

DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE INÓCULO VIRAL PARA O PROCESSO DE PRODUÇÃO EM BATELADA-ALIMENTADA DE BACULOVÍRUS SPODOPTERA

G. C. DANTAS¹, A. F. de ALMEIDA², A. R. A. REIS¹, G. R. de MACEDO¹ M. L. SOUZA³ e M. R. S. PEDRINI¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química

² Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biotecnologia

³ Embrapa, Cenargen

E-mail para contato: gracianaclecia@yahoo.com.br

RESUMO – A produção *in vitro* de baculovírus em escala industrial apresenta grandes desafios, a perda de virulência ao longo dos cultivos celulares é um dos problemas a serem solucionados para que a produção em larga escala seja atingida. Além disso, o custo de produção deve ser competitivo com o mercado atual, uma vez que a quantidade de bioinseticida utilizada deve demonstrar eficiência significativa quando comparada aos inseticidas químicos utilizados em lavouras. Mecanismos devem ser estudados para que a produção *in vitro* de baculovírus alcance níveis satisfatórios também do ponto de vista operacional. O processo de batelada-alimentada pode ser uma alternativa para produção *in vitro* de baculovírus, este sistema permite que a fonte de nutrientes seja adicionada na cultura quando a densidade celular estiver avançada, período que ocorre limitação de nutrientes e declínio da atividade celular, provocando consequente diminuição da produção viral. Com adição de novos nutrientes, a produção viral poderá atingir altas concentrações permitindo maior eficiência do processo. Ademais, para melhoria do processo de produção visando o aumento em escala industrial precisam-se minimizar os custos com inóculo, portanto, o estudo da quantidade de inóculo é necessário. Neste trabalho, realizou-se um estudo comparativo da quantidade de inóculo viral (1%; 2,5%; 5% e 10% (v/v)), utilizada para infectar a suspensão de células Sf21 no processo de infecção do baculovírus SfMNPV em batelada-alimentada.

1. INTRODUÇÃO

O uso de inseticida químico ainda é o método predominante para redução de danos devidos aos ataques de pragas em lavouras devido ao seu amplo espectro de atuação. Apesar de serem bastante utilizados, métodos alternativos são propostos com a finalidade de diminuir ou até mesmo eliminar o uso continuado de agrotóxicos (Franceschini *et al.*, 2001). O controle biológico tem importante papel no desenvolvimento da produção agrícola, principalmente no que se refere ao manejo integrado de pragas e na agricultura sustentável. A utilização de baculovírus como agentes de biocontrole demonstra ser uma alternativa interessante devido à especificidade

de atuação e à inocuidade observada com relação ao meio ambiente e, sobretudo ao homem (Hamilton *et al.*, 2003).

A lagarta *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida no seu estágio larval como lagarta-do-cartucho, é uma das mais importantes pragas da cultura do milho. A agressividade desta praga vem causando enormes prejuízos nas lavouras, aumentando o custo de produção da cultura em mais de 37% e entre outros fatores, causando desequilíbrio biológico devido ao uso continuado de inseticidas químicos. Assim, livre dos inimigos naturais e com a disponibilidade de alimento durante o ano todo, a praga tem amplas condições de sobrevivência e proliferação. O método tradicional para o controle da *S. frugiperda* é a utilização de inseticidas químicos, mas devido ao seu amplo espectro de atuação tem sido reduzida sua aplicação em virtude das consequências negativas sobre a fauna benéfica, a ressurgência de pragas tornando-as mais resistentes, e sobre a contaminação do ambiente (Gassen, 1996). Assim, é importante encontrar alternativas que minimizem os efeitos adversos destes inseticidas sintéticos sobre o meio ambiente, que sejam eficientes, de baixo custo e de fácil manipulação pelos produtores.

O processo de produção *in vitro* de baculovírus tem encontrado bloqueios técnicos e econômicos que parecem basear-se particularmente na instabilidade genética do vírus, o que inviabiliza a ampliação da escala de produção (*scale up*) e na resistência do usuário em aceitar tecnologias comparativamente caras e de longo tempo de maturação. No entanto, a produção *in vitro* tem sido apontada como um dos mais importantes desenvolvimentos a serem realizados nos próximos anos, especialmente se considerarmos o desenvolvimento de produção de controladores em larga escala. Contudo, há necessidade de desenvolver estratégias com a finalidade de minimizar os efeitos indesejáveis da produção *in vitro* de baculovírus, principalmente quando se trata da perda de virulência ao longo de várias passagens em cultivos celulares. Diante disto, algumas maneiras de conduzir o processo de produção *in vitro* são importantes para o sucesso na produção. Alguns estudos mostram o aumento da produção de bioinseticidas através da escolha do processo de produção e do modo de operação dos sistemas de produção (Zhang *et al.*, 2005; Almeida, 2010).

O sistema de operação em batelada alimentada é normalmente utilizado como alternativa para o aumento de produção quando se utiliza o sistema em batelada simples. Define-se o processo em batelada alimentada como sendo uma estratégia onde os nutrientes são acrescidos durante o cultivo e os produtos permanecem até o final do cultivo (Chico *et al.*, 2007, Almeida, 2010). Visando uma redução no custo da produção *in vitro* do baculovírus *Spodoptera*, este trabalho tem como objetivo obter uma quantidade de inóculo viral mínima a ser utilizada no processo de infecção do baculovírus SfMNPV em batelada-alimentada.

2. METODOLOGIA

2.1. Células

A célula utilizada foi *Spodoptera frugiperda*, linhagem Sf21, cultivada em incubadora rotativa refrigerada (Tecnal – TE421), com agitação controlada de 120 rpm e 28°C, utilizando o meio de cultura Sf-900II® SFM (*Serum Free Medium*) (GIBCO). A concentração celular foi estimada utilizando um microscópio fase-contraste (Olympus, Japão) e um hemocitômetro, modelo Neubauer (Bright-Line Hemacytometer Sigma).

2.2. Vírus

O vírus de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) isolado-18, foi cedido pelo Dr. Fernando Hercos Valicente da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), Sete Lagoas, MG. O inóculo viral de SfMNPV foi obtido a partir do ODV (*occluded derived virus*), (Almeida, 2010). A concentração de corpos de oclusão foi determinada utilizando-se a contagem em hemocitômetro. Para a contagem, as células infectadas com o vírus SfMNPV foram lisadas com uma solução de 1% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) por 2 horas para total dissolução da membrana celular e liberação dos corpos de oclusão.

2.3. Determinação da concentração celular e da produção de OBs

A concentração celular dos cultivos foi determinada diariamente por contagem (em triplicata) utilizando o método de exclusão com 0,1% (v/v) de azul de tripan (King e Possee, 1992), utilizando-se a Equação (1):

$$C \left[\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right] = \frac{N_{\text{células}} \cdot D}{18 \times 10^{-4} \rightarrow \text{volume de 2 lados do hemacitômetro}} \quad (1)$$

Onde:

C – Concentração de células

D – Fator de diluição

$N_{\text{células}}$ – Média da contagem de células.

A produção final de corpos de oclusão (OBs) (OB/mL) foi determinada após 8 dias de cultivo. Para esta determinação, as células foram dissolvidas com detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) a uma concentração final de 0,5% (v/v) por 1 hora a 28 °C antes da contagem (em triplicata) em hemocitômetro, conforme a Equação (2):

$$C_{OB} \left(\frac{OB}{mL} \right) = \frac{D \times 5 \times M_{OB}}{1 \times 10^{-4}} \quad (2)$$

Onde:

C_{OB} – Concentração de OB

D – Fator de diluição

M_{OB} – Média da contagem de OB

5 – Número de quadrantes do hemocitômetro a serem contados em cada lado.

2.4. Determinação da quantidade viral

Os experimentos foram realizados em Erlenmeyer de 125 mL (*Schott*) com volume de suspensão de 20 mL operados em *shaker* orbital a 120 rpm e temperatura controlada a 28°C. Células Sf21 sadias, viabilidade média de 94% em 3 dias de cultivo, foram inoculadas com 1,0%, 2,5%, 5,0% e 10,0% (v/v) do BV (vírus extracelular) do baculovírus selvagem SfMNPV. O crescimento celular foi acompanhado diariamente até atingir viabilidade inferior a 50%. Já a produção de corpos de oclusão foi acompanhada durante o processo final de infecção, nos últimos quatro dias. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Apresentando erro médio de 5% para a contagem de células e 21% para contagem de corpos de oclusão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de infecção das células Sf21 para a obtenção dos corpos de oclusão utilizando como inóculo viral diferentes concentrações de BVs está representado pelas Figuras 1 e 2.

A Figura 1 mostra as curvas de crescimento das células não infectadas e infectadas durante o processo de infecção. Nas primeiras 48 horas de cultivo, o crescimento celular foi equivalente tanto para as células não infectadas (células controle) como para as infectadas em todas as concentrações estudadas. Porém, após 48 horas pós-infecção (h.p.i) observou-se uma diferenciação de crescimento entre as células controle e infectadas. As células infectadas desenvolveram-se menos devido à ação viral, enquanto as células não infectadas estavam em pleno desenvolvimento demonstrando a adaptação às condições de cultivo.

As células infectadas com 1,0% e 2,5% de inóculo viral apresentaram o mesmo comportamento, diferenciando das células controle a partir do terceiro dia de infecção. Já as infecções com 5,0 % e 10% de inóculo viral estabeleceram seu processo de infecção após 24 h.p.i. Neste caso, pode-se afirmar que o sincronismo de infecção foi observado, ou seja, todas as

células apresentaram sinais de infecção bastante visíveis (Palomares & Ramírez, 2009). O sincronismo de infecção favorece o rendimento na produção de baculovírus, mas a utilização de alta multiplicidade de infecção (MOI) pode resultar na formação de partículas interferentes defectivas (DIPs) durante a passagem seriada do vírus provocando assim o chamado efeito passagem (Wickham *et al.*, 1991). O efeito passagem é um dos problemas que precisam ser solucionados para obtenção de alta produção de baculovírus em cultivos celulares.

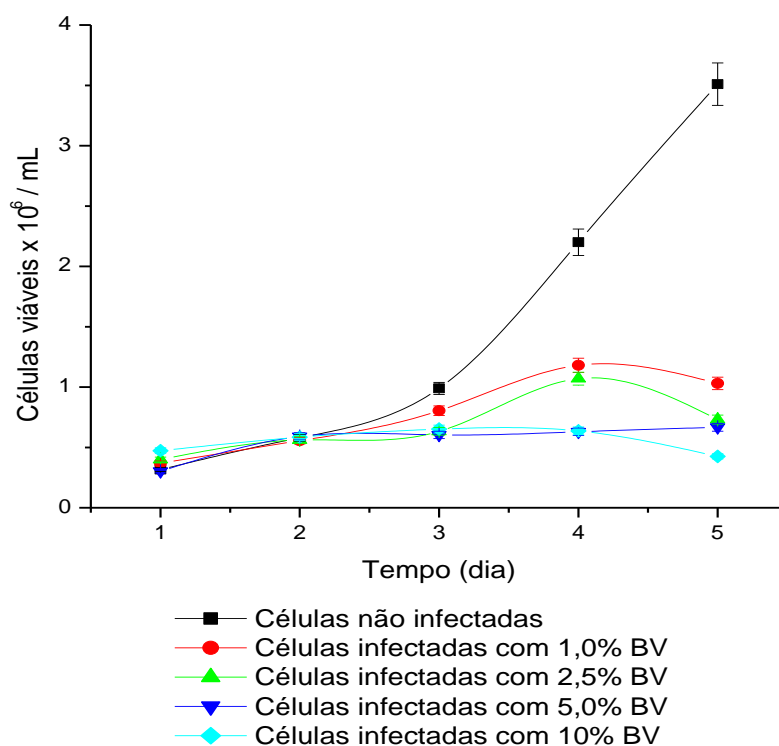


Figura 1. Curvas de crescimento das células não infectadas e infectadas com diferentes concentrações de BVs.

A Figura 2 apresenta a produção volumétrica e específica de OB do SfMNPV obtidos do processo de infecção, utilizando como inóculo as diferentes concentrações de BVs. A produção volumétrica de OB não demonstrou diferenciação no processo de infecção com as concentrações 2,5% e 5,0% de BV, obtendo uma produção de $1,97 \times 10^8$ OB/mL para estes sistemas. Já com a concentração de 1,0% de inóculo viral a produção atingiu $1,82 \times 10^8$ OB/mL. Quando se utilizou 10% de BV do SfMNPV obteve-se uma produção de $2,6 \times 10^8$ OB/mL. Analisando as concentrações de OB obtidas do processo de infecção percebeu-se que as quantidades com 1%; 2,5% e 5% de inóculo não apresentaram diferenças significativas na produção. Do ponto de vista

econômico, esta observação é interessante devido à quantidade de inóculo que poderá ser utilizada num futuro processo de ampliação de escala. A minimização dos custos de produção proporcionada pela menor quantidade de estoque viral é uma prática desejada para obtenção de um processo de produção mais competitivo no mercado (Mena *et al.*, 2010).

Analisando a produção específica de OB percebeu-se que as infecções com 1,0%, 2,5% e 5,0% obtiveram 121, 135 e 171 OB/Célula, respectivamente, enquanto a infecção com 10% de BV obteve melhor resultado com aproximadamente 250 OB/Célula ao final de dez dias de infecção. Porém, para estratégias de ampliação de escala, como no processo em batelada-alimentada, deve-se obter alta concentração viral com baixas quantidades de inóculo para que o processo de produção seja competitivo do ponto de vista econômico e operacional. Altas concentrações de inóculo significam maiores custos com a matéria-prima, portanto, a utilização da concentração de 10% de inóculo viral, apesar de apresentar maior produção de baculovírus, terá maior custo de operação. Como a proposta deste trabalho é analisar as concentrações de inóculo viral para que a produção de baculovírus seja sustentável, a produção de 10% não tornaria viável a produção em larga escala para este sistema utilizado.

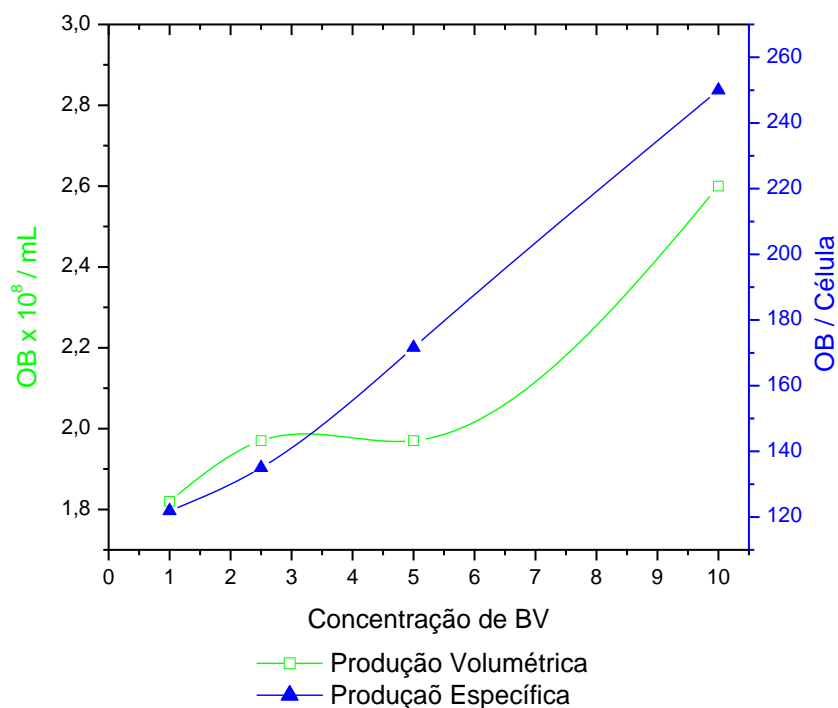


Figura 1. Curvas de produção volumétrica e específica de OB da infecção de células por SfMNPV nas diferentes concentrações de BVs .

4. CONCLUSÃO

Após 10 dias de infecção, obteve-se uma produção de $(1,82, 1,97, 1,97 \text{ e } 2,6) \times 10^8$ OB/mL e 121,81, 135,01, 171,61 e 250 OB/Célula para as células infectadas com 1,0%, 2,5%, 5,0% e 10% de BV, respectivamente. Este resultado mostrou que os sistemas estudados obtiveram produção viral próximas, dessa forma, 1% de concentração do inóculo viral pode ser ideal para se utilizar no processo de produção em batelada-alimentada de baculovírus *Spodoptera*. Lembrando que menor quantidade de inóculo gera economia durante todo o processo infectivo. Assim, visando o processo de ampliação de escala, menor número de bateladas simples será suficiente para se atingir a quantidade mínima de vírus efetivo para infectar uma determinada suspensão celular, garantido o aumento de produção de baculovírus.

5. NOMENCLATURA

BV – Vírus extracelular
C – Concentração celular
CNPMS – Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
 C_{OB} – Concentração de OB
D – Fator de diluição
DIP – Partículas interferentes definitivas
h.p.i – horas pós infecção
 M_{OB} – Média da contagem de OB
MOI – Multiplicidade de infecção
 $N_{células}$ – Média da contagem de células
OB – Corpos de oclusão
ODV – Vírus derivado de corpos de oclusão
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SFM - *Serum Free Medium*
SfMNPV – *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus*.

6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. F. Estratégias de Produção in vitro de Bioinseticida Viral: Influências do Isolado, da Cinética e do Modo de Operação. *Tese de Doutorado*. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. Brasil. 2010. 133f.

CHICO, E.; RODRIGUEZ, G.; FIGUEREDO, A. Biorreatores para células animais. In: Moraes

A. M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L. R.. *Tecnologia do Cultivo de Células Animais de Biofármacos a Terapia Gênica*. São Paulo: Roca, 2007. p. 216-254.

FRANCESCHINI, M.; GUIMARÃES, A.P.; CAMASSOLA, M.; FRAZZON, A.P.; BARATTO, C.M.; KOGLER, V.; SILVA, M.V.; DUTRA, V.; NAKAZOTO, L.; CASTRO, L.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Biotecnologia aplicada ao controle biológico. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.23, p.32-37, 2001.

GASSEN, D. N. Manejo de pragas associadas à cultura do milho. Passo Fundo - RS. Aldeia Norte, 1996.

HAMILTON, S. F.; SUNDING, D. L.; ZILBERMAN, D. Public goods and the value of product quality regulations: the case of food safety. *J. of Public Econ.*, v.87, p. 799-817, 2003.

KING, L. A.; POSSEE, R. D. The baculovirus expression system: a laboratory guide London; New York: Chapman & Hall, p. xiv, 229 p. 1992.

MENA, J. A.; AUCOIN, M. G.; MONTES, J.; CHAHAL, P. S.; KAMEN, A. A. Improving adeno-associated vector yield in high density insect cell cultures. *The J. of Gene Medicine*. 12. p.157-167. 2010.

PALOMARES, L. A.; RAMIREZ, O. T. Challenges for the production of virus-like particles in insect cells: The case of rotavirus-like particles. *Bioch. Eng. J.*, 45 p.158–167, 2009.

WICKHAM, T. J.; DAVIS, T.; GRANADOS, R. R.; HAMMER, D. A.; SHULER, M. L.; recombinant protein production as a function of multiplicity of infection. *Biotech. L.*, v.13, p.483-488. 1991.

ZHANG, Y. H.; ENDEN, G.; MERCHUK, J. C. Insect cells-baculovirus system: factors affecting growth and low MOI infection. *Bioch. Eng. J.*, v. 27, p.8-16. 2005.