado da P5. Para esta infecção, voltou-se a utilizar o volume de trabalho de 20mL. Por conta de ser menos virulento, a infecção promovida pelo ODV demorou um pouco mais para ficar visível, entretanto foi a que menos durou, sendo prolongada por 5 dias.

Figura 10 – Gráfico da infecção utilizando - ODV



Fonte: Autor.

5.3 Análise cinética de crescimento

Com os resultados obtidos dos parâmetros cinéticos, consegue-se aferir que o crescimento das células viáveis é praticamente o dobro das células infectadas, mais uma vez demonstrando a susceptibilidade da célula ao vírus. Nota-se também que, a medida que ocorrem novas infecções, o vírus fica mais eficiente em diminuir a taxa de crescimento celular.

Isso também é averiguado quando se compara os coeficientes de morte, onde as células infectadas possuem K_d maior. Pode-se visualizar que, ao longo das passagens, o vírus foi capaz de aumentar sua eficiência em matar as células, já que o K_d tende a ficar cada vez maior ao longo das passagens.

O único K_d diferente é o da célula com o ODV, este que possui uma capacidade de infecção menor do que o BV. Por conta disso, inicialmente essas células conseguiram crescer um pouco mais, entretanto ao longo da infecção o vírus conseguiu realizar seu ciclo.

Quadro 1 – Parâmetros cinéticos das infecções nas passagens

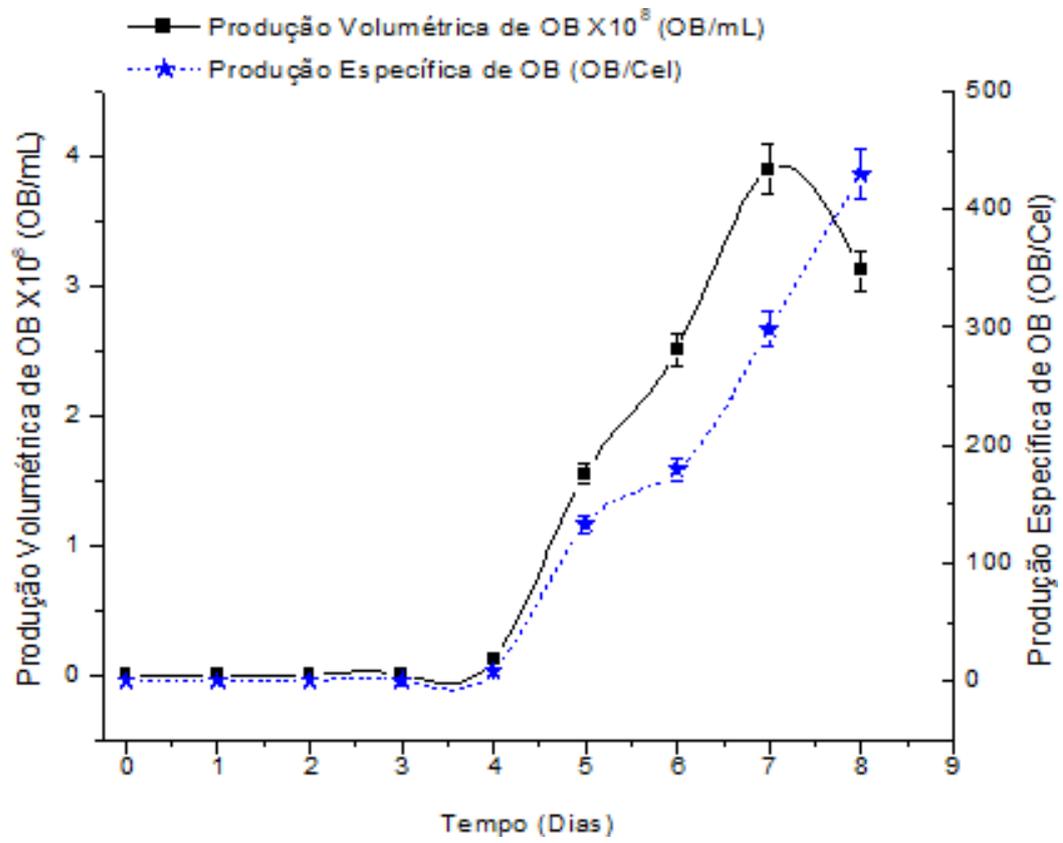
Passagem	μ_{ap} Con.(d ⁻¹)	μ_{ap} Infec.(d ⁻¹)	μ_{max} Con.(d ⁻¹)	μ_{max} Infec(d ⁻¹)	K_d Con.(d ⁻¹)	K_d Infec.(d ⁻¹)
P3	0,6021	0,3313	0,6236	0,3593	0,0215	0,02798
P4	0,6187	0,2681	0,62516	0,3561	0,00646	0,0880
P5	0,386	0,1562	0,39525	0,1724	0,00925	0,0162
ODV	0,2743	0,0192	0,28197	0,0147	0,00767	-0,00446

Fonte: Autor

5.4 Produção de OB

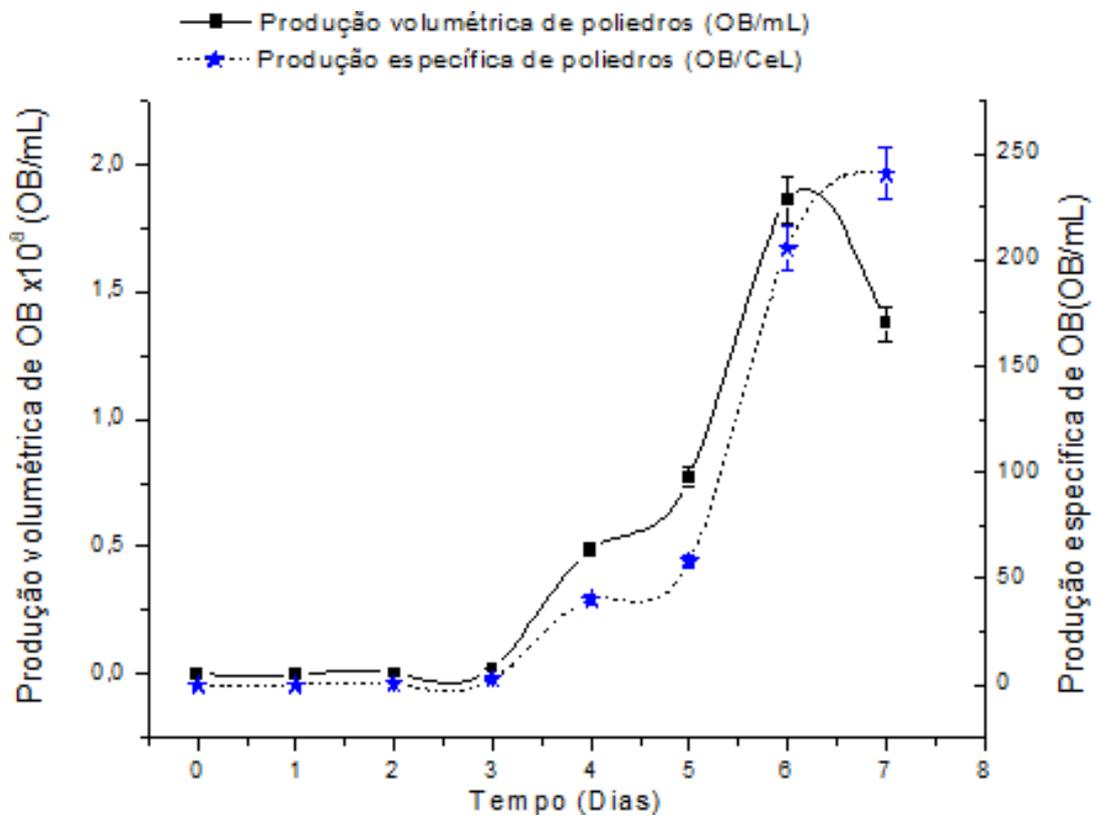
Em todas as quatro infecções foi possível a quantificação de OB. Entretanto, observou-se diferenças nas produções de cada uma delas, o que é devido ao efeito de passagem sofrido pelo vírus. As Figuras 11, 12 e 13 indicam a produção volumétrica e específica de OB utilizando-se BV enquanto na Figura 14 o inóculo inicial foi o ODV.

Figura 11 – Gráfico da produção de OB - P3



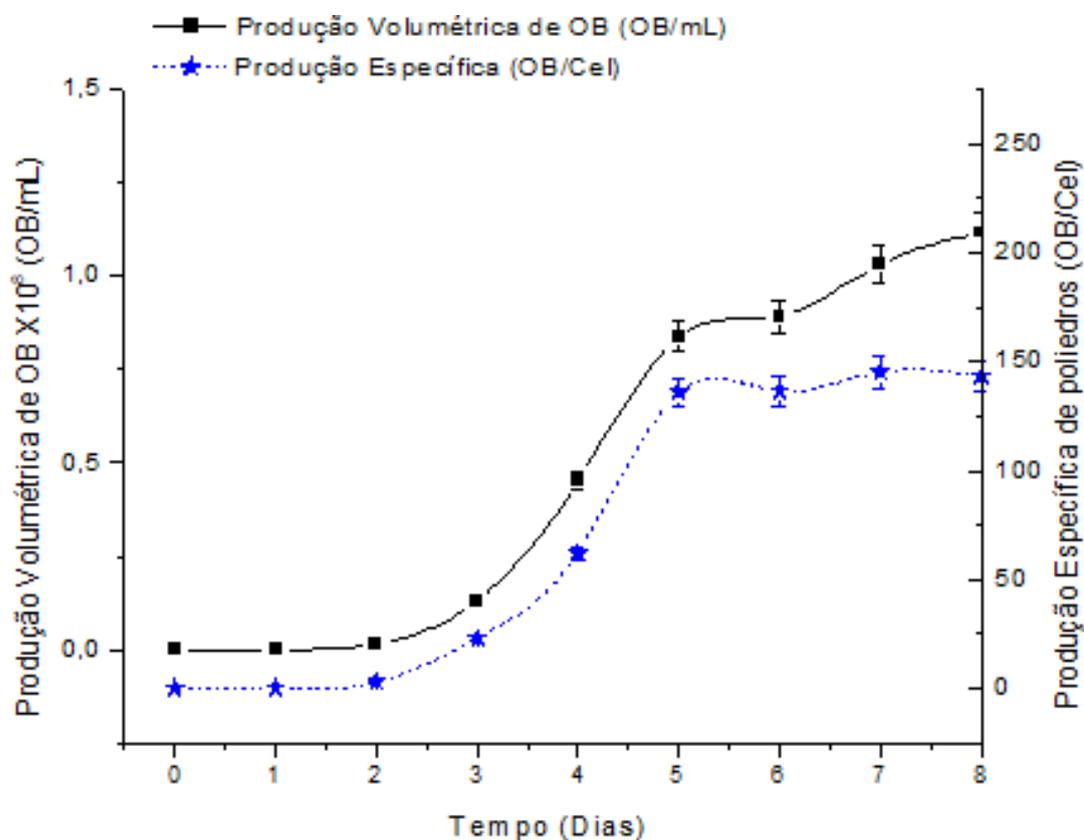
Fonte: Autor.

Figura 12 – Gráfico da produção de OB - P4



Fonte: Autor.

Figura 13 – Gráfico da produção de OB - P5

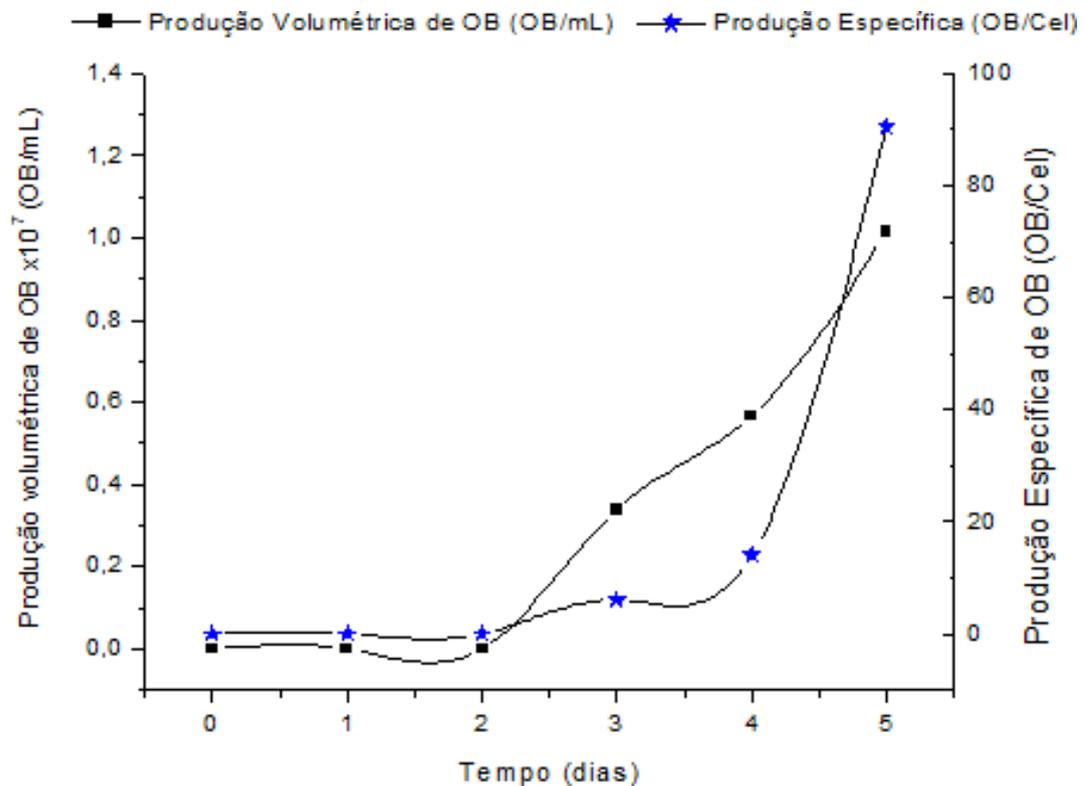


Fonte: Autor.

Os gráficos 11, 12 e 13 relacionados com a passagem seriada do vírus, apresentam um mesmo comportamento, não havendo produção de OB nos primeiros dias. Somente após o 3 d.p.i. é que foi possível a quantificação dos OB. Em todos os casos, a produção sempre tende a possuir uma fase exponencial que culmina com o fim das células viáveis. A passagem P3 foi a que mais produziu OB, atingindo valores de 430 OB por célula. As passagens subsequentes produziram respectivamente 240 e 145 OB por célula. Outro ponto interessante constatado nos gráficos é que, até a P5, a produção volumétrica conseguiu passar valores de 1×10^8 OB por mL.

Esses valores são muito relevantes e demonstram tanto a boa adaptabilidade da célula às condições de cultivo, quanto a capacidade do Isolado 18 de produzir OB.

Figura 14 – Gráfico da produção de OB - ODV



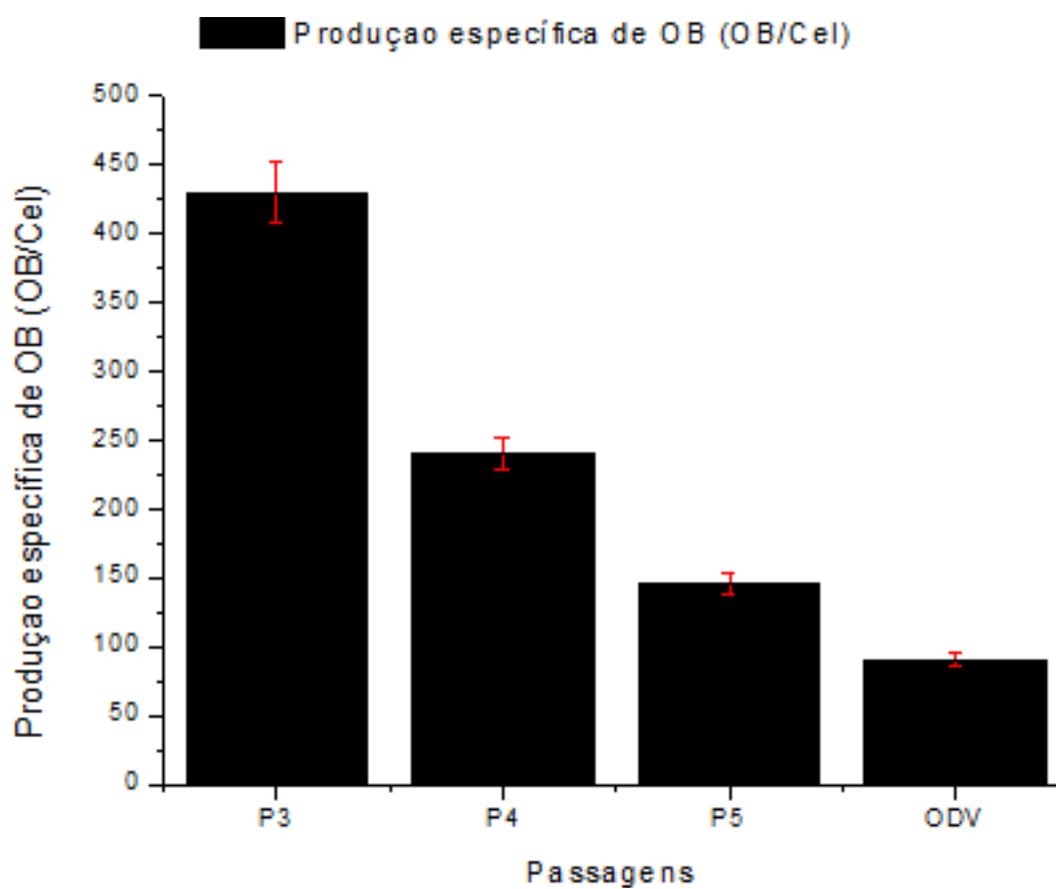
Fonte: Autor.

A produção conseguida advinda pelo ODV foi a menor de todas, o que já era esperado pelo BV ser mais virulento. Mesmo a infecção não possuindo o mesmo tempo que as outras, a produção foi considerada satisfatória.

5.5 Efeito de passagem e das partículas virais

O efeito de passagem foi algo visível ao longo das infecções, sendo resumido na Figura 15. Essa queda já era esperada, entretanto pode-se afirmar uma boa estabilidade do vírus ao longo dessas três passagens, gerando assim um resultado satisfatório. Vale, ainda, salientar a diferença da produção específica do BV para o ODV, demonstrando assim como o BV é um bom produtor de OB.

Figura 15 – Gráfico de visualização do efeito de passagem



Fonte: Autor.

6 DISCUSSÃO

Como um dos pontos de interesse de qualquer bioprocessos, a diminuição de custo é algo importante e que sempre deve ser considerado. Mesmo o meio Sf900 IITM sendo um meio considerado clássico, seu uso tem aumentado consideravelmente para a produção de OB em células Sf21, Sf9 e S2 (PADRE, 2015; PEREIRA, 2010; VIEIRA, 2010), que se deve à sua boa estabilidade e ao fato da não necessidade de suplementação com SFB.

A estabilização da cultura no meio já era prevista, visto que não é algo novo na literatura. Todavia, um dos principais motivos para a grande variação na concentração de células e na viabilidade no começo da cultura foram quedas recorrentes de energia. Como a célula já se encontrava num início de um processo de adaptação, principalmente às forças de cisalhamento, a falta de movimento e da temperatura constante causavam a morte das células, diminuindo assim sua viabilidade.

As infecções realizadas, seguiram o padrão de crescimento celular e viabilidade comumente encontrados (SOARES; AUGUSTO; CASTILHO, 2007). Notou-se um aumento na virulência do vírus ao longo das passagens, visto que a P4, a P5 e a utilizada com o ODV não chegaram à concentração celular de 1×10^6 . Isso provavelmente aconteceu por conta do vírus utilizar-se da membrana da própria célula para fazer seu capsídeo. Segundo Padre (2015) discute, é possível que no encapsulamento ocorra incorporação de proteínas de membrana da célula hospedeira, tornando assim, uma linhagem mais susceptível ao vírus. Isso pode ser levantado, já que tanto o inóculo viral, quanto a célula foram adquiridos através da EMBRAPA e nada impede que o isolado-18 tenha entrado em contato a linhagem de célula utilizada no trabalho.

O baixo crescimento celular visto na infecção realizada com o ODV pode ter sido causado pelo acúmulo de substâncias utilizadas para a liberação do mesmo, pois as células são sensíveis à variação de pH do meio (CLAUS et al., 2012). Por conta disso pode-se suspeitar que uma das substâncias usadas pode ter interferido, haja visto o Kd negativo que foi encontrado ao se fazer a análise cinética.

Igualmente a partir dos dados cinéticos, nota-se que o dobro da quantidade meio na mesma concentração oferece ótimas condições de crescimento, com uma fase exponencial longa e viabilidade prolongada.

Um ponto deveras positivo no trabalho foi a alta produção de OB. Comparando o sistema utilizado com outros encontrados na literatura, houve um aumento na produção de OBs. Almeida (2005) conseguiu utilizando células Sf9 em suspensão, meio de cultivo HyClone e suplementação de SFB a 5% uma produção específica de 400 OB/cel; Chakraborty e Reid (1998) obtiveram em meio SF900II com 10% de SFB uma concentração específica máxima de 222 OB/cel. Já SLAVICEK et al. (1995) e POTTER, FAULKNER e MACKINNON (1976) conseguiram uma produção específica,

utilizando-se cultivo em monocamada, em células *Lymantria díspar* e *Trichoplusia ni*, respectivamente 57 OB/cel e 70 OB/cel. Assim sendo, comparando com a produção específica obtida, que foi de 433 OB/cel, o presente trabalho conseguiu valores relevantes e de alto interesse. Uma possível hipótese para estes resultados seria, como anteriormente mencionado a incorporação de proteínas de membrana da célula hospedeira, possivelmente aumentando a produção de biopesticidas produzidos.

Esse aumento na produção de OB não foi algo único das infecções com BV. Na infecção realizada com o ODV, constatou-se uma produção específica obtida de 90 OB/cel em 5 dias. Em outro trabalho, Dantas (2010) demonstrou que, no mesmo período, a produção foi de 30 OB/cel. Além disso, Dantas (2010) consegue somente depois do 8 d.p.i. valores maiores que 90 OB/cel. Demonstrando que o ODV ainda tem uma boa capacidade de infecção e também consegue produzir quantidades de OB satisfatórias.

Finalmente, vale ressaltar que o efeito de passagem relatado no trabalho foi similar ao demonstrado por Almeida (2005) com células Sf9, especialmente no que tange aos valores registrados da P3 até a P5.

7 CONCLUSÕES

Desta forma, a respeito dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se aferir que: a célula Sf21 se adaptou ao meio Sf900II, sendo viável seu uso para a produção de biopesticidas; a célula Sf21 devidamente adaptada a este meio de cultura consegue ser uma ótima produtora de OB; o Isolado-18 possui boa capacidade de produção de OB; o Isolado-18 no sistema trabalhado possui boas qualidades para viabilizar a produção de biopesticidas *in vitro*; os vírus obtidos possuem virulência alta.

Referências

- AGÊNCIA BRASIL. OCDE e FAO: produção agrícola mundial deve crescer 20% em dez anos. Agência Brasil. 2018. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2018-07/ocde-e-fao-producao-agricola-mundial-deve-crescer-20-em-dez-anos>>. Acesso em: 08/09/2018.
- ALMEIDA, A. F. D. **Estratégias de Produção *in vitro* de Bioinseticida Viral : Influências do Isolado , da Cinética e do Modo de Operação**. 2010. 150 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) — Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- ALMEIDA, A. F. de. **Avaliação Preliminar Da Viabilidade De Produção *in Vitro* De Um Isolado Brasileiro De Baculovirus Spodoptera Frugiperda Mnpv**. 2005. 109 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) — Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- BARBOSA, M. A. P. **Estabilidade do Baculovirus Spodoptera (SfMNPV) - 6NR na formulação de pó molhável**. 2016. 29 p. Monografia (Engenharia Agrônômica) — Universidade Federal de São João Del-Rei.
- BEAS-CATENA, A. et al. Baculovirus biopesticides: An overview. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 24, n. 2, p. 362 – 373, Abril 2014.
- CASTRO, M. E. B. et al. Biologia molecular de baculovirus e seu uso no controle biologico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 1733 – 1761, Outubro 1999.
- CHAKRABORTY, S.; REID, S. Serial Passage of a *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa zea* Cell Cultures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, n. 3, p. 303 – 308, Outubro 1998.
- CLAUS, J. D. et al. Production of Insecticidal Baculoviruses in Insect Cell Cultures: Potential and Limitations. In: _____. **Insecticides – Basic and Other Applications**. [S.l.]: Intechopen, 2012. cap. 7, p. 127 – 152.
- CONAB. Conab - Estimativa da produção de grãos é de 228,6 milhões de toneladas. 2018. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2481-estimativa-da-producao-de-graos-e-de-228-6-milhoes-de-toneladas>>. Acesso em: 2018-08-09T00:00:00+00:00.
- DANTAS, G. C. **Efeito da Adição de Colesterol e Ecdisona na Produção *in vitro* do Baculovirus Spodoptera frugiperda MNPV**. 2010. 99 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) — Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- DANTAS, G. C. **Contribuição para a Tecnologia de Produção de Corpos de Oclusão do Baculovirus Spodoptera: Análise das Proteínas Virais e Caracterização Matemática**. 2015. 110 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) — Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- DOW, J. A. T. pH GRADIENTS IN LEPIDOPTERAN MIDGUT. **Journal of Experimental Biology**, v. 172, n. 1, p. 355 – 375, Novembro 1992.

- GRAMKOW, A. W. **Patologia dos baculovírus: Efeito da ação de enzimas heterólogas e análise da resposta transcricional do hospedeiro durante a infecção viral**. 2013. 157 p. Tese (Pós-Graduação em Patologia Molecular) — Universidade de Brasília.
- IBGE. IBGE Agência de Notícias PIB avança 1,0% em 2017 e fecha ano em R\$ 6,6 trilhões. 2018. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-noticias/releases/20166-pib-avanca-1-0-em-2017-e-fecha-ano-em-r-6-6-trilhoes.html>>. Acesso em: 2018-08-09T00:00:00+00:00.
- IKEDA, M.; HAMAJIMA, R.; KOBAYASHI, M. Baculoviruses: Diversity, evolution and manipulation of insects. **Entomological Science**, v. 18, n. 1, p. 1 – 20, Janeiro 2015.
- JEHLE, J. A. et al. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. **Archives of Virology**, v. 151, n. 7, p. 1257 – 1266, Maio 2006.
- JONES; EJETA. A new global agenda for nutrition and health : the importance of agriculture and food systems. **Bull World Health Organ**, v. 94, n. December 2015, p. 228 – 229, Fevereiro 2016.
- KING, L. A.; POSSEE, R. D. **The Baculovirus Expression System: A laboratory guide**. 1. ed. [S.l.]: SPRINGER-SCIENCE+BUSINESS MEDIA, B.V., 1992. ISBN 978-94-010-5047-0.
- LYNN, D. E. Enhanced infectivity of occluded virions of Gypsy Moth nuclear polyhedrosis virus for cell cultures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 63, n. 3, p. 268 – 274, Maio 1994.
- MACHADO, L. C. **PRODUÇÃO in vivo DE BACULOVIRUS SPODOPTERA EM LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA : Noctuidae)**. 2016. 43 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias) — Universidade Federal do Espírito Santo.
- MAZID, S. A review on the use of biopesticides in insect pest management. **International Journal of Science and Advanced Technology**, v. 1, n. 7, p. 169 – 178, Setembro 2011.
- MOSCARDI, F. Assessment of the Application of Baculoviruses for Control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 44, n. 1, p. 257 – 289, Janeiro 1999. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.44.1.257>>.
- MOSCARDI, F. et al. **Microbes and microbial technology: Agricultural and environmental applications**. [S.l.: s.n.], 2011. 415 – 445 p.
- OLIVEIRA, J. V. de C. **EXPRESSÃO TEMPORAL DOS GENES DO NUCLEOPOLIEDROVÍRUS *Anticarsia gemmatalis* E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A CÉLULA NUCLEOPOLIEDROVÍRUS *Anticarsia gemmatalis***. 2010. 61 p. Tese (Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia) — Universidade de São Paulo.
- PADRE, G. A. del. **Estudo da cinética de crescimento de células de inseto Sf21 e infecção por baculovírus**. 2015. 127 p. Dissertação (Escola Politécnica da Universidade de São Paulo) — Universidade de São Paulo.
- PEREIRA, G. F. **Otimização do crescimento de células Sf-9 em biorreator visando à produção de biopesticida**. 2010. 113 p. Dissertação (Escola Politécnica da Universidade de São Paulo) — Universidade de São Paulo.

POTTER, K. N.; FAULKNER, P.; MACKINNON, E. A. Strain Selection During Serial Passage of *Trichoplusia ni* Nuclear Polyhedrosis Virus. **Journal of Virology**, v. 18, n. 3, p. 1040 – 1050, Junho 1976.

POWER, J. F. et al. Modeling and optimization of the baculovirus expression vector system in batch suspension culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 6, p. 710 – 719, Setembro 1994.

SIQUEIRA, S. L. **Agrotóxicos E Saúde Humana : contribuições dos profissionais do campo da saúde**. 2006. 34 p. Monografia (Enfermagem) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SLAVICEK, J. M. et al. Isolation of a Baculovirus Variant That Exhibits Enhanced Polyhedra Production Stability during Serial Passage in Cell Culture. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, n. 1, p. 153 – 160, Outubro 1995.

SOARES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do Cultivo de Células Animais, de Biofármacos à Terapia Gênica**. 1. ed. [S.l.]: Roca, 2007. ISBN 978-85-7241-730-3.

TAPPARO, A. F. **Substituição do uso de soro fetal bovino na manutenção do cultivo de células CER infectadas pelo vírus da doença infecciosa da bursa de Fabrício**. 2009. 79 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas) — Universidade Estadual de São Paulo.

VAUGHN, J. L. et al. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). **In vitro**, v. 13, n. 4, p. 213 – 217, Abril 1977.

VIEIRA, P. B. **Cultura de células de *Drosophila melanogaster* (S2) em processo contínuo**. 2010. 135 p. Dissertação (Escola Politécnica da Universidade de São Paulo) — Universidade de São Paulo.

VOLKMAN, L. E.; SUMMERS, M. D.; HSIEH, C. H. Occluded and nonoccluded nuclear polyhedrosis virus grown in *Trichoplusia ni*: comparative neutralization comparative infectivity, and in vitro growth studies. **Journal of Virology**, v. 19, n. 3, p. 820 – 832, Setembro 1976.

Glossário

Glossário

Bioinseticida: Produto desenvolvido a partir de organismos vivos e que não possuem substâncias químicas, não sendo ofensivo ao meio ambiente;

Estroma virogênico: hipertrofia nuclear causada pela presença do vírus;

Fenótipos: caracteres visíveis de um indivíduo ou de um organismo, em relação à sua constituição e às condições do meio ambiente;

***In vitro*:** expressão latina que designa todos os processos biológicos que têm lugar fora dos sistemas vivos, no ambiente controlado e fechado de um laboratório e que são feitos normalmente em recipientes de vidro;

***In vivo*:** refere-se à experimentação feita dentro ou no tecido vivo de um organismo vivo;

Repasse celular: transferência das células de um meio com pouco nutrientes para um um frasco com meio novo

Vírião: partícula viral infecciosa;

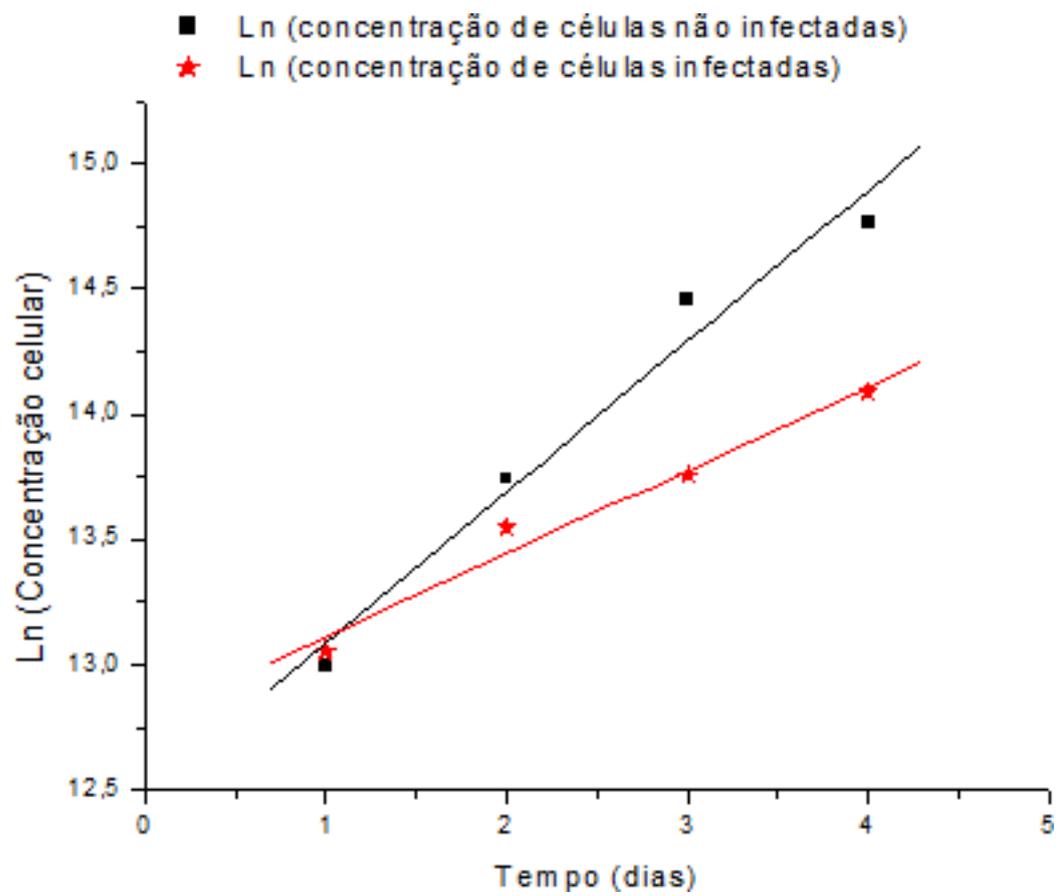
Anexos

Anexos

Gráficos de linealização

.1 Anexo A

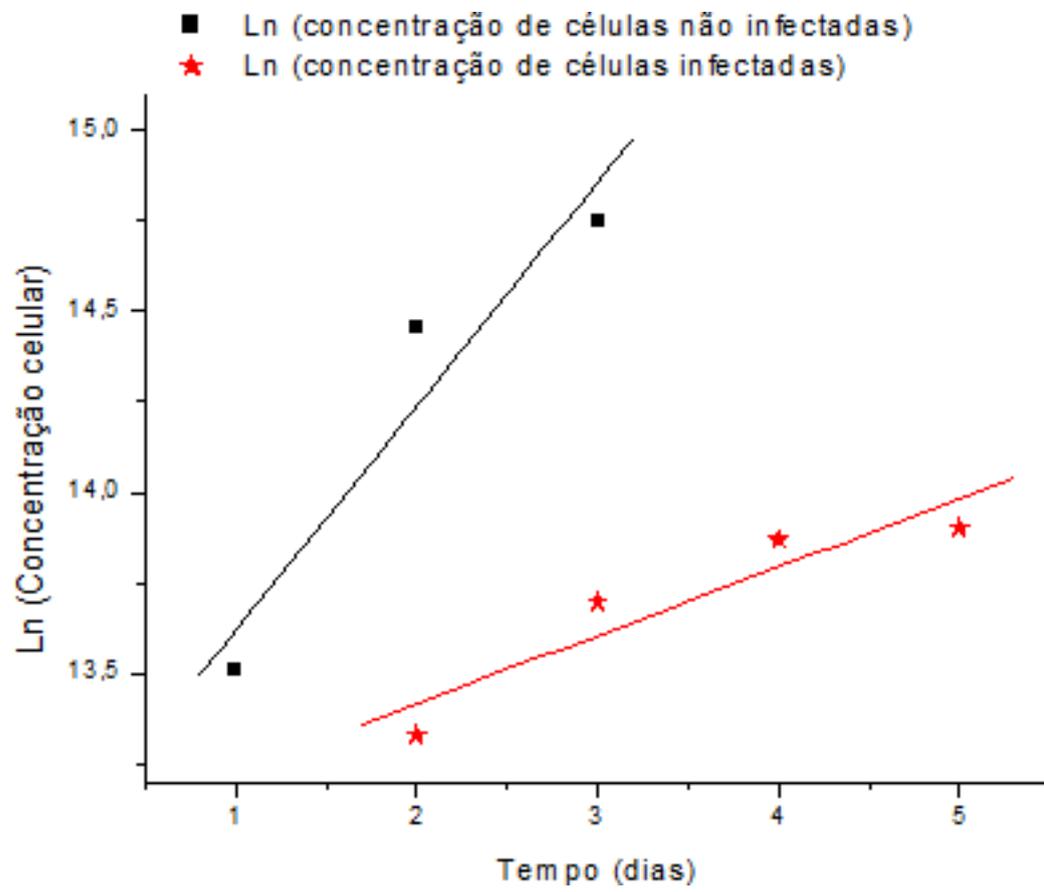
Figura 16 – Ln (concentração celular) versus tempo - P3



Fonte: Autor

.2 Anexo B

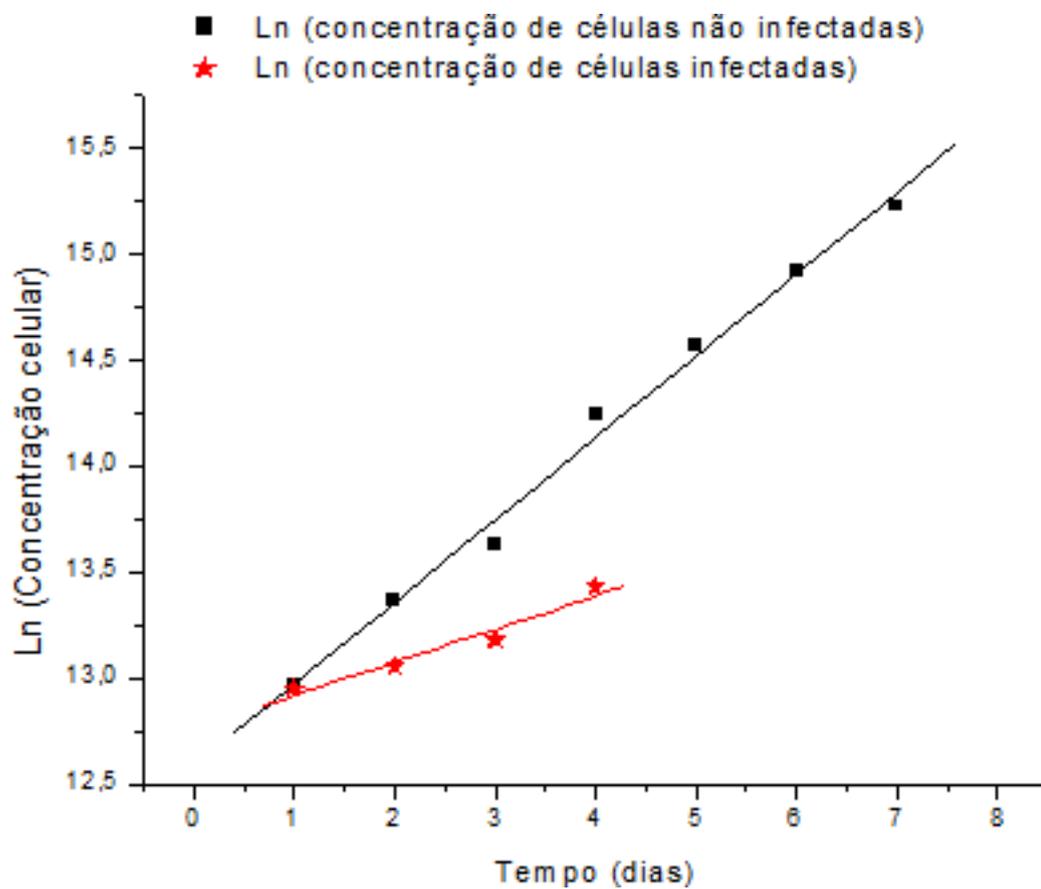
Figura 17 – Ln (concentração celular) versus tempo - P4



Fonte: Autor

.3 Anexo C

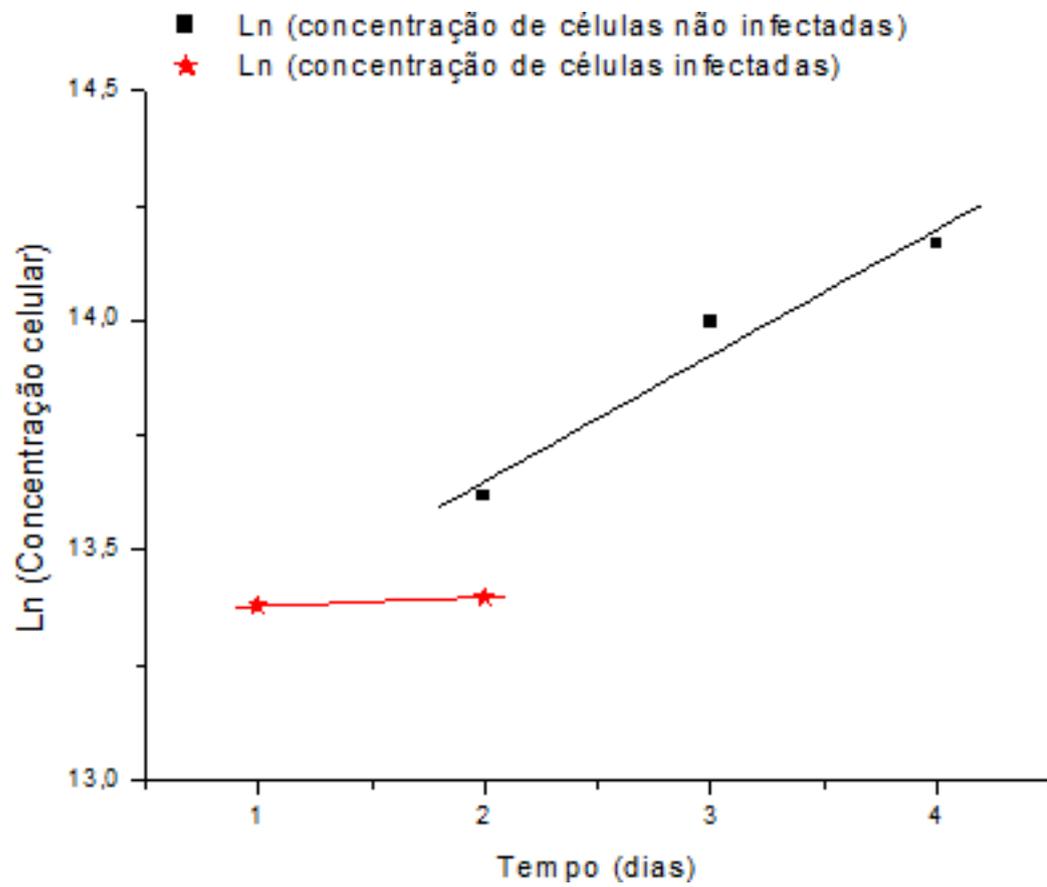
Figura 18 – Ln (concentração celular) versus tempo - P5



Fonte: Autor

.4 Anexo D

Figura 19 – Ln (concentração celular) versus tempo - ODV



Fonte: Autor