

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LISETH VIVIANA GONZÁLEZ GIL

AVALIAÇÃO DA EXPANSÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS EM
BIORREATOR DE ESCOAMENTO EM VÓRTICES DE TAYLOR (BEVT)

SÃO CARLOS

2015

AVALIAÇÃO DA EXPANSÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS EM
BIORREATOR DE ESCOAMENTO EM VÓRTICES DE TAYLOR (BEVT)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LISETH VIVIANA GONZÁLEZ GIL

AVALIAÇÃO DA EXPANSÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS EM
BIORREATOR DE ESCOAMENTO EM VÓRTICES DE TAYLOR (BEVT)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química para a obtenção do título de mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Alberto Torres Suazo

SÃO CARLOS

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G643a González Gil, Liseth Viviana
Avaliação da expansão de células estromais
mesenquimais em biorreator de escoamento em vórtices
de Taylor (BEVT) / Liseth Viviana González Gil. --
São Carlos : UFSCar, 2016.
151 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2015.

1. Célula estromal mesenquimal. 2. hMSC-TERT. 3.
Biorreator de escoamento em vórtices de Taylor. 4.
Tensão de cisalhamento. 5. Transferência de
oxigênio. I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LISETH VIVIANA GONZALEZ GIL APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 31 DE MARÇO DE 2015.

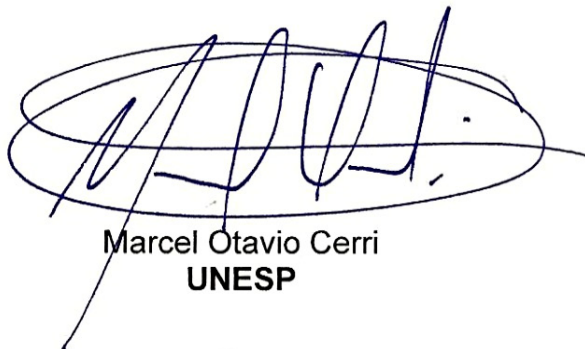
BANCA EXAMINADORA:



Claudio Alberto Torres Suazo
Orientador, UFSCar



Alberto Colli Badino Junior
UFSCar



Marcel Otavio Cerri
UNESP

"A maior sabedoria está na simplicidade. Amor, respeito, tolerância, compartilhar, gratidão, perdão. Não é complexo ou elaborado. O conhecimento real é gratuito. Está codificada em seu DNA. Tudo que você precisa está dentro de você. Grandes professores disseram que desde o início. Encontre o seu coração, e você vai encontrar

(Carlos Barrios)

AGRADECIMENTOS

A minha família, principalmente a meus pais, Isabel Gil e Delio González, pelo apoio incondicional, o amor, a força e os conselhos na distância, sem vocês eu não estivera nem seria o que sou agora, obrigada pelo seu esforço e por serem os melhores pais para mim. Aos meus irmãos, Yiber González e Natalia González, pelas risadas e as palavras de ânimo, o amor e paciência.

À família Larrota Vargas pelo apoio, a companhia e o amor, Dona Rosalba Vargas, você é como minha segunda mãe, obrigada por me receber e fazer-me sentir em casa.

Aos meus amigos na Colômbia, pelas risadas, a companhia, conselhos, paciência e amizade ao longo do caminho que compartilhamos juntos.

A professor Claudio A. Suazo, por me receber e me dar a oportunidade de conhecer, aprender e aportar a esta maravilhosa área de pesquisa, obrigada pela paciência, a confiança, conselhos e orientação.

Aos meus amigos da Colômbia, Brasil e Peru, Saidy Ayala, Hernan Rojas, Raul Revelo, Margarita Ramos, Vera Silva, Ana Fornazari e Genoveva C., pela acolhida, a ajuda, a companhia, as risadas, os conselhos e a amizade, com vocês a permanência no Brasil foi ainda mais especial.

Aos amigos do laboratório, Ana Ruela, Diogo P. Santos, Genoveva Flores, Gizella Maymone, Juliana de Sá, Monize Decarli, Paula Bertuso, Thaila Wodewotzky, pela colaboração com a língua e no trabalho, pela paciência, companhia, sugestões e pelas risadas, apesar do pouco tempo tenho muitas lembranças dos momentos compartilhados com vocês, obrigada. Harminder, obrigada pela ajuda e os conselhos durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao CNPQ pelo financiamento através da bolsa de estudos concedida.

Ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos.

RESUMO

As células estromais mesenquimais (CEMs), consideradas uma alternativa promissora pelas características de auto-regeneração e potencial de diferenciação, ocorrem em pequenas quantidades em diferentes tecidos de um indivíduo adulto. Por causa disso e com a necessidade de obtê-las em grandes quantidades para serem usadas em tratamentos clínicos, tem surgido uma forte demanda de novos tipos de biorreatores para seu cultivo em larga escala. Assim, uma adequada caracterização da transferência de massa e das forças cisalhantes são necessárias para o aperfeiçoamento desses biorreatores. Nesse cenário, o presente trabalho teve como finalidade avaliar as características hidrodinâmicas e de transferência de oxigênio para o cultivo de CEMs num protótipo de biorreator de escoamento em vórtices de Taylor (BEVT), projetado para oxigenação mediante uma membrana de silicone. Para a avaliação das características de transferência de oxigênio foram realizadas medições pelo método dinâmico para a obtenção do coeficiente volumétrico de transferência de massa global (K_{TLA}). A tensão de cisalhamento gerada a diferentes condições de frequências de rotação, foi calculada a partir de correlações da literatura para escoamento de Taylor. Os resultados obtidos de K_{TLA} com o uso da membrana foram relativamente altos com valores entre 4,80 e 11,53 h^{-1} em frequências de rotação do cilindro interno entre 60 e 120 rpm. As tensões de cisalhamento mostraram valores baixos em relação a outros tipos de biorreatores, com valores menores a $1N/m^2$ para frequências entre 60 e 90 rpm. Vantagens do BEVT também foram evidenciadas considerando a hidrodinâmica apresentada nos vórtices com o tamanho de turbilhões calculado pela escala de Kolmogorov. Os resultados de cultivos da linhagem de hMSC-TERT aderida ao microcarregador Cultispher® S em meio de cultivo alfa-MEM com 15% v/v de soro fetal bovino foram satisfatórios, evidenciando uma adequada adaptação das células ao ambiente hidrodinâmico e oxigenado do BEVT. Obteve-se uma velocidade de crescimento específica considerada alta ($0,032 h^{-1}$) e um fator de expansão máximo de 9 com a adição de microcarregadores após 120 h de cultivo. Ao todo, os resultados mostram que o BEVT preenche os requisitos tecnológicos de cultivo exigidos pelas CEMs e se torna uma alternativa conveniente para o cultivo de outras células animais aderentes, aglomerantes e sensíveis a forças hidrodinâmicas.

Palavras Chave: Célula estromal mesenquimal. hMSC-TERT. Biorreator de escoamento em vórtices de Taylor. Tensão de cisalhamento. Transferência de oxigênio. Microcarregador Cultispher S

ABSTRACT

The mesenchymal stromal cells (CEMs), considered a promising alternative due to the characteristics of self-regeneration and differentiation potential, occur in small amounts in different tissues of an adult individual. Because of this and the need to obtain them in large quantities for use in clinical treatments, there has been a strong demand for new types of bioreactors for its large-scale cultivation. Thus, a suitable characterization of mass transfer and shear forces are necessary for the improvement of these bioreactors. In this scenario, the present study finality was to evaluate the hydrodynamic characteristics and oxygen transfer to the CEMs cultivation in a Taylor vortex flow bioreactor prototype (BEVT), designed for oxygenation through a silicone membrane. To evaluate the oxygen transfer characteristics measurements were performed by the dynamic method for obtaining the volumetric coefficient of global mass transfer (K_{TLA}). The shear stress, generated at different rotation speed conditions, was estimated from literature correlations for Taylor flow. The results obtained with the use of K_{TLA} membrane were relatively high with values between 4.80 and 11.53 h^{-1} in the rotation speed of the internal cylinder between 60 and 120 rpm. The shear stress showed low values in relation to other types of bioreactors, with lower values 1N / m² for speeds between 60 and 90 rpm. BEVT Benefits were also observed considering the hydrodynamics presented in the vortex with the whirls size calculated by the Kolmogorov scale. The results of cultures of hMSC-TERT lineage adhered to the microcarrier Cultispher® S in alpha-MEM medium culture with 15% v/v fetal bovine serum were satisfactory, showing a suitable adaptation of the cells to the BEVT oxygenated and hydrodynamic environment. Was obtained a considered high specific growth rate (0,032 h^{-1}) and a maximum expansion factor of 9 with the addition of microcarriers after 120 h of culture. Altogether, the results show that the BEVT fulfills the cultivation technology requirements required by the CEMs and becomes a convenient alternative to culture other adherent, susceptible to caking and hydrodynamic forces sensitive animal cells.

Keywords: mesenchymal stromal cell. hMSC-TERT. Taylor vortex flow bioreactor. Shear stress. Oxygen transfer. Cultispher S Microcarriers.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

alpha-MEM	<i>Alpha minimum essential médium</i> -Meio essencial mínimo alpha
ATP	Adenosina tri-fosfato
BHK	<i>Baby Hamster kidney</i> -Células de rim de Hamster recém nascido
BEVT	Biorreator de Escoamento em Vórtices de Taylor
CEMs	Células estromais mesenquimais
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i> – ovário de hamster chinês
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CTEs	Células-Tronco Embrionárias
CTAs	Células- tronco adultas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid – Ácido desoxirribonucleico
DO	Demanda de oxigênio
FE	Fator de expansão
FUNDHERP	Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto
GFP	Green fluorescent protein – proteína com a expressão no espectro visível de fluorescente verde
hMSC	Célula estromal mesenquimal humana
hMSC-TERT	Linhagem celular estromal mesenquimal, imortalizada pela Telomerase Reverse Transcriptase
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i> - Célula de embrião humano
HL-60	<i>Human promyelocytic leukemia cells</i> . Células de leucemiapromielocítica Humanas
LDH	Enzima Lactato Deshidrogenase

MSC	<i>Mesenchymal stromal cells</i> -Células estromais mesenquimais
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
m	metro
µm	Micrômetro
min.	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Newton, unidade de medida de força
NAD ⁺	Nicotina Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotina Adenina Dinucleotídeo
O ₂	Oxigênio
OD	Concentração de oxigênio dissolvido (% de saturação de ar)
P	Permeabilidade
PBS	Phosphae Buffer Saline-Solução tampão fosfato
pH	Potencial de hidrogênio iônico
rpm	Rotações por minuto
Sf-9	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Célula de inseto)
SFB	Soro Fetal Bovino
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
ppm	Partes por milhão
3T3-L1	Linhagem celular derivada de rato
U 937	Linha de células isoladosa partir dolinfoma histiocítico

LISTA DE VARIÁVEIS

a	Área interfacial da transferência de massa por unidade de volume	$[L^2L^{-3}]$
C^*	Concentração de oxigênio no meio saturado de ar	$[ML^{-3}]$
d	Largura do espaço anular entre os dois cilindros	[L]
C	Concentração de oxigênio no meio circulante	$[ML^{-3}]$
D	Coefficiente de difusão do oxigênio	$[L^2T^{-1}]$
L	Comprimento axial do cilindro	[L]
k_{La}	Coefficiente de transferência de massa	$[LT^{-1}]$
$K_{TL}a$	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio global para aeração através da membrana e da áera superficial do líquido no espaço anular	$[T^{-1}]$
$K_{Tm}a$	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio global para aeração através da áera superficial do líquido no espaço anular	$[T^{-1}]$
k_{Las}	Coefficiente de transferência de massa sem aeração externa	$[T^{-1}]$
$K_s a$	Coefficiente de transferência de massa na superfície do líquido anular	$[T^{-1}]$
r_{ext}	Raio do cilindro externo (estacionário)	[L]
r_{int}	Raio do cilindro interno (rotatório)	[L]
t_1	Tempo 1	[T]
t_2	Tempo 2	[T]
δ	Espessura da membrana de silicone	[L]
N_{t_1}	Número de células no tempo 1	
N_{t_2}	Número de células no tempo 2	
q_{O_2}	Taxa de consumo células de oxigênio	$[MT^{-1}]$
γ	Taxa de cisalhamento	$[T^{-1}]$

μ	Velocidade específica de crescimento	$[T^{-1}]$
η	Escala de Kolmogorov	$[L]$
ρ	Densidade do fluido	$[ML^{-3}]$
ν	Viscosidade cinemática do fluido	$[L^2T^{-1}]$
Ω_i	Frequência de rotação do cilindro interno	$[T^{-1}]$
τ	Tensão de cisalhamento	$[ML^{-1}T^{-2}]$
T	Torque	$[ML^2T^{-1}]$
ε	Média da energia de dissipação	$[L^2T^{-3}]$
U_{ax}	Velocidade superficial axial	$[LT^{-1}]$
Re_θ	Número de Reynolds rotacional	[Adimensional]
Ta	Número de Taylor	[Adimensional]
G	Número adimensional do Torque	[Adimensional]
Γ	Razão de aspecto = $\frac{L}{d}$	[Adimensional]
σ	Razão entre os dois raios = $\frac{r_{int}}{r_{ext}}$	[Adimensional]

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1. CÉLULAS TRONCO	27
2.1.1. Classificação segundo o potencial de diferenciação	27
2.1.2. Classificação segundo a origem	28
2.2.3. Aplicações terapêuticas das CEMs	31
2.2. CULTURA CELULAR IN VITRO	32
2.2.1. Biorreatores	32
2.3. BIORREATOR DE ESCOAMENTO EM VÓRTICES DE TAYLOR	50
2.3.1. escoamentos no Taylor	51
2.3.3. Transporte de oxigênio no BEVT	54
2.3.4. Aplicações do BEVT	56
2.4 Considerações gerais sobre a Revisão Bibliográfica	58
3. OBJETIVOS	60
4. MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1. Células	61
4.2. Meios de cultura e congelamento	61
4.3. Microcarregadores	62
4.4. Frascos de Cultura	63
4.4.1. Biorreator de escoamento em vórtices de Taylor	63
4.5. Fundamentação teórica para caracterização da transferência de oxigênio no BEVT	68
4.6. Metodologia para determinação de modelos empírico de k_{TLA} e k_{sa}	74
4.7. Simulação da capacidade de oxigenação do BEVT para cultivo de CEMs.	76
4.8. Cálculo da tensão de cisalhamento no BEVT	76
4.8.1. Cálculo do tamanho de turbilhões determinado pela escala de Kolmogorov	78

4.9.	Preservação celular	78
4.10.	Procedimento padrão seguido nos cultivos da linhagem hMSC-TERT no BEVT	79
4.10.1.	Ativação da linhagem hMSC-TERT	79
4.10.2.	Procedimento de preparo do inóculo em frasco T	80
4.10.3.	Adesão celular em frasco spinner	81
4.10.4.	Expansão da linhagem hMSC-TERT no BEVT	82
4.11.	Métodos analíticos.....	83
4.11.1.	Análise de viabilidade e densidade celular	83
4.11.2.	Análise da concentração celular baseado no método de MTT	83
4.11.3.	Medição do tamanho de agregados durante o cultivo	83
4.11.4.	Análise de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia.....	84
4.11.4.3.	Análise de amônia	85
4.12.	Velocidade específica de crescimento e fator de expansão.....	85
4.13.	Diferenciação celular	85
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	87
5.1.	Transferência de oxigênio no BEVT	87
5.1.1.	Aferimento do eletrodo de oxigênio dissolvido utilizado nas medições de k_{La}	87
5.1.2.	Determinação dos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio no BEVT	88
5.1.3.	Modelos empírico de k_{La} em função da agitação e aeração.....	96
5.1.4.	Verificação da capacidade de oxigenação do BEVT para cultivo de CEMs	101
5.2.	Tensão de cisalhamento no BEVT	102
5.3.	Cultivo de células estromais mesenquimais no BEVT	106
5.3.1.	Diferenciação celular	118
5.3.2.	Comparação entre os experimentos de cultivo celular realizados	119
5.	CONCLUSÕES	124
6	SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	125

7. REFERÊNCIAS.....	126
8 APÊNDICES.	135

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hierarquia de desenvolvimento potencial nas células animais.	28
Figura 2. Multipotencialidade de células estromais mesenquimais.	30
Figura 3. Biorreatores usados em cultura celular.	35
Figura 4. Relação entre OTR (taxa de transferência de oxigênio), coeficiente volumétrico de transferência de massa e parâmetros hidrodinâmicos apresentados em um biorreator.	38
Figura 5. Respostas obtidas em diferentes condições de cultivo medidos a partir da taxa de dissipação de energia (TDE).	47
Figura 6. a). Desenho esquemático do escoamento laminar-Couette, b). desenho com corte longitudinal do escoamento em vórtices de Taylor, c) representação do escoamento <i>wavy</i> e d) escoamento em vórtices de Taylor turbulento.	52
Figura 7. Protótipo do BEVT utilizado nos experimentos de cultivo da linhagem hMSCs-TERT, com o agitador (cilindro interno) e membrana de silicone.	64
Figura 8. Vistas do cilindro interno de Teflon do BETV. Sendo a). vista inferior com os quatro ímãs, b). vista superior mostrando os furos para saída do ar, c) vista lateral do cilindro e d) vista do cilindro interno (agitador) com a membrana de silicone, junto com a tampa superior do reator.	65
Figura 9. Desenho do BEVT e seus componentes principais.	65
Figura 10. Montagem dos equipamentos empregados para medições de k_La utilizando uma réplica do BEVT com adaptações para possibilitar as medidas de transferência de oxigênio.	68
Figura 11. Modelo esquemático de transferência de oxigênio através da interface GML.	69
Figura 12. Esquema do procedimento empregado pela técnica dinâmica de dessorção-absorção para as medições dos coeficientes de transferência de oxigênio.	72
Figura 13. Procedimento seguido na realização de experimento de cultivo para a expansão da linhagem hMSC-TERT.	79
Figura 14. Resultados obtidos para análise da resposta do eletrodo de OD a ser utilizado nos estudos de transferência de oxigênio do BEVT. Para reproduzir as condições utilizadas nos cultivos no BEVT utilizou-se volume de 60 mL de meio de cultura alfa MEM suplementado com 15% v/v de SFB, a 37°C.	88

Figura 15. Perfis de porcentagem de oxigênio dissolvido em função do tempo para determinação de k_{TLA} (A) e de k_{sa} (B) a vazão de ar constante de 1 vvm e frequências de rotação do cilindro interno de 60, 80, 100 e 120 rpm. Utilizou-se como fase líquida 60 mL de meio alfa MEM a 37°C suplementado com 15% v/v de SFB, na ausência de células.	89
Figura 16. Resultados das determinações do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{TLA}) a frequências de rotação de 60, 80, 100 e 120 rpm e vazões específicas de ar de 0,5, 1 e 2 vvm. Utilizando meio alfa MEM suplementado com 15% de SFB a 37°C. As medições foram realizadas em triplicata a fim de obter o desvio padrão das medições apresentado pelas barras nos pontos experimentais.	91
Figura 17. Resultados das determinações do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{sa}) a diferentes frequência de rotação do cilindro interno de 60, 80, 100 e 120 rpm e vazões específicas de ar de 0,5, 1 e 2 vvm. Utilizando meio de cultivo alfa MEM suplementados com 15% de SFB a 37°C. As medições foram realizadas em triplicata a fim de obter o desvio padrão das medições apresentado pelas barra nos pontos experimentais.	91
Figura 18. Resultados das medidas do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LAs}) realizados sem adição externa de ar e a diferentes frequências de rotação do cilindro interno de 90, 100 e 120 rpm. As condições de operação foram iguais às utilizadas em cultivo com meio alfa MEM suplementados com 15% v/v de SFB a 37°C. As medidas foram realizadas em duplicata.	94
Figura 19. Representação dos efeitos das variáveis do modelo (Equação 4.1) (a) e da superfície de resposta (b) dos valores experimentais obtidos da frequência de rotação do cilindro interno de 60, 80, 100 e 120 rpm e vazões de ar de 0,5, 1 e 2 vvm, para a determinação do coeficiente global de transferência de oxigênio K_{TLA}	97
Figura 20. Comparação entre os valores de K_{TLA} obtidos experimentalmente e os obtidos com o modelo empírico proposto.	98
Figura 21. Representação dos efeitos das variáveis do modelo (a) e da superfície de resposta (b) dos valores experimentais para determinação do coeficiente de transferência de oxigênio (k_{sa}) para valores experimentais obtidos da frequência de rotação do cilindro interno de 60, 80, 100 e 120 rpm e vazões de ar de 0,5, 1 e 2 vvm, quando a transferência de oxigênio ocorre através da interface gás-líquido.	98
Figura 22. Comparação entre os valores de k_{sa} obtidos experimentalmente e os obtidos com o modelo empírico proposto.	100

Figura 23. a) Representação da cinética de crescimento da linhagem celular hMSCs-TERT obtida em frasco spinner no LATECC; b) simulação da variação da concentração de oxigênio dissolvido em condições de regime de batelada com concentração inicial de oxigênio de 50% da saturação com ar e um q_{O_2} de $1,13 \times 10^{-10}$ $\text{mmolO}_2 \cdot \text{célula}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ com a cinética de crescimento dada pela equação 4.1, para diferentes valores do coeficiente k_{TLA}	102
Figura 24. Imagens das CEMs expressando a proteína GFP (emitindo fluorescência na zona verde do espectro visível), aderidas aos microcarregadores no Experimento 1. Cultivo com A) 8 horas; B) 48 horas; C) 72 horas D) 120 horas, E) 144 horas e F) 168 horas.....	107
Figura 25. Experimento realizado a 90 rpm, usando meio alfa MEM suplementado com 15% v/v de SFB, para cultivo com a linhagem hMSC-TERT ancorada ao microcarregador Cultispher-S. Cultivo realizado sem passagem de ar pelo biorreator ($Q = 0$). Em A) é apresentado o valor do pH. Em B) estão os resultados da concentração de substratos limitantes glicose, glutamina e arginina e metabólitos tóxicos lactato e amônia e em C) são apresentados o número de células aderidas aos microcarregadores sem fator de correção e com fator de correção e o número de células em suspensão.	110
Figura 26. Imagens das CEMs expressando a proteína GFP (emitindo fluorescência na zona verde do espectro visível), aderidas aos microcarregadores no Experimento 2. Cultivo com: A) 8 horas; B) 48 horas; C) 72 horas D) 120 horas, E) 144 horas e F) 168 horas.....	111
Figura 27. Experimento realizado a 120 rpm, usando meio alfa MEM suplementado com 15% v/v de SFB, para cultivo com a linhagem hMSC-TERT ancorada ao microcarregador Cultispher-S. Cultivo realizado sem passagem de ar pelo biorreator ($Q = 0$). Em A) é apresentado o valor do pH. Em B) estão os resultados das medidas do tamanho médio dos agregados e o tamanho médio dos microcarregadores representado pela linha horizontal vermelha, em C) estão as concentração de substratos glicose, glutamina e arginina e metabólitos tóxicos lactato e amônia e em D) é apresentado o número de células aderidas aos microcarregadores sem fator de correção e com fator de correção e o número de células em suspensão.....	112
Figura 28. Imagens das CEMs expressando a proteína GFP (emitindo fluorescência na zona verde do espectro visível), aderidas aos microcarregadores no Experimento	

3. Cultivo com: A) 8 horas; B) 24 horas; C) 72 horas D) 120 horas, E) 144 horas e F) 168 horas.	113
Figura 29. Experimento realizado a 110 rpm, usando meio alfa MEM suplementado com 15% v/v de SFB, para cultivo com a linhagem hMSC-TERT ancorada ao microcarregador Cultispher-S. Cultivo realizado sem passagem de ar pelo biorreator $Q = 0$. Em A) é apresentado o valor do pH. Em B) estão os resultados das medidas do tamanho médio dos agregados e o tamanho médio dos microcarregadores representado pela linha horizontal vermelha, em C) estão as concentrações de substratos glicose, glutamina e arginina e metabólitos tóxicos lactato e amônia. Em D) é apresentado o número de células aderidas aos microcarregadores sem fator de correção e com fator de correção e o número de células em suspensão.	115
Figura 30. Experimento realizado a 100 rpm usando meio alfa MEM suplementado com 15% de SFB, para cultivo com a linhagem hMSC-TERT ancorada ao microcarregadores Cultispher-S. Cultivo realizado sem passagem de ar pelo biorreator $Q = 0$. Em A) é apresentado o valor do pH. Em B) é apresentado o número de células aderidas aos microcarregadores sem fator de correção e com fator de correção e o número de células em suspensão. Em C) estão os resultados das medidas do tamanho médio dos agregados e o tamanho médio dos microcarregadores representado pela linha horizontal vermelha, em D) estão as concentrações de substratos glicose, glutamina e arginina e metabólitos tóxicos lactato e amônia. ...	117
Figura 31. Imagens das CEMs expressando a proteína GFP (emitindo fluorescência na zona verde do espectro visível), aderidas aos microcarregadores no Experimento 4. Cultivo com: A) 8 horas; B) 24 horas; C) 48 horas D) 72 horas, E) 96 horas e F) 168 horas após a adição de microcarregadores.	118
Figura 32. Diferenciação em condrócitos (A), (B); osteócitos (C), (D) e adipócitos (E), (F), das células recuperadas do experimento 3.	119
Figura 33. Comparação dos 4 experimentos realizados com a linhagem hMSCs-TERT aderidas ao microcarregadore Cultispher-S no BEVT e no spinner (A) e o diâmetro médio dos agregados (B).	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Doses de hMSC usadas em ensaios clínicos para diferentes doenças. ...	32
---	----

Tabela 2. Medidas de demanda de oxigênio de diferentes tipos de células animais.	39
Tabela 3. Interações entre a célula e seu ambiente dentro de um biorreator.	42
Tabela 4. Estudos de células animais submetidas a diferentes condições de tensão de cisalhamento em diferentes equipamentos.....	46
Tabela 5. Respostas obtidas em cultivo de células animais a diferentes condições de operação em biorreatores.....	47
Tabela 6. Estudos feitos em biorreator do tipo Taylor em biotecnologia e diferentes áreas.....	57
Tabela 7. Composição do meio de cultura alfa-MEM utilizado nos cultivos da linhagem hMSC-TERT	61
Tabela 8. Características do microcarregador Cultispher S (PerCELL Biolytica, Suécia) usado para aderência das células hMSC-TERT	63
Tabela 9. Dimensões e características geométricas do BEVT.	66
Tabela 10. Relações matemáticas empregadas para a otimização do modelo.....	75
Tabela 11. Solução PBS utilizada para retirar resquícios de células mortas do frasco T.	81
Tabela 12. Processo de diferenciação celular.	86
Tabela 13. Resultados da determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio global (k_{TLA}) obtidos a diferentes condições de frequências de rotação do cilindro interno (60, 80, 100 e 120 rpm) e vazões específicas de ar (0,5, 1 e 2 vvm). O biorreator foi operado sem células em condições normais de cultivo de 37°C e meio de cultura alfa MEM com 15 % v/v de SFB.....	90
Tabela 14. Resultados da determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio global (k_{sa}), obtidos a diferentes condições de frequências de rotação do cilindro interno (60, 80, 100 e 120 rpm) e vazões específicas de ar (0,5, 1 e 2 vvm). O biorreator foi operado sem células em condições normais de cultivo de 37°C e meio de cultura alfa MEM com 15 % v/v de SFB.....	90
Tabela 15. Comparação das resistências da transferência de oxigênio no meio de cultivo alfa MEM a 37°C no BEVT. Resistência total do sistema ($1/K_{Ta}$) e as individuais da membrana ($1/k_{ma}$), da película estagnada líquida ao redor da membrana ($1/K_{La}$) e da película estagnada na interface gás-líquido ($1/k_{sa}$).	93

Tabela 16. Comparação dos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio global (k_{TLA}) obtidos neste trabalho com os de outros biorreatores tipo BEVT e outras configurações encontrados na literatura.	95
Tabela 17. Comparação de valores calculados da tensão de cisalhamento média para o BEVT e tamanho de turbilhões calculados pela escala de Kolmogorov para as diferentes frequências de rotação utilizadas neste trabalho.....	103
Tabela 18. Dados comparativos de tensões de cisalhamento em diferentes tipos de biorreatores utilizados para cultivo de células animais.....	104
Tabela 19. Condições de operação nos experimentos de cultivo da linhagem hMSC-TERT utilizando o BEVT.	107
Tabela 20. Comparação dos experimentos realizados com a linhagem hMSCs-TERT aderida aos microcarregadores Cultispher-S com vazão de ar zero através do BEVT.	122
Tabela 21. Comparação dos resultados obtidos por outros estudos realizados com diferentes tipos de células em biorreatores com formação de vórtices encontrados na literatura.	123

1. INTRODUÇÃO

Os avanços obtidos a partir da década de 1990 na área da biotecnologia têm aberto diversos caminhos para promover avanços em diferentes áreas, sendo a medicina umas das mais beneficiadas. Alguns destes avanços têm permitido a produção de biofármacos, proteínas terapêuticas, anticorpos monoclonais entre outros; produzidos por tecnologia celular ou recombinante (BRINDLEY et al., 2011; CHISTI, 2001; DRUGMAND; SCHNEIDER; AGATHOS, 2011). Recentemente, o descobrimento das células tronco e seu grande potencial de uso na medicina regenerativa, despertou grande interesse por ser candidatas com propriedades únicas, oferecendo a possibilidade na cura de vários tipos de doenças consideradas até agora incuráveis.

O interesse pelas células tronco surge como consequência de sua alta capacidade de autorenovação e de diferenciação em múltiplos tipos de células especializadas morfológica e funcionalmente (PRÓSPER; VERFAILLIE, 2003). Estas características podem ser usadas para o tratamento de doenças como leucemia, anemia, Alzheimer, Parkinson, doenças cardiovasculares entre outras (SCHOP, 2010). Trata-se de doenças degenerativas, que não têm podido ser combatidas com sucesso com os métodos tradicionais da medicina. Atualmente outras áreas de pesquisa como, por exemplo, a engenharia de tecidos vem expandindo suas possibilidades de contribuição na produção de órgãos funcionais *in vitro*, a partir do cultivo dessas células para posterior transplante (ARIAS; FELMER, 2009; FOX et al., 2014; TEMPLE, 2001; MARQUES; TEXEIRA; ESTILITA C. P; 2008). Isto tornou o emprego de células tronco uma alternativa viável, resultando numa ampla demanda destas na área clínica.

Existem diversas fontes de obtenção de células-tronco, uma das mais procuradas é a que se encontra nos primeiros estágios da formação do embrião, sendo chamadas de células-tronco embrionárias. Estas células são consideradas como totipotentes, ou seja células com o potencial de gerar todas as células diferenciadas no organismo, porém seus usos são limitados devido as restrições éticas vigentes (MCLAREN, 2001) em vários países do mundo. Ao contrário das células embrionárias, as células adultas multipotentes ou células estromais mesenquimais (CEMs) encontradas na maioria dos tecidos e órgãos de um organismo

adulto como na medula óssea, cordão umbilical, gordura, fígado, pulmão, músculo, fluido amniótico, pâncreas, polpa dentária, pele (SCHUSTER; MARTENS; ITESCU, 2008; ZUK et al., 2002), placenta, cordão umbilical (ARIAS; FELMER, 2009) e cérebro (ALVAREZ-BUYLLA; GARCÍA-VERDUGO; TRAMONTIN AD; 2001). Um dos problemas da utilização de células adultas é sua baixa disponibilidade nestes tecidos, encontrando-se concentrações estimadas menores a 0,0001% na medula (CAPLAN, 2007), dificultando a obtenção e aplicação das mesmas por serem insuficientes para iniciar o tratamento de qualquer doença (JUNG et al., 2012; SCHALLMOSER et al., 2008). Devido aos problemas encontrados na utilização de CEMs, grandes esforços de pesquisa têm sido dedicados para solucioná-los. A solução mais plausível envolve a utilização de novos conceitos de biorreatores capazes de criar um ambiente favorável para o crescimento celular através do controle fino de variáveis de processo como temperatura, pH, oxigênio dissolvido, tensão de cisalhamento e concentração de nutrientes (BARRETT et al., 2010; NEUNSTOECKLIN et al., 2014). Alguns avanços conseguidos no desenvolvimento de biorreatores têm possibilitado melhorias nos cultivos com células em suspensão, porém, pouco progresso tem-se conseguido no cultivo de células dependentes de ancoramento como as CEMs.

Várias opções de biorreatores têm sido divulgadas na literatura para produção em larga escala de células *in vitro* (LEIB; PEREIRA; VILLADSEN, 2001; NIENOW, 2006; SANTIAGO; GIORDANO; SUAZO, 2011; TANZEGLOCK, 2008). O desenvolvimento destes equipamentos e de metodologias de cultivo para várias linhagens dessas células têm permitido uma visão mais ampla e detalhada das dificuldades e necessidades que são típicas de células com funcionalidades tão complexas como as células tronco. A dimensão dessa complexidade só foi aferida recentemente através de pesquisas que demonstram como as células animais são capazes de sensoriar uma diversidade de sinais físicos e químicos no ambiente circundante e responder de forma precisa e direcionada em prol de seus interesses de preservação da vida (CESARZ; TAMAMA, 2015; LADOUX; NICOLAS, 2012; LUO et al., 2011).

Dois dos fatores físicos que vêm preocupando há várias décadas os engenheiros de bioprocessos que desenvolvem novos tipos de biorreatores para cultivo de células animais são as formas de agitação e aeração (BAIRD; RAO; SHEN, 1993; FLEISEHAKER JR; SINSKEY, 1981; JANES; THOMAS; CALOW, 1987; TRAMPER, 1995). Estas variáveis de processo são muito importantes para a

homogeneização e oxigenação do meio líquido onde a célula permanece em contato com os nutrientes em condições rigidamente controladas de temperatura, pH e concentração de nutrientes (BILGEN; CHANG-MATEU; BARABINO, 2005; DOS SANTOS, 2013; SANTIAGO; GIORDANO; SUAZO, 2011; SINGH, 1999; TANZEGLOCK, 2008). A movimentação do líquido deve ser suficiente para se atingir alto grau de mistura e, por outro lado, moderadamente leve para não lisar uma célula desprovida de parede celular e que tem a capacidade de interpretar e responder fisiologicamente a níveis e tipos diferentes de forças hidrodinâmicas.

Com relação à aeração por borbulhamento, técnica herdada de bioprocessos com células protegidas por parede celular como bactérias e fungos, a qual foi explorada com sucesso numa ampla faixa de vazões de aeração, não pode ser utilizada no cultivo de células animais devido à extrema fragilidade destas por carecer da organela protetora (CROUGHAN; HAMEL; WANG, 2006; DUNLOP; NAMDEV, 1994). O dano causado às células ocorre devido a formação, coalescência e ruptura na interfase gás-líquido das bolhas (GARCIA-BRIONES; CHALMERS, 1994; SCHNEIDER et al., 1995; WU, 1995). Como uma tentativa de evitar a morte celular por esses processos, tem-se validado o uso de agentes “protetores” para aumentar a viscosidade do meio, porém, essa alternativa dificulta a transferência de massa e compromete os processos de purificação do produto final (AUNINS; HENZLER, 1993 *apud* OZTURK, 1996; PAPOUTSAKIS, 1991a; WU, 1995). Outra ideia bastante utilizada para evitar a presença de bolhas durante a oxigenação de biorreatores em larga escala é a utilização de membranas de polímeros permeáveis ao oxigênio como o teflon ou silicone. Porém, o uso desta tecnologia está limitado a biorreatores de tamanhos de equipamentos de umas poucas dezenas de litros ou que usam sistemas de agitação muito cisalhantes para aliviar a resistência da membrana ao transporte de oxigênio (FLEISEHAKER JR; SINSKEY, 1981).

Outra alternativa de biorreator recente vem sendo estudada no Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares (LATECC) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos. Trata-se do biorreator de escoamento em vórtices de Taylor (BEVT), o qual consiste de dois cilindros concêntricos, onde o interno permanece em rotação, atuando como agitador, e o externo permanece fixo. O meio de cultivo encontra-se localizado no espaço anular entre os dois cilindros num tipo especial de escoamento em vórtices toroidais anulares que será detalhado mais

adiante. O oxigênio é fornecido por difusão através de uma membrana de silicone que constitui a própria parede do cilindro interno, oxigenando o meio sem formação de bolhas. O interesse pela hidrodinâmica apresentada em um sistema de cilindros concêntricos, tem sido iniciada a partir do ano 1687 por vários pesquisadores incluindo I. Newton, W. J. Harrison, Stokes e Lord Rayleigh entre outros, que apresentaram as primeiras hipóteses da estabilidade e instabilidade de um fluido não viscoso. A partir desses critérios foi construído o primeiro equipamento por Mallock em 1888, o viscosímetro e um ano depois Couette apresentou seu estudo da estabilidade quando apenas o cilindro externo gira, observando que o movimento do fluido é semelhante a um corpo sólido, de aqui o nome de escoamento laminar Couette. Alguns anos depois em 1923, o desenvolvimento matemático feito por G. I. Taylor em 1923, apresentando uma teoria para fluidos viscosos estabelecendo critérios da presença da hidrodinâmica axissimétrica e as velocidades de rotação crítica para permitir a formação dos padrões de fluxo. A partir destes estudos e os realizados por Coles em 1965 foram definidas as transições quando o cilindro interno é mantido em movimento e o externo em repouso, obtendo quatro escoamentos principais, sendo o inicial apresentado como um escoamento laminar-Couette estável com movimento circunferencial, seguido por um segundo escoamento apresentado a uma velocidade crítica do cilindro interno, caracterizado pela formação de vórtices toroidais localizados ao longo do cilindro interno. Estes vórtices toroidais são caracterizados por apresentar movimento do fluido em três direções, azimutal, radial e axial. Com um incremento na velocidade é sobreposto um escoamento com a formação de ondas sobre os vórtices de Taylor e finalmente com um incremento suficientemente alto na velocidade de rotação o escoamento é tornado turbulento. O primeiro equipamento de cilindros concêntricos com parede rotativa (RWV) para venda comercial foi construído pela Administração Nacional da Aeronáutica e do Espaço (NASA) em 1992. Este dispositivo ao qual são atribuídas características de “microgravidade”, apresenta dois tipos de configurações no eixo horizontal, sendo um deles o frasco de alta aspecto recipiente rotativo (HARV), com rotação do cilindro externo, e o frasco lateral de giro lento (STLV), apresentando vários modos de rotação dos dois cilindros, na mesma direção ou em direções contrárias ou com a rotação de um dos cilindros somente. Algumas das desvantagens observadas nestes equipamentos foram a dificuldade para seu escalonamento, pobre transferência de massa e mudanças no desenvolvimento normal de microrganismos (FRANCIS; CONNOR; SPAULDING, 1997; HAUT et al., 2003a; SIECK et al., 2013).

Por outra parte o frasco de cilindros concêntricos no eixo vertical tem sido avaliado para cultura celular com resultados competitivos e a diferença do RWV apresenta facilidade no escalonamento (JULIAN; AL-RUBEAI, 2005). A prova do

princípio de utilização deste equipamento, BEVT, para cultivo de células dependentes de ancoramento em condições não limitantes de cisalhamento e de transferência de oxigênio foi demonstrado por Santiago em 2007, com cultivos da linhagem de célula de mamífero CHO-K1 amplamente conhecida em aplicações industriais de bioprocessos. Apesar desse sucesso inicial, há poucos dados disponíveis sobre a caracterização deste biorreator numa ampla faixa de condições de operação para fazer avaliações mais realista e completa da potencialidade do mesmo. Nesse contexto, o desenvolvimento de processos de cultivo *in vitro* das CEMs combinada com as qualidades oferecidas por este biorreator, apresenta grande importância para o avanço nas aplicações da biotecnologia. Assim, o emprego inédito deste equipamento para avaliar o processo de cultivo de células estromais mesenquimais é oportuno e apropriado por causa da baixa tensão de cisalhamento que produz, e pela alta capacidade de transferência de oxigênio promovendo um ambiente homogêneo devido à formação de vórtices assimétricos considerada favorável para o cultivo de células ancorantes (CURRAN; BLACK, 2005, 2004; SANTIAGO; GIORDANO; SUAZO, 2011; TANZEGLOCK, 2008). Frente ao contexto descrito nos parágrafos anteriores, no presente estudo se propõe a avaliação da expansão de CEMs em um protótipo em escala laboratorial (~60 mL) de biorreator de escoamento em vórtices de Taylor (BEVT) de baixo cisalhamento e com uma adequada oxigenação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CÉLULAS TRONCO

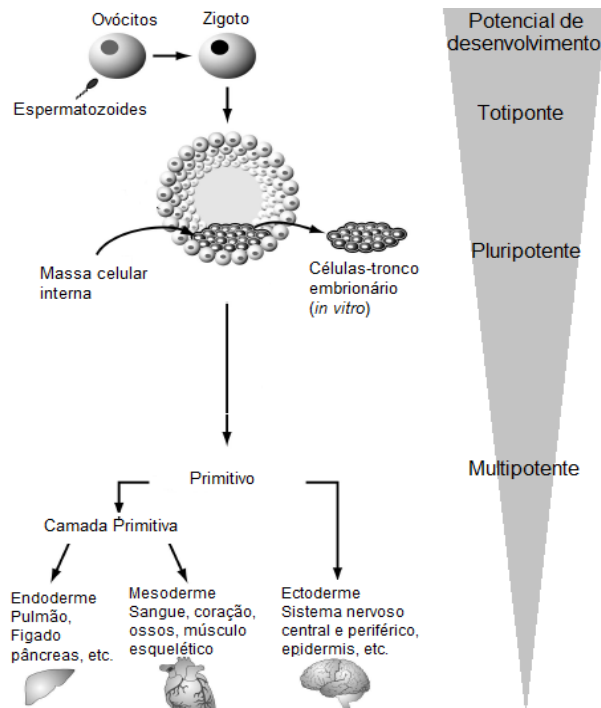
A utilização de células-tronco na área médica começou a ser uma realidade nas últimas décadas, sendo aplicadas na regeneração de tecidos e órgãos e no tratamento de doenças graves ou incuráveis, como câncer, Alzheimer, Parkinson, diabetes, artrite, depressão, esquizofrenia e doenças cardíacas (JUNG et al., 2012). Este crescente avanço é devido as suas características de auto-renovação e potencial de diferenciação. A auto-renovação é entendida como a capacidade que as células-tronco têm de se proliferar, gerando células não especializadas, idênticas às originais ou células progenitoras especializadas, quando em condições favoráveis, o que faz referência ao seu potencial de diferenciação em múltiplos tipos celulares comprometidos com funções específicas (GOLTRY et al., 2009).

2.1.1. Classificação segundo o potencial de diferenciação

Os termos toti, pluri e multipotente são comumente usados para descrever a potencialidade que uma célula tem de diferenciar-se nos diversos tipos de células especializadas e tecidos (Figura 1).

As totipotentes são células com a capacidade de formar um organismo completo, encontrando-se nas primeiras horas após a fertilização. As células pluripotentes têm a capacidade de diferenciar-se em todos os tipos de células e tecidos das três camadas germinativas primárias (ectoderma, mesoderma e endoderma), porém não podem dar origem a um indivíduo completo. Já as células multipotentes possuem a capacidade de gerar células e tecidos maduros a partir de múltiplas linhagens específicas da camada germinativa onde elas se encontram (DONOVAN; GEARHART, 2001; SCHOP, 2010)

Figura 1. Hierarquia de desenvolvimento potencial nas células animais.



Adaptado de Lakshmiathy; Chesnut; Thyagarajan, (2009)

2.1.2. Classificação segundo a origem

As células-tronco também podem ser divididas como embrionárias ou adultas. As células embrionárias são encontradas nas etapas iniciais do desenvolvimento embrionário. Por razões éticas, estas células apresentam limitações para o uso terapêutico, já que resulta na destruição do embrião. As restrições ao uso de células embrionárias, também se baseiam nas alterações apresentadas nos processos de metilação e sua relação com as alterações genéticas que impulsionam o processo de progressão tumoral (BAYLIN; HERMAN, 2000; MCLAREN, 2001).

Uma alternativa que vem sendo explorada na intenção de se minimizar os entraves éticos é a obtenção de células-tronco pluripotentes a partir de células especializadas geneticamente modificadas, chamadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), mas que apresentam o mesmo risco de formação de tumores, assim como as células-tronco embrionárias autênticas (FOX et al., 2014; YAMANAKA, 2007).

As células tronco adultas são divididas em germinativas e somáticas. As germinativas são células unipotentes que dão origem aos ovócitos e espermatozoides.

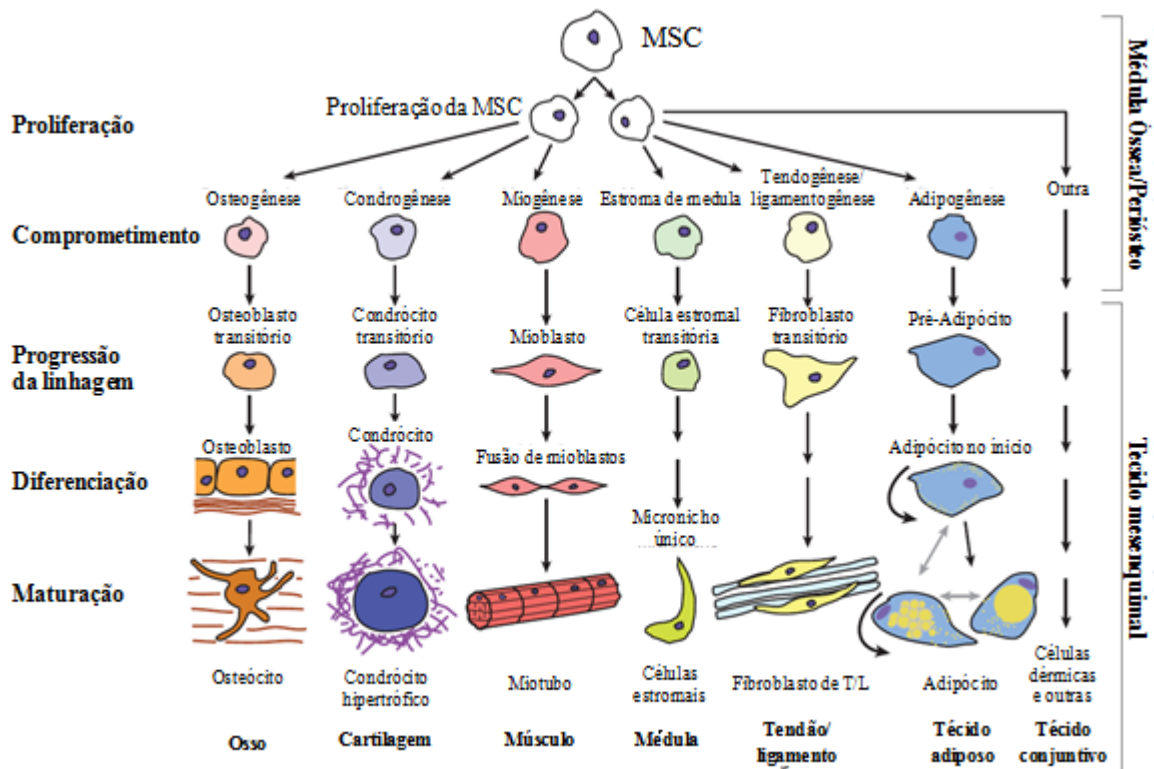
As células somáticas são consideradas multipotentes (GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008), e são encontradas em maior quantidade na medula óssea e tecido adiposo (gordura), mas também estão presentes no fígado, pulmão, músculo, líquido amniótico, pâncreas, polpa dentária, pele (SCHUSTER; MARTENS; ITESCU, 2008; ZUK et al., 2002), placenta, cordão umbilical (ARIAS; FELMER, 2009) e no cérebro (TEMPLE, 2001). A maioria dos tecidos adultos funcionam como um reservatório de células-tronco somáticas multipotentes, as quais permanecem vinculadas às funções de renovação específicas do órgão do qual fazem parte (por exemplo, as células da medula óssea são capazes de produzir qualquer componente do sangue e do sistema imune), mas que também têm a capacidade latente de renovar outros órgãos ou tecidos (DONOVAN; GEARHART, 2001; SCHOP, 2010).

2.1.3. Células estromais mesenquimais

As células estromais mesenquimais (*mesenchymal stromal cells*, CEMs) são um tipo de célula-tronco somática que depende de ancoramento e cresce em monocamadas sobrepostas. Possuem uma extensiva capacidade de proliferação e a habilidade de diferenciar-se em osteócitos, condrócitos e adipócitos (Figura 2) tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BAKSH; SONG; TUAN, 2004; PITTENGER et al., 1999), além de relatos de ter o potencial de se diferenciar em outros tipos celulares como hepáticas, neuronais, cardíacas, renais, pancreáticas, de músculo entre outras, evidenciando sua plasticidade (SCHOP, 2010; ZUK et al., 2002).

A forma de divisão das CEMs é assimétrica, ou seja, a partir de uma única célula, geram duas células filhas diferentes, sendo uma idêntica à célula progenitora (indiferenciada) e outra comprometida com a via de diferenciação. Deste modo, há uma manutenção do número de células estromais nos tecidos, enquanto geram células diferenciadas em resposta ao microambiente no qual a célula está inserida. Esta habilidade de auto-renovação e replicação está ligada com o comprimento dos telômeros, o qual é reduzido com cada divisão e reflete a idade da célula (GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008).

Figura 2. Multipotencialidade de células estromais mesenquimais.



Adaptado de Schop, (2010)

A linhagem de células estromais mesenquimais humanas, hMSC-TERT, derivada da medula óssea, é imortalizada pela expressão da subunidade catalítica da enzima telomerase, a hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*). A expressão desta, neutraliza o encurtamento progressivo dos telômeros que ocorre a cada divisão celular, inibindo a senescência celular (ALLSOPP; HARLEY, 1995). A expressão da hTERT restaura o telômero, permitindo que as células tenham pouca ou nenhuma variação nas características biológicas mantendo seu caráter multipotente (auto-renovação e capacidade de diferenciação) durante uma série de passagens (ABDALLAH et al., 2005). Esta linhagem é considerada um modelo de células-tronco para várias pesquisas pois, permitiu-se a comparação de resultados obtidos através de seu uso na padronização de experimentos com células-tronco (MENDONÇA, 2013; SANCHES, 2010; WEBER et al., 2007).

2.2.3. Aplicações terapêuticas das CEMs

As pesquisas utilizando células-tronco adultas na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos está avançando desde o início do século XX, ao contrário do uso de células embrionárias, que diminuiu drasticamente devido às questões éticas, aos relatos de riscos de formação de tumores, como mencionado anteriormente, e às rejeições pelo organismo receptor quando usadas em transplantes. As células-tronco adultas e células especializadas (diferenciadas) normalmente não geram tumores ou rejeições quando extraídas do mesmo paciente (autólogas) ou de doadores compatíveis (células alogênicas); sendo estas as mais empregadas para as pesquisas em terapia celular (GOLTRY et al., 2009; SCHOP, 2010).

A medicina regenerativa busca a substituição de células danificadas por células funcionais para restituir as funções de determinado órgão ou tecido; o emprego desta técnica pode ser uma alternativa ao tratamento de algumas doenças degenerativas como Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla, infarto do miocárdio, anemia, diabetes, leucemia, problemas ósseos entre outras lesões, tais como queimaduras, úlceras, doenças metabólicas, etc (ARIAS; FELMER, 2009; JUNG et al., 2012; TEMPLE, 2001). No caso da engenharia de tecidos, um tecido é primeiro construído *in vitro*, para posteriormente ser transplantado. Um exemplo desse tipo de aplicação é o uso de condrócitos cultivados para o tratamento de pacientes com defeitos cartilagosos. Nesta área, já são encontrados produtos comerciais para suporte celular que auxiliam na formação *in vitro* do tecido transplantado (GOLTRY et al., 2009; SCHOP, 2010)

As CEMs são encontradas no organismo humano em reservas com concentrações muito baixas, sendo quantidades menores de 0,0001% na medula, insuficientes para aplicações terapêuticas (CAPLAN, 2007; PITTENGER et al., 1999). Devido a esta limitação somada às altas doses utilizadas, torna-se necessário a pesquisa da produção intensificada dessas células, sendo a expansão *in vitro* em biorreatores, uma alternativa viável para obter o número suficiente de células para a aplicação na área clínica. Jung et al., (2012) lista a quantidade média de células-tronco adultas a serem necessárias no tratamento de algumas doenças (Tabela 1).

Tabela 1. Doses de hMSC usadas em ensaios clínicos para diferentes doenças.

DOENÇA	QUANTIDADE DE CÉLULAS INJETADA
Leucodistrofia metacromática	2-10 x 10 ⁶ células/kg
Doença do enxerto contra hospedeiro	0,4-9x10 ⁶ células/kg 2-8x10 ⁶ células/kg
Esclerose múltipla	1-2x10 ⁶ células/kg 1,5-100x10 ⁶ células/paciente
Infarto do miocárdio	0,5-5x10 ⁶ celulas/kg 48-60x10 ⁶ células/paciente
Esclerose lateral amiotrófica	11-120 x 10 ⁶ células/paciente
Osteoartrite	13 x 10 ⁶ células/paciente
Lesão medular	8 x 10 ⁶ , 40x10 ⁶ , 50x10 ⁶ células/paciente em locais diferentes
Diabetes	1,2-1,5 x10 ⁶ células/kg

Adaptado de (JUNG et al., 2012)

2.2. CULTURA CELULAR IN VITRO

2.2.1. Biorreatores

O desenvolvimento de métodos de cultivo escalonáveis, reproduzíveis e controláveis envolvem a obtenção de altas concentrações celulares sem reduzir a qualidade do produto, condições indispensáveis para as aplicações em tratamentos clínicos. Tais requisitos podem ser providenciados pelos biorreatores. Estes sistemas normalmente buscam uma transferência de massa eficiente (facilitando o acesso ao nutrientes e oxigênio), facilidade na manipulação, monitoramento e controle dos parâmetros do processo de cultivo; tais como o pH e temperatura, além da minimização do estresse mecânico e da agregação (GODARA; MCFARLAND; NORDON, 2008; WANG et al., 2005).

A importância da escolha da geometria do biorreator e do agitador para obter as melhores condições de operação vão depender principalmente do tipo de célula, a taxa de consumo de oxigênio e a resistência ao estresse hidrodinâmico gerado pelo fluido; podendo ser pouco sensíveis, como acontece com as células vegetais, ou caso contrário, como as células animais em suspensão ou aderidas a microcarregadores em cultivo tridimensional; que são sensíveis às condições hidrodinâmicas geradas no microambiente de cultivo (CHERRY, 1993; LEUNG et al., 2011; SCHOP, 2010; SCHOP et al., 2010; WANG et al., 2005).

A forma de expansão para células dependentes de ancoramento mais comum é a cultura estática, em recipientes como o frasco T, mantido em uma incubadora de CO₂ para proporcionar uma atmosfera adequada para crescimento (BUTLER, 2004), tendo como vantagem ser descartável, porém, como desvantagens o emprego de muita mão de obra para expansão de grandes quantidades de células, aumentando o risco de contaminação em cada passagem (FERRARI et al., 2012).

Vários tipos de geometria tanto de biorreatores quanto de agitadores são usados atualmente em cultura animal em escala laboratorial. O mais empregado é o cultivo agitado como no caso do frasco spinner (Figura 3A), que são comumente feitos de vidro ou plástico, contendo um agitador magnético centralizado que pode-se encontrar em diferentes geometrias (NIEBRUEGGE et al., 2009). A configuração de agitador mais empregado em cultura animal por minimizar o estresse hidrodinâmico e favorecer o crescimento celular é o agitador tipo bulbo (MENDONÇA, 2013; NIEBRUEGGE et al., 2009; SANCHES, 2010; SANTOS et al., 2007). O spinner é comumente operado em batelada e apresenta como desvantagem, difícil escalonamento, aglomeração depois certo tempo de cultivo e baixa homogeneidade oferecida (CHERRY; PAPOUTSAKIS, 1986; MENDONÇA, 2013), gerando gradientes de concentração tanto de nutrientes quanto de oxigênio, levando à necessidade do incremento da agitação que propiciaria um aumento no estresse hidrodinâmico (WANG et al., 2005).

Outro tipo de biorreator é o de parede rotativa (Figura 3B) que consiste em dois cilindros concêntricos contendo no espaço anular o meio de cultivo. O cilindro externo pode ser mantido fixo enquanto o interno permanece girando, simulando ambiente de microgravidade quando é operado horizontalmente. Este biorreator tem várias

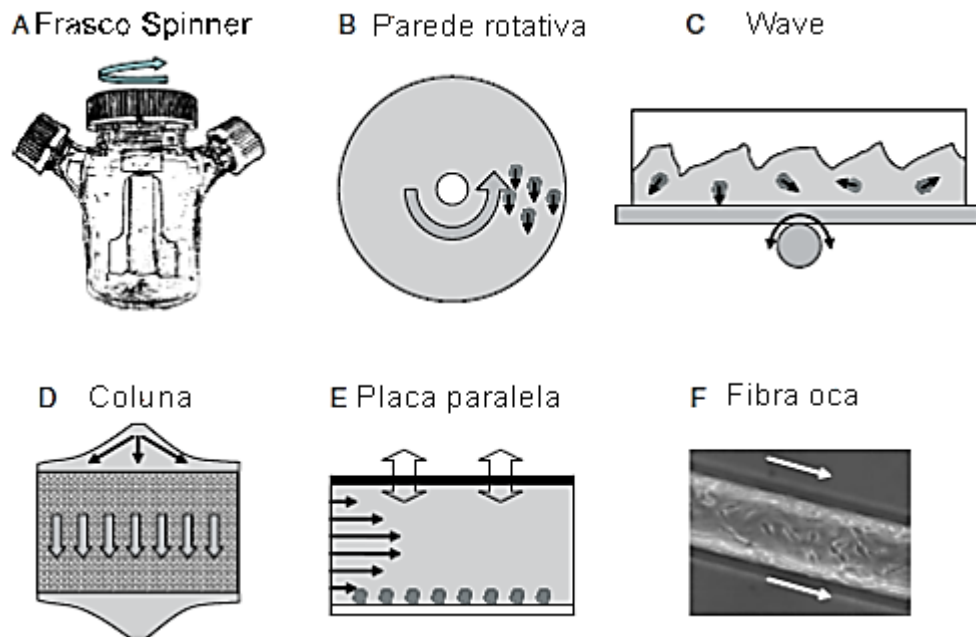
vantagens para a cultura de células animais por apresentar baixa tensão de cisalhamento e uma adequada transferência de massa para cultura tridimensional permitindo uma alta proliferação celular. A oxigenação neste tipo de biorreatores pode ser proporcionada através de uma membrana de silicone ao redor do cilindro interno (GODARA; MCFARLAND; NORDON, 2008; WANG et al., 2005). O biorreator de escoamento de Taylor ou Taylor-Couette é um tipo de biorreator de parede rotativa, podendo ser utilizado em condições de operação em batelada ou contínuo.

O biorreator tipo *Wave* consiste em uma bolsa estéril de plástico flexível apoiada em uma plataforma móvel (Figura 3C). Este biorreator permite condições de trabalho em batelada, batelada alimentada e perfusão. As características que o diferencia dos outros tipos de biorreatores é que não requer esterilização (CHICO E. RODRÍGUEZ G, FIGUEREDO A., 2008).

Entre outras configurações de biorreatores, encontra-se o de fibra oca, sua geometria assemelha-se com os vasos sanguíneos, permitindo suprir as necessidade de nutrientes difundidos através dos poros das fibras, eliminação dos resíduos e diminuição das forças hidrodinâmicas apresentadas em biorreatores agitados e da aglomeração (DOS SANTOS, 2013). O meio de cultivo é distribuído através das fibras enquanto as células encontram-se na superfície delas (Figura 3F); este biorreator opera em perfusão (MARTIN; VERMETTE, 2005) mas, apresenta problemas de escalamento devido à presença de gradientes apresentando um ambiente de cultura não homogêneo (WANG et al., 2005).

O biorreator tipo placas paralelas tem sido estudado principalmente por proporcionar taxas de fluxo laminares específicas para o estudo do efeito da tensão de cisalhamento sobre monocamadas de células dependentes de ancoramento (JOSHI; ELIAS; PATOLE, 1996). Este opera em perfusão. O reator de colunas (Figura 3F) usa sistemas de aeração tanto para oxigenar quanto para agitar o meio. Estes biorreatores e os acima mencionados são alguns dos reatores com as configurações mais empregadas para cultivo animal.

Figura 3. Biorreatores usados em cultura celular.



Adaptado de Godara; Mcfarland; Nordon, (2008).

Entre os parâmetros necessários para garantir o desenvolvimento de um cultivo em um determinado biorreator, a forma do controle da transferência de oxigênio tem grande importância, por garantir um adequado desenvolvimento fisiológico do cultivo celular, principalmente quando se tem alta densidade celular em produção de larga escala. As limitações do oxigênio podem levar a mudanças rápidas na fisiologia celular, metabolismo, produtividade, qualidade e até morte celular por mecanismos de apoptose, caso não seja adequadamente fornecida a quantidade ideal de oxigênio dissolvido no meio de cultura (KINNEY; SARGENT; MCDEVITT, 2011; PEIXOTO P. M., COELHO V. P. R., CASTILLO L R., 2008).

2.2.1.1. Transferência de oxigênio e cultura celular

Considerando a pouca solubilidade do oxigênio em água, na ordem de 7 partes por milhão ou 7 mg/L a 35 °C e a pressão atmosférica, se faz necessária a suplementação deste elemento ao longo do processo. Algumas alternativas para evitar esta limitação tem se apresentado, principalmente para sistemas de tratamento de águas em larga escala (MARTIN; NERENBERG, 2012), processos fermentativos

ou cultura celular (CERRI, 2009; FLEISEHAKER JR; SINSKEY, 1981; SANTIAGO; GIORDANO; SUAZO, 2011; WRÓNSKI et al., 1999).

No caso do cultivo, o fornecimento de oxigênio pode ser conseguido por aeração superficial, como é o caso de sistemas de cultivo estático, como o frasco T, onde a transferência de gases (oxigênio e dióxido de carbono) acontece na interface gás-líquido. Outra das possibilidades para suprir esta deficiência, consiste em aspersores localizados no fundo do biorreator ou através do agitador, que proporcionam bolhas de ar de tamanhos controlados pela hidrodinâmica apresentada no reator, proporcionando uma alta transferência de massa, necessária para alguns processos industriais (MOREIRA et al., 1995a).

Porém, em cultivo de células animais o dano causado por sistemas de aeração direta foi reportado na literatura, pela introdução de forças adicionais à agitação devido às formações, coalescências, ascensões de bolhas de gás no meio e ruptura destas na interface gás-líquido, podendo provocar forças suficientemente altas para causar morte celular (CHISTI, 2001; DORAN, 1995), além dos problemas associados com a formação de espuma causados por este tipo de aeração (KUNAS; PAPOUTSAKIS, 1990, 2009; WU, 1995).

Esta situação pode ser solucionada com o uso de agentes protetores como Dextran, Pluronic-F68, Metilcelulose (CMC) entre outros (GOLDBLUM et al., 1990; PAPOUTSAKIS, 1991a; VAN DER POL; PAIJENS; TRAMPER, 1995; WU, 1995) Mesmo assim, as dificuldades apresentadas nas eventuais etapas de purificação, na limitação na transferência de massa ou aumento na osmolaridade do meio, podem se apresentar com o uso destes agentes (MOREIRA et al., 1995a; SEN; KALLOS; BEHIE, 2002).

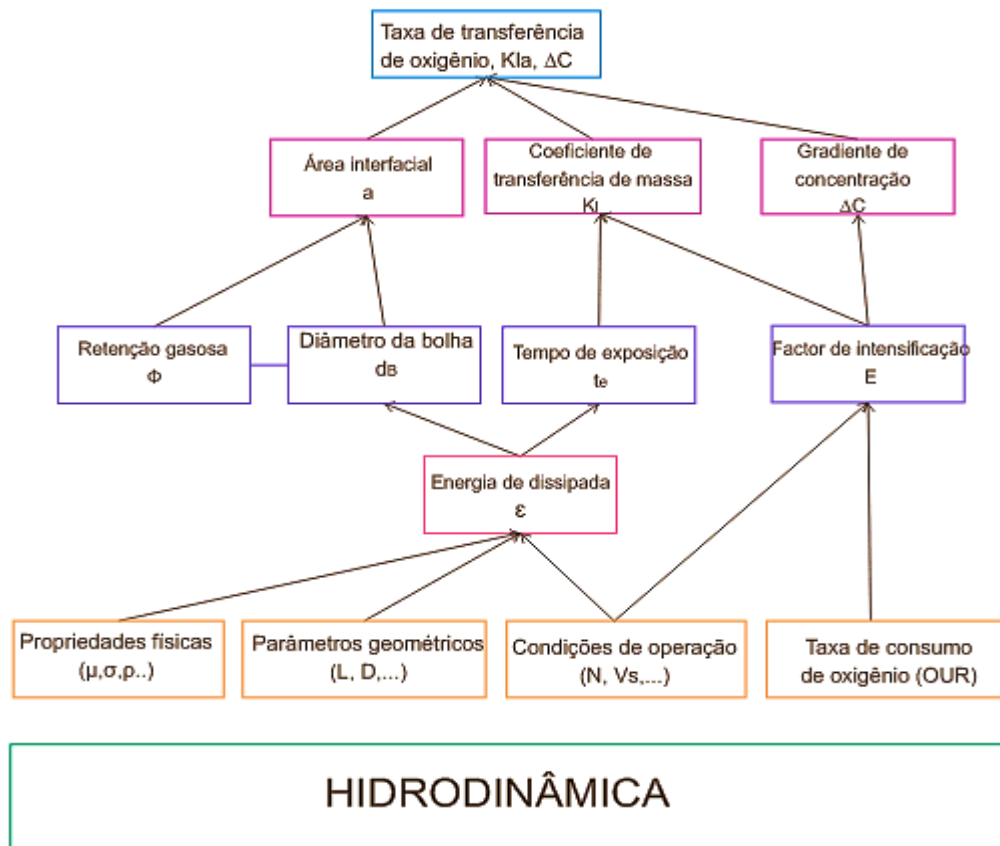
As relações existentes entre a transferência de massa, a tensão de cisalhamento e outros parâmetros importantes do cultivo, podem ser observadas na Figura 4, sendo estes dois, os mais críticos no desenvolvimento e escalamento de biorreatores.

Para pequenas concentrações celulares com pouca demanda de oxigênio, é possível satisfazer a demanda apenas pela difusão apresentada na interface presente na superfície do meio de cultivo. Contudo, com um incremento na concentração celular ou no volume do líquido, com a redução da relação superfície volume, a concentração de oxigênio torna-se um fator limitante para o desenvolvimento do

cultivo (BUTLER, 2004; OZTURK, 1996). Por causa disto, com o objetivo de aumentar a oxigenação sem causar danos à célula, opta-se pelo uso de membranas permeáveis microporosas ou densas, eliminando a presença de bolhas e as forças associadas à sua formação (GOOCH; FRANGOS, 1993). Fleishaker JR e Sinskey, (1981) estudaram as limitações de crescimento em um cultivo de células dependentes de ancoramento quando a transferência de massa no cultivo era dada somente pela área superficial do líquido, mostrando ser incapaz de suportar a demanda de oxigênio de uma cultura celular em comparação à aeração através de uma membrana de silicone comercial, que podia chegar a manter aerados volumes de cultivo de até 10 litros com bons resultados de densidade celular; tornando-se uma alternativa viável e adequada para cultura em larga escala. Ozturk, (1996) comparou diferentes sistemas de aeração, encontrando adequado o uso de membrana de silicone, capazes de proporcionar suficiente oxigenação para suportar densidade celular de 5×10^7 células/mL com uma vazão de ar de 0,1 vvm. Sendo necessário para cultivo uma concentração de oxigênio dissolvido entre 40 e 60 % de saturação de ar (GÓDIA, CAIRÓ, 2006).

As limitações de oxigênio podem induzir mudanças no metabolismo, aumentando a produção de lactato, consumo de glicose e glutamina e produzindo menor quantidade de moléculas ATP (adenosina trifosfato). Mesmo quando a taxa de crescimento não é afetada, o consumo de ATP para a manutenção celular apresenta variação dependendo do nível de oxigenação, como no caso da sua diminuição em condições de saturação próximas a 60 % quando comparado à níveis mais baixos (ZUPKE; SINSKEY; STEPHANOPOULOS, 1995). Porém, outros estudos relataram a diminuição da concentração celular devido a limitações de oxigênio (ABU-REESH; KARGI, 1991; JANES; THOMAS; CALOW, 1987). Sendo o oxigênio um dos nutrientes mais importantes para as células por fazer parte de ciclos metabólicos aeróbios importantes e apresentar uma baixa solubilidade (mesmo este sendo consumido a mesma taxa da glicose que está em maior concentração) em meio de cultivo, podendo ser muitas vezes, o fator limitante do sucesso *in vitro* de vários processos (MARTIN; VERMETTE, 2005).

Figura 4. Relação entre OTR (taxa de transferência de oxigênio), coeficiente volumétrico de transferência de massa e parâmetros hidrodinâmicos apresentados em um biorreator.



Adaptado de Garcia-Ochoa e Gomez, (2009).

2.2.1.2. Demanda de oxigênio

Devido a sua importância, o oxigênio deve ser continuamente fornecido, seja por sistemas de agitação ou de aeração como foi mencionado. Mesmo assim, um excesso de oxigênio no meio que rodeia as células também é prejudicial, induzindo a presença de radicais livres no meio que são citotóxicos podendo causar danos oxidativos (CHICO, RODRÍGUEZ, FIGUEREDO, 2007) e envelhecimento prematuro das células. Por isto é necessário o conhecimento da demanda de oxigênio ($\text{mol O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) da população celular, que pode ser usada como um indicador de viabilidade celular (FLEISEHAKER JR; SINSKEY, 1981). Esta grandeza pode ser definida pela equação 2.1.

$$DO = Q_{O_2} * X \quad (2.1)$$

Sendo Q_{O_2} a velocidade específica de consumo de oxigênio e X a concentração celular.

O consumo específico de oxigênio (Q_{O_2}) das células CHO foi reportado como sendo aproximadamente igual a $2,85 \times 10^{-13} \text{ mol O}_2 \text{ cel}^{-1}\text{h}^{-1}$ para cultivo em batelada e $2,54 \times 10^{-13} \text{ mol O}_2 \text{ celula}^{-1}\text{h}^{-1}$ para contínuo (DUCOMMUN et al., 2000). No entanto, tais valores dependem das condições de crescimento da cultura, da concentração de certas substâncias no meio, como a presença do soro, do tipo de células, das próprias características dela em resposta às forças de cisalhamento, o tempo e a porcentagem de oxigênio dissolvido nas quais elas foram mantidas (DANE; BROADFOOT; PAUL, 1963; DUCOMMUN et al., 2000; HEIMBURG et al., 2005) (Tabela 2).

Para duas linhagens de adipócitos humanas primária e 3T3-L1 o valor da demanda de oxigênio encontradas foram de $0,591 \pm 0,302$ e $1,231 \pm 0,332 \text{ nmol min}^{-1}$ respectivamente, para uma concentração de $0,4 \times 10^6$ células indiferenciadas em meio com 10 % de soro fetal bovino; enquanto na ausência de soro foi consideravelmente maior encontrando-se a $2,865 \pm 0,219$ e $2,886 \pm 0,69 \text{ nmol min}^{-1}$ para a mesma concentração de células diferenciadas (HEIMBURG et al., 2005).

Tabela 2. Medidas de demanda de oxigênio de diferentes tipos de células animais.

QO₂x 10¹² (mmol O₂/ célula*h)	Linhagem	Referências
113	Células estromais mesenquimais	PATTAPPA et al., (2011)
5	FS-4 (células humanas diploides)	J; JR; SINSKEY, (1981)
43	Medula óssea	PHILLIPS, H. J.; ANDREWS, R. V, (1960)**
285	CHO	DUCOMMUN et al., (2000)
37	Célula de fígado (humana)	DANE; BROADFOOT; PAUL, (1963)
28	Célula de olho (humana)	Phillips, H. J.; Andrews, R. V, (1960)*

40	Célula de intestino (humana)	Phillips, H. J.; Andrews, R. V, (1960)*
----	------------------------------	---

*obtido de WAGNER; VENKATARAMAN; BUETTNER, (2011)

**obtido de J; JR; SINSKEY, (1981)

Para célula de hibridoma de rato foi relatado que a influência da taxa de consumo de oxigênio é independente da concentração de oxigênio dissolvido entre 25 % e 75 % de saturação de oxigênio (FLEISEHAKER JR; SINSKEY, 1981); mas para células vegetais esta faixa de independência se encontra entre 50 e 100 % de saturação de ar (LAMBOURSAIN; ST-ONGE; JOLICOEUR, 2002), evidenciando a variabilidade dessa dependência entre tipos diferentes de células.

2.2.1.2. Forças hidrodinâmicas em cultivo celular

A sensibilidade apresentada pelas células animais ao ambiente no qual estão se desenvolvendo é devido à ausência de uma parede celular rígida de proteção, que fazem delas suscetíveis ao estresse hidrodinâmico, diferente do que acontece com as células microbianas (DUNLOP; NAMDEV, 1994).

A tolerância de uma linhagem particular a esses tipos de estresses depende de vários fatores como: a magnitude das forças hidrodinâmicas locais produzidas por uma condição específica de agitação; a geometria do biorreator; o tempo de exposição ao cisalhamento e a geometria do agitador (Tabela 3). Outros fatores importantes também relacionados com a sensibilidade da linhagem são a fase de crescimento na qual elas se encontram e a exposição às situações de estresse químico. O estresse químico pode ser gerado por situações de limitação ou excesso de nutrientes, acumulação de metabólitos, aumento da pressão osmótica e temperatura abaixo do ideal, também podem causar estresse celular e influência no crescimento e produtividade celular, aumentando a vulnerabilidade destes parâmetros (KRETZMER, 2000) (Tabela 3).

Como resultado das condições estressantes do ambiente, as células respondem com incrementos na atividade metabólica, tais como aumentos drásticos nas taxas de consumo específico de glicose, a fim de produzir mecanismos para reparar o dano causado; provocando uma conversão rápida a lactato (AL-RUBEAI M, OH S K W, 1990; LEUNG et al., 2011; PETERSEN; MCINTIRE; PAPOUTSAKIS, 1988;

SANTOS et al., 2007), metabolito tóxico que causa efeito inibitório para hMSCs em valores iguais ou maiores a 35,4 mM (SCHOP et al., 2009).

Com o objetivo de explicar o dano celular gerado pelo ambiente hidrodinâmico em biorreatores agitados, foi apresentada uma teoria na qual o cisalhamento gerado neste ambiente de agitação é causado pela energia mecânica transferida do agitador ao líquido, dissipada por uma série de turbilhões em cascata, os quais eventualmente convertem toda a energia mecânica em energia térmica. Esta dissipação de energia de caráter heterogêneo permite a mistura do fluido, mas também é a fonte do estresse hidrodinâmico causada nas células, principalmente as que se encontram perto da região do agitador, embora representando só 10% do volume do reator, pode conter 70% da dissipação total de energia (aproximadamente $1,0 \times 10^3 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3}$ ($1 \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$) para biorreatores em pequena escala), podendo ser duas ordens de grandeza maior que a taxa de dissipação de energia na média volumétrica (DORAN, 1995; GODOY-SILVA et al., 2009).

No caso das células animais dependentes de ancoramento para crescer, os microcarregadores (partículas sólidas, macroporosas ou microporosas geralmente de 80-200 μm de diâmetro) estão sendo usados amplamente em biorreatores agitados, porque permitem real escalonamento, proporcionando uma área superficial para crescimento maior por unidade de volume (PAPOUTSAKIS, 1991b; SCHUGERL et al., 2000), embora precisem de uma velocidade mínima de agitação para conseguir mantê-los suspensos, pelo fato de serem ligeiramente mais densos que o meio de cultivo (NIENOW, 2006). Contudo, a incapacidade das células de mudar de posição ou girar em resposta a uma força de cisalhamento no fluido, somado com a ausência da parede celular, permitem que elas sejam extremamente prejudicadas com as interações entre microcarregador e turbilhões, gerados no fluido pela agitação, em comparação às células não dependes de ancoramento (CHISTI, 2001; DORAN, 1995; GREGORIADES et al., 2000; MOREIRA et al., 1995b). O tamanho desses turbilhões pode ser calculado pela escala de longitude de Kolmogorov; podendo encontrar valores maiores que o tamanho típico de células animais (entre 9 e 15 μm) ou microcarregadores, fazendo somente mudar a direção do movimento destes, sem causar dano letal às células aderidas na superfície do microcarregador, no caso de ter um cultivo com células dependentes de ancoramento. Contudo, situações de excessiva agitação permitem a formação de turbilhões de tamanhos menores com a energia suficiente para causar morte celular (DORAN, 1995; PAPOUTSAKIS, 1991b).

Como o tamanho dos turbilhões deve ser maior que o tamanho dos microcarregadores para não causar dano celular, existem algumas possibilidades para evitar isto como a adição de substâncias que aumentem a viscosidade (agentes protetores mencionados anteriormente) ou diminuindo a frequência de rotação; podendo causar possíveis limitações no fornecimento de um ambiente homogêneo que proporcione às células um contínuo acesso a nutrientes e a eliminação de gradientes de temperatura e pH (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009). Portanto é necessário considerar estas condições que irão interferir no processo de cultivo, para evitar que a morte celular seja causada pelas forças hidrodinâmicas ou pelas limitações de oxigênio ou nutrientes, sem comprometer o produto final (CHISTI, 2001; KRETZMER, 2000; MOREIRA et al., 1995a).

Tabela 3. Interações entre a célula e seu ambiente dentro de um biorreator.

CONTRIBUIÇÃO	REFERÊNCIAS
Interações entre células e turbilhões turbulentos	CHERRY; PAPOUTSAKIS, (1986); CHERRY, 1993; PAPOUTSAKIS, (1991); SEN; KALLOS; BEHIE, (2002)
Colisões entre células, de células com o agitador e colisões entre células com superfícies estacionárias dentro do reator.	ABU-REESH; KARGI, (1989); PAPOUTSAKIS, (1991)
Geração de forças de cisalhamento perto de objetos sólidos no reator.	GODOY-SILVA et al., (2009) input ZHOU, KRESTA, (1996a)
Geração de forças de cisalhamento por bolhas através do líquido e ruptura destas na superfície líquida.	KUNAS; PAPOUTSAKIS, (1990); PAPOUTSAKIS, 1991; WU, (1995); GARCIA-BIONES; CHALMERS, (1994)
Estresse químico, por limitação de nutrientes, concentração de metabólitos, aumento da pressão osmótica, temperatura abaixo do ideal.	AL-RUBEAI M, OH S K W, (1990); PETERSEN; MCLNTIRE; PAPOUTSAKIS, (1988); SEN; KALLOS; BEHIE, (2002)

Da mesma forma, para conhecer as condições críticas de trabalho para cultura celular têm sido empregados diferentes configurações de biorreatores (Tabela 3) e submetendo as células à condições de estresse específico como no caso de câmaras de fluxo. Esta metodologia permite gerar condições definidas semelhantes às condições *in vivo*. Mesmo assim, a informação adquirida nestas condições não pode ser generalizada, pois as células são submetidas a situações específicas, com tempo determinado de exposição aos níveis de estresse e passagens de fluxo com um escoamento laminar através da câmara; enquanto que no biorreator elas estão submetidas constantemente ao estresse hidrodinâmico (GODOY-SILVA et al., 2009; LEUNG et al., 2011). Keane, Ryan e Gray (2003) apresentaram a influência no comportamento de uma linhagem de células CHO exposta a níveis de cisalhamento entre 0.005 e 1 N·m⁻² com um tempo máximo de exposição de 12 min, encontrando aumentos na taxa de consumo de glicose; resultados encontrados também para hibridoma em um sistema agitado tipo spinner (ABU-REESH; KARGI, 1991), com diminuição na produtividade da enzima e na produção de lactato, quando era incrementado o nível de cisalhamento; mesmo que mudanças na morfologia e viabilidade celular não foram observadas nesta faixa de estresse hidrodinâmico. Ao contrário, Ludwig, Kretzmer e Schügerl (1992) observaram fortes modificações na morfologia, viabilidade e tamanho das células BHK (Células de rim de Hamster recém-nascido) expostas entre 0.25 e 2.25 N·m⁻², durante um tempo de exposição de 24 horas. Godoy-Silva et al., (2009) estudaram os efeitos de células CHO expostas a passagens repetitivas ou simples de forças hidrodinâmicas a diferentes taxas de dissipação de energia entre 16,7 e 3,16 x 10² N·m⁻² usando também uma câmara de fluxo, observando que o mínimo da taxa de dissipação para causar dano letal na célula é de 46,6 N·m⁻². Para exposições repetitivas durante 4 dias, o dano celular foi aumentando consideravelmente com o incremento no nível da taxa de dissipação sendo observável mudanças no diâmetro celular (tendendo a diminuir), mesmo assim não foi evidente uma diminuição significativa no crescimento celular, viabilidade, metabolismo, morte e produtividade em exposições repetitivas.

Outro equipamento usado para produzir estresse por cisalhamento por tempos curtos de exposição é o viscosímetro, que foi empregado para determinar as condições críticas em forças hidrodinâmicas entre 0,5 e 2,09 N·m⁻² durante 4 horas de exposição para células CHO e HEK, apresentando efeitos letais com forças

superiores a 0,8 e 1,2 N·m⁻² respectivamente (TANZEGLOCK et al., 2009). Mardikar e Niranjan (2000) encontraram resultados similares para células hibridomas, mas para os outros tipos de células animais aconteceu o contrário, sendo mais prejudicadas a baixos níveis de cisalhamento (Tabela 4).

Em sistemas CSTR de cultivo de hibridoma observou-se que um aumento gradual da velocidade de agitação, em comparação com mudanças drásticas, não teve repercussões negativas na concentração de células viáveis em velocidades entre 100 e 300 rpm (ABU-REESH; KARGI, 1991). Estas condições também promoveram uma proliferação mais rápida quando comparadas com cultivos controlados a frequência de rotação muito baixas (GOOCH; FRANGOS, 1993), que provocaram diminuição na viabilidade possivelmente devido a falta da transferência de oxigênio. Embora estas condições não sejam influenciadas exclusivamente pela velocidade de agitação mas também pela geometria do agitador (LEUNG et al., 2011; SANTOS et al., 2007). Com velocidades de agitação maiores houve um aumento na liberação da enzima LDH (lactato desidrogenase), causado pela morte celular, assim como um aumento na taxa específica de consumo de glicose, influenciando na viabilidade e produtividade celular (ABU-REESH; KARGI, 1991).

Duas linhagens de hESC (human Embryonic Stem Cells) dependentes de ancoramento também foram submetidas à cultura agitada (frasco *spinner* operado em 30 rpm no máximo), evidenciando que as respostas ao estresse hidrodinâmico são específicas do tipo de célula; respostas que podem levar a reduzir a capacidade de pluripotência e crescimento celular e que não foi evitado com a adição de agentes protetores (LEUNG et al., 2011).

Considerando os diferentes tipos de respostas ao ambiente hidrodinâmico, pode se dizer que dependendo da magnitude do dano existem alterações sub-letais e letais. Como alterações sub-letais encontram-se as mudanças: na morfologia (SANTOS et al., 2007); processos de mecanotransdução (LADOUX; NICOLAS, 2012); metabolismo, pela perda do contato célula-célula, viabilidade e aumento na taxa de consumo de glicose (ABU-REESH; KARGI, 1991); taxas de crescimento; e produção de anticorpo (GODOY-SILVA; MOLLET; CHALMERS, 2009); alterações nos mecanismos de agregação (cinética e tamanho) e fenótipo celular (diferenciação e função) (KINNEY et al, 2011; LEUNG et al., 2011). Estas situações são apresentadas em níveis intermediários de estresse, onde a célula pode ser danificada e ativar seus

mecanismos de morte programada. Em níveis de estresse ambiental baixos, as células podem produzir proteínas de choque térmico, que permitem sua sobrevivência até que o estímulo termine ou seja eliminado. Porém, caso as condições sejam altamente estressantes, estes provocam efeitos letais, levando a morte celular por mecanismo de necroses ou lises, ou induzem várias repostas fisiológicas sem causar necessariamente algum dano físico, mas causando a morte devido aos mecanismos de apoptose (AL-RUBEAI et al., 1995; COTTER; AL-RUBEAI, 1995; PEIXOTO, COELHO, CASTILLO, 2007).

O mecanismo de morte celular por apoptose é um mecanismo controlado pelos próprios genes das células resultando em um processo de autodestruição. A apoptose é caracterizada por uma série de alterações: (1) degradação da cromatina; (2) mudança na estabilidade do conteúdo de DNA; (3) alterações na distribuição dos lipídios da membrana e (4) redução do pH intracelular. Ao contrário, a necrose é um mecanismo de morte acidental por rompimento da membrana plasmática ocasionando um extravasamento do material citoplasmático, culminando na fragmentação do núcleo (PEIXOTO, COELHO, CASTILLO 2007; WANG et al., 2005).

Para ter uma valorização qualitativa do dano celular, um dos métodos empregados é a medição da quantidade de enzima intracelular lactato desidrogenase (LDH) liberada no meio de cultura quando a membrana celular se rompe. Vários estudos realizados em diferentes condições e biorreatores têm empregado a quantificação da atividade da enzima LDH como indicativo de dano celular causado por um ambiente agressivo (ABU-REESH; KARGI, 1991; GODOY-SILVA et al., 2009; PETERSEN; MCINTIRE; PAPOUTSAKIS, 1988, 1990; RACHER; LOOBY; GRIFFITHS, 1990; SANCHES, 2010; WOLTERBEEK; VAN DER MEER, 2005). Devido à sensibilidade e rapidez deste método para detectar e quantificar o número de células mortas, ao contrário das medições de consumo de metabolitos usadas para o mesmo fim, mas que desconsidera mudanças no metabolismo celular levando a falsos resultados (RACHER; LOOBY; GRIFFITHS, 1990).

Outros métodos que têm sido utilizados para medir o dano celular são a quantificação da liberação de DNA, cinética metabólica e a contagem celular por hemocítmetro, sendo este último, um dos métodos menos recomendados devido à impossibilidade de considerar as células lisadas (ABU-REESH; KARGI, 1991; KEANE;

RYAN; GRAY, 2003; LUDWIG; KRETZMER; SCHÜGERL, 1992; QUESNEY et al., 2001).

A discordância na literatura quanto a sensibilidade dos tipos de células animais ao cisalhamento, é devido ao uso de diferentes tipos de linhagens celulares, equipamentos e condições de operação, dificultando uma posterior comparação entre estes. A Tabela 4 resume as metodologias aqui citadas, sendo possível verificar a diversidade de procedimentos utilizadas.

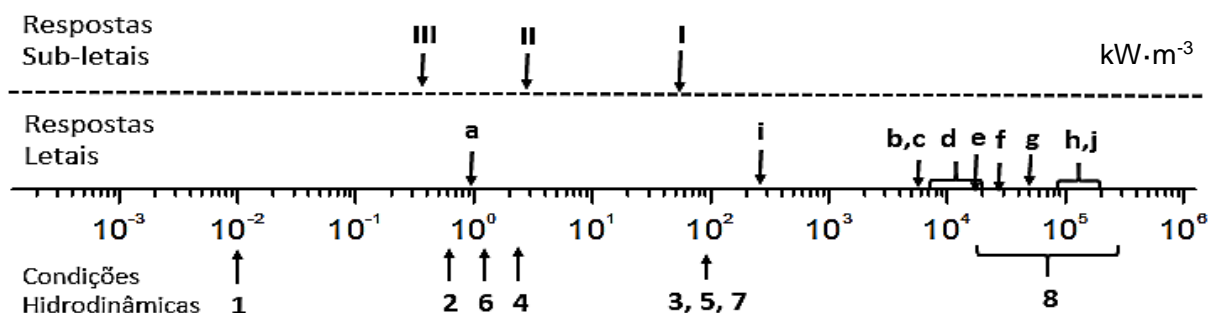
Tabela 4. Estudos de células animais submetidas a diferentes condições de tensão de cisalhamento em diferentes equipamentos.

CÉLULA	EQUIPAMENTO	CONDIÇÕES	REFERÊNCIAS
hESC	Placas de poços	Velocidade de agitação entre 100 e 120 rpm	LEUNG et al., (2011)
Hibridoma hESC Célula primária de rato	Spinner	Velocidade de agitação de 200, 255 e 300 rpm	ABU-REESH; KARGI, (1991); LEUNG et al., (2011); SANTOS et al., (2007)
CHO BHK HL60 K562CL.6 SF9 U937 PUTKO	Placas e câmara de fluxo	Estresse hidrodinâmico entre 0,005 e 2,25 N/m ² .	GODOY-SILVA et al., (2009); KEANE; RYAN; GRAY, (2003); LUDWIG; KRETZMER; SCHÜGERL, (1992)
Hibridoma Murino	Frasco	Cultura mantida a 200 rpm e 600 rpm.	AL-RUBEAI M, OH S K W, (1990)
CHO HEK	Viscosímetro	Exposição de tensão entre 0,59-2,09 N/m ² , para um intervalo de tempo de 4 horas.	MARDIKAR; NIRANJAN, (2000); PETERSEN; MCINTIRE; PAPOUTSAKIS,

			(1988), (1990); TANZEGLOCK et al., (2009)
Hibridoma	CSTR	Frequências de agitação entre 60 e 350 rpm	ABU-REESH; KARGI, (1991)
CHO HEK CrI-1444, ATCC	Fluxo extensional	Durante curtos períodos de exposição a diferentes tensão 100, 500, 600 N/m ² .	GREGORIADES et al., (2000); TANZEGLOCK et al., (2009); ZORO et al., (2008)

A unificação de resultados dados em várias escalas e condições hidrodinâmicas relacionados com os efeitos obtidos em vários tipos de células animais em cultivo vem sendo realizada por Chalmers e colaboradores, a partir dos valores da taxa de dissipação de energia (TDE), como pode ser observado na Figura 5 e na Tabela 5. Esta unificação permitiu finalmente comparar todos os estudos realizados mesmo a diferentes condições de operação e equipamento para avaliar o dano sub-letal ou letal causado em cultivo de células animais.

Figura 5. Respostas obtidas em diferentes condições de cultivo medidos a partir da taxa de dissipação de energia (TDE).



Modificado de AL-RUBEAI, (2015)

Tabela 5. Respostas obtidas em cultivo de células animais a diferentes condições de operação em biorreatores.

Respostas críticas fisiológicas sub-letais em bioprocessos					
Símbolo	Células	Modo de crescimento	Modo do teste	Resposta	Referência
I	CHO	Suspensão	10 dias exposição repetitiva	Mudanças no perfil da glicosilação Proteína recombinante	Godoy-Silva et al., (2009)*
II	LnCap	Aderidas	Tempo de exposição a definidas tensões cisalhamento	Dano na integridade da membrana, mudanças em receptores	McCoy; Ward; Hoare, (2010)
III	CHO	Suspensão	Biorreator de 2L	Efeitos na taxa de produção de proteína recombinante e glicosilação	Sieck et al., (2013)
Respostas letais (necrose incluindo liberação de LDH)					
Símbolo	Célula	Modo de crescimento	Referência		
a	CHO-K1	Crescimento por ancoramento	Gregoriades et al., (2000)		
b	PERP. C6	Suspensão (infecção nativa ou por adenovirus)	Ma; Koelling; Chalmers, (2002)*		
c	CHO (GS)	Suspensão	Godoy-Silva et al., (2009)*		
d	Hibridoma	Suspensão	Thomas et al. (1994); Zhang e Thomas (1993)		
e	MCF-7	Suspensão	Ma; Koelling; Chalmers, (2002)*		
f	Mieloma de rato	Suspensão	McQueen; Bailey, (1989)		

g	Hela S3, L929 rato	Suspensão	Augenstein et al. (1971)
h	CHO-K1, hibridoma HB-24	Suspensão	Ma; Koelling; Chalmers, (2002)*
i	CHO-K1, apoptose	Crescimento por ancoramento, suspensão	Mollet et al., (2007)*
j	CHO-K1	Suspensão (transfeção de bcl2 e selvagem)	Mollet et al., (2007)*
Condições hidrodinâmicas			
Símbolo	Processo	Descrição	Referência
1	Agitação	Taxa de energia dissipada média em biorreatores de cultivo de célula animal típico	Varley e Birch (1999)
2	Agitação	Taxa de energia dissipada média em frasco de mistura de 10L (Agitador turbina Rushton, 700 rpm)	Zhou e Kresta (1996)
3	Agitação	Taxa de energia dissipada local máxima frasco de mistura de 10L (Agitador turbina Rushton, 700 rpm)	Zhou e Kresta (1996)
4	Agitação	Taxa de energia dissipada média em fermentador de 22,000L (Agitador turbina Rushton, 140 rpm)	Wernersson; Tragardh, (1999)
5	Agitação	Taxa de energia dissipada local máxima em fermentador de 22,000L (Agitador turbina Rushton, 140 rpm)	Wernersson; Tragardh, (1999)
6	Agitação	Taxa de energia dissipada local máxima em frasco spinner	Venkat; Stock; Chalmers, (1996)*

7	Ruptura de bolha	Água pura (diâmetro de bolha: 6,32mm)	Garcia-Briones; Chalmers, (1994)*
8	Ruptura de bolha	Água pura (diâmetro de bolha: 1,7mm)	Garcia-Briones; Chalmers, (1994)*

*Trabalhos publicados do grupo do CHALMERS na Universidade de Ohio, EUA.

Adaptado de AL-Rubeai, (2015)

2.3. BIORREATOR DE ESCOAMENTO EM VÓRTICES DE TAYLOR

Como uma alternativa para diminuir as possíveis limitações de oxigênio, gradientes de nutrientes e acúmulo de metabólitos, encontra-se o biorreator de escoamento em vórtices de Taylor (BEVT), que consiste em um sistema constituído por dois cilindros coaxiais, com a possibilidade de serem operado em batelada (CURRAN; BLACK, 2005) ou em sistema contínuo. Quando é operado em sistema contínuo, um escoamento axial no espaço anular pode ser adicionado ao sistema, isto é conhecido como escoamento de Taylor-Couette-Poiseuille (TCP) (GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000; RESENDE et al., 2001).

O BEVT, apresenta diferentes padrões de escoamento quando o cilindro exterior permanece em repouso, enquanto que o líquido no espaço anular entre os cilindros é posto em movimento pela rotação do cilindro interno (CURRAN; BLACK, 2004; DESMET; VERELST; BARON, 1996; LUEPTOW; DOCTER; MIN, 1992) permitindo a formação de vórtices no espaço anular. Por outro lado quando o movimento do fluido é realizado pela rotação do cilindro externo não é evidenciada a formação de vórtices, sendo uma alternativa possível a rotação dos dois cilindros simultaneamente (MOORE, 1994).

O interesse na hidrodinâmica apresentada neste tipo de sistemas de cilindros concêntricos, foi inicialmente apresentado por Newton em 1687, e a partir destas hipóteses surgiu a construção do primeiro equipamento, o viscosímetro que foi desenvolvido por Mallock em 1888. Estes eventos permitiram um avanço no estudo do comportamento de fluidos em regimes de fluxo laminar, abordagem estudada por Couette em 1890, conhecido como fluxo laminar Couette. Finalmente o desenvolvimento matemático feito por Taylor em 1923 estabeleceu uma teoria fundamental para o desenvolvimento da hidrodinâmica de fluidos viscosos, determinando as velocidades de rotação crítica para permitir a formação de vórtices

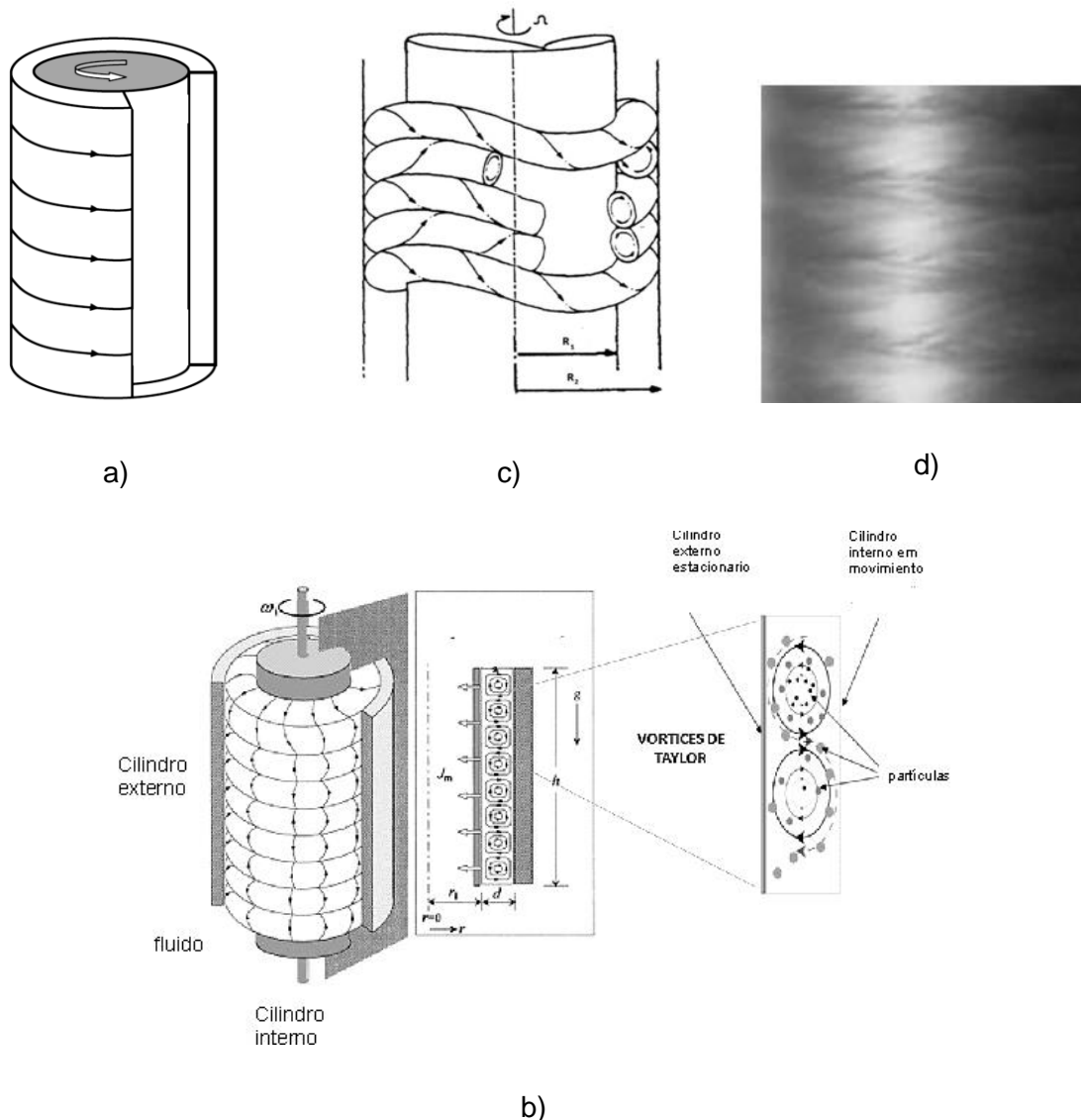
sem escoamento axial, denominado escoamento em vórtices de Taylor, (JULIAN; AL-RUBEAI, 2005; JUNFEN, 2003; MOORE, 1994).

As vantagens deste tipo de biorreator, na presença de vórtices, estão ligadas com a obtenção de vários tipos de regimes, desde o laminar até o turbulento passando por diferentes padrões de fluxo, que são formados a medida que a velocidade de agitação do cilindro interno é aumentada, proporcionando uma mistura adequada, com excelente transferência de massa e calor; permitindo a eliminação de zonas mortas, alta escalabilidade e controle do ambiente hidrodinâmico, o que permite alcançar o desempenho ideal para uma grande variedade de aplicações em sistemas com reações químicas e bioquímicas (JULIAN; AL-RUBEAI, 2005; RESENDE et al., 2001). As aplicações em BEVT foram estudadas obtendo resultados eficientes quando comparadas com o cultivo realizado em frasco *shaker* (JANES; THOMAS; CALOW, 1987).

2.3.1. Escoamentos no Taylor

O primeiro regime apresentado para baixas velocidades de agitação do cilindro interno, é denominado escoamento laminar-Couette (Figura 6a). Este padrão de fluxo em teoria não apresenta componentes de velocidade axial, sendo o escoamento do fluido confinado à direção azimutal com gradientes de velocidade na direção radial, por causa disto o transporte de massa que ocorre na direção axial é dado somente por mecanismos de difusão, assemelhando-se com um reator de fluxo em pistão. Acima de uma rotação crítica um segundo padrão denominado fluxo laminar com vórtice de Taylor é imposto (Figura 6b), onde o fluxo circular se bifurca para uma série de vórtices toroidais assimétricos em contra-rotação, preenchendo o espaço anular entre os cilindros mesmo em regime laminar; este regime é atingido rapidamente quando se tem um espaço anular pequeno em relação à altura (CURRAN; BLACK, 2004; GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000; JUNFEN, 2003; TANZEGLOCK, 2008).

Figura 6. a). Desenho esquemático do escoamento laminar-Couette, b). desenho com corte longitudinal do escoamento em vórtices de Taylor, c) representação do escoamento wavy e d) escoamento em vórtices de Taylor turbulento.



Adaptado de CURRAN; BLACK, (2004); FÉNOT et al., (2011); KYUN et al., (1999); OHMURA; SUEMASU; ASAMURA, (2005); TANZEGLOCK, (2008).

Nesse regime a energia transmitida ao fluido por rotação do cilindro interno produz dois fluxos rotacionais: rotação tangencial global e secundária (com componentes axiais e radiais) dentro dos vórtices, que estão espaçados regularmente ao longo do eixo do cilindro cada um com uma altura axial aproximadamente igual à largura da abertura anular (Figura 6b). (DESMET; VERELST; BARON, 1996). Estas condições permitem um acréscimo de transferência de massa, sendo semelhante a um sistema de CSTRs conectados em série, com uma adequada transferência de massa entre os vórtices (RESENDE et al., 2001).

Com aumento da velocidade no escoamento de vórtices de Taylor é imposto um terceiro padrão de escoamento oscilante, gerando ondas azimutais que viajam em torno do cilindro interno, conhecido como escoamento de vórtices *wavy* (Figura 6c). Aumentando a velocidade de rotação não é mais dirigido por ondas e se torna um sistema turbulento (Figura 6d) (TANZEGLOCK, 2008). Nestes casos, a transferência de massa entre vórtices torna-se dominante e todo o reator com escoamento de vórtice se comporta como um CSTR (RESENDE et al., 2001).

2.3.2. Relações no biorreator em vórtices de Taylor

Para um biorreator caracterizado por um escoamento padrão entre dois cilindros coaxiais no qual o cilindro interno está em movimento e o externo permanece estacionário, a relação que governa as forças inerciais e viscosas é usualmente apresentada pelo número adimensional de Taylor definido como:

$$Ta = \left(\frac{\Omega_i r_i d}{\nu} \right) \left(\frac{d}{r_i} \right)^{0.5} = Re \left(\frac{d}{r_i} \right)^{0.5} \quad (2.2)$$

Onde Ω é a velocidade superficial axial ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$) do cilindro interno, d é a largura do espaço entre os dois cilindros (cm), ν é a viscosidade cinemática ($\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$) e r_i é o raio do cilindro interno (cm).

Os quatro regimes principais, são diferenciados pelo número de Taylor, sendo eles: o escoamento laminar Couette entre 0 e 41,3; escoamento com vórtices de Taylor com um número de Taylor crítico, $Ta_{crit} = 41,3$; escoamento em vórtices *wavy* com número de Taylor de 115,2, para uma relação de aspecto alta ($\Gamma = H/d > 20$) que só pode-se apresentar com uma relação de raios inferior a 1,4, e finalmente escoamento turbulento observado apresentado a um número de Taylor de 288 (CURRAN; BLACK, 2004). Outros autores encontraram estes escoamentos com presença de vórtices entre $51,4 < Ta < 640$ (Kataoka et al., (1975) *apud* DESMET; VERELST; BARON, 1996), embora as diferenças entre estas faixas possam depender da geometria do BEVT.

Outro número importante a ser considerado é o número de Reynolds, baseado na rotação do cilindro interno definido como:

$$Re = \frac{\Omega_i r_i (r_o - r_i)}{\nu} \quad (2.3)$$

onde, Ω_i é a velocidade de rotação do cilindro interno ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$), r_0 e r_i o raio do cilindro externo e interno (cm) respectivamente e ν a viscosidade cinemática ($\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$).

Quando se tem sistemas com escoamento axial, escoamento em Taylor-Couette-Poiseuille, a relação das forças inerciais e viscosas é descrita como número de Reynolds axial Re_{ax} , sendo que este termo tem pouco ou nenhum efeito no sistema (SANTIAGO, 2007). Enquanto que foi demonstrado que é possível manter partículas em suspensão para altas relações de Re_{θ}/Re_{ax} , isto é para velocidades baixas (ou nulas) de fluxo axial, (RESENDE et al., 2001), fator considerado importante para cultivo celular com microcarregadores.

2.3.3. Transporte de oxigênio no BEVT

A transferência de oxigênio foi estudada para o fluxo de Taylor-Couette usando uma membrana de silicone, onde atribui-se a diminuição do crescimento na biomassa de células vegetais devido a concentrações baixas de oxigênio dissolvido; sendo considerado o fator limitante para o desenvolvimento do cultivo de células vegetais (JANES; THOMAS; CALOW, 1987). Curran e Black, (2005) obtiveram os mesmos resultados quando o biorreator com aeração superficial é operado em regime laminar-Couette para cultivo de fibroblastos, após de 15 horas de cultivo, o que foi solucionado com um regime em vórtices de Taylor.

O uso de membranas de silicone sobre o cilindro interno do biorreator de escoamento de Taylor é prático para aplicações químicas, físicas e biológicas. Tem sido utilizado em processos relacionados com transferência de massa gás-líquido, dando lugar a processos de oxigenação por meio de processos de absorção-difusão. Nas membranas altamente permeáveis ao oxigênio, normalmente de silicone, o oxigênio é difundido primeiro através da fase gasosa, depois pela membrana e finalmente no meio de cultura; sendo aumentada consideravelmente a taxa de transferência de oxigênio (OTR), em comparação de outros sistemas de aeração superficial (MOREIRA et al., 1995a)

Assim a injeção de gás através do cilindro interno (atuando como agitador) desempenha duas funções: misturador e dispersante de gás, permitindo vários outros benefícios associados com alto coeficiente de transferência de oxigênio com requerimentos de potência competitivos (RISHELL et al., 2004). O uso deste tipo de

sistemas de aeração é recomendado para ser utilizado em fermentação extrativa, em cultivos altamente sensíveis às condições hidrodinâmicas, em cultivos com células imobilizadas, entre outras potenciais aplicações.

A oxigenação através de membranas tem sido estudada em processos de suspensão de partículas sensíveis ao cisalhamento, permitindo baixos requerimentos de condições fortes de agitação quando a transferência é dada através da superfície da membrana exposta do líquido, apresentando uma transferência de oxigênio mais eficiente (JR; SINSKEY, 1981), podendo ser empregado em fluídos altamente viscosos, para os quais os métodos convencionais de aeração direta são ineficientes (WRON et al., 1999).

Para quantificar a transferência de oxigênio em geral, é usado um balanço da concentração de oxigênio no meio de cultura considerando parâmetros como o coeficiente de transferência de massa global de oxigênio ($k_L a$) que é usualmente medido ou estimado. O $k_L a$ é uma variável que faz referência a área superficial entre o gás e a fase líquida (a), e o coeficiente de transferência de massa convectivo global (k_L), este último considera a resistência de transferência de massa de ambos os lados da interface gás-líquido (CURRAN; BLACK, 2005; MARTIN; VERMETTE, 2005), além disso, é considerado no balanço as taxas de consumo de oxigênio por sistemas biológicos (OUR) se são apresentados no sistema de estudo.

Em conclusão, a concentração de oxigênio dissolvido global em meios de cultivo depende da velocidade de consumo atual de oxigênio (OUR) pela população celular no volume e da velocidade de transferência do mesmo (OTR).

Para avaliar a taxa de transferência de oxigênio (OTR) em biorreatores, são realizadas medições de concentração de oxigênio dissolvido (DO), para determinar o coeficiente de transporte de oxigênio volumétrico ($k_L a$), (CURRAN; BLACK, 2005). Este coeficiente é necessário para quantificar a eficiência do sistema de aeração e o efeito das demais variáveis de operação relacionadas para um adequado fornecimento do oxigênio (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009); sendo este fortemente influenciado pela vazão de gás e pela velocidade de agitação (NISHIKAWA et al., 1981).

Para sistemas areados, a velocidade de transferência de oxigênio (OTR) pode ser definida como segue na equação 2.1:

$$OTR = \frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) \quad (2.4)$$

Onde, k_L representa o coeficiente de massa do filme líquido, a área interfacial específica de troca de massa, C^* e C são as concentrações na interfase e no volume, respectivamente. Sendo esta equação aplicável nos casos onde não se tem consumo de oxigênio por uma população, ou seja, OUR igual a zero.

As técnicas para quantificação da concentração de oxigênio dissolvido podem ser divididas em químicas e físicas. Como métodos químicos estão a oxidação por sulfito e absorção de CO_2 ; métodos empregados amplamente há anos, mas eles apresentaram limitações devido às mudanças que promovem nas propriedades físico-químicas dos líquidos, obtendo valores subestimados de oxigênio dissolvido, além da dificuldade de usar sistemas vivos nas medições. Como método físico se destaca o método dinâmico, baseado na resposta de um sensor de concentração de oxigênio em um líquido durante processos de absorção ou dessorção de oxigênio na solução; podendo ser utilizado na presença ou ausência de microrganismos (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009).

2.3.4. Aplicações do BEVT

Um dos maiores problemas em cultura celular, além das limitações por nutrientes e oxigênio pela falta de homogeneidade, é a desigual distribuição da tensão de cisalhamento e dissipação de energia. O BEVT é um equipamento que proporciona vantagens neste sentido pelas características hidrodinâmicas que apresentam uma efetiva agitação promovida pelos vórtices, sendo adequada para trabalhar com suspensão de partículas frágeis. Giordano; Giordano; Cooney, (2000) estudaram o efeito da hidrodinâmica no BEVT com partículas esféricas de sílica extremamente sensíveis às forças de cisalhamento, em um tempo de exposição de 84 h a 3000 rpm com alta carga de partículas, sem observar mudanças representativas na morfologia; comprovando a homogeneidade da distribuição das forças de cisalhamento aproximadamente homogêneas no longo do biorreator.

Curran e Black, (2004) estudaram um cultivo de células imortalizadas de fibroblastos em BEVT com aeração superficial, atingindo uma viabilidade de aproximadamente 80 % (constante ainda para um tempo de cultivo de 22 h) em regime laminar em vórtices de Taylor ($Re = 152,2$), obtendo uma maior transferência de oxigênio em comparação com o regime laminar de Couette ($Re = 101,8$), no qual a morte celular foi inevitável por limitações de oxigênio no meio após de 15 h de cultivo. Haut et al., (2003) submeteu células animais ao fluxo de escoamento *wavy* (entre 14 e 24 rpm) e turbulento (entre 40 e 47 rpm) em um biorreator tipo Taylor-Couette horizontal, dotado de uma membrana localizada no cilindro interno. Foram obtidos resultados eficientes para cultura celular em questões de transferência de oxigênio e tensões de cisalhamento moderadas (em média não maiores a $0,1 \text{ N/m}^2$ Curran e Black, (2004), encontraram valores de forças de cisalhamento aceitáveis para o cultivo celular a número de Taylor menores a 100, mas isto tem que ser levado em consideração pela forte influência nas relações de raios dos cilindros e a relação de aspecto.

Tanzeglock, (2008) apresentou um estudo de cultivo de células animal CHO em suspensão em um biorreator tipo Taylor-Couette, trabalhando a velocidades de agitação de 75 rpm para uma taxa de energia de dissipação media máxima de $0,021 \text{ m}^2/\text{s}^3$, equivalente a $0,8 \text{ N/m}^2$, obtendo altas taxas de crescimento e porcentagem de viabilidade em comparação ao tanque agitado.

Em outras aplicações encontradas na literatura, estão os processos de adsorção a fim de recuperar produtos bioquímicos diretamente de caldos homogêneos de fermentação (JUNFEN, 2003). Na Tabela 6 estão listadas as aplicações do reator, como em processos de clarificação, concentração e purificação de produtos químicos ou bioquímicos.

Tabela 6. Estudos feitos em biorreator do tipo Taylor em biotecnologia e diferentes áreas.

APLICAÇÕES	REFERÊNCIAS
Fotocatálise	DUTTA; RAY, (2004); SENGUPTA; KABIR; RAY, (2001)

Cultura de célula animal	COWGER et al., (1999); HAUT et al., (2003); O'CONNOR et al., (2002); SANTIAGO; GIORDANO; SUAZO, (2011); TANZEGLOCK, (2008); ZHU et al., (2010)
Cultura de célula vegetal	GONG et al., (2006); JANES; THOMAS; CALOW, (1987)
Cultura de microrganismos	PAPÁČEK et al., (2011); PATEL et al., (2010); PAULE et al., (2011)
Tratamentos clínicos	SCIENCES, (1999)
Processos enzimáticos	GIORDANO; GIORDANO; PRAZERES, (1998); GIORDANO; GIORDANO; COONEY, (2000); MOORE, (1994); RESENDE et al., (2001)
Processos químicos	KYUN et al., (1999)

2.4 Considerações gerais sobre a Revisão Bibliográfica

O interesse pelo desenvolvimento de técnicas de cultivo para a expansão das CEMs vem crescendo devido às aplicações promissoras que podem ser utilizadas no

tratamento de doenças que se julgavam incuráveis e que hoje podem ser tratadas por meio de terapia celular ou engenharia de tecidos.

O biorreator de escoamento em vórtices de Taylor (BEVT) é de grande interesse por apresentar tensões de cisalhamento baixas e uniformemente distribuídas, assim como eficiência na transferência de oxigênio quando comparado com outros tipos de biorreatores. Santiago; Giordano e Suazo, (2011) demonstraram a possibilidade de usar este biorreator para o cultivo de células animais. O exame da literatura especializada feita nesta revisão bibliográfica mostra que, com exceção dos trabalhos de Curran e Black, (2004, 2005) pouca informação bibliográfica foi encontrada sobre o BEVT ou equipamentos que utilizem princípio de vórtices de Taylor. Frente a essa situação de carência de informação tecnológica, torna-se imprescindível o levantamento de dados que permitam realizar uma avaliação mais completa sobre o potencial deste biorreator no cultivo de CEMs.

Em vista disto este estudo torna-se útil para obter resultados que possibilitem o avanço nesta área de pesquisa, apresentando uma proposta de biorreator com as características necessárias para cultivos de CEMs.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de um protótipo de biorreator de escoamento em vórtices de Taylor (BEVT) em escala de laboratório (~100 mL) e avaliação do seu potencial para a expansão de células estromais mesenquimais (CEMs) aderidas ao microcarregador Cultispher®, com alta produtividade e preservação das qualidades de diferenciação.

Como objetivos específicos:

1. Quantificar a capacidade de oxigenação do biorreator sem formação de bolhas utilizando os recursos analíticos e fundamentos teóricos de fenômenos de transporte.
2. Quantificar as tensões de cisalhamento esperadas em condições normais (37°C e pH entre 6,8 e 7,4) de operação do biorreator visando a identificação de faixas convenientes para sua utilização no cultivo de células animais.
3. Análise do desempenho do biorreator na expansão de CEMs com preservação de sua qualidade terapêutica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Células

As Células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea humana e conhecidas como *human Mesenchymal Stem Cells-hMSC* foram imortalizada através da expressão da transcriptase reversa da telomerase. A TERT é uma proteína catalítica da subunidade do complexo da telomerase que impede o encurtamento dos telômeros após cada ciclo celular, podendo gerar linhagens de células com a capacidade de se expandir indefinidamente, mantendo sua taxa de crescimento fisiológico e as suas características funcionais (PIPER et al., 2012). Esta linhagem também possui a expressão de GFP (Green Fluorescent Protein), proteína que apresenta fluorescência verde quando estimulada por luz ultravioleta, facilitando a visualização de células vivas quando utilizando um microscópio adequado.

Essa linhagem foi fornecida pelo Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas e sua equipe do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP).

4.2. Meios de cultura e congelamento

A preparação do meio de cultura para a expansão das células tronco mesenquimais foi realizado no meio básico α -MEM (*Minimum Essential Medium*) (Cultilab), suplementado com 15% v/v de soro fetal bovino, antibiótico penicilina (10000 U/mL)/estreptomicina (10000 μ g/mL), glicose, glutamina, arginina, hepes e bicarbonato. Na Tabela 7 são apresentadas as quantidades presentes no meio de cultura.

Tabela 7. Composição do meio de cultura alfa-MEM utilizado nos cultivos da linhagem hMSC-TERT

COMPONENTES	QUANTIDADE	FABRICANTE
α -MEM em pó	10,2 g/L	Cultilab, EUA
Soro Fetal Bovino	0,150 L	HyCLone, EUA
Arginina	0,4358 g	SIGMA-ALDRICH, EUA
Glicose	1.000 g	SIGMA-ALDRICH, EUA

Glutamina	0,3654 g	SIGMA-ALDRICH, EUA
Bicarbonato	1,260 g	CULTILAB, Brasil
Hepes (1M)	4,2894	GIBCO, EUA
Penicilina e Streptomicina	0,01 L	GIBCO, EUA
Água purificada no sistema Mili-Q	1 L	MILLIPORE, Alemanha*

* Filtro

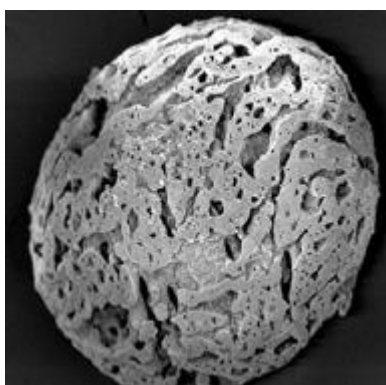
O meio de cultura foi esterilizado através da filtração em membrana de resina de 0,22 μm (Milipore).

O meio de congelamento para armazenamento das células hMSC-TERT foi preparado no laboratório com uma composição de 90% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 10% de Metil sulfóxido (DMSO 99,85 % extra puro, Across Organics, New Jersey, EUA), também filtrado em membrana de seringa 0,22 μm (Milipore).

4.3. Microcarregadores

Utilizou-se o microcarregador Cultispher S (PerCELL Biolytica, Suécia), caracterizado por ser um microcarregador macroporoso (Figura 8) com matriz de gelatina, podendo ser dissolvida com enzima proteolítica para uma melhora no processo de recuperação de células viáveis nos cultivos. As características físicas do microcarregador são apresentadas na Tabela 8, a partir de informações fornecidas pelo fabricante.

Figura 8. Imagem do microcarregador Cultispher-S (PerCELL Biolytica, Suécia).



Fonte: YANG; ROSSI; PUTNINS, (2007)

Tabela 8. Características do microcarregador Cultispher S (PerCELL Biolytica, Suécia) usado para aderência das células hMSC-TERT.

Características	Valores
Densidade (g/L)	1,04
Diâmetro (μm)	130-380
Número aproximado de microcarregadores/g de massa seca	$8,0 \times 10^5$
Média do diâmetro de poro (μm)	20

4.4. Frascos de Cultura

Na expansão de células em cultivo estático para preparo do inóculo do cultivo da hMSC-TERT no BEVT, foram utilizados frascos de cultura celular ou frascos T com área superficial de 75 cm^2 de poliestireno, especialmente tratadas para adesão (TPP). Também foi utilizado frasco spinner de 100 mL (BELLCO, EUA) com agitador tipo bulbo de vidro.

4.4.1. Biorreator de Escoamento em vórtices de Taylor

O BEVT utilizado é formado por um corpo de vidro borossilicato, com volume de aproximadamente 100 mL, constituído por dois braços laterais com tampas de Teflon desenhadas uma para a retirada de amostra e a outra para facilitar a saída de gases; o biorreator também está composto por uma tampa superior de maior tamanho de Teflon que permite o ingresso de gases, um cilindro interno com esqueleto do mesmo material (Figura 8c) recoberto por uma membrana fina de silicone, que permanece suspenso numa haste de vidro (Figura 7, 8 e 9). O vidro foi escolhido para facilitar o giro quando em contato com Teflon, já que o fator de atrito vidro-Teflon é convenientemente baixo. As informações detalhadas das dimensões do BEVT podem ser encontradas na Tabela 9.

Figura 7. Protótipo do BEVT utilizado nos experimentos de cultivo da linhagem hMSCs-TERT, com o agitador (cilindro interno) e membrana de silicone.



Fonte: acervo pessoal

A parte superior do agitador possui quatro furos para saída bem distribuída dos gases (neste caso dióxido de carbono, nitrogênio e oxigênio), visando a diminuição da espessura da camada limite formada na parede interna da membrana de silicone ao serem liberados no espaço “de cabeça” entre a tampa do biorreator e a superfície do meio de cultura (Figura 8b). Na parte inferior do esqueleto do agitador foram fixados quatro ímãs distribuídos simetricamente para possibilitar a rotação uniforme do cilindro interno (Figura 8a).

Figura 8. Vistas do cilindro interno de Teflon do BETV. Sendo a). vista inferior com os quatro ímãs, b). vista superior mostrando os furos para saída do ar, c) vista lateral do cilindro e d) vista do cilindro interno (agitador) com a membrana de silicone, junto com a tampa superior do reator.



a)



b)



c)

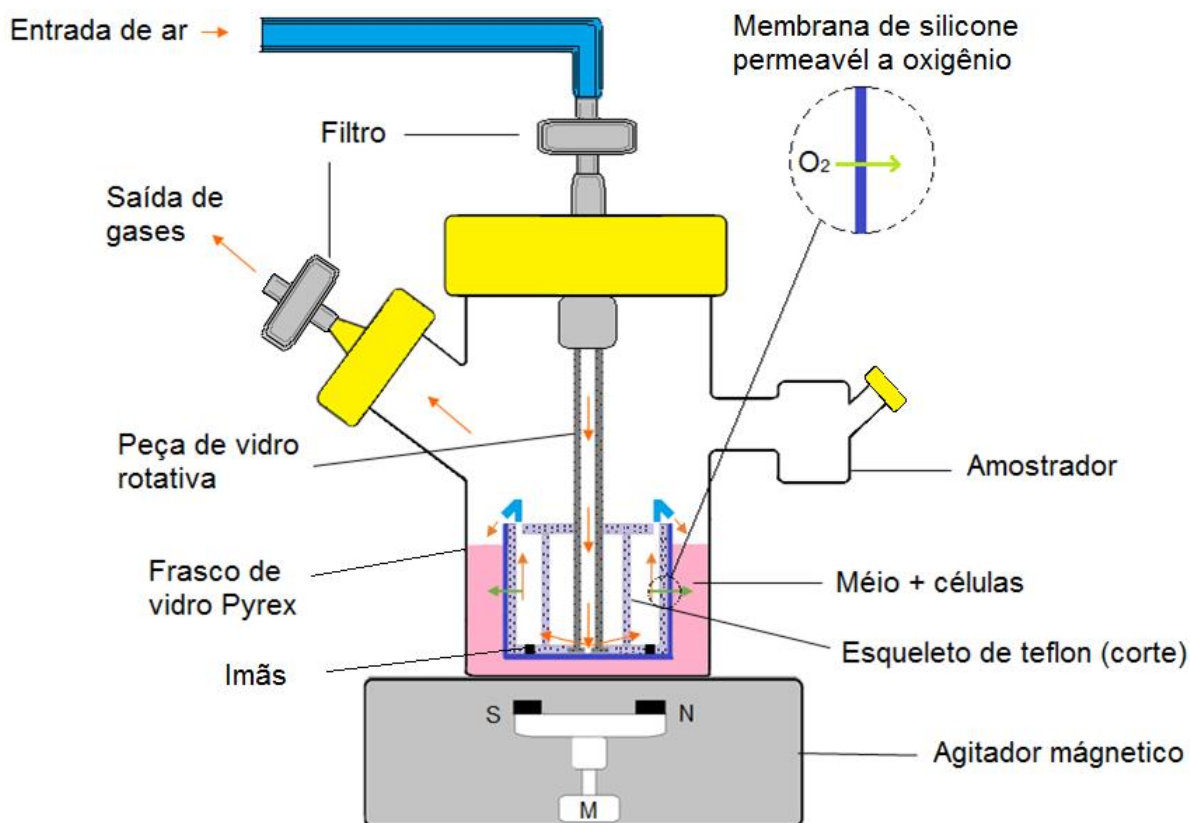


d)

Fonte: acervo pessoal

O silicone (Momentive Performance Materials, EUA) utilizado nas membranas que envolve o agitador é formado por: Metiltriacetoxissilano, octametilciclotetrasiloxano e diacetil di-tert-butoxy silano. A transferência de oxigênio através da membrana ocorre por difusão e sem formar bolhas de ar no meio de cultivo.

Figura 9. Desenho do BEVT e seus componentes principais



Fonte: acervo pessoal

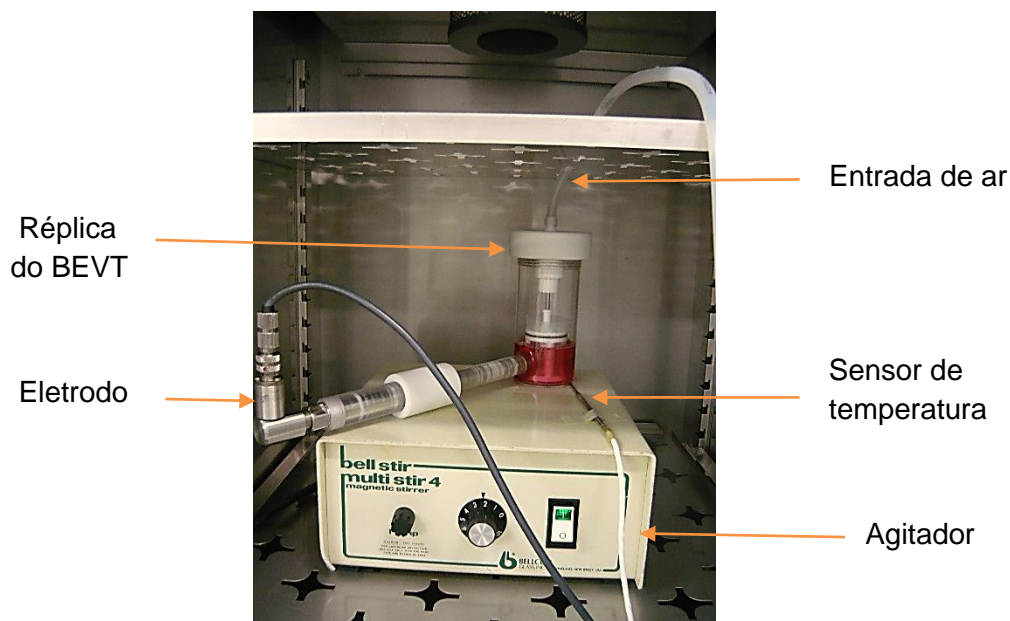
Tabela 9. Dimensões e características geométricas do BEVT.

DIMENSÕES	VALOR
Raio interno do biorreator R_{ext} (cilindro externo)	32,6 [mm]
Raio externo do cilindro interno ($R_{int}=D_i/2 +$ espessura da membrana de silicone)	21,885 [mm]
Altura do agitador	50,8 [mm]
Altura do líquido h	40 [mm]
Espessura da membrana de silicone	0,218 [mm]
Espaço anular ($d=R_{ext}-R_{int}$)	10,671 [mm]
Volume do biorreator	100 [mL]
Volume de trabalho	60 [mL]
CARACTERÍSTICAS GEOMÉTRICAS	
Razão entre os raios	0,6726
$\sigma = \frac{r_{int}}{r_{ext}}$	

Razão de aspecto $\Gamma = \frac{h}{d}$	3,748
--	-------

Para avaliar a transferência de oxigênio construiu-se uma réplica de vidro simplificada do BEVT, com o objetivo de facilitar a medição da concentração de oxigênio dissolvido no meio em diferentes velocidades de agitação e fluxos de ar, usando um eletrodo medidor de oxigênio dissolvido (InPro®6800 Series O2 sensor 12/25 mm da Mettler, Toledo). Neste caso foram usadas as mesmas dimensões do biorreator, do agitador e da membrana descritas anteriormente, mas adicionalmente instalou-se um braço lateral para a introdução do eletrodo (vide Figura 10). Foram realizados três tipos de medições de k_{LA} : na primeira medição, foi determinado o valor do k_{TLA} que incluía a transferência de oxigênio simultânea através da interface gás-membrana-líquido (GML) e através da interface gás-líquido (GM) no espaço anular entre os dois cilindros. No outro caso para determinar os valores do k_{sa} , o cilindro interno (agitador) foi vedado com duas camadas de folha de alumínio comercial, usualmente utilizado como barreira na permeação de gases como o oxigênio (JEREMIAH LE., 1996; TOLDRÁ F., 2008), para não permitir a passagem de gases por difusão através da membrana. No último caso foram realizadas medições sem a injeção de ar, as quais permitiram determinar o coeficiente de transferência k_{La} s. Na Figura 10 é apresentada a réplica do BEVT usada para a realização das medições.

Figura 10. Montagem dos equipamentos empregados para medições de k_La utilizando uma réplica do BEVT com adaptações para possibilitar as medidas de transferência de oxigênio.



Fonte: acervo pessoal

O eletrodo permaneceu conectado à unidade de monitoramento e controle de gases do biorreator BIOFLO 110 marca New Brunswick (EUA).

4.5. Fundamentação teórica para caracterização da transferência de oxigênio no BEVT

Neste item serão apresentados os fundamentos teóricos, hipóteses e simplificações adotadas para caracterização da transferência de oxigênio do protótipo de BEVT. Para avaliar a transferência de massa no BEVT sem consumo de oxigênio por um agente biológico, foi utilizado o balanço de massa descrito pela primeira lei de Fick da difusão, descrito pela equação 4.1, que descreve o movimento de uma espécie química através de outra devido à diferença de gradientes apresentados no sistema.

$$J = -AD \frac{\partial C}{\partial z} \quad (4.1)$$

Sendo J a densidade de fluxo molar total por difusão unidimensional, A a área através da qual ocorre a difusão, D a difusividade, C a concentração do oxigênio e z a distância.

A equação também pode ser escrita como segue, sendo específica para difusão em coordenadas cilíndricas (CUSSLER, 2009).

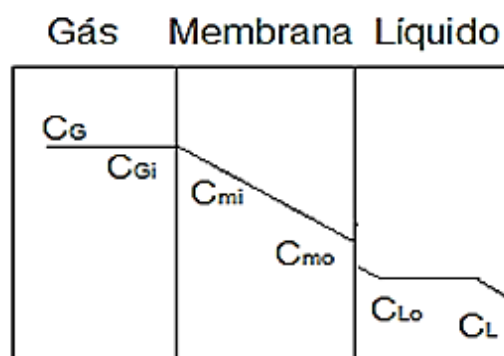
$$-j = D \frac{dC}{dr} \quad (4.2)$$

Para o sistema da Figura 11, a Equação 4.2 pode ser reescrita por meio de um modelo de resistências associadas com a transferência de massa nas películas estagnadas, que são formadas nas interfaces GML e GL (CÔTÉ; BERSILLON; HUYARD, 1989). Assim, a expressão que define o fluxo de oxigênio em condições de estado estacionário na interface GML pode ser definida como:

$$j = \frac{1}{\frac{1}{k_G} + \frac{1}{S_G k_m} + \frac{1}{(S_G/S_L) k_L}} \left(C_G - \frac{C_L}{S_G/S_L} \right) \quad (4.3)$$

Onde k_G , k_m e k_L são os coeficientes de transferência de massa da película estagnada gasosa, da membrana e da película estagnada líquida, respectivamente. Por outro lado C_G e C_L são as concentrações de oxigênio dissolvido no gás e no seio líquido, e os coeficientes adimensionais para a fase gás, $S_G = C_{mi}/C_{Gi}$, e para a fase líquida $S_L = C_{mo}/C_{Lo}$.

Figura 11. Modelo esquemático de transferência de oxigênio através da interface GML.



Adaptado de RISHELL et al., (2004).

Na Equação 4.3 a resistência dada pela existência de uma película gasosa estagnada entre o seio gasoso homogêneo e a membrana apresenta somente o transporte do oxigênio, caracterizado pelo inverso do coeficiente de transferência da película

gasosa, $1/k_G$, que é várias ordens de grandeza menor que o coeficiente $1/k_L$, já que a resistência da película líquida é normalmente maior e o oxigênio é pouco solúvel no meio líquido, em conclusão, a resistência da interface gás-membrana é desprezível. Além disso, considerando válida a lei de Henry ($p = HC_L$) e a lei dos gases ideais ($p = C_G RT$) e considerando os coeficientes adimensionais para a fase gás e a fase líquida no equilíbrio, obtém-se a Equação 4.4

$$j_m = \frac{1}{\frac{1}{S_G^* k_m} + \frac{1}{k_L}} (p - HC_L) \quad (4.4)$$

Sendo H a solubilidade usada como uma propriedade que expressa o equilíbrio através do líquido, com valor de $0,94 \text{ atm m}^3\text{mol}^{-1}$ (DUCOMMUN et al., 2000), considera-se também que S_G^* é igual a S_G/RT e a temperatura do sistema é de 37°C . A pressão parcial do oxigênio na fase gasosa (p) no sistema foi verificada com manômetro.

Para as membranas de polímero densas não porosas como a usada para envolver o cilindro interno do biorreator, o transporte ocorre constantemente na interface via sorção/difusão (PANDEY; CHAUHAN, 2001), sendo representado pelo coeficiente de transporte de oxigênio da membrana (k_m) dado na equação 4.5.

$$k_m = \frac{D}{\delta} \quad (4.5)$$

Onde D é o coeficiente de difusão de oxigênio através da silicone e δ é a espessura da membrana (RISHELL et al., 2004). O termo $S_G^* D$ que resulta da substituição da Equação 4.5 na Equação 4.4 é conhecido como a permeabilidade gás-membrana (P) (JAVAID, 2005; PANDEY; CHAUHAN, 2001). Assim obtemos a Equação 4.6.

$$j_m = \frac{1}{\frac{\delta}{HP} + \frac{1}{k_L}} \left(\frac{p}{H} - C_L \right) = k_{Tm} \left(\frac{p}{H} - C_L \right) \quad (4.6)$$

A permeabilidade da membrana foi medida em uma célula de permeação de volume constante, construída no departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos. O procedimento realizado foi :1- Colocação da amostra (membrana) na célula, 2- Vácuo durante 48h, 3- Pressurização da face superior (*upstream*) e 4- Medição do aumento da pressão em função do tempo na face

inferior (*downstream*). O valor da permeação encontrado foi de 316 barrer ($1,06 \times 10^{-16} \text{ kmol} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$), sendo de aproximadamente a metade dos valores mostrados por ANN. N.Y. (1965) apud ZHANG; CLOUD, (2006) para membranas de silicone *rubber*, que foram de 620 barrer.

Considerando também a contribuição à transferência de oxigênio na interfase anular GL entre os dois cilindros, podemos utilizar a Equação 4.7, descrita como segue:

$$j_s = k_s(C_G - C_L) = k_s \left(\frac{p}{H} - C_L \right) \quad (4.7)$$

Portanto, a transferência total de oxigênio no biorreator pode ser expressa pela Equação 4.8 e 4.9:

$$j_T a = j_m a + j_s a = (k_{Tm} a + k_s a) \left(\frac{p}{H} - C_L \right) \quad (4.8)$$

$$\frac{dc}{dt} = j_T a = K_{TL} a \left(\frac{p}{H} - C_L \right) \quad (4.9)$$

Onde $K_{TL} a$ é o coeficiente de transferência global total no sistema que considera a transferência de oxigênio através da membrana ($k_{Tm} a = \frac{1}{\frac{\delta}{HPa} + \frac{1}{k_L a}}$) e da superfície superior do líquido no espaço anular ($k_s a$).

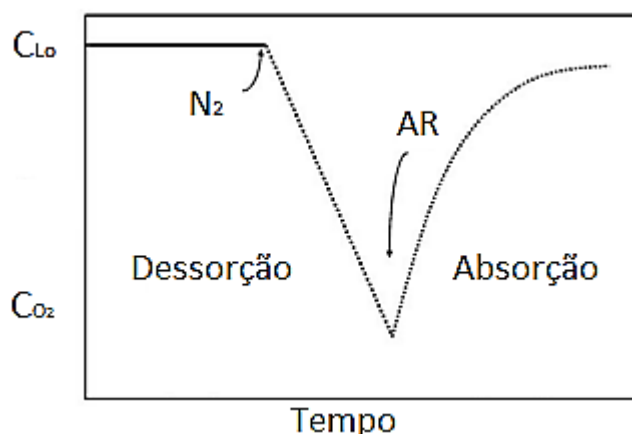
Numa cultura de células aeróbias como é o caso das células animais, o balanço de massa resulta da quantidade de oxigênio que é transferida ao volume do líquido menos a quantidade que é consumida pelas células, este sistema pode ser descrito através de uma equação de balanço de oxigênio como segue:

$$\frac{dc}{dt} = K_{TL} a (C_G - C_L) - Q_{O_2} X \quad (4.10)$$

Para determinar o coeficiente volumétrico global de transferência de oxigênio global ($K_{TL} a$) foi empregado o método dinâmico, usando apenas um sinal de resposta de um eletrodo imerso no meio de cultura submetido a aeração, isto para medir a variação com o tempo da concentração de oxigênio por absorção ou dessorção de oxigênio (Figura 12) (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009). A técnica dinâmica de

absorção foi iniciada pela calibração do eletrodo por injeção de nitrogênio gasoso no líquido, a fim de garantir uma eliminação completa do oxigênio dissolvido até uma resposta da sonda (eletrodo polarográfico com cartucho de membrana substituível InPro®6800 Series O₂ sensor 12/25 mm da Mettler, Toledo) no valor zero, a seguir, o eletrodo foi submetido a uma condição de saturação de oxigênio (100%) no líquido, estes dois pontos foram definidos como *set point* no console do BioFLO 110. Este procedimento foi realizado todos os dias durante a realização dos experimentos, antes de começar as medições.

Figura 12. Esquema do procedimento empregado pela técnica dinâmica de dessorção-absorção para as medições dos coeficientes de transferência de oxigênio.



Adaptado de GARCIA-OCHOA; GOMEZ, (2009)

Após a calibração do eletrodo foi injetado nitrogênio até um valor próximo de zero para começar as medições realizadas em triplicata, considerando as condições normais de operação de cultivo, 37 °C e 5% de CO₂, e variando as velocidades de rotação do cilindro interno e a vazão de ar que escoava no interior da membrana tubular de silicone.

A partir destas medições era obtida a variação de porcentagem de oxigênio dissolvido com o tempo na ausência de células, obtendo um balanço simplificado já que a demanda de consumo de oxigênio para este caso seria igual a zero temos:

$$\frac{dc}{dt} = K_{TL}a(C_G - C_L) \quad (4.11)$$

Onde, C_G é a concentração de oxigênio na fase gasosa, C a concentração de oxigênio no seio do líquido, K_{TL} o coeficiente global de transferência de massa e “a” é a área interfacial.

Assim integrando a Equação 4.11 podemos determinado o valor de $K_{TL}a$ como o coeficiente angular da Equação 3.12.

$$\ln\left(1 - \frac{C_L}{C_G}\right) = -K_{TL}a * t \quad (4.12)$$

Rearranjando a equação 4.12 obtém-se a Equação 4.13:

$$\frac{C_L}{C_G} = (1 - e^{-K_{TL}a \cdot t}) \quad (4.13)$$

Por outro lado, para determinar o tempo de resposta do eletrodo foram realizadas medições para obter a constante de atraso, estimando o valor do erro que as medições do coeficiente de transferência de oxigênio podem apresentar em relação ao tempo característico de transporte de oxigênio. Assim, AIBA *et al.*, (1973) propuseram uma correção no atraso da sonda expressa a partir de uma função de primeira ordem, expressada pela Equação 4.14:

$$\frac{dC_P}{dt} = k_p(C_L - C_P) \quad (4.14)$$

Onde, C é a concentração real de O_2 , C_p é o sinal do eletrodo e k_p a constante de atraso do eletrodo (h^{-1}).

Para avaliar a influência dos tempos de resposta do eletrodo na concentração real de oxigênio dissolvido (C_L) e na concentração prevista pela sonda (C_p) em função do tempo, foi introduzida na equação 3.14 o valor de C_L em função do tempo, obtido da equação 4.13, em seguida esta equação resultante foi integrada e considerando as condições $C_p=0$ para $t=0$ e $C_p=C_G$ para $t=\infty$, conseguimos a seguinte relação:

$$\frac{C_p}{C_G} = 1 + \frac{k_{TL}a}{k_p - k_{TL}a} * e^{-k_p t} - \frac{k_p}{k_p - k_{TL}a} * e^{-k_{TL}a t} \quad (4.15)$$

Nesta equação para valores de k_p muito maiores do que $k_{TL}a$, não há necessidade de fazer nenhuma correção dos valores dados pelo sinal do eletrodo (SCHMIDELL, 2001).

A constante do atraso do eletrodo (k_p) foi determinada através de um ensaio de degrau, submergindo o eletrodo em uma solução de sulfito de sódio, na qual a concentração de oxigênio atinge o valor zero e, posteriormente, transferindo o eletrodo rapidamente para uma dissolução intensamente agitada saturada com ar (100% de saturação) (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009). Nestas condições e considerando que $C_L=C_G$ em $t=0$ temos para a equação 4.14 após a integração:

$$\ln\left(1 - \frac{C_p}{C_G}\right) = -k_p * t \quad (4.16)$$

A equação 4.16 mostra que na representação gráfica dos valores de $\ln(1 - C_p/C_G)$ em função do tempo, obtidos pelo ensaio em degrau, é obtida uma reta cujo coeficiente angular permite determinar um valor para k_p .

Posteriormente e considerando as características do BEVT, foram definidas algumas condições de operação com o objetivo de estabelecer e quantificar a eficiência na transferência de oxigênio, sendo estabelecidas as variáveis:

1. Frequências de rotação do cilindro interno (60, 80, 100 e 120 rpm).
2. Vazões específicas de ar através da membrana tubular de silicone de 0,5; 1 e 2 vvm (30, 60 e 120 mL min⁻¹ em 60 mL, respectivamente).

Além disso, foram consideradas as seguintes hipóteses durante os experimentos:

1. Fase líquida homogênea.
2. Volume da membrana constante.
3. Temperatura da fase gasosa e líquida constante.

4.6. Metodologia para determinação de modelos empírico de k_{TLA} e k_{sa}

Para poder prever valores dos coeficientes de transferência em condições diferentes às medidas realizadas, foram determinados modelos empíricos a partir do método dos mínimos quadrados. Assim, estes modelos irão proporcionar valores da variável de resposta com um alto grau de precisão, sempre que os valores das variáveis independentes, neste caso frequência de agitação e vazão de ar, estejam na faixa na qual o modelo foi obtido.

Para montagem dos modelos empíricos a partir dos resultados experimentais obtidos, foi utilizado o programa Excel 2013 e sua aplicação solver. Para isto os valores das medições realizadas em triplicata foram comparados com um modelo polinomial, com o objetivo de minimizar a soma dos quadrados das diferenças entre o valor estimado pelo modelo e os dados coletados experimentalmente, sendo estas diferenças chamadas resíduos. As equações utilizadas para obter a otimização do modelo são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Relações matemáticas empregadas para a otimização do modelo.

Fonte de Variação	SQ	g.l.	MQ
Regressão	$\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$
Resíduos	$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p} = s^2$
Total	$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$	$n - 1$	

SQ_R = soma dos quadrados da regressão; SQ_r = soma dos quadrados dos resíduos
 \hat{y}_i = valores estimados pelo modelo; \bar{y} =média dos dados experimentais da variável de resposta
 y_i = valores obtidos experimentalmente; g.l.=Grau de liberdade (p =número de parâmetros do modelo e n = número de ensaios); MQ_R = mínimos quadrados da regressão; MQ_r = mínimos quadrados dos resíduos.

O coeficiente de correlação foi calculado pela equação 4.17 e a percentagem da variação explicável pelo modelo por meio da equação 4.18.

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} \quad (4.17)$$

$$\% \text{ da variação explicável} = \frac{(SQ_T - SQ_R)}{SQ_T} * 100 \quad (4.18)$$

Os resultados dos cálculos realizados através das equações mostradas anteriormente são apresentados no apêndice 8.4D.

4.7. Simulação da capacidade de oxigenação do BEVT para cultivo de CEMs

Foi realizada também uma simulação no programa MATLAB R2013a para avaliar a variação da concentração de oxigênio com o tempo considerando uma cinética de crescimento própria para a linhagem de CEM conhecida como hMSC-TERT. Esta linhagem está sendo utilizada em vários trabalhos no Laboratório de Tecnologia de Cultivos de Celulares do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, como modelo de CEM cultivada em vários tipos de biorreatores. Assim, a equação 4.19 representa um dos melhores comportamentos cinéticos com melhor crescimento obtido em frasco spinner no laboratório.

$$X = 60000 + 9405,5 * t - 98,9189 * t^2 + 1,6718t^3 - 0,00645t^4 \text{ cel/mL} \quad (4.19)$$

Para o cálculo da demanda de oxigênio utilizou-se um valor de qO_2 encontrando na literatura para este tipo de célula de $1,13 \times 10^{-10} \text{ mmolO}_2/\text{célula} \cdot \text{h}$ (PATTAPPA et al., 2011). Outros dados empregados para a simulação foram: alguns dos valores do coeficiente de transferência medidos, a concentração de oxigênio no meio em equilíbrio (C_G) igual a $2,22 \times 10^{-4} \text{ mmol mL}^{-1}$, muito comum nos meios de cultura para cultivo de células animais (DOYLE; GRIFFITHS, 1998), e a concentração de oxigênio no seio do líquido (C_L) de $1,11 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$, isto considerando condições de 50 % de saturação de ar, que pode ser uma condição razoável para CEMs, as quais normalmente se originam em condição de hipóxia. Assim, utilizando estas condições, o balanço apresentado na Equação 4.10 (item 5.5) e o código encontrado no apêndice 8.3 C foi possível realizar a simulação.

4.8. Cálculo da tensão de cisalhamento no BEVT

A tensão de cisalhamento foi determinada pela lei de viscosidade de Newton (Equação 4.20), caracterizada pela proporcionalidade da tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento.

$$\tau = \mu \gamma \quad (4.20)$$

Onde μ é a viscosidade do fluido ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), que para este estudo é o meio de cultivo α -MEM suplementado com 15% v/v de soro fetal bovino, considerado um fluido newtoniano, e γ a taxa de cisalhamento (s^{-1}).

A quantificação da taxa de cisalhamento na parede interna (γ), por ser a zona de maior atrito no biorreator de escoamento em vórtices de Taylor foi determinada pela correlação ajustada por Beaudoin (1989), a partir de dados apresentados no estudo de Taylor (1936) *apud* Moore, (1994) como segue:

$$\gamma = 0,23Ta^{0,5} \frac{r_i \Omega_i}{d} \quad (4.21)$$

Onde r_i é o raio interno no reator (m), Ω_i é a frequência de rotação do cilindro interno (s^{-1}), Ta é o número de Taylor e d sendo o espaço anular entre os dois cilindros (m).

A correlação empregada por Hooker, Lee e An (1989) dada pela Equação 4.22, também foi empregada para medir a taxa de cisalhamento média no ânulo entre os cilindros.

$$\gamma = \frac{2\pi r_i \Omega_i}{d} \quad (4.22)$$

Esta equação parte da hipótese do modelo de duas placas paralelas separadas por uma distância definida como d , na qual uma delas permanece fixa, sendo comparada em coordenadas cilíndricas com o cilindro externo, e a outra é posta em movimento a uma velocidade constante simulando o cilindro interno.

Outra relação a ser comparada com as anteriores foi empregada considerando várias variáveis como: o torque produzido pelo movimento do cilindro interno, o número adimensional do torque, a energia de dissipação, a geometria do BEVT e as frequências de rotação do cilindro interno empregadas. O número adimensional do Torque foi calculado baseado na correlação proposta por Wendt em 1933 *apud* Lathrop; Fineberg; Swinney, (1992)

$$G = 1,45 \frac{\sigma^{3/2}}{(1-\sigma)^{7/4}} Re^{3/2} \quad \text{para } 4 \times 10^2 < Re < 10^4 \quad (4.23)$$

$$G = 0,23 \frac{\sigma^{3/2}}{(1-\sigma)^{7/4}} Re^{1,7} \quad \text{para } 10^4 < Re < 10^5 \quad (4.24)$$

Onde σ é a relação entre raios e Re é o número de Reynolds. A partir destas relações é calculado o torque e, conseqüentemente, a energia de dissipação por segundo em unidade de volume (RACINA; KIND, 2006), sendo esta última variável dependente da taxa de cisalhamento (SÁNCHEZ PÉREZ et al., 2006), para poder estimar finalmente o valor da tensão de cisalhamento média no espaço anular, como segue nas Equações 4.25 a 4.28:

$$T = G * \rho * v^2 * h \quad (4.25)$$

$$\varepsilon = \frac{T * \Omega}{\rho * V} \quad (4.26)$$

$$\gamma = \left(\frac{\varepsilon}{\nu}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.27)$$

$$\tau = \gamma * \mu \quad (4.28)$$

Onde, ε é a energia de dissipação média ($W \cdot kg^{-1}$), h a altura do líquido (m), Ω é a frequências de rotação do cilindro interno (s^{-1}), ν é a viscosidade cinemática ($m^2 \cdot s^{-1}$) e ρ a densidade do líquido ($kg \cdot m^3$).

4.8.1. Cálculo do tamanho de turbilhões determinado pela escala de Kolmogorov

A escala de Kolmogorov que indica o tamanho de turbilhões gerados pelo movimento do fluido, foi calculada a partir da energia de dissipação (Equação 4.26) e a viscosidade cinemática como indica a equação 4.29 (KUNAS; PAPOUTSAKIS, 1990).

$$\eta = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon}\right)^{1/4} \quad (4.29)$$

Onde η obtida em unidades de μm .

4.9. Preservação celular

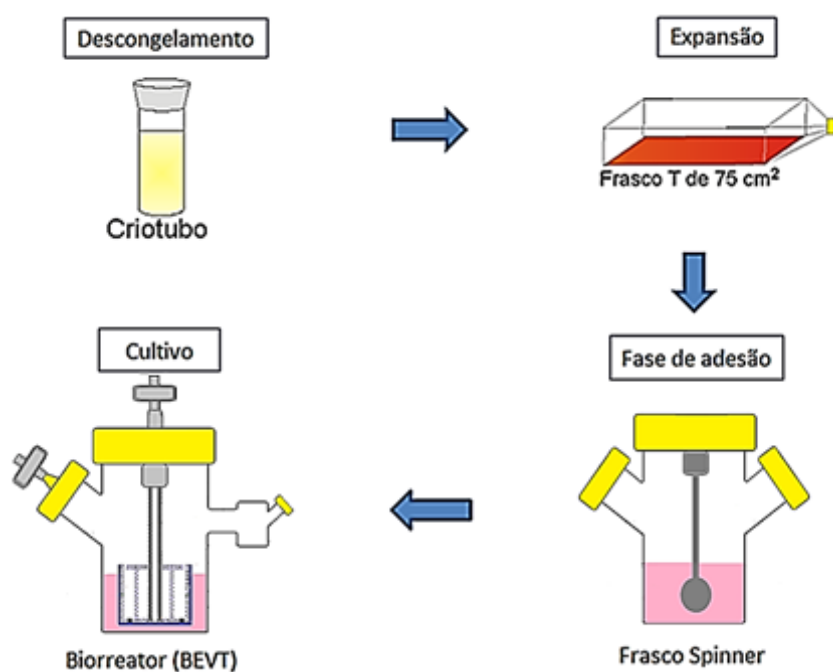
Para armazenamento e preservação das hMSC-TERT, estas foram retiradas do cultivo na fase exponencial e centrifugadas a 1600 rpm por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em volume de meio de congelamento, formado pela mistura de DMSO e soro em uma proporção de 1:9, mantendo uma concentração de 1×10^6 células/mL por tubos criogênicos. A seguir, as

células foram transferidas para um recipiente contendo isopropanol e mantidas por um dia no *freezer* a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aproximadamente. Finalmente, estas foram transferidas a um tanque com nitrogênio líquido para permanecer a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.10. Procedimento padrão seguido nos cultivos da linhagem hMSC-TERT no BEVT

A seguir se descreve o procedimento genérico que foi seguido para realizar experimentos de cultivo com a linhagem hMSC-TERT no BEVT (Figura 13).

Figura 13. Procedimento seguido na realização de experimento de cultivo para a expansão da linhagem hMSC-TERT.



Fonte: Acervo pessoal.

4.10.1. Ativação da linhagem hMSC-TERT

Para descongelar e ativar as células armazenadas em tubos criogênicos, estes eram retirados do nitrogênio líquido e imediatamente levados para banho termostático a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ até total descongelamento. A seguir, as células eram transferidas para tubo *Falcon* contendo 9 mL de meio de cultivo para obter o volume total de 10 mL, sendo posteriormente centrifugado, em centrífuga Excelsa Baby I, modelo 206 (FANEM,

Brasil), a 1600 rpm por 5 minutos para retirar o excesso de meio de congelamento. O sobrenadante era retirado e as células ressuspensas em 2 mL de meio de cultivo e colocadas em frascos T de 75 cm² contendo 13 mL de meio de cultivo com 15 % v/v de Soro Fetal Bovino, para começar a fase de expansão em incubadora da Thermo Forma (EUA) mantidas em ambiente controlado a 37°C e 5% de CO₂. Todos os procedimentos envolvendo manipulação asséptica foram realizados em Câmara de fluxo laminar Sterilgard III advance, classe II, da Baker Company (EUA), modelo SG403/SG603.

4.10.2. Procedimento de preparo em frasco T do inóculo

Para atingir a concentração de $1,25 \times 10^5$ células/mL a inocular no frasco spinner, onde se efetuava a fase de adesão celular, eram necessários no mínimo quatro frascos T de 75 cm² com 90% de confluência. Após obter a concentração necessária para o inóculo nestes frascos, retirava-se com pipeta o meio de cultivo e realizava-se a lavagem com 10 mL de PBS (Solução tampão fosfato) (composição apresentada na Tabela 11), com pH ajustado entre 7,2 e 7,4, para retirar qualquer resto de meio e/ou células mortas. Em seguida, adicionava-se 4 mL de Tryple (GIBCO), enzima de dissociação celular, para desaderir as células da superfície dos frascos. Após 5 minutos mantendo os frascos na temperatura de 37° C e 5% de CO₂, a ação enzimática era interrompida com 6 mL meio de cultivo contendo 15% v/v de SFB. As células em suspensão eram transferidas a Falcons para ser submetidos a um processo de separação em uma centrífuga Excelsa Baby I, modelo 206 (FANEM, Brasil), a 1600 rpm por 5 minutos. O sobrenadante era descartado e as células ressuspensas em 2 mL de meio de cultivo com 15% v/v de SFB. Desta suspensão era retirada uma alíquota para contagem de células no hemocítômetro. Após o procedimento anterior, das células presentes nos *Falcons* podia ser retirada a quantidade necessária para inoculação no frasco spinner.

Tabela 11. Solução PBS utilizada para retirar resquícios de células mortas do frasco T.

COMPONENTE	QUANTIDADE
NaCL	8 g
KCL	0,2 g
NaHPO ₄	1,15 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
Água purificada no sistema Mili-Q	1000 mL

4.10.3. Adesão celular em frasco spinner

Por outro lado, na preparação dos microcarregadores, uma concentração de 3 g/L em suspensão de PBS, com pH aproximado de 7,2, era preparada e mantida durante aproximadamente uma hora, para depois ser esterilizados a 120°C por 30 minutos. A seguir, os microcarregadores eram lavados com PBS estéril e deixados finalmente em quantidade de meio de cultivo até cobri-los totalmente. Na preparação do frasco spinner, a solução heptanólica de organosiloxano clorado chamada Sigmacote® (Sigma-Aldrich, EUA) era adicionada no interior, permitindo a formação de uma fina camada que evita a adesão de células e microcarregadores à superfície do vidro. Depois de alguns minutos para permitir a evaporação do heptano à temperatura ambiente, o frasco spinner era esterilizado a 120°C por 30 minutos para poder ser utilizado na câmara de fluxo laminar.

Após esterilização do frasco spinner e em condições assépticas, era adicionado o meio de cultivo com 15% v/v de SFB; os microcarregadores hidratados e a quantidade de células necessários para um de volume total de 50 mL. É importante mencionar que anteriormente à inoculação das células estas eram filtradas por membrana com 100 µm de tamanho de poro (MILLIPORE, Alemanha), para remover agregados de células maiores que 100 µm e assim evitar morte celular prematura durante o cultivo, pela criação de zonas necróticas na parte central dos agregados (KINNEY; SARGENT; MCDEVITT, 2011). Finalmente o spinner era colocado na incubadora Thermo Forma (EUA) a 37°C, sob 5% v/v CO₂ para iniciar a fase de adesão celular com duração de 8 h. Esta primeira etapa do cultivo era dividida em 4 partes, cada uma delas com tempo de duração de duas horas e frequência de rotação de aproximadamente 40 rpm. Na primeira etapa o cultivo era agitado por 30 s a cada 15

min. Na etapa seguinte a agitação era mantida por 30 s a cada 30 min. Na próxima etapa a agitação com duração de 30 s era iniciada a cada 60 min e na etapa final o cultivo era mantido estático. A intermitência é necessária para permitir que as células consigam aderir aos microcarregadores de forma homogênea. A frequência de rotação intermitente utilizada nesta etapa foi escolhida a partir do estudo de Ng; Berry; Butler, (1996), que evidenciou condições favoráveis para o crescimento celular com esta metodologia.

Após 8 h de cultivo, era retirada a primeira amostra para análise e em seguida a solução de células/microcarregadores era transferida ao BEVT. A amostra retirada de meio de cultivo era submetida a análises de viabilidade celular (células aderidas), quantificação de células em suspensão, quantificação de consumo de nutrientes e produção dos metabólitos mais importantes.

4.10.4. Expansão da linhagem hMSC-TERT no BEVT

Após a transferência da suspensão de células ao BEVT, adicionava-se mais 10 mL de meio e este era transferido para incubadora de CO₂ nas mesmas condições utilizadas para o frasco Spinner. A frequência de rotação do cilindro interno, de 90, 100, 110 e 120 rpm, era mantida até o final de cada experimento. A partir das 24 h de operação, e a cada 24 h eram realizadas trocas de meio de 50 % do volume total de cultivo (60 mL) até finalizar o experimento, ao mesmo tempo em que eram retiradas amostras para análises antes e depois das trocas. Este procedimento apresentava como objetivo principal controlar o processo, proporcionar remoção de nutrientes e diluição dos metabólitos que podem limitar o crescimento. O pH foi controlado com a adição de NaOH 0,5 M e manipulação do CO₂. Os quatro experimentos foram realizados sem injeção de ar no BEVT em diferentes frequências de agitação (90, 100, 110 e 120 rpm). Esta escolha se justifica pelo fato de ser muito comum nos laboratórios de cultivos de células animais em cultivos rotineiros de células, utilizar equipamentos ou dispositivos simples como frascos T, garrafas rolantes e frascos spinner sem injeção externa de ar.

4.11. Métodos analíticos

4.11.1. Análise de viabilidade e densidade celular

A contagem das células foi realizada com uma diluição da solução aquosa de azul de tripan 0,4% (v/v) (GIBCO, EUA), para determinar a densidade e a viabilidade celular por meio da câmara de Neubauer com ajuda de microscópio BX51 (Olympus, Japão). O corante permite a contagem diferencial de células vivas e mortas (NG; BERRY; BUTLER, 1996), sendo estas últimas permeáveis ao corante adquirindo cor azulada enquanto que as células viáveis mantêm sua cor original.

4.11.2. Análise da concentração celular baseada no método de MTT

Para determinar a concentração celular foi empregado o método do MTT usando o kit de ensaio toxicológico *in vitro* baseado no MTT (Sigma-Aldrich, EUA), fundamentado na reação enzimática na qual é reduzido o Brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (amarelo) para formazan (azul escuro). A quantificação do número de células é realizada a partir da atividade mitocondrial das células viáveis. Assim, no momento de começar o experimento uma amostra de células é usada para elaboração de uma curva de calibração, já que partindo de uma concentração conhecida destas, valores de absorbância são obtidos no comprimento de onda de 590 nm com ajuda de um espectrofotômetro Thermo Forma (EUA) de microplacas de poços.

4.11.3. Medição do tamanho de agregados durante o cultivo

Das amostras retiradas a cada 24h, era corada uma quantidade dos microcarregadores com 20 µL de solução aquosa de azul de tripan 0,4% v/v (GIBCO, EUA), para ser posteriormente transferida à câmara de Neubauer e por meio do microscópio modelo CK30 (Olympus, Japão) ser fotografados. As imagens recolhidas foram tratadas no software Imagem Pro Plus 8.5, para posterior medição do diâmetro médio de cada agregado e/ou microcarregadores. Foram realizadas 40 medições de diâmetros para calcular finalmente a média aritmética e o desvio padrão para cada tempo.

4.11.4. Análise de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia

Durante os experimentos, foram separadas amostras dos sobrenadantes e mantidas no congelador a -20 °C para posterior análise de glicose, aminoácidos, amônia e lactato.

4.11.4.1. Análise de lactato, glutamina e glicose

O bioanalisador YSI-7100 MBS (*Multiparameter Bionanalytical System*, Yellow Springs Instruments, EUA) foi utilizado para análise rápida e contínua de glicose, ácido láctico, glutamina e glutamato. Sua metodologia baseia-se na produção de peróxido de hidrogênio pela enzima oxidase imobilizada em membranas na presença do substrato. O peróxido é oxidado em um ânodo de platina produzindo elétrons com taxa constante e proporcional à quantidade de substrato, sendo assim a concentração do substrato definida.

4.11.4.2. Análise de aminoácidos

A análise de aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras do sobrenadante foram preparadas segundo as etapas de filtração, secagem, reidratação, derivatização até sua diluição em tampão antes da injeção no equipamento. Foi utilizada uma coluna pico-tag (Waters, IRL) como fase estacionária e como eluente foi utilizado um gradiente constituído por duas fases móveis (A e B). A fase A é composta de acetato de sódio tri-hidratado 17,86 g/L (J. T. Baker, EUA), trietilamina 0,047% v/v (SIGMAALDRICH, EUA), EDTA 0,0188% v/v e acetonitrila 6% v/v (Panreac, ESP) em água ultrapura tipo 1. A fase B contém acetonitrila 60% v/v e EDTA 0,02% v/v em água ultrapura tipo 1. As condições de operação do cromatógrafo da Waters foram: temperatura de 36°C, tempo de corrida de 45 minutos e gradiente com vazão pré-determinada. Os picos foram detectados no comprimento de onda 254 nm. Também foi obtida uma curva a partir de padrões adquiridos da Waters.

4.11.4.3. Análise de amônia

As análises de amônia foram realizadas com eletrodo de íon seletivo da Thermo Scientific (EUA), modelo ORION 710A. O medidor foi utilizado para obter as medidas em mg·L⁻¹.

4.12. Velocidade específica de crescimento e fator de expansão

A velocidade específica de crescimento (μ) da fase exponencial foi calculada a partir da equação 4.30.

$$\mu = \frac{dN}{dt} \cdot \frac{1}{N} = \frac{\ln(N_{t_2}/N_{t_1})}{t_2 - t_1} \quad (4.30)$$

Onde, μ é a velocidade específica de crescimento, N_{t_1} o número de células no tempo 1, N_{t_2} o número de células no tempo 2, t_1 o tempo 1 e t_2 = tempo 2.

O fator de expansão máximo durante o experimento é calculado pela equação 4.31.

$$FE = \frac{X_f}{X_i} \quad (4.31)$$

Sendo X_f e X_i , as concentrações máxima de células obtida e inicial, respectivamente

4.13. Diferenciação celular

As células recuperadas após o cultivo foram induzidas à diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos. Para isto foram utilizadas três placas de 24 poços, nas quais foram colocadas 5×10^3 cel/mL em 6 poços em cada placa para iniciar o processo de diferenciação com os indutores específicos empregados para cada caso (Tabela 12). Durante o processo de diferenciação eram realizadas trocas da metade do meio indutor a cada 2-3 dias. As placas foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂. Após completar o tempo de incubação as placas eram submetidas ao processo de coloração pelo procedimento apresentado na Tabela 12. Finalmente, após a diferenciação as placas eram observadas no microscópio óptico para coletar evidência fotográfica. A diferenciação em osteócitos foi evidenciada pelo acúmulo de cristais de

oxalato de cálcio. Por outro lado, os adipócitos apresentaram formação de gotículas de gordura coradas em amarelo e os condrócitos evidenciaram formação de agregados de coloração azulada semi-aderidos à superfície da placa.

Tabela 12. Processo de diferenciação celular.

	Indutores específicos*	Tempo de incubação (dias)	Coloração
Adipócitos	Dexametasona (10^{-8} M) e Rosiglitazona (5μ M)	15	Para cada poço foi retirado o meio indutor e colocado 500μ L de paraformaldeído 4% (v/v) (por 30 min), em seguida retirado para adicionar álcool 70% (v/v) por 2 minutos. Posteriormente, o álcool foi retirado para adicionar o corante Sudan II, que foi retirado após 5 minutos para lavagem do poço com álcool 70% (v/v).
Osteócitos	Dexametasona (10^{-8} M), ácido ascórbico 2-fosfato (50μ M) e	15	Para cada poço foi retirado o meio indutor e colocado 500μ L de paraformaldeído 4% (v/v) por 30 min, em seguida foi adicionado o corante nitrato de prata 5% (v/v) por 30 minutos em ausência de luz. Cumprido o tempo este foi retirado para adicionar Tiosulfato de Sódio até cobrir o poço por 5 minutos, sendo retirado finalmente com água destilada.
Condrócitos		21	Depois de retirado o meio indutor de cada poço, eles foram lavados com 500μ L de PBS e foi adicionado paraformaldeído 2%. Após 30 minutos, os poços foram lavados com água destilada e finalmente foi adicionado 1% de Azul de Alciano deixado por 1 hora, para ser retirado depois por água destilada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Transferência de oxigênio no BEVT

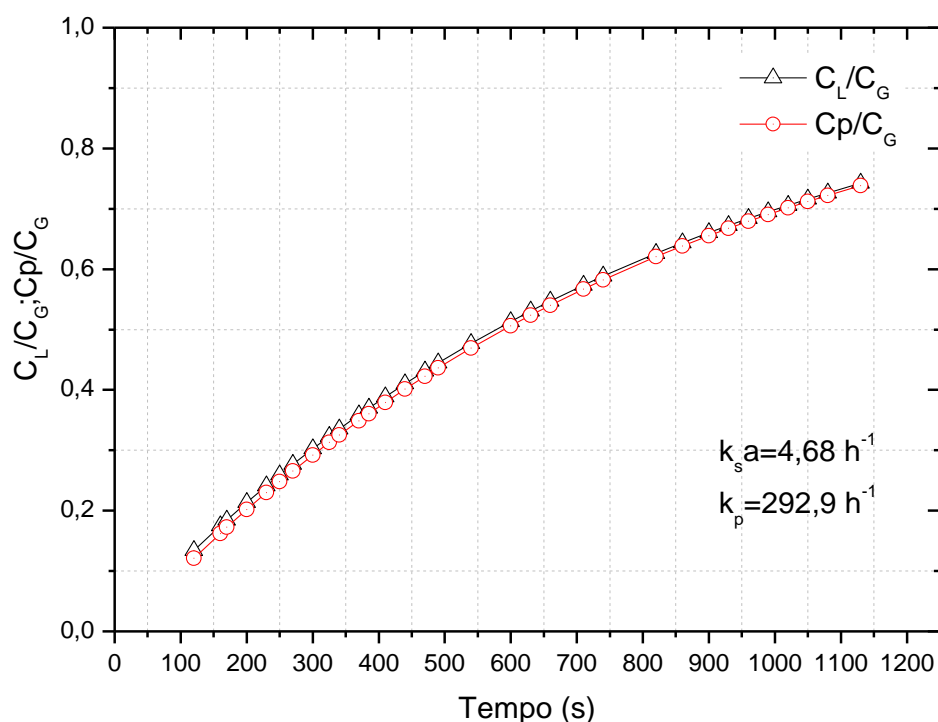
5.1.1. Aferimento do eletrodo de oxigênio dissolvido utilizado nas medições de k_{La}

Para conferir a confiabilidade dos dados da concentração de oxigênio dissolvido, visando à determinação dos coeficientes de transferência de oxigênio, foram realizadas medições em quadruplicata usando o método de degrau (SCHMIDELL W.; ALMEIDA L. U.; AQUARONE E.; BORZANI W., 2001) para duas diferentes amostras de meio de cultivo alfa MEM suplementado com 15% v/v de SFB. O volume de meio e temperatura foram os mesmos usados para todas as medições realizadas, 60 mL e 37 °C. A Figura 14 apresenta os resultados da relação C/C_G para uma vazão de ar de 0,5 vvm com frequência de rotação do cilindro interno de 60 rpm, que apresentou como resultado k_{sa} de 4,68 h⁻¹, e os resultados obtidos usando a Equação 3.15 (item 3.7). Destas medições obtidas pelo método de degrau foi possível obter o valor da constante de atraso do eletrodo de k_p de 292,9 h⁻¹.

Os resultados permitem concluir que a resposta do eletrodo é razoavelmente rápida, oferecendo confiabilidade nos dados obtidos de oxigênio dissolvido no meio, mesmo em condições de aeração e rotação mais baixas, proporcionando aproximações dos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio com baixo erro, sem a necessidade de efetuar correções nas medições.

Assim, já demonstrado que o tempo de resposta do eletrodo era desprezível, são apresentados os resultados obtidos do K_{TLA} e k_{sa} no item seguinte a partir das diferentes condições de operação de velocidades de rotação e vazões específicas de ar injetado.

Figura 14. Resultados obtidos para análise da resposta do eletrodo de OD a ser utilizado nos estudos de transferência de oxigênio do BEVT. Para reproduzir as condições utilizadas nos cultivos no BEVT utilizou-se volume de 60 mL de meio de cultura alfa MEM suplementado com 15% v/v de SFB, a 37°C.

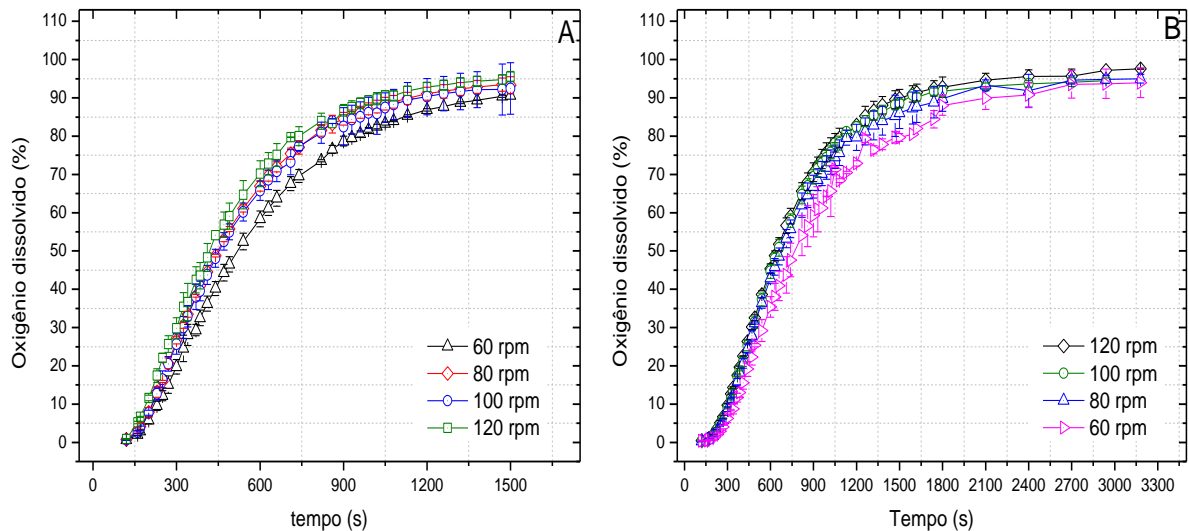


Fonte: Acervo pessoal

5.1.2. Determinação dos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio no BEVT

A transferência de oxigênio no BEVT foi quantificada partindo de um balanço de massa que permitiu obter, a partir dos perfis da porcentagem de oxigênio dissolvido dados pelo método dinâmico de absorção, valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio global (k_{TLA}) e na interface gás-líquido (k_{sa}), para diferentes condições de vazão de ar e de frequência de rotação do cilindro interno. Assim, para avaliar o processo de transferência de oxigênio realizaram-se medições: através da área de contato da membrana de silicone com meio de cultura para determinação de k_{TLA} e através da superfície de contato ar-líquido para determinação de k_{sa} . Na Figura 15 são apresentados os resultados obtidos dos perfis de porcentagem de oxigênio dissolvido para o k_{TLA} e o k_{sa} , que foram realizadas com 60mL de meio alfa MEM suplementado com 15 % v/v de soro fetal bovino (SFB) na ausência de células. Os dados foram realizados em triplicata e em seguida tratados no programa OriginPro 8.5.

Figura 15. Perfis de porcentagem de oxigênio dissolvido em função do tempo para determinação de k_{TLA} (A) e de k_{sa} (B) a vazão de ar constante de 1 vvm e frequências de rotação do cilindro interno de 60, 80, 100 e 120 rpm. Utilizou-se como fase líquida 60 mL de meio alfa MEM a 37°C suplementado com 15% v/v de SFB, na ausência de células.



Fonte: Acervo pessoal

Na Figura 15A e 15B pode ser evidenciada a ligeira contribuição do emprego da membrana de silicone no transporte de oxigênio, atingindo a saturação do meio em menor tempo (aproximadamente de 25 min contra 35 min) para uma frequência de agitação de 120 rpm. Desta forma, os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio global (k_{TLA}), seguindo a lógica, apresentaram valores ligeiramente maiores aos obtidos com aeração somente na área da interface gás-líquido (k_{sa}), como pode ser evidenciado nas Tabelas 13 e 14. A importância do uso de membranas de silicone e a melhora na oxigenação do meio de cultura sem formação de bolhas, sendo isto uma consideração importante no caso de cultivo de células animais.

Tabela 13. Resultados da determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio global (k_{TLA}) obtidos a diferentes condições de frequências de rotação do cilindro interno (60, 80, 100 e 120 rpm) e vazões específicas de ar (0,5, 1 e 2 vvm). O biorreator foi operado sem células em condições normais de cultivo de 37°C e meio de cultura alfa MEM com 15 % v/v de SFB.

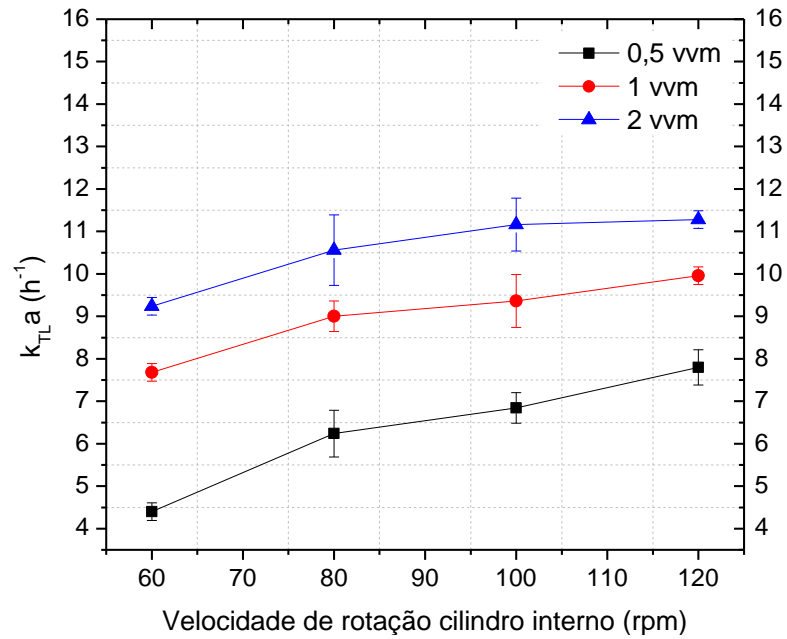
Frequências de rotação do cilindro interno (rpm)	Valores de k_{TLA} (h^{-1})		
	0,5 vvm	1 vvm	2 vvm
60	4,8±0,2	7,68±0,20	9,24±0,20
80	6,24±0,54	9±0,3	10,56±0,83
100	6,72±0,41	9,36±0,62	11,16±0,62
120	7,8±0,4	9,96±0,20	11,28±0,20

Tabela 14. Resultados da determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio global (k_{sa}), obtidos a diferentes condições de frequências de rotação do cilindro interno (60, 80, 100 e 120 rpm) e vazões específicas de ar (0,5, 1 e 2 vvm). O biorreator foi operado sem células em condições normais de cultivo de 37°C e meio de cultura alfa MEM com 15 % v/v de SFB.

Velocidade de rotação do cilindro interno (rpm)	Valores de k_{sa} (h^{-1})		
	0,5 vvm	1 vvm	2 vvm
60	4,68±0,36	5,28±0,83	7,8±0,9
80	5,04±0,00	6,24±0,54	9±0,0
100	5,16±0,54	6,48±0,00	9,48±0,20
120	5,4±0,36	7,08±0,41	9,6±0,20

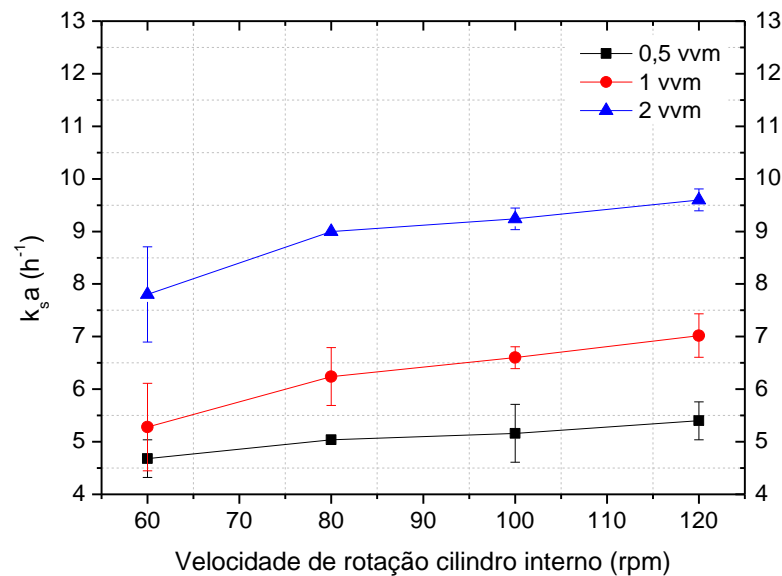
A partir dos resultados apresentados nas Tabelas 13 e 14 foram elaboradas as Figuras 16 e 17.

Figura 16. Resultados das determinações do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{TLA}) a frequências de rotação de 60, 80, 100 e 120 rpm e vazões específicas de ar de 0,5, 1 e 2 vvm. Utilizando meio alfa MEM suplementado com 15% de SFB a 37°C. As medições foram realizadas em triplicata a fim de obter o desvio padrão das medições apresentado pelas barras nos pontos experimentais.



Fonte: Acervo pessoal

Figura 17. Resultados das determinações do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{sa}) a diferentes frequência de rotação do cilindro interno de 60, 80, 100 e 120 rpm e vazões específicas de ar de 0,5, 1 e 2 vvm. Utilizando meio de cultivo alfa MEM suplementados com 15% de SFB a 37°C. As medições foram realizadas em triplicata a fim de obter o desvio padrão das medições apresentado pelas barra nos pontos experimentais.



Fonte: Acervo pessoal

Nas Figuras 16 e 17 o fato das pequenas diferenças dos valores do k_{TLA} e k_{sa} são atribuídas à resistência dupla, em série, originada pela membrana de silicone e a camada de líquido estagnada em volta da membrana. Assim, dos resultados anteriores se pode concluir que a transferência de oxigênio acontece predominantemente pela interface gás-líquido, sendo mais evidente quando a vazão de ar é pequena (0,5 vvm). Isto pode ser verificado nos cálculos apresentados na Tabela 15. Estes resultados também indicaram um maior efeito da vazão de ar, em comparação à frequência de rotação do cilindro interno, nos valores dos coeficientes de transferência de massa (k_{TLA} e k_{sa}). Isto pode ser observado mais claramente quando a transferência é dada somente através da superfície do líquido. Resultados da pouca influência causada pela agitação em sistemas de transferência de oxigênio através de membranas também foram encontradas na literatura (LEE; HUANG; LEE, 1990; MOREIRA et al., 1995a). Igualmente para a aeração superficial, a potência inserida através da agitação não tem uma influência forte sobre o k_{sa} , pelo menos para vazões de ar entre 0,5 e 2 vvm, apresentadas neste trabalho.

Na Tabela 15 são apresentados os valores das respectivas resistências associadas com a transferência de oxigênio no BEVT. Nestes resultados pode ser observado que a maior resistência é dada pela película estagnada líquida comparada com a apresentada pela membrana, coerente com os estudos de Côté; Bersillon; Huyard (1989). Além disso, é notável a pequena diminuição desta resistência com o aumento na frequência de rotação, observado também nas Figuras 16 e 17 como já foi mencionado anteriormente.

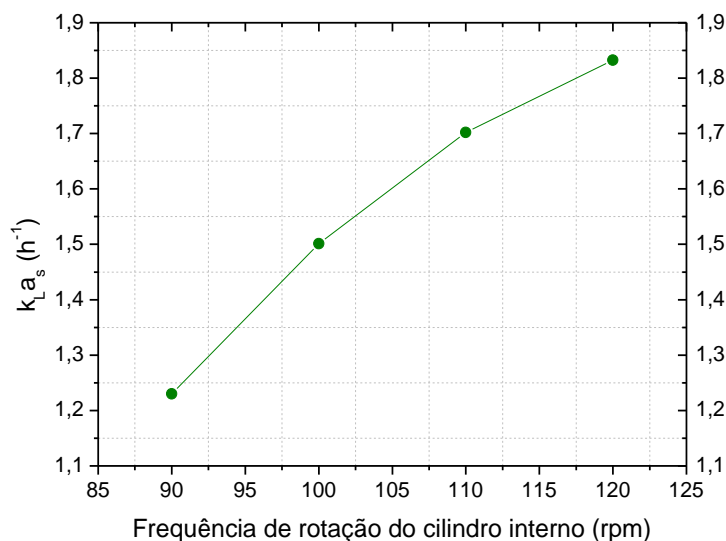
Tabela 15. Comparação das resistências da transferência de oxigênio no meio de cultivo alfa MEM a 37°C no BEVT. Resistência total do sistema ($1/K_{Ta}$) e as individuais da membrana ($1/k_{ma}$), da película estagnada líquida ao redor da membrana ($1/K_{La}$) e da película estagnada na interface gás-líquido ($1/k_{sa}$).

		Resistências à transferência de oxigênio (h)			
Vazão de ar (vvm)	Frequência rotação (rpm)	Total $1/K_{Ta}$	Interface gás-líquido $1/k_{sa}$	Membrana $1/k_{ma}$	Película estagnada de líquido ao redor da membrana $1/K_{La}$
0,5	60	0,208	0,225	0,042	2,735
	80	0,160	0,198	0,042	0,791
	100	0,148	0,193	0,042	0,598
	120	0,128	0,185	0,042	0,374
1	60	0,130	0,189	0,042	0,374
	80	0,111	0,160	0,042	0,319
	100	0,106	0,154	0,042	0,304
	120	0,100	0,141	0,042	0,304
2	60	0,108	0,128	0,042	0,652
	80	0,094	0,111	0,042	0,598
	100	0,089	0,105	0,042	0,552
	120	0,088	0,104	0,042	0,552

Com o objetivo de conhecer também a eficiência da transferência de oxigênio para uma vazão de ar igual a zero, foram medidas as porcentagens de oxigênio para as frequências de rotação de 90, 100, 110 e 120 rpm e assim obtido o coeficiente de transferência de oxigênio para cada caso. Estas medições foram realizadas para observar o desempenho do BEVT nesta situação e pelo fato de ser uma condição amplamente utilizada na literatura em cultura celular. Na Figura 18 são apresentados os resultados obtidos.

Contudo, os resultados dos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio, seja com o uso da membrana (k_{TLA}), sem ela (k_{sa}) ou em condições de vazão de ar zero (k_{La_s}) são considerados satisfatórios, comparados com os obtidos em biorreatores convencionais, tipo tanque agitado (Tabela 16), operados com altas frequências de agitação para obter resultados comparáveis aos obtidos neste estudo. Contudo, o sistema em estudo não consegue superar a eficiência da transferência de oxigênio apresentada nos sistemas aerados por aspersores (MOREIRA et al., 1995a), que mesmo tendo vantagens são desfavoráveis quando se trata de cultivo de células animais pela geração de bolhas e de espuma (KUNAS; PAPOUTSAKIS, 1990; WU, 1995).

Figura 18. Resultados das medidas do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La_s}) realizados sem adição externa de ar e a diferentes frequências de rotação do cilindro interno de 90, 100 e 120 rpm. As condições de operação foram iguais às utilizadas em cultivo com meio alfa MEM suplementados com 15% v/v de SFB a 37°C. As medidas foram realizadas em duplicata.



Fonte: Acervo pessoal

Tabela 16. Comparação dos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio global (k_{TLA}) obtidos neste trabalho com os de outros biorreatores tipo BEVT e outras configurações encontrados na literatura.

BIORREATOR	CONDIÇÕES	AERAÇÃO	k_{La} (h^{-1})	REFERÊNCIA
1) Wave 2) HTBR*	1) 150 rpm 2) 300 rpm.	Aeração interface gás-líquido	1) 2-4 2) 1,7-3,3	HANSON et al., (2009)
Tanque agitado	1) 50 rpm 2) 250 rpm	Membrana tubular (80% porosidade) 600 mLmin ⁻¹ em 1550 mL (0,39 vvm)	1) 0,63 2) 1,584	DUCOMMUN et al., (2000)
Tanque agitado	Velocidades entre 50 e 350 rpm, para os três sistemas de aeração.	1) Aeração interface gás-líquido (0,2 vvm) 2) Aspersores (0,04 vvm) 3) Membrana (0,5 vvm)	1) 0,5 e 3,8 2) 0,8 e 15,5 3) 3 e 6	MOREIRA et al., (1995a)
BEVT	1) 25 rpm 2) 50 rpm 3) 75rpm	Membrana tubular 1) 400 mL.min ⁻¹ em 800 mL (0,5 vvm) de meio de cultura DMEM	1) 3,3 2) 4,2 3) 5,3	SANTIAGO; GIORDANO; SUAZO, (2011)
BEVT	1) Re=101.7 2) Re=1018	Aeração interface gás-líquido	1) 0,18 2) 0,78	CURRAN; BLACK, (2005)

*Biorreator de alto rendimento

5.1.3. Modelos empírico de k_{La} em função da agitação e aeração

Com o objetivo de ter uma visão geral da variação do k_{La} em função da agitação e aeração, foram construídos dois modelos empíricos, utilizando a metodologia de análise de superfície de resposta considerando os níveis das variáveis avaliadas. Sendo as variáveis independentes a frequência de rotação com 4 níveis (60, 80, 100 e 120 rpm) e a vazão de ar com 3 níveis (0,5; 1,0 e 2,0 vvm). Os modelos foram baseados no método do ajuste dos mínimos quadrados (item 3.6).

Nos cálculos para determinação dos modelos, os efeitos das variáveis sobre o processo e a obtenção da superfície de resposta, foram realizados no Excel 2013 com a aplicação Solver e com o programa Statistica versão 12.

Na primeira situação, quando a transferência de oxigênio ocorre através da membrana de silicone, os dados se ajustaram bem a uma análise de regressão múltipla quadrática, dado pela Equação 4.1. Considerando as duas variáveis independentes, a frequência de rotação (N) e a vazão de ar (Q), e uma variável dependente que é o coeficiente global de transferência de massa (k_{TLA}) temos:

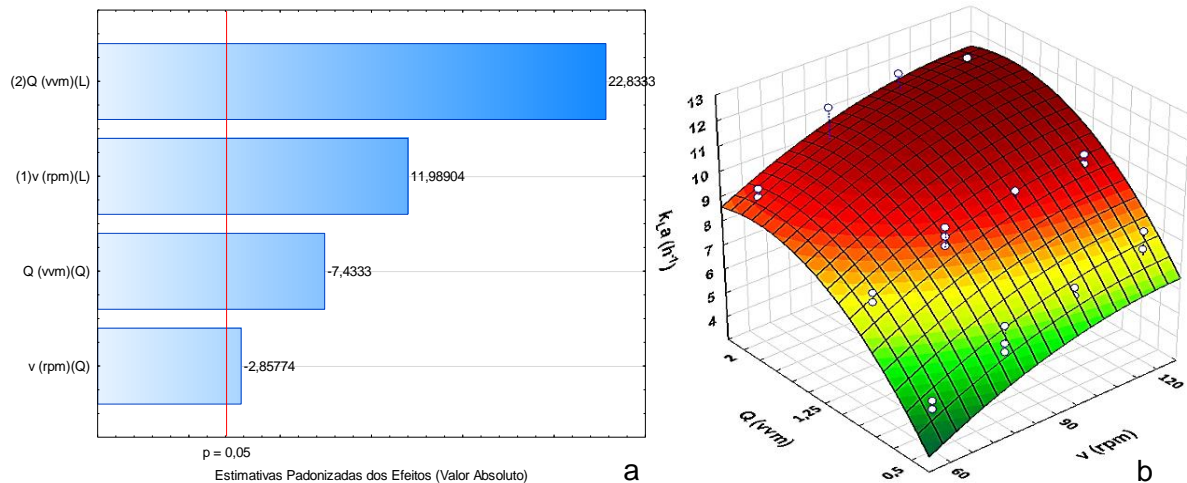
$$k_{TLA}: 10,095 + 1,182N - 0,4725N^2 + 2,055Q - 1,3275Q^2 \quad (4.1)$$

Os valores das constantes representam uma medida do efeito das variáveis independentes sobre o K_{TLA} , sendo maiores os valores destas para a variável Q , representando uma maior influência na transferência de oxigênio nas condições usadas neste trabalho.

A grandeza da importância das variáveis também é apresentada na Figura 19a, onde é observado que as variáveis consideradas (vazão de ar e velocidade de rotação) apresentam efeito significativo sobre o comportamento do BEVT. Os sinais também possuem significado e representam a influência positiva ou negativa sobre a variável de resposta. A Figura 19b apresenta a superfície de resposta obtida com os resultados das Tabelas 13 e 14. Observando essa figura e apoiado nos parâmetros estatísticos que quantificam a qualidade do ajuste, pode-se dizer que o modelo representa com bastante fidelidade os resultados experimentais de transferência de

oxigênio. Portanto, o modelo empírico pode ser utilizado para prever com confiança valores de K_{TLA} para diversas situações de agitação e aeração do BEVT.

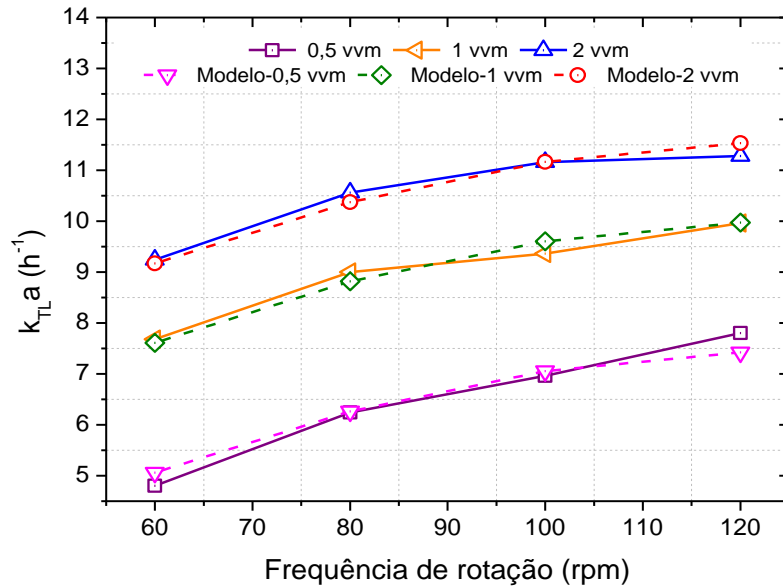
Figura 19. Representação dos efeitos das variáveis do modelo (Equação 4.1) (a) e da superfície de resposta (b) dos valores experimentais obtidos da frequência de rotação do cilindro interno de 60, 80, 100 e 120 rpm e vazões de ar de 0,5, 1 e 2 vvm, para a determinação do coeficiente global de transferência de oxigênio K_{TLA} .



Fonte: Acervo pessoal

Pela Figura 20, pode-se verificar de forma mais evidente que o modelo obtido se ajusta muito bem aos dados obtidos experimentalmente, com coeficiente de correlação ou R^2 de 0,96 indicando que 96% da variação total em torno da média dos dados é explicada pela regressão, ficando para os resíduos apenas 4%. Além disso, obteve-se uma porcentagem de variação explicável de 96,6%, o que significa que o modelo pode ser preditivo na faixa das variáveis consideradas.

Figura 20. Comparação entre os valores de K_{TLA} obtidos experimentalmente e os obtidos com o modelo empírico proposto.



Fonte: Acervo pessoal

Para vazão de ar zero o modelo obtido é apresentado pela Equação 4.2, como segue:

$$k_L a_s = -4,3803 + 0,094N - 0,000352N^2 \quad (4.2)$$

Este modelo baseado nas medidas realizadas para as frequências de agitação entre 90-120 rpm, também se ajusta muito bem com os valores obtidos experimentalmente, com R^2 de 1.

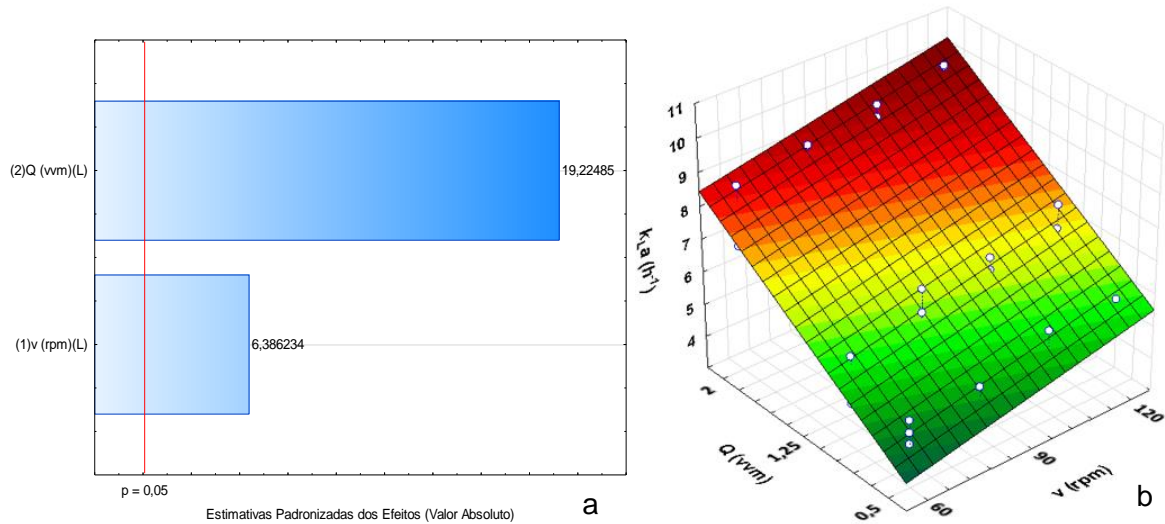
Por outro lado, o modelo resultante proporcionado pelo sistema aerado através da interface gás-líquido é apresentado pela Equação 4.3

$$k_{sa}: 6,96359 + 0,69193N + 1,911259Q \quad (4.3)$$

sendo N a frequência de rotação do cilindro interno e Q vazão de ar. Neste modelo também pode ser observado uma maior influência do Q no valor de resposta da variável k_{sa} . Estes resultados podem ser observados também na Figura 21a. A superfície de resposta também foi obtida e é apresentada na Figura 21b, sendo igualmente coerente com os dados apresentados na Tabela 14.

Figura 21. Representação dos efeitos das variáveis do modelo (a) e da superfície de resposta (b) dos valores experimentais para determinação do coeficiente de transferência de oxigênio (k_{sa}) para valores

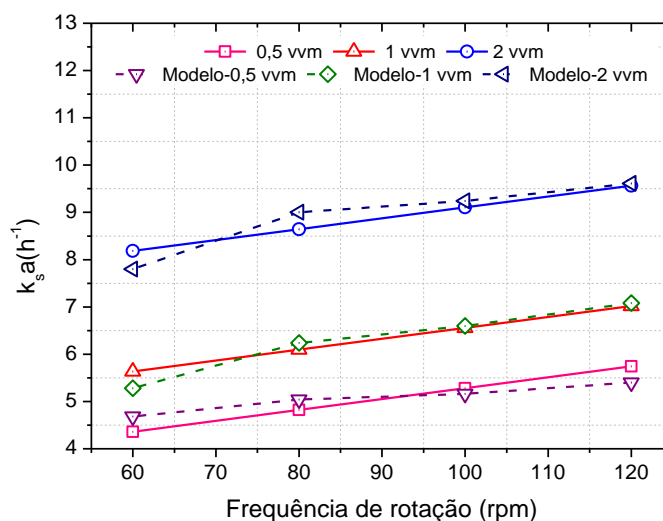
experimentais obtidos da frequência de rotação do cilindro interno de 60, 80, 100 e 120 rpm e vazões de ar de 0,5, 1 e 2 vvm, quando a transferência de oxigênio ocorre através da interface gás-líquido.



Fonte: Acervo pessoal

Através da Figura 22, pode ser verificado que o modelo escolhido também se ajusta bem com os dados obtidos experimentalmente, com coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,93, sendo 93% da variação total em torno da média explicada pela regressão, ficando para os resíduos apenas 7,0%. Além disso, foi obtida uma porcentagem de variação explicável de 94,9%, o que quer dizer que o modelo pode ser preditivo nas faixas avaliadas das variáveis.

Figura 22. Comparação entre os valores de $k_s a$ obtidos experimentalmente e os obtidos com o modelo empírico proposto.



Fonte: Acervo pessoal

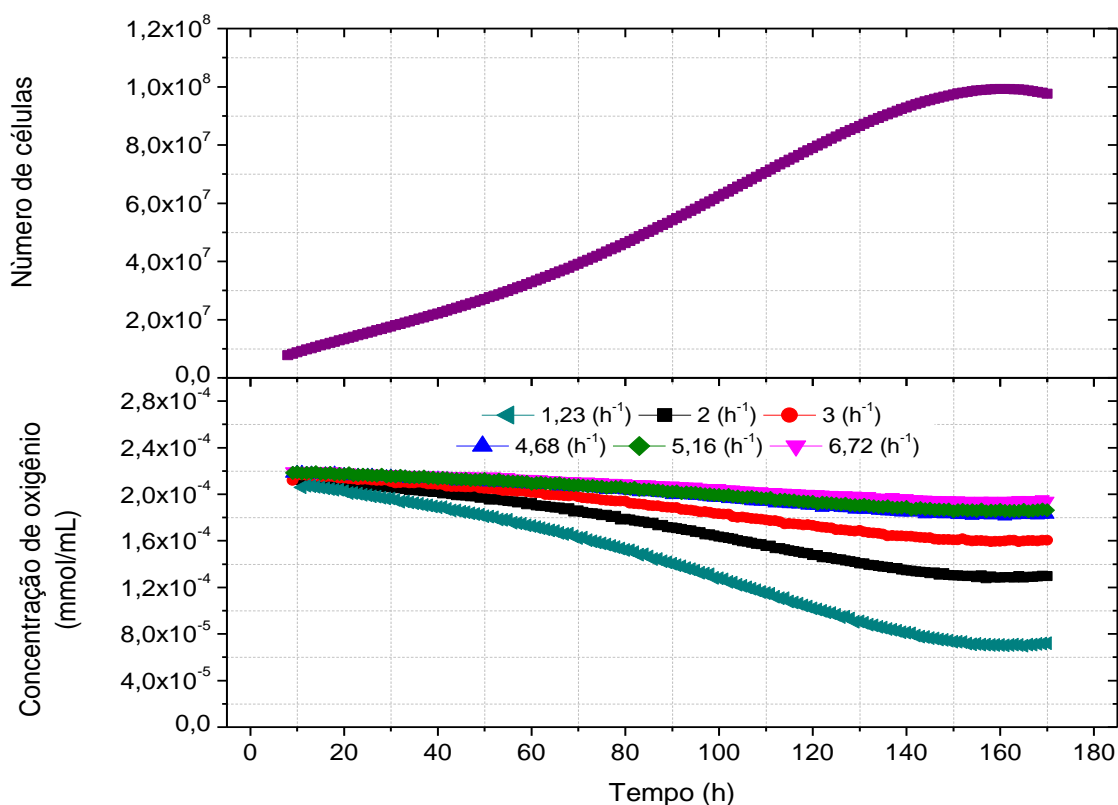
A forte influência que apresenta a aeração no coeficiente de transferência de massa em biorreatores de tanque agitado, como foi observado pelos resultados, e a contribuição do emprego da membrana de silicone sobre a transferência de oxigênio já foram descritos em vários estudos (FLEISEHAKER JR; SINSKEY, 1981; MOREIRA et al., 1995a; TISU; PAVKO, 2010). Entretanto, também são encontrados na literatura trabalhos apresentando maior efeito da frequência de agitação para outros biorreatores (DUCOMMUN et al., 2000; SANTIAGO; GIORDANO; SUAZO, 2011). Além disso, têm sido propostos na literatura diferentes modelos para o coeficiente de transferência de oxigênio, considerando outras variáveis como viscosidade e volume do líquido, além das mencionadas. Contudo, é razoável considerar que os fatores que apresentam influência mais significativa sobre o coeficiente de transferência são dependentes das condições de operação do biorreator, entretanto, os mais importantes continuam sendo a geometria do biorreator, o sistema de aeração usado e a viscosidade do fluido que influem diretamente no processo de transporte de oxigênio através do meio de cultura (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009). No caso de sistemas com aeração através de membranas, a contribuição na transferência de oxigênio também irá depender da permeabilidade desta e da área de transferência (LEE; HUANG; LEE, 1990).

5.1.4. Verificação da capacidade de oxigenação do BEVT para cultivo de CEMs

Antes de proceder com os experimentos de expansão de CEMs no BEVT foi realizada uma verificação da capacidade de oxigenação para evitar operá-lo em condições limitantes do crescimento celular. Assim, para uma velocidade de consumo de oxigênio entre 0,02-0,6 $\mu\text{mol}/10^6\text{celulas/h}$ e pressão parcial de 30% da saturação com ar, foi encontrado por Fenge e Lüllau (2006) que seria necessário um coeficiente de transferência de oxigênio entre 0,4-4 h^{-1} para suprir com suficiente oxigênio o cultivo. Ozturk (1996) calculou que, para uma densidade celular de 10^8 células/mL, é necessário um coeficiente de transferência de massa entre 5 e 55 h^{-1} . Por outro lado, os resultados reportados por Curran e Black (2005) para biorreator tipo BEVT operado em escoamento laminar Couette ($Re=101.8$), equivalente a um k_{La} menor a 0,2 h^{-1} , e usando concentração inicial de $2,5 \times 10^5$ células mL^{-1} a concentração de oxigênio foi reduzida a zero após 15,75 h de cultivo de fibroblastos em meio de cultura MEM suplementado com 10% v/v de SFB. Portanto, a avaliação da transferência de oxigênio para suprir a demanda de oxigênio durante o cultivo é indispensável. Assim, na Figura 23 é apresentada uma simulação usando o programa MATLAB R2013a para avaliar a variação da concentração de oxigênio com o tempo, considerando a cinética de crescimento apresentada pela Equação 3.19 para a linhagem hMSC-TERT.

Na Figura 23 pode ser observado que o BEVT consegue suportar crescimento exponencial durante 170 horas de cultivo, mesmo com valores do coeficiente de transferência de oxigênio baixos.

Figura 23. a) Representação da cinética de crescimento da linhagem celular hMSCs-TERT obtida em frasco spinner no LATECC; b) simulação da variação da concentração de oxigênio dissolvido em condições de regime de batelada com concentração inicial de oxigênio de 50% da saturação com ar e um q_{O_2} de $1,13 \times 10^{-10} \text{ mmolO}_2 \cdot \text{célula}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ com a cinética de crescimento dada pela equação 4.1, para diferentes valores do coeficiente k_{TLA} .



Fonte: Acervo pessoal

5.2. Tensão de cisalhamento no BEVT

Para avaliar a tensão de cisalhamento no BEVT, foram empregadas as correlações apresentadas no item 3.7 do capítulo de material e métodos, as quais consideram diferentes variáveis tanto de operação como de geometria do biorreator, para calcular a tensão de cisalhamento média (correlação 2 e 3) e na parede do cilindro interno (correlação 1), baseado na lei de Newton da viscosidade. Os resultados obtidos dos cálculos das tensões de cisalhamento foram baixos para todas as relações apresentadas, corroborando o uso deste tipo de reator para cultivo de células animais. Na Tabela 17 são apresentados os resultados para diferentes frequências de rotação das tensões de cisalhamento e tamanho dos turbilhões calculados pela escala de Kolmogorov (item 3.9.1; Equação 3.28).

Tabela 17. Comparação de valores calculados da tensão de cisalhamento média para o BEVT e tamanho de turbilhões calculados pela escala de Kolmogorov para as diferentes frequências de rotação utilizadas neste trabalho.

Frequência de rotação do cilindro interno (rpm)	Ta	Re	Tensão de cisalhamento 1 (N/m ²)*	Tensão de cisalhamento 2 (N/m ² **	Tensão de cisalhamento 3 (N/m ² ***	η (μ m)
50	1140,86	1628	0,062	0,050	0,021	164
60	1369,03	1954	0,082	0,061	0,027	147
70	1597,21	2279	0,104	0,071	0,032	133
80	1825,38	2605	0,127	0,081	0,038	122
90	2053,55	2931	0,152	0,091	0,044	114
100	2281,72	3256	0,178	0,101	0,051	106
110	2509,90	3582	0,205	0,112	0,057	100
120	2738,07	3908	0,234	0,122	0,064	95
130	2966,24	4233	0,263	0,132	0,070	90
140	3194,42	4559	0,295	0,142	0,077	86
150	3422,59	4885	0,327	0,152	0,084	83
200	4563,45	6513	0,503	0,203	0,030	138

*Correlação ajustada por Beaudoin e Jaffrin apud Moore, (1994).

**Correlação obtida por Hooker; Lee; Am, (1989).

*** Correlações obtidas de Lathrop; Fineberg; Swinney, (1992); Racina; Kind, (2006); Sánchez Pérez et al., (2006).

A diferença entre os resultados obtidos para as tensões de cisalhamento apresentadas (Tabela 17) é devido à quantidade de parâmetros relacionados em cada caso, considerando que a melhor aproximação é dada a partir das correlações obtidas por Lathrop; Fineberg e Swinney (1992); Racina e Kind (2006) e Sánchez Pérez et al. (2006), já que consideram além de variáveis como a viscosidade e o número de Reynolds, a energia dissipada no fluido e o torque devido à rotação do cilindro interno. Além disso, as relações matemáticas obtidas para determinar o número adimensional do torque (item 4.8, Equações 4.23 e 4.24) para o cálculo da tensão de cisalhamento, foram adquiridas experimentalmente para um sistema de cilindros concêntricos com

presença de vórtices e validas para a geometria do equipamento empregado neste estudo.

Contudo estes resultados mostram-se satisfatórios e moderadamente baixos em relação aos mencionados na literatura para causar efeitos letais nas células (item 2.2.1.2) obtendo-se valores menores a $1 \text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$. Resultados para este tipo de biorreator de tensões de cisalhamento máxima, média e mínima no espaço anular foram apresentados por Curran e Black (2004), encontrando valores máximos de $4 \text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$ para uma relação de raios (σ) de 0,926 e Santiago, Giordano e Suazo (2011) apresentaram valores de $0,4 \text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$ na parede do cilindro interno para σ de 0,79; sendo esta discrepância causada provavelmente pela diferença geométrica usada em cada caso. Embora não sejam encontrados estudos para avaliar o crescimento das CEMs no ambiente hidrodinâmico apresentado no BEVT, os níveis de estresse aos quais estaria exposta a suspensão celular em comparação a outros equipamentos, são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Dados comparativos de tensões de cisalhamento em diferentes tipos de biorreatores utilizados para cultivo de células animais.

Equipamento	Tipo de célula	Condição	Tempo de exposição	Referência
Taylor	CEMs	0,044* $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$ (90 rpm) 0,057* $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$ (110 rpm) 0,064* $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$ (120 rpm)	8 dias	Neste estudo
Spinner	hMSCs	0,049 $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$ (50 rpm) 0,025 $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$ (30 rpm)	13 dias	HEWITT et al., (2011)
Spinner	MSC de suínos	0,013 $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$ (25 rpm) 0,04 $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$ (75 rpm)	16 dias	FERRARI et al., (2012)
Tanque agitado	CHO Sf2/0	15, 21, 38, 83, 103 $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$	10-11 dias	NEUNSTO ECKLIN et al., (2014)

Câmara de fluxo laminar de meio de cultura	BHK	0 – 2,5 N·m ⁻²	24 horas	LUDWIG; KRETZME R; SCHÜGER L, (1992)
Viscosímetro rotacional de copo e rotor	CHO HEK	0-2,09 N·m ⁻²	4 horas	TANZEGL OCK et al., (2009)

*Valores considerando as correlações obtidas por Lathrop; Fineberg; Swinney, (1992); Racina; Kind, (2006) e Sánchez Pérez et al., (2006).

Mesmo que em outros equipamentos as tensões de cisalhamento sejam comparáveis às do BEVT, muitos deles ressaltando o tanque agitado apresentam limitações por exibir regiões com pouca uniformidade na distribuição espacial de cisalhamento, com valores superiores a 2 N·m⁻² (LIOVIC et al., 2012). Nestes biorreatores, por exemplo, quando são usadas altas frequências de agitação tem sido observada morte celular causada por alguns dos fenômenos já expostos na Tabela 3. Por outro lado, apresenta-se como outra desvantagem a pouca homogeneidade ou grão de mistura do meio de cultivo quando operados a frequências de agitação baixas. No caso de CEMs os cultivos se tornam mais complicados devido às dificuldades que este tipo de célula apresenta pela formação de grandes agregados, atingindo tamanhos que podem prejudicar o desempenho do cultivo quando são empregadas baixas frequências de agitação, tal como foi mostrado nos estudos de Ferrari (2012) e de Mendonça (2013). Finalmente, o BEVT é apresentado como uma alternativa para proporcionar um ambiente controlado e homogêneo a baixas tensões de cisalhamento, mesmo sob condições de agitação normalmente incomuns para serem empregadas em cultivo celular.

Por outro lado, em relação aos valores obtidos pela escala de Kolmogorov para tamanho de turbilhões, é importante mencionar que mesmo sendo uma relação muito empregada na literatura é válida somente para regimes turbulentos, isto é para $Re \geq 10^4$. Considerando isto e já que os cultivos foram planejados para ser realizados com frequências de agitação entre 90 e 120 rpm, o tamanho teórico calculado para os turbilhões encontra-se entre 114 e 95 μ m, valores que não deveriam ser vistos como críticos. Além disso, Ohmura, Suemasu e Asamura (2005) apresentaram um estudo

mostrando que a segregação dos microcarregadores coincide com a formação dos vórtices no espaço anular entre os cilindros, sendo que para tamanhos de partículas em suspensão menores a 50 μm localizam-se no centro dos vórtices concêntricos, onde são encontrados os turbilhões de menores tamanhos, e nos vórtices menores após alguns minutos. Por outro lado, as partículas com tamanhos maiores a 50 μm estavam localizados na região dos vórtices externos, impulsadas pela força centrífuga. Assim, para as frequências de agitação planejadas a serem utilizadas no BEVT e considerando também os tamanhos dos microcarregadores empregados, os turbilhões formados não prejudicarão o desenvolvimento do cultivo.

Considerando a Figura 5 e Tabela 5, os valores obtidos da taxa de dissipação de energia (TDE) no BETV estiveram na faixa de 10^{-2} kw/m^3 , o que indica que o ambiente hidrodinâmico apresentado não causaria efeitos letais ou sub-letais que poderiam afetar as células aderidas aos microcarregadores o que concorda com os resultados calculados para a tensão de cisalhamento.

5.3. Cultivo de células estromais mesenquimais no BEVT

A seguir são apresentados os resultados preliminares de 4 cultivos com Q (vazão de ar) igual a zero, e frequências de rotação de 90, 100, 110 e 120 rpm. O conjunto de experimentos com vazão zero foi escolhido por representar uma situação prática bastante comum e fácil de comparar com outros biorreatores que funcionam com suspensão de células aderidas aos microcarregadores utilizando os princípios do tradicional tanque agitado, tendo como exemplo principal o frasco spinner. Além disso, há grande interesse em encontrar um biorreator que preencha as sofisticadas demandas tecnológicas no cultivo de células de alta complexidade fisiológica como as CEMs, aqui representadas pela linhagem hMSCs-TERT como modelo. Para todos os experimentos, a fase de adesão das hMSCs-TERT foi iniciada no frasco spinner com duração de 8 h e inóculo de $6,25 \times 10^6$ células e 3g/L de microcarregador Cultispher-S. A seguir são resumidas algumas informações apresentadas em cada experimento (Tabela 19) e os resultados em ordem cronológica de execução obtidos nos quatro experimentos de cultivo da linhagem hMSC-TERT utilizando o BEVT.

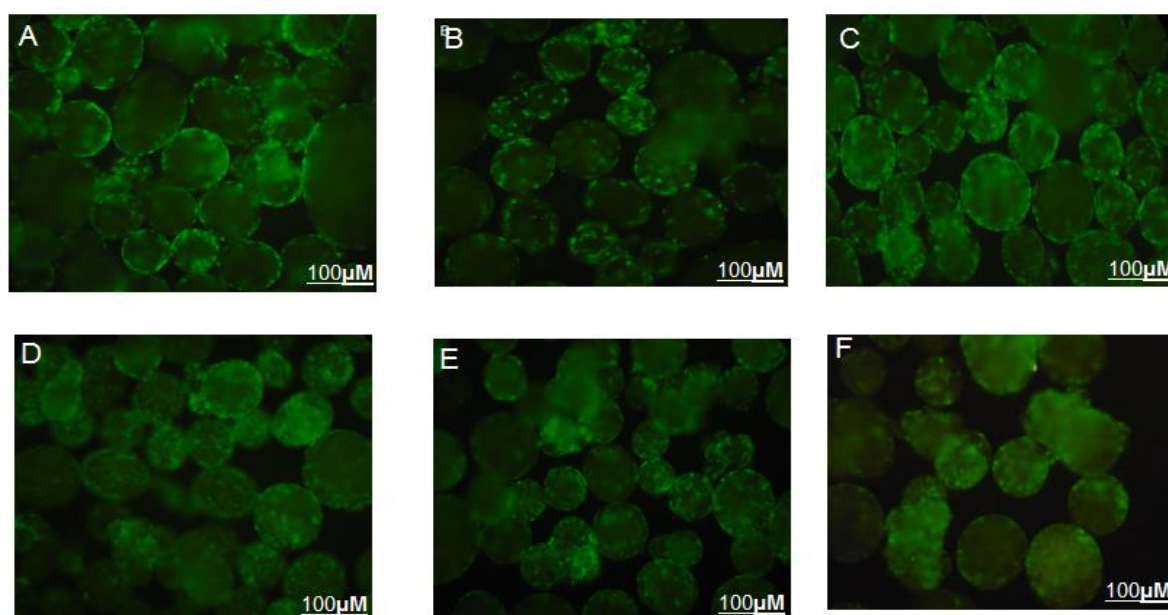
Tabela 19. Condições de operação nos experimentos de cultivo da linhagem hMSC-TERT utilizando o BEVT.

Experimento	Frequência de rotação (rpm)	Medição do tamanho de partículas	Adição de microcarregadores
1	90	ND	Não
2	120	Sim	Não
3	110	Sim	Não
4	100	Sim	Sim

Experimento 1

Neste experimento foi observada uma adesão e expansão das células homogênea, permitindo o espalhamento na maioria dos microcarregadores (Figura 24).

Figura 24. Imagens das CEMs expressando a proteína GFP (emitindo fluorescência na zona verde do espectro visível), aderidas aos microcarregadores no Experimento 1. Cultivo com A) 8 horas; B) 48 horas; C) 72 horas D) 120 horas, E) 144 horas e F) 168 horas.



Fonte: Acervo pessoal

Os resultados de quantificação de células viáveis obtidos pelo método de MTT mostraram crescimento tipicamente exponencial no BEVT. Este comportamento não foi observado em cultivos da linhagem hMSC-TERT bem sucedidos em spinner na faixa de 40 a 50 rpm seguindo protocolos já padronizados em nossos laboratórios. O comportamento não exponencial acontece por causa da formação de aglomerados de microcarregadores colonizados com células. Esta tendência e sua função na fisiologia nas CEMs têm sido objeto de muitas pesquisas e de revelações muito importantes para seu cultivo e utilização terapêutica (FLORES LUNA, 2014; SART et al., 2014). A formação dos aglomerados se origina a partir de ligações célula-célula envolvendo, principalmente, proteínas da família das caderinas importantes para a comunicação celular (KINNEY; SARGENT; MCDEVITT, 2011). Adicionalmente, as células também estabelecem ligações com integrinas, proteínas presentes na matriz extracelular, que por sua vez constituem um conjunto de macromoléculas previamente biossintetizado pelas próprias CEMs, sendo também a matriz extracelular de extrema importância para várias funções vitais das células (BRIZZI; TARONE; DEFILIPPI, 2012). Concluindo com o mencionado anteriormente, ressaltando a importância da formação destes agregados celulares.

Após a transferência do cultivo para o BEVT, observou-se que a frequência de rotação entre 60 e 80 rpm não conseguia manter em suspensão os microcarregadores, e que a maioria destes eram sedimentados no fundo do biorreator. Quando a agitação foi aumentada para 90 rpm foi observado que a maioria dos microcarregadores ficavam suspensos e melhor distribuídos no líquido. Assim, a partir das 8 h o cultivo foi mantido com agitação de 90 rpm.

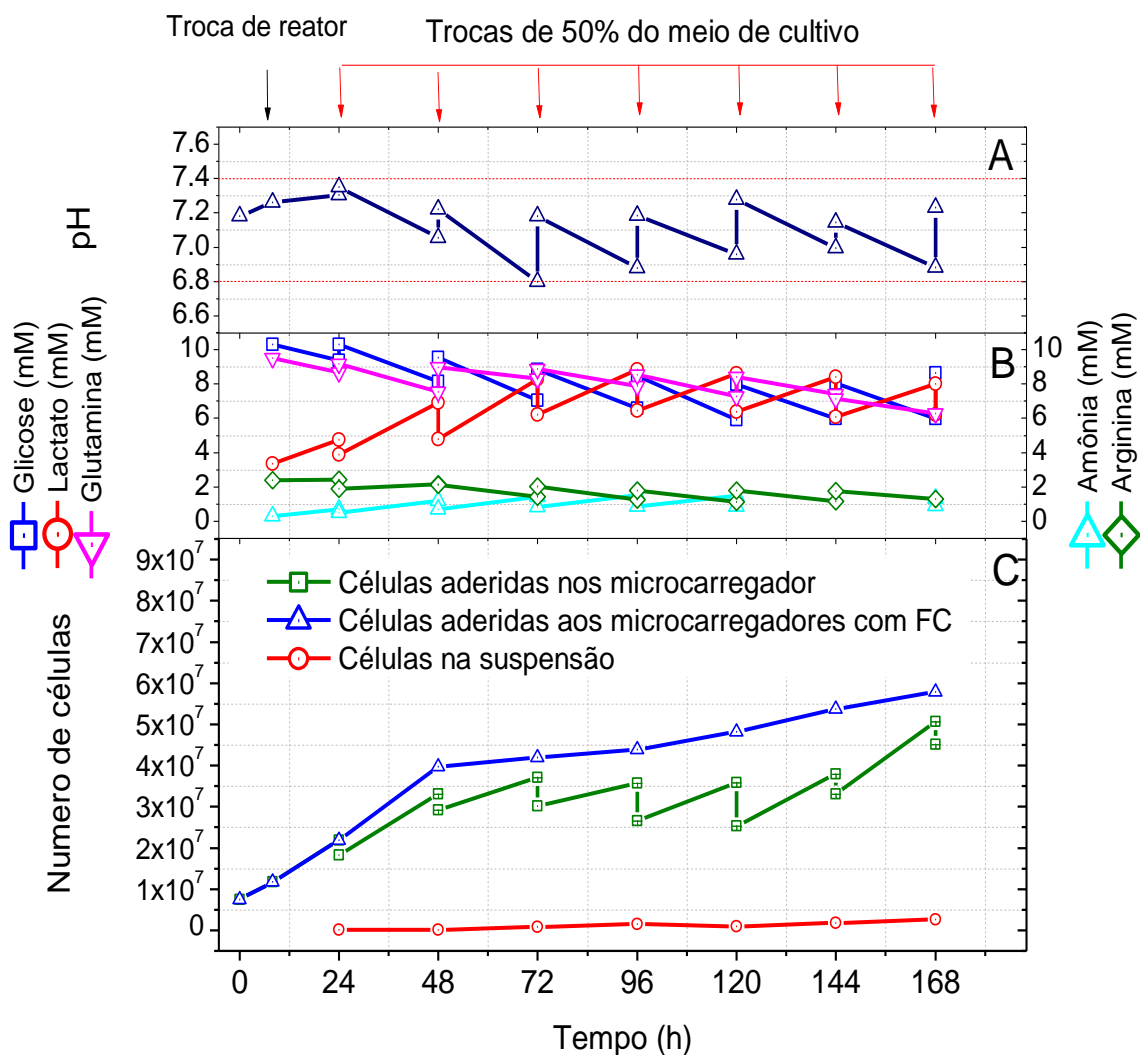
Neste experimento, o controle do pH foi realizado manipulando a concentração de CO₂ na incubadora e com as trocas periódicas de meio de cultura a cada 24 h, conseguindo manter o valor numa faixa de 6,80 e 7,36 (Figura 25A). Os resultados obtidos de concentração dos metabólitos, lactato e amônia, não atingiram níveis prejudiciais ao crescimento, sendo menores que 35 mM e 2,4mM, respectivamente, valores considerados inibitórios (SCHOP et al., 2009). As concentrações dos nutrientes também não atingiram valores limitantes para o crescimento (Figura 25B).

Na Figura 25C pode ser observado que as células conseguiram adaptar-se bem à hidrodinâmica do BEVT, não sendo detectada queda do crescimento após a troca

de biorreator. A velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{\text{máx}}$, na região de crescimento exponencial (8 à 48 h) foi de $0,0251 \text{ h}^{-1}$, com fator de expansão de 6,75, sem levar em consideração a diluição de 50% do meio realizada a partir das 24 h de cultivo. Considerando o fator de correção (FC) dado pela diluição, o fator de expansão seria de 7,72. Os resultados obtidos pela contagem de células em suspensão comprovam a baixa taxa de morte para tensão de cisalhamento de $0,044 \text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$ e tamanho de turbilhões de $114 \mu\text{m}$, estimados para as condições de operação do BEVT utilizadas.

Contudo, após 72 h de cultivo foi atingido pH de 6,84, observando-se queda na velocidade de crescimento, possivelmente causada pelo ambiente ácido (JUNG et al., 2012). Uma segunda causa possível pode ser devido à tendência natural de formação de agregados que é uma característica típica das CEMs. Considerando o experimento 1, foi planejado para os seguintes experimentos realizar medições dos tamanhos dos agregados para verificar a possível interferência no rendimento do cultivo.

Figura 25. Experimento realizado a 90 rpm, usando meio alfa MEM suplementado com 15% v/v de SFB, para cultivo com a linhagem hMSC-TERT ancorada ao microcarregador Cultispher-S. Cultivo realizado sem passagem de ar pelo biorreator ($Q = 0$). Em A) é apresentado o valor do pH. Em B) estão os resultados da concentração de substratos limitantes glicose, glutamina e arginina e metabólitos tóxicos lactato e amônia e em C) são apresentados o número de células aderidas aos microcarregadores sem fator de correção e com fator de correção e o número de células em suspensão.

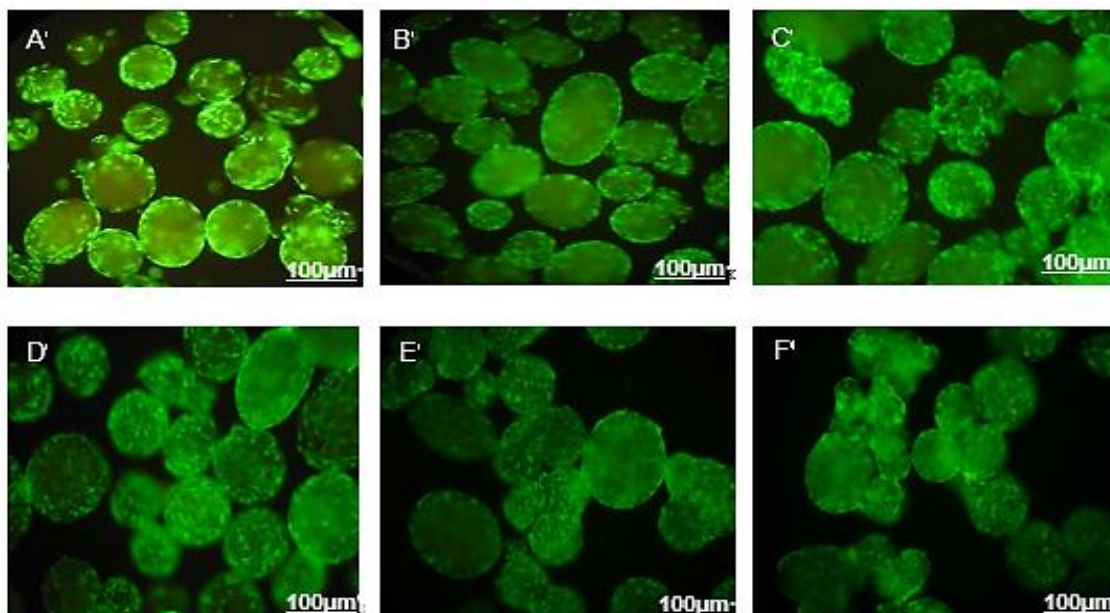


Fonte: Acervo pessoal

Experimento 2

Neste experimento também foi observada uma fase de adesão adequada e, após a troca de biorreatores, foi visível um espalhamento homogêneo das células na maioria dos microcarregadores (Figura 26).

Figura 26. Imagens das CEMs expressando a proteína GFP (emitindo fluorescência na zona verde do espectro visível), aderidas aos microcarregadores no Experimento 2. Cultivo com: A) 8 horas; B) 48 horas; C) 72 horas D) 120 horas, E) 144 horas e F) 168 horas.



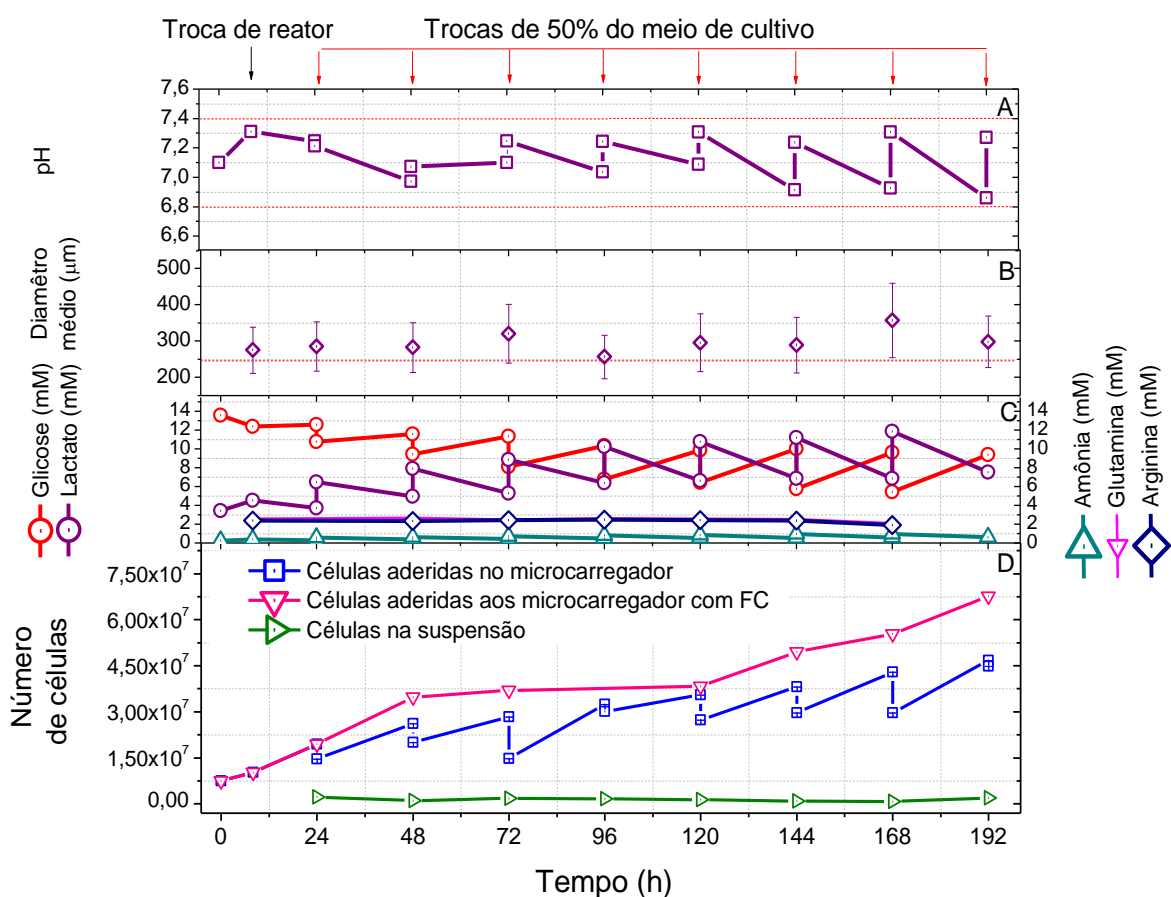
Fonte: Acervo pessoal

O controle do pH foi realizado manualmente com a adição de solução de NaOH 1 M ao meio de troca após 24 h com intuito de manter o pH entre 6,9 e 7,3 (Figura 27A). Mesmo assim, após as 48 h ocorreu queda na velocidade de crescimento. Com a medição do tamanho dos aglomerados e considerando que o tamanho médio dos microcarregadores é aproximadamente 255 μm , foi evidente o controle deste parâmetro devido à hidrodinâmica apresentada no BEVT obtendo diâmetros não maiores que 350 μm (Figura 27B), sendo descartada a possibilidade da influência negativa do pH e da agregação no crescimento. Igualmente não foram esgotados os nutrientes principais (glicose, glutamina, arginina) e os metabolitos gerados, lactato e amônia, não atingiram concentrações tóxicas que fossem prejudiciais para o desenvolvimento do cultivo (Figura 27C).

Os resultados obtidos de quantificação de células viáveis pelo método de MTT mostraram boa adaptação das células ao ambiente hidrodinâmico diferente apresentado no BEVT mesmo usando uma frequência de rotação de 120 rpm, no qual as células estavam expostas a tensões de cisalhamento de $0,064 \text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$, conseguindo

manter os microcarregadores em suspensão e homogeneamente distribuídos (Figura 27D).

Figura 27. Experimento realizado a 120 rpm, usando meio alfa MEM suplementado com 15% v/v de SFB, para cultivo com a linhagem hMSC-TERT ancorada ao microcarregador Cultispher-S. Cultivo realizado sem passagem de ar pelo biorreator ($Q = 0$). Em A) é apresentado o valor do pH. Em B) estão os resultados das medidas do tamanho médio dos agregados e o tamanho médio dos microcarregadores representado pela linha horizontal vermelha, em C) estão as concentração de substratos glicose, glutamina e arginina e metabólitos tóxicos lactato e amônia e em D) é apresentado o número de células aderidas aos microcarregadores sem fator de correção e com fator de correção e o número de células em suspensão.



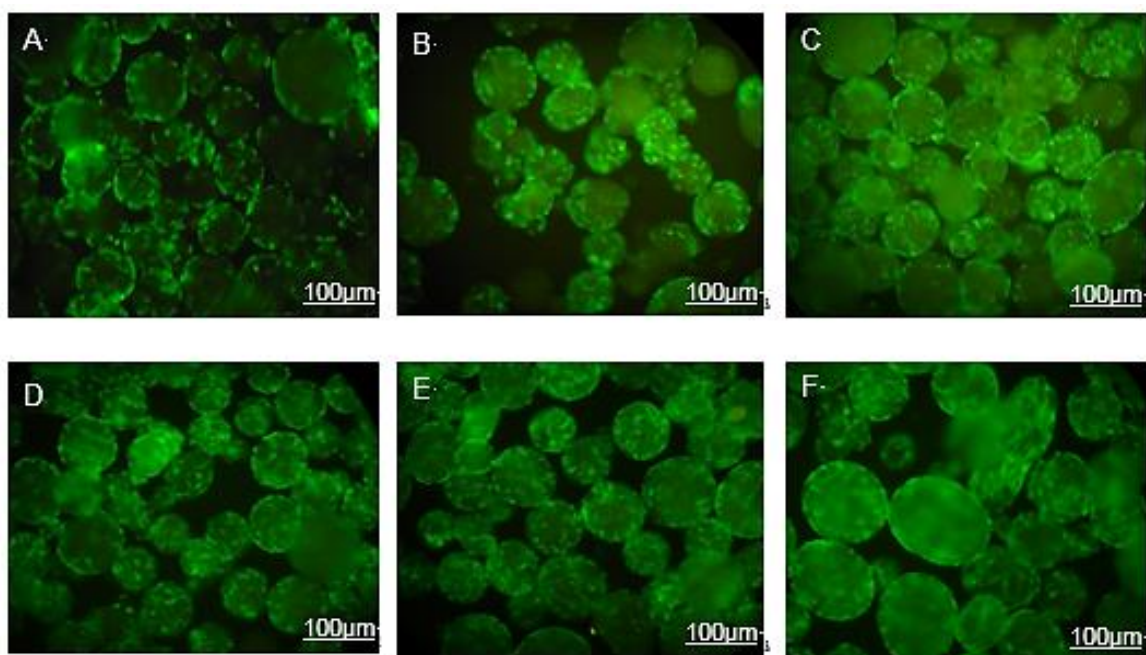
Fonte: Acervo pessoal

Com os cálculos da escala de Kolmogorov obteve-se tamanho dos turbilhões de 95 μm . Neste experimento foi atingida velocidade de crescimento máxima de $0,0225 \text{ h}^{-1}$ (entre 8 a 48 h) e fator de expansão de 6,2 e 9,0 sem e com a correção do fator, respectivamente.

Experimento 3

No experimento 3 foi realizado o cultivo de hMSCs a 110 rpm, conseguindo uma fase de adesão e de expansão adequada e homogênea (Figura 28).

Figura 28. Imagens das CEMs expressando a proteína GFP (emitindo fluorescência na zona verde do espectro visível), aderidas aos microcarregadores no Experimento 3. Cultivo com: A) 8 horas; B) 24 horas; C) 72 horas D) 120 horas, E) 144 horas e F) 168 horas.



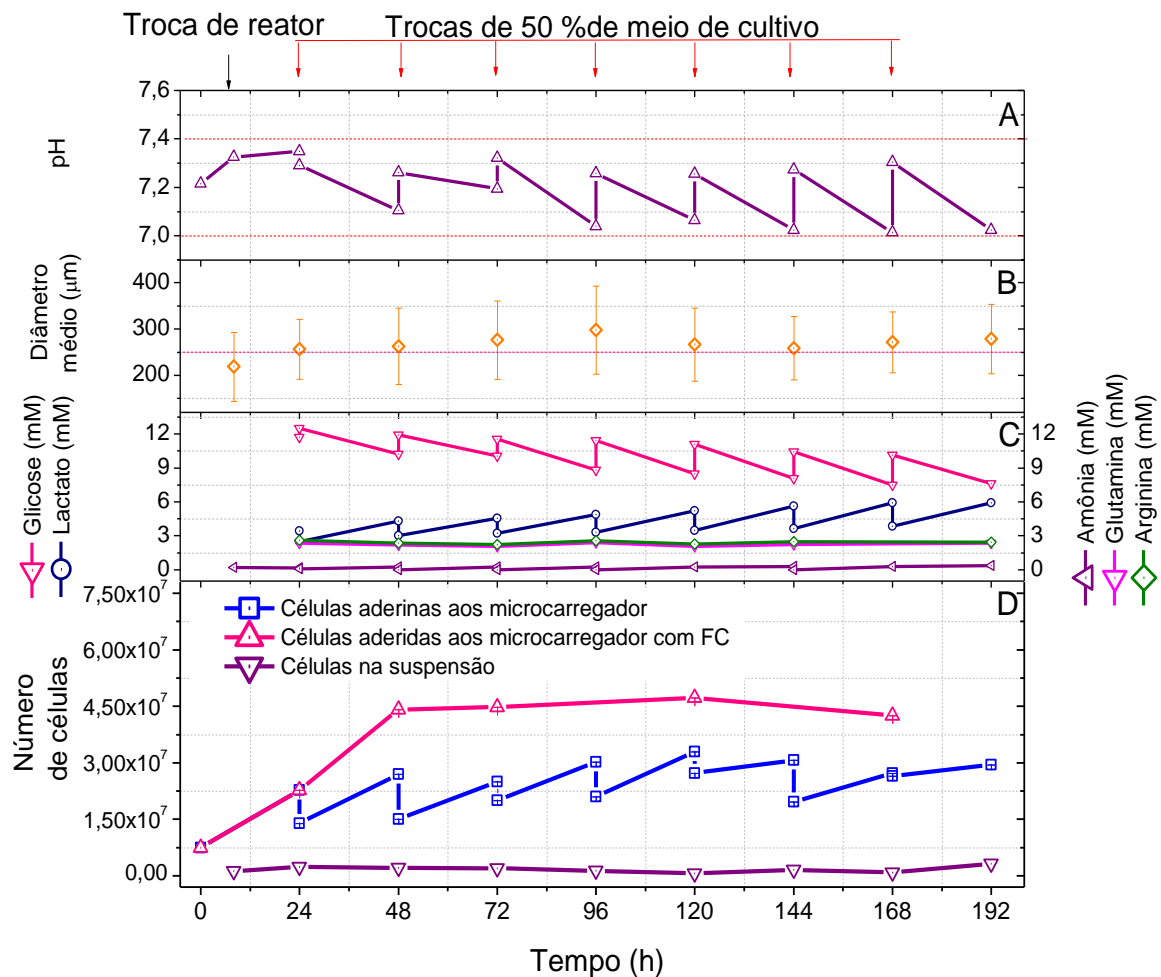
Fonte: Acervo pessoal

De forma semelhante ao experimento 2, neste experimento o pH foi mantido numa faixa apropriada para o crescimento, porém, a partir das 72 horas de cultivo a velocidade de crescimento tende a zero. Um descobrimento importante neste experimento, na tentativa de encontrar uma explicação à aparente desaceleração precoce do crescimento, foi o aquecimento da superfície do agitador em contato com a base do BEVT. A agitação acima de 90 rpm provocava mais atrito externo que o normal e, como consequência, gerava um aumento de ~ 2 °C acima da temperatura padrão de 37 °C, programada para o líquido em agitação. Apesar da conhecida sensibilidade das células animais às temperaturas mais altas, não se percebeu efeito letal da temperatura de ~ 39 °C atingida no experimento (Figura 29D). O pH foi mantido em níveis não limitante de crescimento (Figura 29 A).

O resultado do diâmetro médio dos agregados foi também controlado, apresentando tamanhos não maiores a 320 μm (Figura 29B). O tamanho dos turbilhões foi de aproximadamente 100 μm . Os resultados de concentrações tanto de nutrientes quanto de metabólitos, foram mantidos em valores não limitantes para o desenvolvimento do cultivo (Figura 29C).

Os resultados de quantificação de células obtidos pelo método de MTT mostraram boa adaptação das hMSCs-TERT ao ambiente apresentado no BEVT mesmo sendo expostas a tensões de cisalhamento de 0,057 $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$, obtendo velocidade de crescimento máxima entre 8 e 24 h de 0,0273 h^{-1} e fator de expansão máximo de 4,4 e 6,30 considerando a quantidade de células sem e com a correção do fator, respectivamente (Figura 29D).

Figura 29. Experimento realizado a 110 rpm, usando meio alfa MEM suplementado com 15% v/v de SFB, para cultivo com a linhagem hMSC-TERT ancorada ao microcarregador Cultispher-S. Cultivo realizado sem passagem de ar pelo biorreator $Q = 0$. Em A) é apresentado o valor do pH. Em B) estão os resultados das medidas do tamanho médio dos agregados e o tamanho médio dos microcarregadores representado pela linha horizontal vermelha, em C) estão as concentrações de substratos glicose, glutamina e arginina e metabólitos tóxicos lactato e amônia. Em D) é apresentado o número de células aderidas aos microcarregadores sem fator de correção e com fator de correção e o número de células em suspensão.



Fonte: Acervo pessoal

Experimento 4

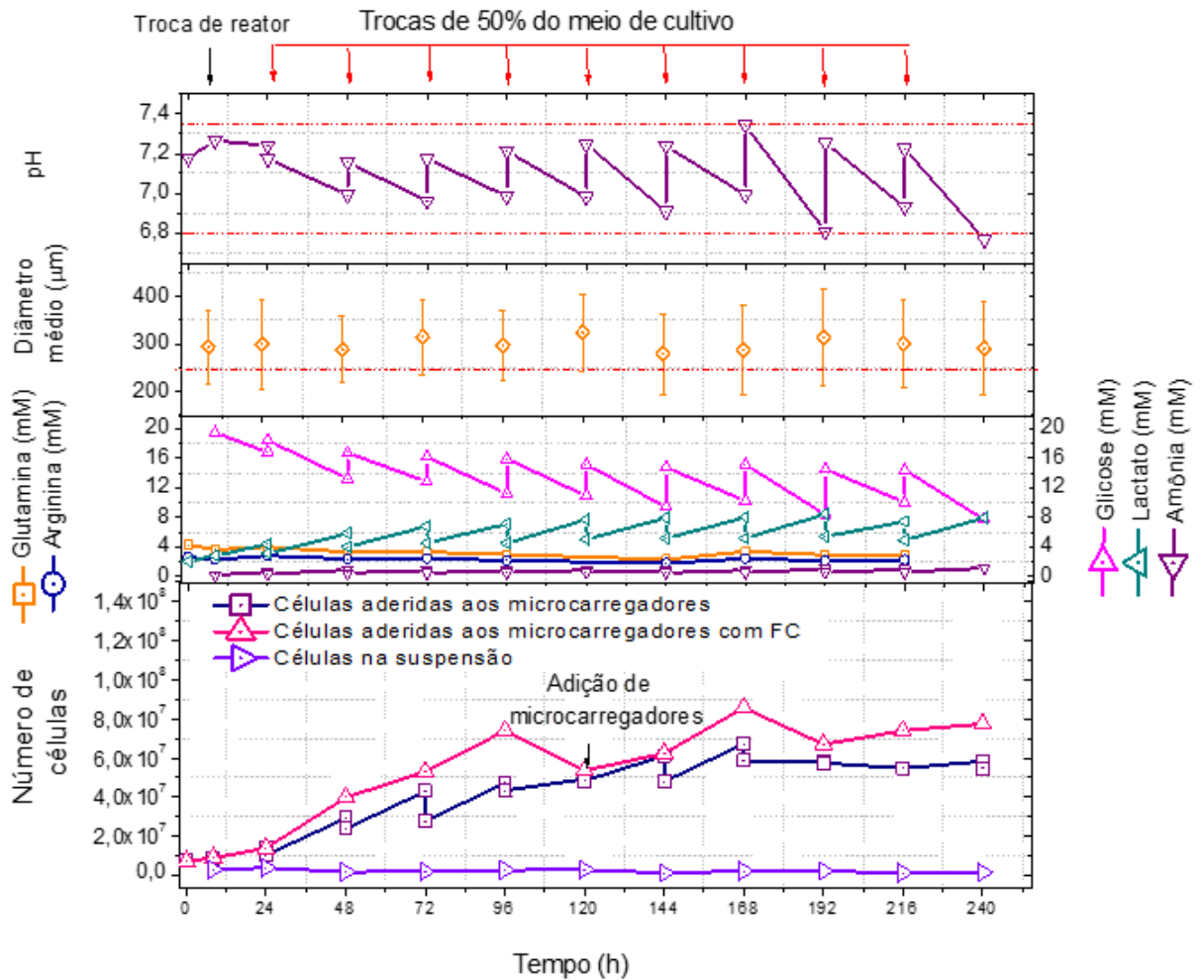
Este cultivo foi realizado a uma frequência de agitação de 100 rpm, equivalente a uma tensão de cisalhamento de $0,051 \text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$ e com adequado controle da temperatura, do pH e das concentrações de nutrientes e metabólitos, estes últimos conservando a faixa desejada principalmente pelas trocas de meio duas vezes por dia, necessárias neste cultivo devido à queda rápida do pH como consequência do crescimento celular vigoroso (Figura 30).

A formação de agregados foi quantificada pelas medidas do diâmetro médio das partículas presentes nas amostras retiradas do biorreator entre 280 e 330 μm como pode ser observado na Figura 30B, encontrando diâmetros dos agregados não maiores a 400 μm ao longo do cultivo. De forma semelhante aos experimentos anteriores este resultado coloca em evidência a ausência de formação de grandes agregados, considerando que o tamanho médio do microcarregador Cultispher S é de 255 μm .

Foi observada uma fase de adesão homogênea (apresentada durante as primeiras 8 h de cultivo) e crescimento acelerado após a troca de biorreator, sendo evidenciada a fase exponencial a partir das 8 h e até as 48 h de cultivo com velocidade de crescimento de $0,0293 \text{ h}^{-1}$. Contudo, após 120 h foi observada queda na velocidade de crescimento que pode ser atribuída à saturação de células nos microcarregadores, evidenciado nas imagens após 96 h de cultivo como mostra a Figura 31E. Este fenômeno poder ser explicado devido ao fato das células animais apresentarem como característica própria a inibição do crescimento quando se estabelece um contato célula-célula como na saturação da superfície de crescimento (SCHOP et al., 2009; WEBER et al., 2007), levando à estagnação do crescimento celular e finalmente à diminuição do rendimento do cultivo.

Como uma tentativa de dar continuidade ao cultivo foi adicionado uma quantidade de microcarregadores igual a três vezes a concentração colocada no início do experimento ($3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Após a adição dos microcarregadores ao cultivo foi implementado um protocolo de adesão intermitente de 2 h em condições estáticas e 2 h em agitação (100 rpm) até completar 8 h, retomando, a seguir, a agitação de 100 rpm. Os resultados foram bastante animadores, sendo evidenciado a reativação do processo de crescimento celular permitindo continuidade do cultivo até 192 h, onde a diminuição na velocidade de crescimento celular foi apresentada novamente devido, possivelmente, à queda excessiva do pH (Figura 30A).

Figura 30. Experimento realizado a 100 rpm usando meio alfa MEM suplementado com 15% de SFB, para cultivo com a linhagem hMSC-TERT ancorada aos microcarregadores Cultispher-S. Cultivo realizado sem passagem de ar pelo biorreator $Q = 0$. Em A) é apresentado o valor do pH. Em B) é apresentado o número de células aderidas aos microcarregadores sem fator de correção e com fator de correção e o número de células em suspensão. Em C) estão os resultados das medidas do tamanho médio dos agregados e o tamanho médio dos microcarregadores representado pela linha horizontal vermelha, em D) estão as concentrações de substratos glicose, glutamina e arginina e metabólitos tóxicos lactato e amônia.

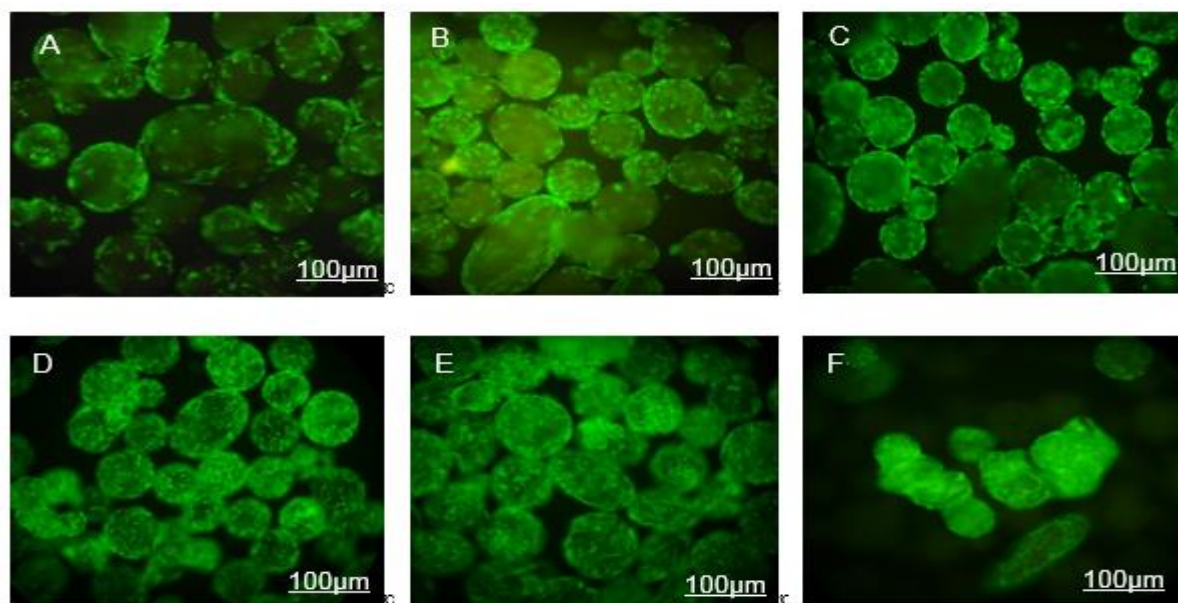


Fonte: Acervo pessoal

A partir das imagens coletadas a cada 24 h ficou evidente a formação de alguns agregados formados após a adição de microcarregadores (Figura 31F), que após algumas horas conseguiram ser colonizados por células entrando novamente em fase de crescimento estacionária (Figura 30D). Este resultado da adição de microcarregadores tem significado muito importante na produtividade do biorreator. Na prática significa que não é necessário reiniciar uma nova batelada com os tempos mortos inerentes a esse modo de operação, podendo adicionar microcarregadores novos para dar continuidade ao cultivo e à expansão das CEMs (FERRARI et al.,

2012). Com esta metodologia conseguiu-se fator de expansão máximo de aproximadamente 9,0 e 11,43, considerando a quantidade de células sem e com a correção do fator, respectivamente.

Figura 31. Imagens das CEMs expressando a proteína GFP (emitindo fluorescência na zona verde do espectro visível), aderidas aos microcarregadores no Experimento 4. Cultivo com: A) 8 horas; B) 24 horas; C) 48 horas D) 72 horas, E) 96 horas e F) 168 horas após a adição de microcarregadores.



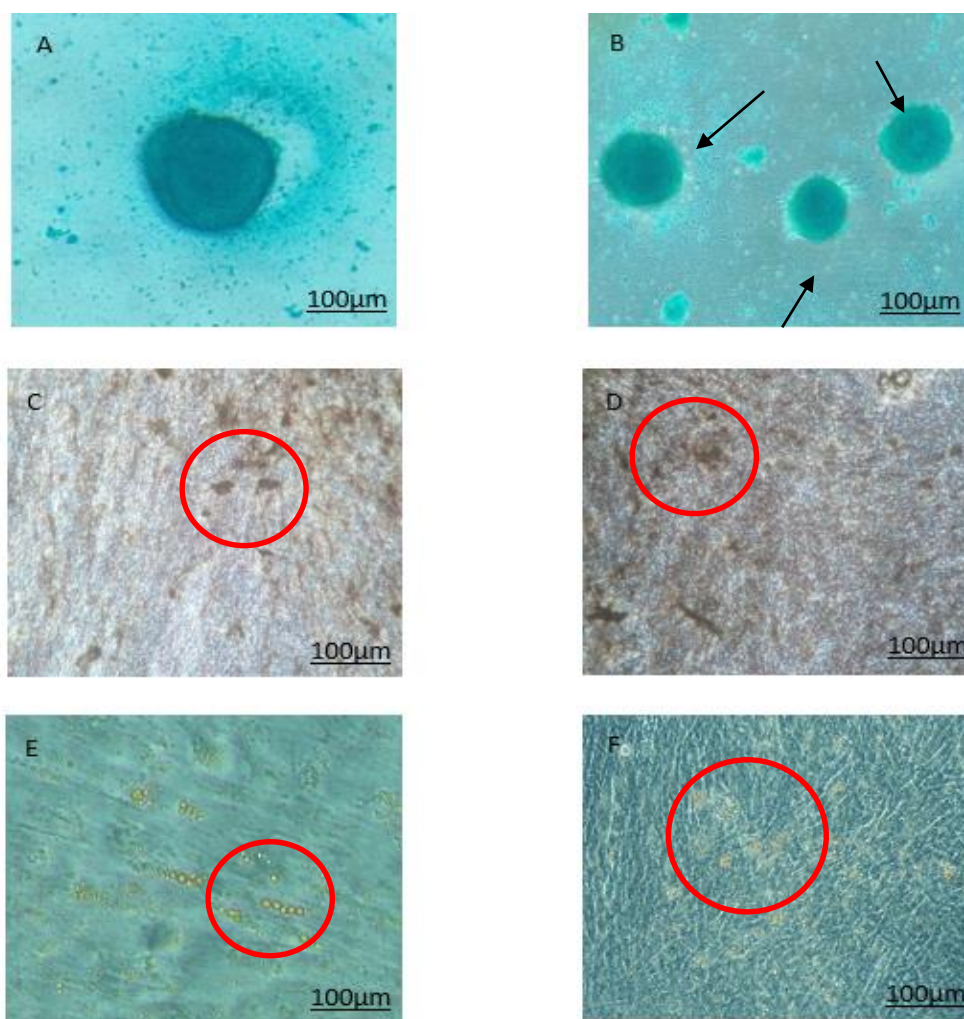
Fonte: Acervo pessoal

5.3.1. Diferenciação celular

Com a finalidade de verificar se as células hMSC-TERT expandidas no BEVT conservavam seu potencial de diferenciação em linhagens especializadas como osteócitos, adipócitos e condrócitos, após finalizar o experimento 2 em que o biorreator foi operado em condições de máximo cisalhamento, a 120 rpm, amostras foram armazenadas para posteriormente passar por processo de indução à diferenciação utilizando metodologias bem padronizadas para essa finalidade (vide item 3.19 em material e métodos). Como pode ser observado na Figura 32, os protocolos de diferenciação utilizados geraram resultados positivos para condrócitos, osteócitos e adipócitos. Assim, pode ser confirmado que as células hMSC-TERT como

modelo representativo das células estromais mesenquimais, não sofreram alterações com relação a seu potencial de diferenciação ao serem cultivadas no BEVT.

Figura 32. Diferenciação em condrócitos (A), (B); osteócitos (C), (D) e adipócitos (E), (F), das células recuperadas do experimento 3.

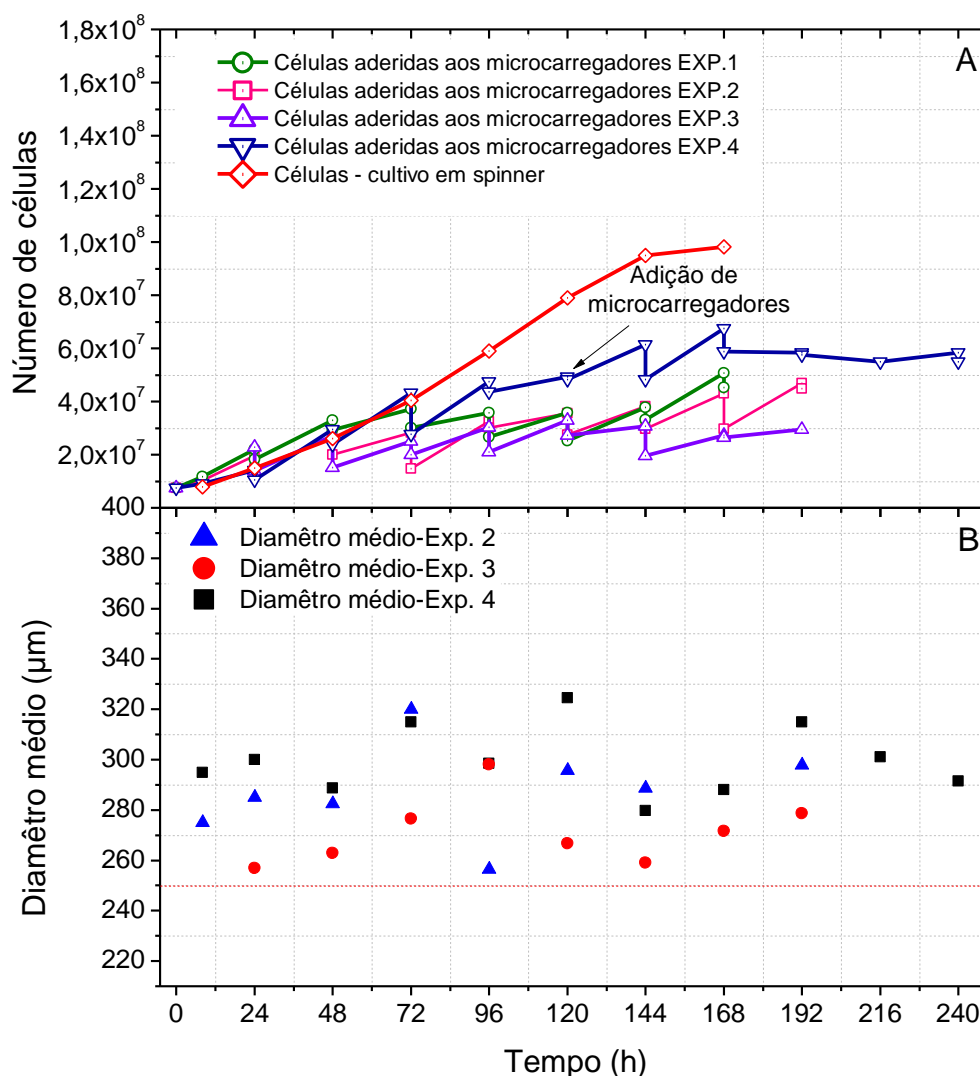


Fonte: Acervo pessoal

5.3.2. Comparação entre os experimentos de cultivo celular realizados

Na continuação para fins comparativos são apresentados todos os experimentos realizados no BEVT e o experimento realizado no spinner, tomado como referência (Figura 33A). Para todos os casos o inóculo foi $1,25 \times 10^5$ cel·mL e a concentração de microcarregadores de $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Em todos os cultivos realizados no BEVT a fase inicial do cultivo, fase de adesão (primeiras 8 h de cultivo), foi realizada no frasco spinner e durante todos os cultivos o pH se manteve na faixa entre 6,8 e 7,3.

Figura 33. Comparação dos 4 experimentos realizados com a linhagem hMSCs-TERT aderidas ao microcarregadore Cultispher-S no BEVT e no spinner (A) e o diâmetro médio dos agregados (B), sendo a linha vermelha o diâmetro médio dos microcarregadores.



Fonte: Acervo pessoal

Na Figura 33A são evidentes as maiores concentrações celulares atingidas no cultivo realizado no frasco spinner, apresentando um fator de expansão maior a 10. Este resultado alcançado pela formação de agregados com diâmetros maiores a 400 μm , permitindo concentrações de células maiores com crescimento em 3 dimensões (não em monocamada) no interior dos agregados, mas com as limitações subsequentes que isto representa para o rendimento do cultivo relacionado com o processo de recuperação final das CEMs. Um cultivo com a presença de grandes agregados pode apresentar uma porcentagem de recuperação celular menor a 75%. Isto pode acontecer por dois motivos, sendo um deles a dificuldade de recuperação

das células localizadas no centro dos agregados e o gerado pela morte apresentado como consequência de longos tempos de exposição à enzima dissociativa das células que estão na superfície dos agregados (FLORES LUNA, 2014; MENDONÇA, 2013). Neste sentido, o BEVT apresenta resultados promissores, permitindo o controle do diâmetro dos agregados como pode ser observado na Figura 33B, sendo relativamente maiores ao diâmetro médio dos microcarregadores, mas sem apresentar tamanhos maiores que 400 μm . Isto, somado com as outras vantagens observadas no BEVT, como já foi apresentado, relacionadas com a transferência de massa, homogeneidade no meio de cultivo e as baixas tensão de cisalhamento mesmo com frequências de rotação altas (90-120 rpm), fazem deste biorreator uma alternativa bastante promissória para cultura de CEMs.

O crescimento celular sem a formação de agregados que permitam mais área disponível para crescimento e a saturação de células nos microcarregadores pode ocorrer rapidamente como foi evidenciado no experimento 4, após 96 h, sendo neste caso a área o fator limitante para o rendimento do cultivo e o que pode ter acontecido também nos anteriores experimentos, já que todos foram realizados com a mesma carga de células por microcarregador. Duas alternativas para a solução deste problema são encontradas na literatura, a primeira consiste em utilizar uma relação inicial de 5 células por microcarregador (HEWITT et al., 2011), menor à empregada nos cultivos realizados (50 células por microcarregador). A segunda envolve a adição de microcarregadores (FERRARI et al., 2012), como foi realizado no experimento 4, com uma metodologia planejada que permita a transferências de células entre estes, proporcionando mais espaço para continuar com o crescimento exponencial.

Fazendo uma análise global dos experimentos realizados neste trabalho, é apresentado na Tabela 20 o resumo dos resultados satisfatórios obtidos no BEVT, que mostra o grande potencial para o cultivo de células animais ancorantes e compará-los com estudos relatados na literatura com este tipo de biorreator (Tabela 21).

Tabela 20. Comparação dos experimentos realizados com a linhagem hMSCs-TERT aderida aos microcarregadores Cultispher-S com vazão de ar zero através do BEVT.

Experimento	Frequência de rotação do cilindro interno (rpm)	Velocidade específica máxima de crescimento μ_{max} (h⁻¹)	Concentração celular máxima (cel·mL⁻¹)	Fator de expansão máximo	Duração (h)
1	90	0,0251	8,44E+05	6,75	168
2	120	0,0225	7,80E+05	6,24	192
3	110	0,027	5,49E+05	4,4	192
4	100	0,029	1,12E+06	9,0	244

Os resultados de quantidade de células obtidos no experimento 4, no qual foi atingida a maior quantidade de células, seria suficiente para poder iniciar o tratamento de dois pacientes, com um peso aproximado de 70 kg, de uma doença comum como infarto do miocárdio. Isto mostra que mesmo com as limitações apresentadas durante o cultivo e considerando também que o BEVT construído foi em escala laboratorial (~100 mL), são promissórios os resultados na área da medicina regenerativa que podem ser obtidos com melhoramento das metodologias empregadas.

Outro aspecto a ressaltar é diminuição tanto de mão de obra quanto de custos em relação à cultura estática, sendo que para obter uma quantidade aproximada à obtida no experimento 4 seria necessário a manipulação de 26 frascos T, tornando-se dispendioso, de difícil monitoramento e com alto risco de variabilidade e contaminação entre os frascos T.

Tabela 21. Comparação dos resultados obtidos por outros estudos realizados com diferentes tipos de células em biorreatores com formação de vórtices encontrados na literatura.

Fator de comparação	Publicações mais relevantes		
	(SANTIAGO, 2007)	(O'CONNOR et al., 2002)	(TANZEGLOCK, 2008)
Tipo de célula	CHO-K1	Sf9	CHO
Tipo de microcarregador	Cytodex 1	---	---
Concentração inicial de células ($\times 10^5$)	2,2	20	3,5
Concentração máxima de células ($\times 10^6$)	1,0	6,1	1,8
Fator de expansão	4,5	2,9	5,1
Duração (h)	49	22	144

---Células não dependentes de ancoramento.

Como este estudo se limitou à validação de resultados com o BEVT operado com $Q = 0$ para uma linhagem celular que tem baixa demanda de oxigênio, estudos complementares com células que exigem mais oxigenação e baixas tensões de cisalhamento se tornam extremamente necessários.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem formular as seguintes conclusões:

1. Os resultados obtidos do coeficiente global de transferência de massa (K_{TLA}) no BEVT livre de bolhas foram satisfatórios, atingindo valores na ordem de 10 h^{-1} , que podem ser considerados suficientes para atender a necessidade de qualquer tipo de célula animal cultivada *in vitro*.
2. A partir dos resultados obtidos, foi comprovada a obtenção de baixas tensões de cisalhamento no BEVT (aproximadamente a 1 N/m^2), mesmo para frequências de rotação consideradas incomuns em biorreatores (90-120 rpm), proporcionando ambiente mais homogêneo e permitindo a suspensão completa dos microcarregadores.
3. Foi possível fazer a expansão da linhagem hMSC-TERT ancorada nos microcarregadores Cultispher® no BEVT. Embora os fatores de expansão sejam ligeiramente inferiores aos obtidos em outros biorreatores convencionais que utilizam impelidores para agitação e oxigenação do meio de cultura, a eficiência da recuperação celular sem a presença de agregados deverá ser incrementada com o uso do BEVT.
4. A adição de microcarregadores durante o cultivo no BEVT pode ser considerada uma alternativa para proporcionar mais área livre para o crescimento celular, sendo uma possibilidade bastante razoável para atingir maiores densidades celulares.
5. Os cálculos do tamanho dos turbilhões no BEVT utilizando a escala de Kolmogorov, confirmam a hidrodinâmica favorável para cultivo de agregados e células ancorantes como as CEMs.
6. Os resultados obtidos da caracterização da transferência de massa, tensão de cisalhamento, modulação da formação de agregados e de expansão celular tornam o BEVT um excelente candidato para atender as rigorosas exigências tecnológicas do cultivo de CEMs.

6 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

1. Avaliar o crescimento de células com maiores demandas de oxigênio e mais sensíveis a cisalhamento que as CEMs utilizando suplementação externa de oxigênio (ou $Q > 0$).
2. Avaliar o comportamento do BEVT utilizando relação menor de quantidade de células inoculadas por microcarregador.
3. Realizar experimentos melhorando a fase de adesão no BEVT.

7. REFERÊNCIAS

ABDALLAH, B. M. et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 326, n. 3, p. 527–38, 21 jan. 2005.

ABU-REESH, I.; KARGI, F. Biological responses of hybridoma cells to defined hydrodynamic shear stress. *Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 3, p. 167–178, fev. 1989.

ABU-REESH, I.; KARGI, F. Biological responses of hybridoma cells to hydrodynamic shear in an agitated bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 13, n. 11, p. 913–919, nov. 1991.

ALLSOPP, R. C.; HARLEY, C. B. Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Experimental cell research*, jul. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628529>>

AL-RUBEAI M, OH S K W, M. R. AND E. A. N. MODIFIED CELLULAR METABOLISM IN HYBRIDOMAS SUBJECTED. *Biotechnology letters*, v. 12, n. 5, p. 323–328, 1990.

AL-RUBEAI, M. *Animal Cell Culture*. Cham: Springer International Publishing, 2015. v. 9p. 763

ARIAS, M.; FELMER, R. Biology of embryonic stem cells (ES cells) in different species : potential applications in biomedicine. *Archivos de medicina veterinaria*, v. 195, p. 185–195, 2009.

BAIRD, M. H. I.; RAO, N. V. R.; SHEN, J. Oxygen Absorption in a Baffled Tank Agitated - Delta Paddle Impeller. v. 71, 1993.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 8, n. 3, p. 301–16, 2004.

BARRETT, T. A et al. Microwell engineering characterization for mammalian cell culture process development. *Biotechnology and bioengineering*, v. 105, n. 2, p. 260–75, 1 fev. 2010.

BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends in Genetics*, v. 16, n. 4, p. 168–174, abr. 2000.

BILGEN, B.; CHANG-MATEU, I. M.; BARABINO, G. A. Characterization of mixing in a novel wavy-walled bioreactor for tissue engineering. *Biotechnology and bioengineering*, v. 92, n. 7, p. 907–19, 30 dez. 2005.

BRINDLEY, D. et al. Bioprocess forces and their impact on cell behavior: implications for bone regeneration therapy. *Journal of tissue engineering*, v. 2011, n. October, p. 620247, jan. 2011.

BRIZZI, M. F.; TARONE, G.; DEFILIPPI, P. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Current opinion in cell biology*, v. 24, n. 5, p. 645–51, out. 2012.

BUTLER, M. *Animal Cell Culture and Technology*. 2. ed. [s.l.] Garland Science, BIOS Scientific, 2004. v. 40p. 299

CAPLAN, A. I. Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine. *Journal of cellular physiology*, v. 213, p. 341–347, 2007.

- CERRI, M. O. Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores airlift de circulação interna geometricamente semelhantes. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2009.
- CESARZ, Z.; TAMAMA, K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. 2015.
- CHERRY, R. S. Animal Cells in Turbulent Fluids: Details of the Physical Stimulus and Biological Response. v. 11, p. 279–299, 1993.
- CHERRY, R. S.; PAPOUTSAKIS, E. T. Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors. v. 1, p. 29–41, 1986.
- CHISTI, Y. Hydrodynamic damage to animal cells. Critical reviews in biotechnology, v. 21, n. 2, p. 67–110, jan. 2001.
- CÔTÉ, P.; BERSILLON, J.-L.; HUYARD, A. Bubble-free aeration using membranes: mass transfer analysis. Journal of Membrane Science, v. 47, n. 1–2, p. 91–106, nov. 1989.
- COWGER, N. et al. Characterization of bimodal cell death of insect cells in a rotating-wall vessel and shaker flask. Biotechnology and bioengineering, v. 64, n. 1, p. 14–26, 5 jul. 1999.
- CROUGHAN, M. S.; HAMEL, J.-F.; WANG, D. I. C. Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. 1987. Biotechnology and bioengineering, v. 95, n. 2, p. 295–305, 5 out. 2006.
- CURRAN, S. J.; BLACK, R. A. Oxygen transport and cell viability in an annular flow bioreactor: comparison of laminar Couette and Taylor-vortex flow regimes. Biotechnology and bioengineering, v. 89, n. 7, p. 766–74, 30 mar. 2005.
- CURRAN, S. J.; BLACK, R. A. Quantitative experimental study of shear stresses and mixing in progressive flow regimes within annular-flow bioreactors. Chemical Engineering Science, v. 59, n. 24, p. 5859–5868, dez. 2004.
- DANE, B. S.; BROADFOOT, M. M.; PAUL, J. A COMPARATIVE STUDY OF RESPIRATORY METABOLISM IN CULTURED MAMMALIAN CELL STRAINS. Experimental cell research, v. 30, p. 369–378, 1963.
- DESMET, G.; VERELST, H.; BARON, G. V. Local and Global Dispersion Effect in Couette-Taylor Flow. I. Description and Modeling of the Dispersion Effects. Chemical Engineering Science, v. 51, n. 8, p. 1287–1298, 1996.
- DONOVAN, P. J.; GEARHART, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. Nature, v. 414, n. November, p. 92–97, 2001.
- DORAN, P. Fluid Flow and Mixing. In: Bioprocess Engineering Principles. LONDRES: ACADEMIC PRESS LIMITED, 1995. p. 129–163.
- DOS SANTOS, D. PERES. AVALIAÇÃO DA EXPANSÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS EM BIORREATOR DE FIBRA OCA. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2013.
- DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. [s.l.] John Wiley & Sons Inc, 1998. p. 332
- DRUGMAND, J.-C.; SCHNEIDER, Y.-J.; AGATHOS, S. N. Insect cells as factories for biomanufacturing. Biotechnology advances, v. 30, n. 5, p. 1140–57, 2011.
- DUCOMMUN, P. et al. A new method for on-line measurement of the volumetric oxygen uptake rate in membrane aerated animal cell cultures. Journal of biotechnology, v. 78, n. 2, p. 139–47, 10 mar. 2000.

- DUNLOP, E. H.; NAMDEV, P. K. EFFECT OF FLUID SHEAR FORCES ON PLANT CELL SUSPENSIONS. *Chemical Engineering Science*, v. 49, n. 14, p. 2263–2276, 1994.
- DUTTA, P. K.; RAY, A. K. Experimental investigation of Taylor vortex photocatalytic reactor for water purification. *Chemical Engineering Science*, v. 59, n. 22-23, p. 5249–5259, nov. 2004.
- FÉNOT, M. et al. A review of heat transfer between concentric rotating cylinders with or without axial flow. *International Journal of Thermal Sciences*, v. 50, n. 7, p. 1138–1155, jul. 2011.
- FERRARI, C. et al. Limiting cell aggregation during mesenchymal stem cell expansion on microcarriers. *Biotechnology progress*, p. 1–8, 2012.
- FLEISEHAKER JR, R. J.; SINSKEY, A. J. Oxygen Demand and Supply in Cell Culture. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 12, p. 193–197, 1981.
- FLORES LUNA, G. L. Genoveva Lourdes Flores Luna AVALIAÇÃO DE ADITIVOS PARA MODULAR A AGLOMERAÇÃO DE MULTIPOTENTES EM FRASCO SPINNER PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2014.
- FOX, I. J. et al. Use of differentiated pluripotent stem cells in replacement therapy for treating disease. *Science*, v. 345, n. 6199, p. 1247391–1–1247391–10, 2014.
- FRANCIS, K. M.; CONNOR, K. I. M. C. O.; SPAULDING, G. F. CULTIVATION OF FALL ARMYWORM OVARY CELLS IN SIMULATED MICROGRAVITY. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, n. May, p. 332–336, 1997.
- GARCIA-BRIONES, M. A.; CHALMERS, J. J. Flow parameters associated with hydrodynamic cell injury. *Biotechnology and bioengineering*, v. 44, n. 9, p. 1089–98, 5 nov. 1994.
- GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnology advances*, v. 27, p. 153–76, 2009.
- GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. R. L. C.; PRAZERES, D. M. F. S. Analysis of a Taylor – Poiseuille vortex flow reactor — I : Flow patterns and mass transfer characteristics. *Chemical Engineering Science*, v. 53, n. 20, p. 3635–3652, 1998.
- GIORDANO, R. L. .; GIORDANO, R. C.; COONEY, C. L. Performance of a continuous Taylor–Couette–Poiseuille vortex flow enzymic reactor with suspended particles. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 10, p. 1093–1101, jul. 2000.
- GODARA, P.; MCFARLAND, C. D.; NORDON, R. E. Design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, p. 408–420, 2008.
- GODARA, P.; NORDON, R. E.; MCFARLAND, C. D. Mesenchymal stem cells in tissue engineering. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, p. 397–407, 2008.
- GODOY-SILVA, R. et al. Physiological responses of CHO cells to repetitive hydrodynamic stress. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 103, n. 6, p. 1103–1117, ago. 2009.
- GODOY-SILVA, R.; MOLLET, M.; CHALMERS, J. J. Evaluation of the effect of chronic hydrodynamical stresses on cultures of suspended CHO-6E6 cells. *Biotechnology and bioengineering*, v. 102, n. 4, p. 1119–30, 1 mar. 2009.
- GOLDBLUM, S. et al. Protective effect of methylcellulose and other polymers on insect cells subjected to laminar shear stress. *Biotechnology progress*, v. 6, n. 5, p. 383–90, 1990.

GOLTRY, K. L. et al. Large-Scale Production of Adult Stem Cells for Clinical Use. In: UMA, L.; CHESNUT, J. D.; THYAGARAJAN, B. (Eds.). EMERGING TECHNOLOGY PLATFORMS. [s.l.] John Wiley & Sons Inc, 2009. p. 153–168.

GONG, Y.-W. et al. Age-related responses of suspension cultured *Taxus cuspidata* to hydrodynamic shear stress. *Biochemical Engineering Journal*, v. 32, n. 2, p. 113–118, nov. 2006.

GOOCH, K. J.; FRANGOS, J. A. Shear sensitivity in animal cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 4, n. 2, p. 193–196, abr. 1993.

GREGORIADES, N. et al. Cell damage of microcarrier cultures as a function of local energy dissipation created by a rapid extensional flow. *Biotechnology and bioengineering*, v. 69, n. 2, p. 171–82, 20 jul. 2000.

HANSON, M. A et al. Comparisons of optically monitored small-scale stirred tank vessels to optically controlled disposable bag bioreactors. *Microbial cell factories*, v. 8, p. 44, jan. 2009.

HAUT, B. et al. Hydrodynamics and mass transfer in a Couette–Taylor bioreactor for the culture of animal cells. *Chemical Engineering Science*, v. 58, n. 3-6, p. 777–784, fev. 2003a.

HAUT, B. et al. Hydrodynamics and mass transfer in a Couette–Taylor bioreactor for the culture of animal cells. *Chemical Engineering Science*, v. 58, n. 3-6, p. 777–784, fev. 2003b.

HEIMBURG, D. VON et al. Oxygen consumption in undifferentiated versus differentiated adipogenic mesenchymal precursor cells, 2005.

HEWITT, C. J. et al. Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. *Biotechnology letters*, v. 33, n. 11, p. 2325–35, nov. 2011.

HOOKE, B. S.; LEE, J. M.; AN, G. Response of plant tissue culture to a high shear environment. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 11, p. 484–490, 1989.

JANES, D. A.; THOMAS, N. H.; CALOW, J. A. Demonstration of a Bubble-Free Annular-Vortex Membrane Bioreactor for Batch Culture of Red Beet Cells. *Biotechnology Techniques*, v. 1, n. 4, p. 257–262, 1987.

JAVAI, A. Membranes for solubility-based gas separation applications. *Chemical Engineering Journal*, v. 112, p. 219–226, set. 2005.

JOSHI, J. B.; ELIAS, C. B.; PATOLE, M. S. Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, v. 62, n. 2, p. 121–141, maio 1996.

JULIAN, C.; AL-RUBEAI, M. *Bioreactors for Tissue Engineering Principles, Design and Operation*. [s.l.] Springer, 2005. p. 370

JUNFEN, M. *Characterization and Application of Vortex Flow Adsorption for Simplification of Biochemical Product Downstream Processing*. [s.l.] Massachusetts Institute of Technology, 2003.

JUNG, S. et al. Large-scale production of human mesenchymal stem cells for clinical applications. *Biotechnology and applied biochemistry*, v. 59, n. 2, p. 106–20, 2012.

KEANE, J. T.; RYAN, D.; GRAY, P. P. Effect of shear stress on expression of a recombinant protein by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering*, v. 81, n. 2, p. 211–20, 20 jan. 2003.

- KINNEY, M. A.; SARGENT, C. Y.; MCDEVITT, T. C. The multiparametric effects of hydrodynamic environments on stem cell culture. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, v. 17, n. 4, p. 249–62, ago. 2011.
- KRETZMER, G. Influence of Stress on Adherent Cells. In: *Influence of Stress on Cell Growth and Product Formation*. [s.l: s.n.]. v. 67p. 15.
- KUNAS, K. T.; PAPOUTSAKIS, E. T. Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment. *Biotechnology and bioengineering*, v. 36, n. 5, p. 476–83, 20 ago. 1990.
- KUNAS, K. T.; PAPOUTSAKIS, E. T. Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment. *Biotechnology and bioengineering*, v. 102, n. 4, p. 980–87; discussion 977–9, 1 mar. 2009.
- KYUN, C. et al. A study on dynamic separation of silica slurry using a rotating membrane filter : 2 . Modelling of cake formation. *Journal of Membrane Science*, v. 157, p. 177–187, 1999.
- LADOUX, B.; NICOLAS, A. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Reports on progress in physics. Physical Society (Great Britain)*, v. 75, n. 11, p. 1–25, nov. 2012.
- LAMBOURSAIN, L.; ST-ONGE, F.; JOLICOEUR, M. A lab-built respirometer for plant and animal cell culture. *Biotechnology progress*, v. 18, n. 6, p. 1377–86, 2002.
- LATHROP, D.; FINEBERG, J.; SWINNEY, H. Transition to shear-driven turbulence in Couette-Taylor flow.pdf. *The American Physical Society*, v. 46, n. 10, p. 6390–6405, 1992.
- LEE, E. K.; HUANG, L.; LEE, Y. H. Effect of Liquid Properties and Flow on Liquid Film Mass Transfer Coefficiene in Silicone Membrane Oxygenation. *Biotechnology and bioengineering*, v. 36, p. 530–533, 1990.
- LEIB, T. M.; PEREIRA, C. J.; VILLADSEN, J. Bioreactors: a chemical engineering perspective. *Chemical Engineering Science*, v. 56, n. 19, p. 5485–5497, out. 2001.
- LEUNG, H. W. et al. Agitation can Induce Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells in Microcarrier Cultures. *Tissue engineering. Part C, Methods*, v. 17, n. 2, 2011.
- LUDWIG, A; KRETZMER, G.; SCHÜGERL, K. Determination of a “critical shear stress level” applied to adherent mammalian cells. *Enzyme and microbial technology*, v. 14, n. 3, p. 209–213, mar. 1992.
- LUEPTOW, R. M.; DOCTER, A.; MIN, K. Stability of axial flow in an annulus with a rotating inner cylinder. *Physics of Fluids*, v. 4, n. 11, p. 2446–2455, 1992.
- LUO, W. et al. Laminar shear stress delivers cell cycle arrest and anti-apoptosis to mesenchymal stem cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 43, n. 3, p. 210–216, 2011.
- MA, N.; KOELLING, K. W.; CHALMERS, J. J. Fabrication and use of a transient contractional flow device to quantify the sensitivity of mammalian and insect cells to hydrodynamic forces. *Biotechnology and bioengineering*, v. 80, n. 4, p. 428–37, 20 nov. 2002.
- MARDIKAR, S. H.; NIRANJAN, K. Observations on the shear damage to different animal cells in a concentric cylinder viscometer. *Biotechnology and bioengineering*, v. 68, n. 6, p. 697–704, 20 jun. 2000.
- MARTIN, K. J.; NERENBERG, R. The membrane biofilm reactor (MBfR) for water and wastewater treatment: principles, applications, and recent developments. *Bioresource technology*, v. 122, p. 83–94, out. 2012.

- MARTIN, Y.; VERMETTE, P. Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances. *Biomaterials*, v. 26, n. 35, p. 7481–503, dez. 2005.
- MCCOY, R.; WARD, S.; HOARE, M. Sub-population analysis of human cancer vaccine cells--ultra scale-down characterization of response to shear. *Biotechnology and bioengineering*, v. 106, n. 4, p. 584–97, 1 jul. 2010.
- MCLAREN, A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature*, v. 414, n. November, p. 129–131, 2001.
- MCQUEEN, A.; BAILEY, J. E. Serum level, cell line, flow type and viscosity on flow-induced lysis of suspended mammalian cells. *Biotechnology letters*, v. 11, n. 8, p. 531–536, 1989.
- MENDONÇA, M. Expansão de células mesenquimais estromais em frasco spinner e avaliação de aditivos para diminuir a aglomeração de microcarregadores. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2013.
- MOLLET, M. et al. Acute hydrodynamic forces and apoptosis: a complex question. *Biotechnology and bioengineering*, v. 98, n. 4, p. 772–88, 1 nov. 2007.
- MOORE, C. M. Characterization of a Taylor Couette Vortex Flow Reactor. [s.l.] Massachusetts Institute of Technology, 1994.
- MOREIRA, J. L. et al. Influence of Power Input and Aeration Method on Mass Transfer in Laboratory Animal Cell a. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, v. 62, p. 118–131, 1995a.
- MOREIRA, J. L. et al. Hydrodynamic effects on BHK cells grown as suspended natural aggregates. *Biotechnology and bioengineering*, v. 46, n. 4, p. 351–60, 20 maio 1995b.
- NEUNSTOECKLIN, B. et al. Determination of the maximum operating range of hydrodynamic stress in mammalian cell culture. *Journal of biotechnology*, v. 194, p. 100–109, 18 dez. 2014.
- NG, Y. C.; BERRY, J. M.; BUTLER, M. Optimization of physical parameters for cell attachment and growth on macroporous microcarriers. *Biotechnology and bioengineering*, v. 50, n. 6, p. 627–35, 20 jun. 1996.
- NIEBRUEGGE, S. et al. Generation of human embryonic stem cell-derived mesoderm and cardiac cells using size-specified aggregates in an oxygen-controlled bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, v. 102, n. 2, p. 493–507, 1 fev. 2009.
- NIENOW, A. W. Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology*, v. 50, n. 1-3, p. 9–33, mar. 2006.
- NISHIKAWA, M. et al. Gas absorption in aerated mixing vessels. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, v. 14, n. 3, p. 219–226, 1981.
- O'CONNOR, K. C. et al. Prolonged shearing of insect cells in a couette bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, n. 5, p. 600–608, out. 2002.
- OHMURA, N.; SUEMASU, T.; ASAMURA, Y. Particle classification in Taylor vortex flow with an axial flow. *Journal of Physics: Conference Series*, v. 14, p. 64–71, 1 jan. 2005.
- OZTURK, S. S. Engineering challenges in high density cell culture systems. *Cytotechnology*, v. 22, p. 3–16, 1996.
- PANDEY, P.; CHAUHAN, R. S. Membranes for gas separation. *Progress in Polymer Science*, v. 26, p. 853–893, ago. 2001.

- PAPÁČEK, Š. et al. Growth impact of hydrodynamic dispersion in a Couette–Taylor bioreactor. *Mathematical and Computer Modelling*, v. 54, n. 7-8, p. 1791–1795, out. 2011.
- PAPOUTSAKIS, E. T. Media additives for protecting freely suspended animal cells against agitation and aeration damage. *Trends in biotechnology*, v. 9, n. 9, p. 316–24, set. 1991a.
- PAPOUTSAKIS, E. T. Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors. *Trends in biotechnology*, v. 9, n. 12, p. 427–37, dez. 1991b.
- PATEL, N. et al. Design of a novel Couette flow bioreactor to study the growth of fungal microorganism. *Journal of biotechnology*, v. 145, n. 3, p. 264–72, 1 fev. 2010.
- PATTAPPA, G. et al. The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation. *Journal of cellular physiology*, v. 226, n. 10, p. 2562–70, out. 2011.
- PAULE, A et al. A photosynthetic rotating annular bioreactor (Taylor-Couette type flow) for phototrophic biofilm cultures. *Water research*, v. 45, n. 18, p. 6107–18, 15 nov. 2011.
- PETERSEN, J. F.; MCINTIRE, L. V; PAPOUTSAKIS, E. T. Shear sensitivity of cultured hybridoma cells (CRL-8018) depends on mode of growth , culture age and metabolite concentration. *Journal of biotechnology*, v. 7, p. 229–246, 1988.
- PETERSEN, J. F.; MCINTIRE, L. V; PAPOUTSAKIS, E. T. Shear sensitivity of hybridoma cells in batch, fed-batch, and continuous cultures. *Biotechnology progress*, v. 6, n. 2, p. 114–20, 1990.
- PIPER, S. L. et al. Inducible immortality in hTERT-human mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, v. 30, n. 12, p. 1879–85, dez. 2012.
- PITTINGER, M. F. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 2 abr. 1999.
- PRÓSPER, F.; VERFAILLIE, C. M. Células madre adultas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, v. 26, n. 3, p. 345–356, dez. 2003.
- QUESNEY, S. et al. Characterization of Vero cell growth and death in bioreactor with serum-containing and serum-free media. *Cytotechnology*, v. 35, n. 2, p. 115–25, mar. 2001.
- RACHER, A J.; LOOBY, D.; GRIFFITHS, J. B. Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. *Cytotechnology*, v. 3, n. 3, p. 301–7, maio 1990.
- RACINA, A.; KIND, M. Specific power input and local micromixing times in turbulent Taylor–Couette flow. *Experiments in Fluids*, v. 41, n. 3, p. 513–522, 13 jul. 2006.
- RESENDE, M. M. et al. Distribution of suspended particles in a Taylor-Poiseuille vortex flow reactor. *Chemical Engineering Science*, v. 56, p. 755–761, 2001.
- RISHELL, S. et al. Mass transfer analysis of a membrane aerated reactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 18, n. 3, p. 159–167, jun. 2004.
- SANCHES, S. EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM FRASCO SPINNER COM MICROCARREGADORES. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2010.
- SÁNCHEZ PÉREZ, J. A. et al. Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors. *Chemical Engineering Journal*, v. 124, n. 1-3, p. 1–5, nov. 2006.

- SANTIAGO, P. A.; GIORDANO, R. D. C.; SUAZO, C. A. T. Performance of a vortex flow bioreactor for cultivation of CHO-K1 cells on microcarriers. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 1, p. 35–45, jan. 2011.
- SANTOS, S. S. et al. Stirred vessel cultures of rat brain cells aggregates: characterization of major metabolic pathways and cell population dynamics. *Journal of neuroscience research*, v. 85, n. 15, p. 3386–97, 15 nov. 2007.
- SART, S. et al. Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties, and applications. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, v. 20, n. 5, p. 365–80, out. 2014.
- SCHALLMOSER, K. et al. Rapid large-scale expansion of functional mesenchymal stem cells from unmanipulated bone marrow without animal serum. *Tissue engineering. Part C, Methods*, v. 14, n. 3, p. 185–96, set. 2008.
- SCHNEIDER, M. et al. Bubble-free oxygenation by means of hydrophobic porous membranes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, n. 9, p. 839–847, set. 1995.
- SCHOP, D. et al. Growth, Metabolism, and Growth Inhibitors of Mesenchymal Stem Cells. *TISSUE ENGINEERING: Part A*, v. 15, n. 8, p. 1877–1886, 2009.
- SCHOP, D. et al. Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, v. 4, n. 2, p. 131–40, fev. 2010.
- SCHOP, D. Growth and metabolism of mesenchymal stem cells cultivated on microcarriers. Enschede, The Netherlands: [s.n.]. p. 175
- SCHUSTER, M. D.; MARTENS, T. P.; ITESCU, S. Allogeneic mesenchymal stem cells for cardiac repair. *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*, v. 16, n. 1, p. 95–101, jan. 2008.
- SCIENCES, M. Ex vivo evaluation of a Taylor-Couette flow , immobilized heparinase I device for clinical application. v. 96, n. March, p. 2350–2355, 1999.
- SEN, A.; KALLOS, M. S.; BEHIE, L. A. Effects of Hydrodynamics on Cultures of Mammalian Neural Stem Cell Aggregates in Suspension Bioreactors. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 40, n. 134, p. 103–113, nov. 2002.
- SENGUPTA, T. K.; KABIR, M. F.; RAY, A. K. A Taylor Vortex Photocatalytic Reactor for Water Purification. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 40, n. 23, p. 5268–5281, nov. 2001.
- SIECK, J. B. et al. Development of a Scale-Down Model of hydrodynamic stress to study the performance of an industrial CHO cell line under simulated production scale bioreactor conditions. *Journal of biotechnology*, v. 164, n. 1, p. 41–9, 10 mar. 2013.
- SINGH, V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology*, v. 30, n. 1-3, p. 149–58, jul. 1999.
- TANZEGLOCK, T. A Novel Lobed Taylor-Couette Bioreactor for the Cultivation of Shear Sensitive Cells and Tissues. n. 18047, 2008.
- TANZEGLOCK, T. et al. Induction of mammalian cell death by simple shear and extensional flows. *Biotechnology and bioengineering*, v. 104, n. 2, p. 360–70, 1 out. 2009.
- TEMPLE, S. The development of neural stem cells. *Nature*, v. 414, p. 112–117, 2001.
- TISU, M.; PAVKO, A. Oxygen Transfer in a Laboratory Stirred Tank Bioreactor During Mammalian Cell Culture Cultivation. [s.l: s.n.].

- TRAMPER, J. Oxygen gradients in animal-cell bioreactors. *Cytotechnology*, v. 18, n. 1-2, p. 27–34, jan. 1995.
- VAN DER POL, L. A.; PAIJENS, I.; TRAMPER, J. Dextran as protectant against damage caused by sparging for hybridoma cells in a bubble column. *Journal of biotechnology*, v. 43, n. 2, p. 103–10, 1 dez. 1995.
- VENKAT, R. V.; STOCK, L. R.; CHALMERS, J. J. Study of hydrodynamics in microcarrier culture spinner vessels: A particle tracking velocimetry approach. *Biotechnology and bioengineering*, v. 49, n. 4, p. 456–66, 20 fev. 1996.
- WAGNER, B. A.; VENKATARAMAN, S.; BUETTNER, G. R. Rate of oxygen utilization by cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 51, n. 3, p. 700–712, 2011.
- WANG, D. et al. The bioreactor: a powerful tool for large-scale culture of animal cells. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 6, n. 5, p. 397–403, out. 2005.
- WEBER, C. et al. Expansion and Harvesting of hMSC-TERT. *The open biomedical engineering journal*, v. 1, p. 38–46, jan. 2007.
- WERNERSSON, E. S.; TRAGARDH, C. Scale-up of Rushton turbine-agitated tanks. *Chemical Engineering Journal*, v. 54, p. 4245–4256, 1999.
- WOLTERBEEK, H.; VAN DER MEER, A. J. G. M. Optimization, Application, and Interpretation of Lactate Dehydrogenase Measurements in Microwell Determination of Cell Number and Toxicity. v. 3, n. 6, p. 675–683, 2005.
- WRON, S. et al. Mass transfer in gas-liquid Couette-Taylor flow in membrane reactor. v. 54, 1999.
- WRÓNSKI, S. et al. Mass transfer in gas- liquid Couette -Taylor flow in membrane reactor. *Chemical Engineering Science*, v. 54, p. 2963–2967, 1999.
- WU, J. Mechanisms of animal cell damage associated with gas bubbles and cell protection by medium additives. *Journal of biotechnology*, v. 43, n. 2, p. 81–94, 1 dez. 1995.
- YAMANAKA, S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell stem cell*, v. 1, n. 1, p. 39–49, 7 jun. 2007.
- YANG, Y.; ROSSI, F. M. V.; PUTNINS, E. E. Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture. *Biomaterials*, v. 28, n. 20, p. 3110–20, jul. 2007.
- ZHANG, H.; CLOUD, A. The Permeability Characteristics of Silicone Rubber Society for the Advancement of Material and Process Engineering. [s.l.: s.n.].
- ZHU, X. H. et al. Study of cell seeding on porous poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) sponge and growth in a Couette–Taylor bioreactor. *Chemical Engineering Science*, v. 65, n. 6, p. 2108–2117, mar. 2010.
- ZORO, B. J. H. et al. The impact of process stress on suspended anchorage-dependent mammalian cells as an indicator of likely challenges for regenerative medicines. *Biotechnology and bioengineering*, v. 99, n. 2, p. 468–74, 1 fev. 2008.
- ZUK, P. A. et al. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, p. 4279–4295, jan. 2002.
- ZUPKE, C.; SINSKEY, A. J.; STEPHANOPOULOS, G. Intracellular flux analysis applied to the effect of dissolved oxygen on hybridomas. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 44, n. 1-2, p. 27–36, dez. 1995.

8 APÊNDICES.

8.1 A - Curva padrão da análise de células viáveis pelo método MTT para os experimentos realizados

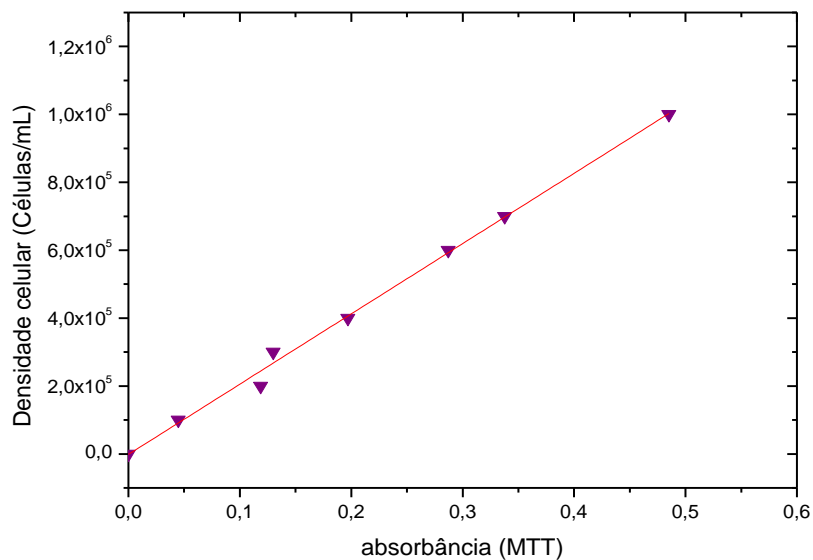


Figura A1. Curva calibração da análise de MTT - Experimento 1. Equação da reta $y=ax+b$, ($a=2,06963E+06$ e $b=-1425,21938$), com coeficiente de correlação de 0,995

Experimento 2

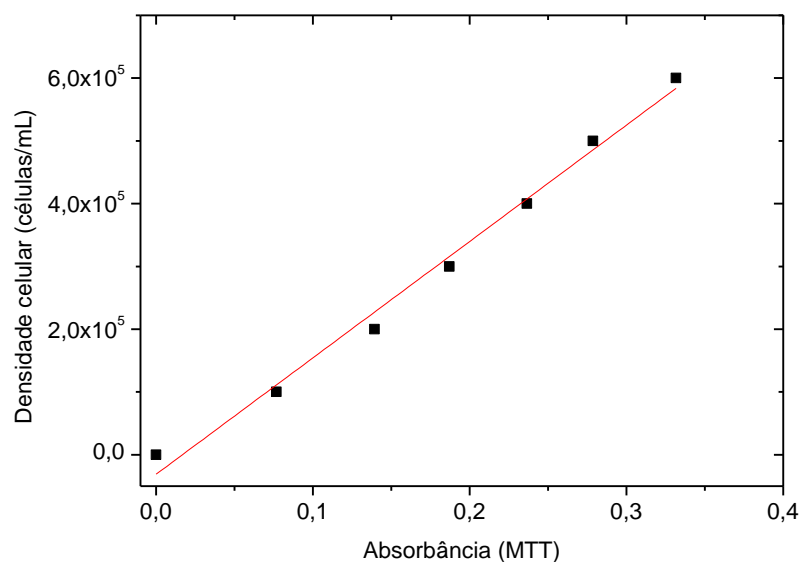


Figura A2 Curva calibração da análise de MTT - Experimento 2. Equação da reta $y=ax+b$, ($a=1,85408E+06$ e $b=-31041,47974$), com coeficiente de correlação de 0,988.

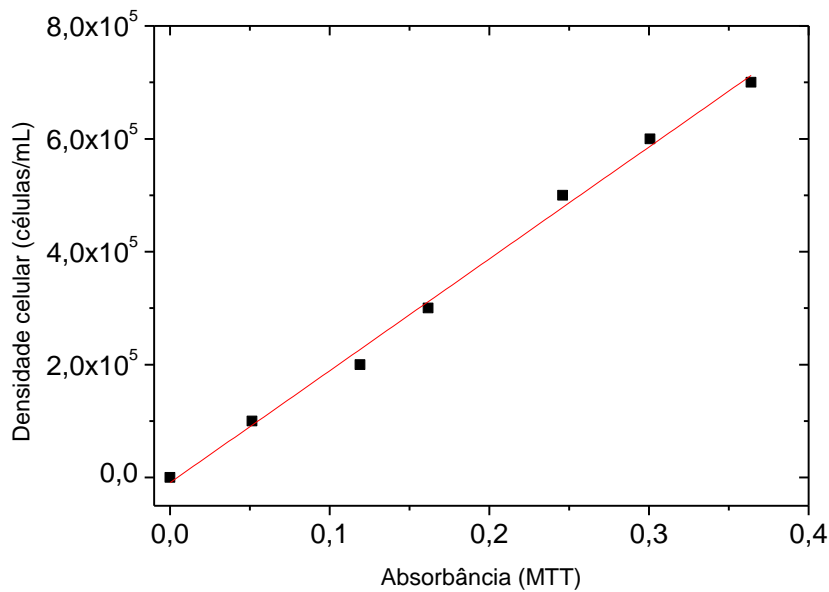


Figura A3 Curva calibração da análise de MTT - Experimento 2. Equação da reta $y=ax+b$, ($a=1,98196E+06$ e $b=-8988,4159$), com coeficiente de correlação de 0,994.

Experimento 4

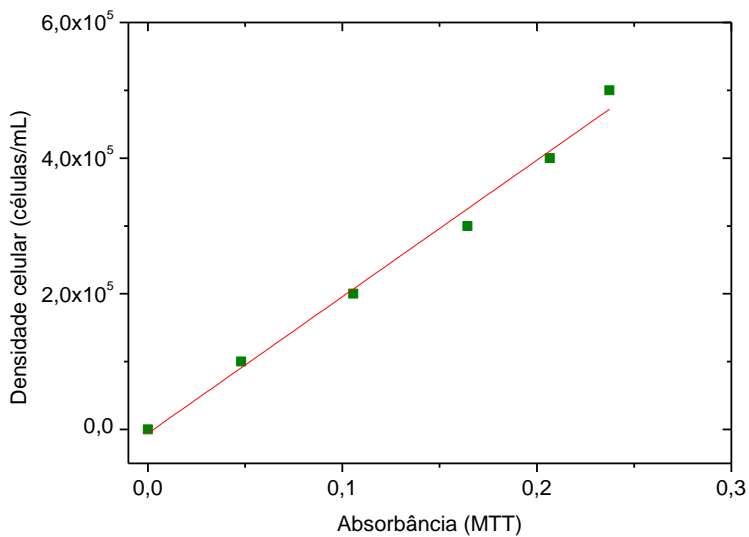


Figura A4 Curva calibração da análise de MTT - Experimento 2. Equação da reta $y=ax+b$, ($a=2,01377E+06$ e $b=-5748,5727$), com coeficiente de correlação de 0,988.

8.2 B. Dados de pH; concentração de glicose, glutamina, arginina, lactato e amônia; número de células aderidas aos microcarregadores com e sem fator de correção e células em suspensão para os experimentos realizados.

Tabela B1 Experimento 1 – Número de células aderidas aos microcarregadores com e sem fator de correção, células em suspensão e pH.

Tempo (h)	Células aderidas nos microcarregador (Número de células)	Células aderidas nos microcarregadores com FC (Número de células)	Células na suspensão (Número de células)	pH
0	7,5E6	7,5E6	--	7,18
8	1,17942E7	1,17942E7	--	7,26
24	2,19354E7	2,19354E7	60000	7,304/7,35*
48	3,30286E7	3,96952E7	150000	7,055/7,22*
72	3,71264E7	4,19649E7	825000	6,8/7,18*
96	3,57191E7	4,39514E7	1,5E6	6,88/7,185*
120	3,58433E7	4,81831E7	975000	6,96/7,277*
144	3,78715E7	5,36788E7	1,8E6	6,995/7,144*
168	3,31114E7	5,79339E7	2,55E6	6,883/7,231*

*Antes e depois da troca de meio

Tabela B2. Resultados obtidos do experimento 1. Glicose, lactato e glutamina foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo.

Tempo (h)	Glicose (mM)	Lactato (mM)	Amônia (mM)	Glutamina (mM)	Arginina (mM)
8	10,3	3,34	0,29324	9,52	2,383
24	9,37	4,74	0,70784	8,67	2,438
24	10,3	3,89	0,48105	9,16	1,885
48	8,14	6,91	1,20523	7,54	2,154
48	9,53	4,8	0,68366	8,98	2,122
72	7,06	8,28	1,42484	8,3	1,428
72	8,84	6,22	0,84444	8,86	2,021

96	6,57	8,83	1,51634	7,87	1,257
96	8,47	6,46	0,84837	8,55	1,804
120	5,92	8,62	1,47712	7,29	1,132
120	7,98	6,38	0,86275	8,41	1,788
144	5,99	8,42	--	7,42	1,164
144	8,04	6,09	--	7,13	1,764
168	5,97	8	1,32026	6,29	1,292
168	8,64	6,22	0,90588		

Tabela B3 Experimento 2 – Número de células aderidas aos microcarregadores com e sem fator de correção, células em suspensão e pH.

Tempo (h)	Células aderidas nos microcarregador (Número de células)	Células aderidas nos microcarregadores com FC (Número de células)	Células na suspensão (Número de células)	pH
0	7,5E6	7,5E6	--	7,1
8	1,02975E7	1,02975E7	--	7,31
24	1,94975E7	1,94975E7	2,325E6	7,246/7,214*
48	2,61775E7	3,48215E7	1,125E6	6,973/7,074*
72	2,83375E7	3,6984E7	1,875E6	7,099/7,246*
96	3,25175E7		1,725E6	7,036/7,245*
120	3,54575E7	3,83595E7	1,35E6	7,088/7,307*
144	3,82175E7	4,94968E7	900000	6,915/7,237*
168	3,31114E7	5,79339E7	2,55E6	6,928/7,308*
192	4,67775E7	6,76323E7	1,95E6	6,859/7,27*

*Antes e depois da troca de meio

Tabela B4 Resultados obtidos do experimento 2. Glicose, lactato e glutamina foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo.

Tempo (h)	Glicose (mM)	Lactato (mM)	Amônia (mM)	Glutamina (mM)	Arginina (mM)
0	13,611	3,43028	0,21681		
8	12,388	4,55151	0,39608	2,556	2,389
24	10,777	6,483	0,549		
24	12,611	3,707	0,278		
48	9,444	7,926	0,643	2,676	2,333
48	11,611	4,940	0,396		
72	8,111	8,892	0,712	2,492	2,416
72	11,333	5,317	0,407		
96	6,777	10,257	0,816	2,617	2,462
96	10,333	6,405	0,487		
120	6,444	10,757	0,844	2,596	2,438
120	9,888	6,627	0,507		
144	5,777	11,212	0,933	2,515	2,402
144	10	6,871	0,522		
168	5,444	11,878	0,952	2,103	1,915
168	9,611	6,871	0,560		
192	9,388	7,526	0,60131		

Tabela B5 Resultados da medição do diâmetro médio de agregados do experimento 2, obtidos a partir de registro fotográfico e pelo programa image Pro plus versão 6.0

Tempo (h)	Diâmetro médio (μm)	Desvio padrão
8	275,04317	62,96651
24	285,08781	67,87528

48	282,5595	67,97087
72	319,9314	80,55976
96	256,5915	59,20709
120	295,63401	79,36084
144	288,77701	76,50421
168	356,74399	102,25878
192	297,79609	70,81761

Tabela B6 Experimento 3 – Número de células aderidas aos microcarregadores com e sem fator de correção, células em suspensão e pH.

Tempo (h)	Células aderidas nos microcarregador (Número de células)	Células aderidas nos microcarregadores com FC (Número de células)	Células na suspensão (Número de células)	pH
0	7,5E6	7,5E6	--	7,216
8			1,2E6	7,326
24	2,37296E7	2,37296E7	2,4E6	7,348/7,291*
48	2,79696E7	--	2,1E6	7,105/7,262*
72	2,60096E7	4,53269E7	1,95E6	7,193/7,321*
96	3,12096E7	--	1,35E6	7,039/7,257*
120	3,39296E7	4,80249E7	1,575E6	7,064/7,255*
144	3,16496E7	--	1,65E6	7,023/7,274*
168	2,81696E7	4,33434E7	825000	7,015/7,305*
192	3,04896E7	--	3,225E6	

*Antes e depois da troca de meio

Tabela B7 Resultados obtidos do experimento 3. Glicose e lactato foram obtidos pela quantificação no bioanalisador YSI, arginina e glutamina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo.

Tempo (h)	Glicose (mM)	Lactato (mM)	Amônia (mM)	Glutamina (mM)	Arginina (mM)

8			0,217		
24	11,722	3,441	0,168	2,341	2,603
24	12,5	2,475	0,067		
48	10,222	4,296	0,2554	2,185	2,603
48	11,944	3,030			
72	10,055	4,562	0,2511	2,071	2,216
72	11,555	3,241			
96	8,833	4,884	0,262	2,382	2,543
96	11,444	3,319			
120	8,5	5,217	0,2511	2,083	2,265
120	11,111	3,463	0,225		
144	8,055	5,617	0,268	2,233	2,478
144	10,444	3,630			
168	7,5	5,928	0,294		
168	10,166	3,841	0,280		
192	7,611	5,939	0,346	2,358	2,437

Tabela B8 Resultados da medição do diâmetro médio de agregados do experimento 3, obtidos a partir de registro fotográfico e pelo programa image Pro plus versão 6.0

Tempo (h)	Diâmetro médio (μm)	Desvio padrão
8	218,86016	74,13559
24	256,8364	64,75991
48	262,90013	82,59028
72	276,62517	84,49438
96	298,16358	95,43614
120	266,69136	78,66178
144	259,04448	68,51721
168	271,61561	65,59092
192	278,73378	74,72355

Tabela B9 Experimento 4 – Número de células aderidas aos microcarregadores com e sem fator de correção, células em suspensão e pH.

Tempo (h)	Células aderidas nos microcarregador (Número de células)	Células aderidas nos microcarregadores com FC (Número de células)	Células na suspensão (Número de células)	pH
0	7,5E6			7,178
8	9,17508E6	9,17508E6	3,225E6	7,265
24	1,42372E7	1,42372E7	4,05E6	7,239/7,173*
48	2,95172E7	4,01102E7	2,025E6	6,993/7,157*
72	4,31572E7	5,32621E7	2,25E6	6,962/7,173*
96	4,74772E7	7,40314E7	2,85E6	6,985/7,213*
120	4,93572E7	5,36023E7	3E6	6,98/7,247*
144	6,13172E7	6,2637E7	1,35E6	6,911/7,237*
168	6,74172E7	8,5698E7	2,475E6	6,992/7,343*
192	5,83572E7	6,6981E7	2,4E6	6,809/7,253*
240	5,83972E7	7,76089E7	1,575E6	6,768

*Antes e depois da troca de meio

Tabela B10 Resultados obtidos do experimento 4. Glicose e lactato foram obtidos pela quantificação no bioanalizador YSI, arginina e glutamina por CLAE e amônia por eletrodo de íon seletivo.

Tempo (h)	Glicose (mM)	Lactato (mM)	Amônia (mM)	Glutamina (mM)	Arginina (mM)
0				4,26	2,642
8	19,444	2,81	0,210	3,665	2,326
24	16,833	4,42	0,6	4,019	2,79
24	18,444	3,11	0,326		
48	13,222	5,84	0,916	3,3	2,338

48	16,722	3,99	0,447		
72	12,833	6,81	0,819	3,309	2,441
72	16,222	4,55	0,522		
96	11,222	7,11	0,802	3	2,164
96	15,888	4,51	0,508		
120	10,944	7,73	0,879		
120	15,166	5,02	0,560		
144	9,388	7,95	0,802	2,333	1,801
144	14,777	5,17	0,545		
168	10,222	8,01	0,839	3,356	2,4
168	15,166	5,16	0,530		
192	8,388	8,44	1,064	2,946	2,11
192	14,5	5,39	0,607		
216	10,055	7,48	0,992	3,008	2,227
216	14,444	4,93	0,573		
240	7,722	7,95	1,161		

Tabela B11 Resultados da medição do diâmetro médio de agregados do experimento 2, obtidos a partir de registro fotográfico e pelo programa image Pro plus versão 6.0

Tempo (h)	Diâmetro médio (μm)	Desvio padrão
8	294,8607	77,04487
24	299,94665	94,71124
48	288,58733	70,25804
72	314,91081	79,17109
96	298,52069	72,46332
120	324,49722	80,88328
144	279,77332	84,68687
168	287,94452	92,70985

192	314,90845	101,7332
216	300,97633	92,57209
240	291,4181	97,04798

8.3 C Código da simulação realizada no programa MATLAB R2013a para avaliar a variação da concentração de oxigênio com o tempo, para a linhagem hMSC-TERT.

```
function dCdt = TwoDiff(t, y, C)
% Differential equations for two variables
% t is time
% y is the state vector
% C contains any required constants
% dydt must be a column vector
%dCdt = [...
    dCdt= C(1)*(C(2)-y(1))-C(3)*(C(4)+C(5)*t-C(6)*t^2+C(7)*t^3-C(8)*t^4);%...
    %polyval(C,t)];

% Initialize workspace and graph
clear; format short e; clf

% Set name of file containing derivatives
DiffFileName = 'TwoDiff';

% Set up time span, initial value(s), and constant(s)
% Note: Variables should be in columns
tspan = 8:1:170;
yinit = 1.11*10^(-4);
C      = [6.72 2.22*10^(-4) 1.13*10^(-10) 60000 9405.5 98.9189 1.6718
0.00645];

% Cx =60000 + 9405,500*t-98,9189*t2 +1,6718*t3 -0,00645*t4      (células /mL)

% Under the hood
% Use ODE function of choice to get output times and states
DE = eval(sprintf('@(t, y, C) %s(t,y,C)', DiffFileName));
[tout, yout] = ode45(@(t,y) DE(t,y,C), tspan, yinit);

% Plot results
figure(1)
plot(tout,yout(:,1),'g-');
title('Oxygen Concentration at K1a 4,68 h^{-1}');
xlabel('time in hours');
ylabel('mol/L');

% figure(2)
% plot(tout,yout(:,2),'b-');
% title('Cell Concentration');
% xlabel('time in hours');
% ylabel('cells/mL');
clc
yout
tout
```

8.4 D Resultados obtidos da otimização dos modelos utilizados para o cálculo de kLa

8.4.1 D Cálculos realizados do modelo para determinação de k_{TLA} com passo de ar através da membrana e da interfase gás-líquido

Para a codificação das variáveis foi utilizada a equação 8.4D

$$V; Q = \frac{X - \frac{X+X_2}{2}}{\frac{X_2 - X_1}{2}} = \frac{X - X_{média}}{ampl_{média}} \quad (8.4D)$$

Tabela D1 Codificação variáveis de operação: Frequência de rotação e vazão de ar

$v_{médio}$	90	$Q_{médio}$	1,25
$ampl_{média}$	30	$ampl_{média}$	0,75

Os coeficientes do modelo foram obtidos pela aplicação de Excel 2013 chamada Solver, os resultados são apresentados na Tabela D2.

Tabela D2 Coeficientes do modelo obtidos pela aplicação solver de Excel 2013

b0	10,095
b1	1,182
b11	-0,4725
b2	2,055
b22	-1,3275

Os graus de liberdade usados para otimização do modelo são apresentados na Tabela D3.

Tabela D3 Grãos de liberdade do sistema analisado

$y_m =$	8,67
$n =$	36
$p =$	5
$m =$	12

Os cálculos realizados para a codificação das variáveis, os valores obtidos em triplicata experimentalmente e os obtidos pelo modelo através do método dos quadrados mínimos é apresentado na Tabela D4.

Tabela D4 Resultados de k_{La} coletados experimentalmente e a partir da otimização dada com ajuste do modelo obtido pelo método de quadrados mínimos

Modelo quadrático dado pelo Statistica								
codificação				SQ _r	SQ _T	SQ _R	SQ _{ep}	
v(rpm)	Q(vvm)	y _i	ŷ _i	desv	(y _i -ȳ) ²	(ŷ _i -ȳ) ²	(y _i -y _{i,m}) ²	
-1	-1	4,68	5,058	0,142884	15,9201	13,046544	0,0144	
1	-1	8,28	7,422	0,736164	0,1521	1,557504	0,2304	
-1	1	9	9,168	0,028224	0,1089	0,248004	0,0576	
1	1	11,52	11,532	0,000144	8,1225	8,191044	0,0576	
-1	-1	4,68	5,058	0,142884	15,9201	13,046544	0,0144	
1	-1	7,56	7,422	0,019044	1,2321	1,557504	0,0576	
-1	1	9,36	9,168	0,036864	0,4761	0,248004	0,0144	
1	1	11,16	11,532	0,138384	6,2001	8,191044	0,0144	
-1	-1	5,04	5,058	0,000324	13,1769	13,046544	0,0576	
1	-1	7,56	7,422	0,019044	1,2321	1,557504	0,0576	
-1	1	9,36	9,168	0,036864	0,4761	0,248004	0,0144	
1	1	11,16	11,532	0,138384	6,2001	8,191044	0,0144	
-0,333333	-1	6,84	6,266	0,329476	3,3489	5,779216	0,36	
0,333333	-1	6,84	7,054	0,045796	3,3489	2,611456	0,0144	
-0,333333	1	10,08	10,376	0,087616	1,9881	2,910436	0,2304	
0,333333	1	10,8	11,164	0,132496	4,5369	6,220036	0,1296	
-0,333333	-1	5,76	6,266	0,256036	8,4681	5,779216	0,2304	
0,333333	-1	7,2	7,054	0,021316	2,1609	2,611456	0,0576	
-0,333333	1	10,08	10,376	0,087616	1,9881	2,910436	0,2304	
0,333333	1	10,8	11,164	0,132496	4,5369	6,220036	0,1296	
-0,333333	-1	6,12	6,266	0,021316	6,5025	5,779216	0,0144	
0,333333	-1	6,84	7,054	0,045796	3,3489	2,611456	0,0144	
-0,333333	1	11,52	10,376	1,308736	8,1225	2,910436	0,9216	
0,333333	1	11,88	11,164	0,512656	10,3041	6,220036	0,5184	
-1	-0,33333333	7,92	7,608	0,097344	0,5625	1,127844	0,0576	
-1	-0,33333333	7,56	7,608	0,002304	1,2321	1,127844	0,0144	
-1	-0,33333333	7,56	7,608	0,002304	1,2321	1,127844	0,0144	
-0,333333	-0,33333333	8,64	8,816	0,030976	0,0009	0,021316	0,1296	
-0,333333	-0,33333333	9	8,816	0,033856	0,1089	0,021316	0	
-0,333333	-0,33333333	9,36	8,816	0,295936	0,4761	0,021316	0,1296	
0,333333	-0,33333333	9,72	9,604	0,013456	1,1025	0,872356	0,1296	
0,333333	-0,33333333	9,72	9,604	0,013456	1,1025	0,872356	0,1296	
0,333333	-0,33333333	8,64	9,604	0,929296	0,0009	0,872356	0,5184	
1	-0,33333333	9,72	9,972	0,063504	1,1025	1,695204	0,0576	
1	-0,33333333	10,08	9,972	0,011664	1,9881	1,695204	0,0144	
1	-0,33333333	10,08	9,972	0,011664	1,9881	1,695204	0,0144	
			SOMA	5,92632	138,7692	132,843	4,6656	

Os resultados do ajuste obtido pelo modelo em relação aos valores experimentais é apresentado na Tabela D5.

Tabela D5 Resultados do ajuste do modelo obtido pelo método de quadrados mínimos

ANOVA				
Fonte de Variação	SQ	g.l.	MQ	
Regressão	132,84	4	33,21	
Resíduos	5,93	31	0,19	
Falta de Ajuste	1,26	7	0,18	
Erro Puro	4,67	24	0,19	
Total	138,77	35		
% de variação explicada ($R^2 \times 100$) =		95,7	%	
% de variação explicável =		96,6	%	

8.4.2 D Cálculos realizados do modelo para determinação de k_{TLA} com passo de ar através da interfase gás-líquido

Tabela D6 Codificação variáveis de operação: Frequência de rotação e vazão de ar

$V_{\text{médio}}$	90	$Q_{\text{médio}}$	1,25
$\text{ampl}_{\text{média}}$	30	$\text{ampl}_{\text{média}}$	0,75

Os coeficientes do modelo foram obtidos pela aplicação de Excel 2013 chamada Solver, os resultados são apresentados na Tabela D7.

Tabela D7 Coeficientes do modelo obtidos pela aplicação solver de Excel 2013

b0	6,96359
b1	0,69193
b2	1,911259

Os graus de liberdade usados para otimização do modelo são apresentados na Tabela D8.

Tabela D8 Grãos de liberdade do sistema analisado

\bar{y}	6,70
n =	35
p =	3
m =	12

Os cálculos realizados para a codificação das variáveis, os valores obtidos em triplicata experimentalmente e os obtidos pelo modelo através do método dos quadrados mínimos é apresentado na Tabela D9.

Tabela D9 Resultados de k_L coletados experimentalmente e a partir da otimização dada com ajuste do modelo obtido pelo método de quadrados mínimos

Modelo linear dado pelo Statistica							
codificação				SQ _r	SQ _T	SQ _R	SQ _{ep}
v(rpm)	Q(vvm)	y _i	ŷ _i	desv	(y _i - \bar{y}) ²	(ŷ _i - \bar{y}) ²	(y _i -y _{i,m}) ²
-1	-1	5,04	4,360401	0,461855	2,746122	5,460362507	0,1296
1	-1	5,4	5,744261	0,118516	1,68258	0,907983834	7,889E-31
-1	1	6,84	8,182919	1,803431	0,020408	2,207530747	0,9216
1	1	9,36	9,566779	0,042758	7,090808	8,234811592	0,0641778
-1	-1	4,32	4,360401	0,001632	5,650808	5,460362507	0,1296
1	-1	5,04	5,744261	0,495984	2,746122	0,907983834	0,1296
-1	1	8,64	8,182919	0,208923	3,774694	2,207530747	0,7056
1	1	9,72	9,566779	0,023477	9,137665	8,234811592	0,0113778
-1	-1	4,68	4,360401	0,102144	4,068865	5,460362507	0
1	-1	5,76	5,744261	0,000248	0,878237	0,907983834	0,1296
-1	1	7,92	8,182919	0,069126	1,49538	2,207530747	0,0144
1	1	9,76	9,566779	0,037334	9,381094	8,234811592	0,0215111
-0,333333	-1	5,04	4,821688	0,04766	2,746122	3,517332171	0
0,333333	-1	5,04	5,282974	0,059037	2,746122	1,999872614	0,0144
-0,333333	1	9	8,644206	0,12659	5,303151	3,791053584	0
0,333333	1	9,36	9,105492	0,064774	7,090808	5,800147199	0,0144
-0,333333	-1	5,04	4,821688	0,04766	2,746122	3,517332171	0
0,333333	-1	5,76	5,282974	0,227553	0,878237	1,999872614	0,36
-0,333333	1	9	8,644206	0,12659	5,303151	3,791053584	0
0,333333	1	9	9,105492	0,011129	5,303151	5,800147199	0,0576
-0,333333	-1	5,04	4,821688	0,04766	2,746122	3,517332171	0
0,333333	-1	4,68	5,282974	0,363578	4,068865	1,999872614	0,2304
0,333333	1	9,36	9,105492	0,064774	7,090808	5,800147199	0,0144
-1	-0,333333	5,76	5,634574	0,015732	0,878237	1,129053285	0,2304
-1	-0,333333	4,32	5,634574	1,728104	5,650808	1,129053285	0,9216
-1	-0,333333	5,76	5,634574	0,015732	0,878237	1,129053285	0,2304
-0,333333	-0,333333	6,84	6,09586	0,553744	0,020408	0,361540673	0,36
-0,333333	-0,333333	6,12	6,09586	0,000583	0,333094	0,361540673	0,0144
-0,333333	-0,333333	5,76	6,09586	0,112802	0,878237	0,361540673	0,2304
0,333333	-0,333333	6,48	6,557147	0,005952	0,047151	0,01959884	0,0144
0,333333	-0,333333	6,48	6,557147	0,005952	0,047151	0,01959884	0,0144
0,333333	-0,333333	6,84	6,557147	0,080006	0,020408	0,01959884	0,0576
1	-0,333333	6,84	7,018434	0,031839	0,020408	0,103227784	0,0576
1	-0,333333		7,018434	0,031839	0,020408	0,103227784	0,0576
1	-0,333333	7,56	7,018434	0,293294	0,744522	0,103227784	0,2304
	\bar{y}	6,70	SOMA	7,428	104,2	96,8065	5,3675

Os resultados do ajuste obtido pelo modelo em relação aos valores experimentais é apresentado na Tabela D10.

Tabela D10 Resultados do ajuste do modelo obtido pelo método de quadrados mínimos

ANOVA				
Fonte de Variação	SQ	g.l.	MQ	
Regressão	96,81	2	48,40	
Resíduos	7,43	32	0,23	
Falta de Ajuste	2,06	9	0,23	
Erro Puro	5,37	23	0,23	
Total	104,23	34		
% de variação explicada ($R^2 \times 100$) =				
		92,9	%	
% de variação explicável =				
		94,9	%	

8.4 E Metodologia para calcular quantidade de células com fator de correção

Para determinar o número de células com o fator de correção, ou seja levando em consideração as retidas de amostra diárias realizadas e determinar a quantidade células que deveria ter em um tempo específico no biorreator, foi determinada a velocidade de crescimento teórica utilizando a Equações A1 e a partir da deste valor é calculada o valor da variável y , isto é o número de células real para cada tempo, obtido com a Equação A2.

$$\mu = \left(\frac{x_{i+(n+1)} - x_{i+n*}}{x_{i+(n+1)} + x_{i+n*}} \right) * \frac{1}{12} \quad n = 1, 2, 3 \dots n \text{ (A1)}$$

Sendo, $x_{i+(n+1)}$ o número de células antes da troca de meio e $x_{i+(n+1)*}$ o número de células depois da troca.

$$y_n = \frac{(1+12*\mu)*x_{i+(n+1)}}{1-12*\mu} \quad n = 1, 2, 3 \dots n \text{ (A2)}$$

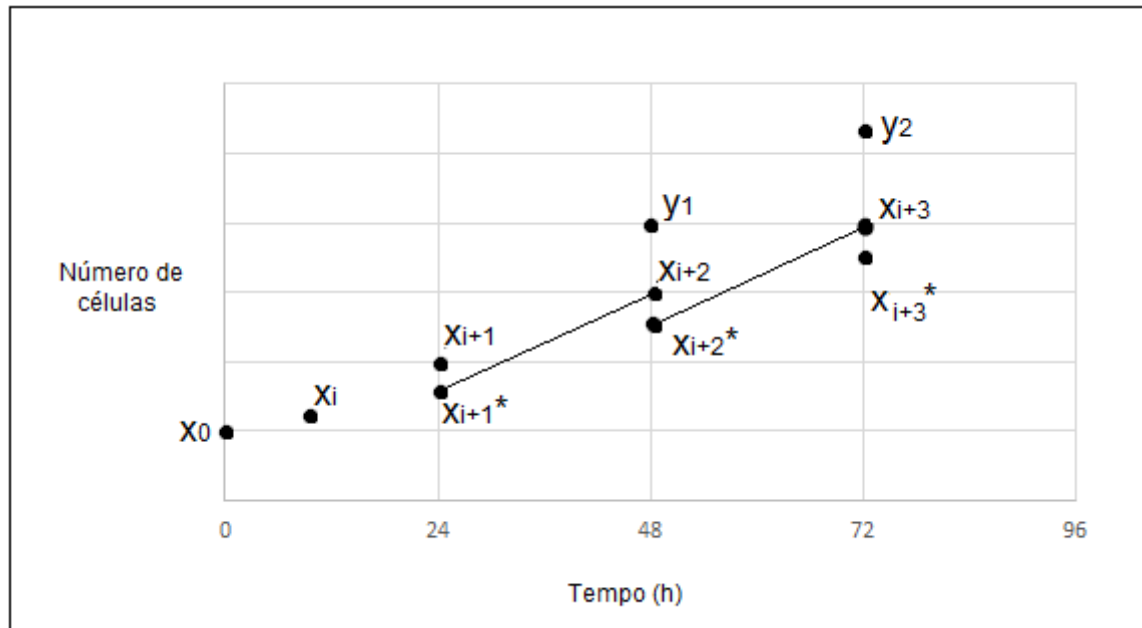


Figura D Metodologia empregada para determinar número de células teórico com o tempo.