

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

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE INOCULAÇÃO COM  
MICROCARREGADOR CYTOLINE 1 VISANDO O CULTIVO DE  
CÉLULA CHO-K1 EM BIORREATOR DE LEITO FIXO**

**Marcelo Vargas Querino**

São Carlos – SP

2004

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

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE INOCULAÇÃO COM  
MICROCARREGADOR CYTOLINE 1 VISANDO O CULTIVO DE  
CÉLULA CHO-K1 EM BIORREATOR DE LEITO FIXO**

**Marcelo Vargas Querino**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo

São Carlos – SP

2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

Q4dp

Querino, Marcelo Vargas.

Desenvolvimento de processo de inoculação com microcarregador Cytoline 1 visando o cultivo de célula CHO-K1 em biorreator de leito fixo / Marcelo Vargas Querino. -- São Carlos : UFSCar, 2008.  
107 f.

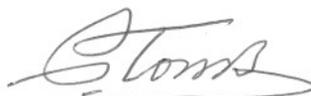
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Célula CHO - K1. 2. Microcarregadores. 3. Célula animal. 4. Biorreatores. I. Título.

CDD: 660.63 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **MARCELO VARGAS QUERINO**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 20 DE AGOSTO DE 2004.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo  
**Orientador, PPG-EQ/UFSCar**



Profª Drª Teresa Cristina Zangirolami  
**PPG-EQ/UFSCar**



Profª Drª Ângela Maria Moraes  
**FEQ/UNICAMP**

## **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos as pessoas com que tive contato durante o mestrado cada um de vós ajudou-me a perseverar diante das dificuldades que surgiram. À minha família, minha base, por estar mesmo de longe contribuindo para a realização deste trabalho. Por fim ao CNPq, processo 133000/02-8, pelo auxílio financeiro.

...quero não o que está feito mas o que tortuosamente ainda se faz.  
(Clarice Lispector)

Nada estará perdido enquanto estivermos em busca.  
(Santo Agostinho)

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	viii
<b>NOMENCLATURA</b> .....	ix
<b>CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 2 OBJETIVO</b> .....	6
<b>CAPÍTULO 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	7
<b>3.1 Célula animal CHO</b> .....	7
<b>3.2 Microcarregadores no cultivo de célula animal</b> .....	10
3.2.1 Vantagens e desvantagens na utilização de microcarregadores.....	10
3.2.2 Requisitos de um bom microcarregador.....	11
3.2.3 Microcarregadores disponíveis comercialmente.....	14
3.2.4 O microcarregador Cytoline 1.....	16
<b>3.3 Biorreatores</b> .....	18
3.3.1 Biorreator Cytopilot.....	19
<b>3.4 Cultivo de célula animal CHO em microcarregador Cytoline 1</b> .....	21
<b>3.5 Avaliação da revisão bibliográfica</b> .....	34
<b>CAPÍTULO 4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
<b>4.1 Materiais</b> .....	36
4.1.1 Células animais utilizadas neste trabalho.....	36

4.1.2 Meio de cultura	37
4.1.3 Outras reagentes	38
4.1.4 Preservação das células	39
4.1.5 Manipulação das células	40
4.1.6 Cultivo celular em frasco T	40
4.1.7 Cultivo celular em frasco spinner	41
<b>4.2 Métodos analíticos</b>	<b>44</b>
4.2.1 Determinação do número de células em suspensão	44
4.2.2 Determinação da viabilidade celular	44
4.2.3 Determinação da concentração de células aderidas	45
4.2.4 Determinação da concentração de glicose consumida	46
4.2.5 Caracterização do microcarregador Cytoline 1	46
<b>4.3 Métodos de análise dos resultados</b>	<b>47</b>
4.3.1 Análise dos resultados	48
<b>CAPÍTULO 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>49</b>
<b>5.1 Plano inicial de trabalho</b>	<b>49</b>
5.1.1 Sobre o projeto e a construção do biorreator de leito fixo	49
5.1.2 Sobre o projeto e a construção do reservatório de meio	51
5.1.3 Adaptações e montagem de equipamento	51
5.1.3.1 Escoamento do meio de cultura	52
5.1.3.2 Circulação de meio de cultura e fornecimento de ar	53
5.1.3.3 Monitoração e controle do pH	53
5.1.4 Equipamento completo para o cultivo de célula animal CHO-K1	54
5.1.5 Testes preliminares e dificuldades encontradas	55

<b>5.2 Desempenho do microcarregador Cytoline 1 em frasco spinner</b>	58
5.2.1 Resultados e análise do primeiro experimento	59
5.2.2 Resultados e análise do segundo experimento	62
5.2.3 Resultados e análise do terceiro experimento	64
5.2.4 Resultados e análise do quarto experimento	66
5.2.5 Resultados e análise do quinto experimento	71
5.2.6 Resultados e análise do sexto experimento	77
5.2.7 Resultados e análise do sétimo experimento	82
<b>5.3 Comparação do desempenho do microcarregador Cytoline 1 nos experimentos com célula CHOZMD e considerações gerais</b>	86
<b>5.4 Recomendações a serem seguidas no preparo do inóculo em spinner</b>	93
<b>CAPÍTULO 6 CONCLUSÕES</b>	94
<b>CAPÍTULO 7 SUGESTÕES</b>	96
<b>CAPÍTULO 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	97
<b>APÊNDICE</b>	100

## RESUMO

O uso da tecnologia de cultivo de célula animal para a expressão de proteínas recombinantes vem ganhando interesse crescente dentro da biotecnologia em função da obtenção de novos medicamentos eficientes no tratamento de doenças crônicas. Neste trabalho foi utilizada a linhagem recombinante CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*), denominada CHOZMD, dependente de ancoramento. Capaz de expressar uma desintegrina com propriedades antimetastáticas. Conhecendo os precedentes de bom desempenho do biorreator de leito fixo com utilização de microcarregadores no cultivo de células animais em larga escala fixou-se como objetivo deste trabalho a definição de um método para preparo de inóculo para esse biorreator utilizando o microcarregador macroporoso comercial Cytoline 1 em frasco spinner. Os cultivos realizados em frasco spinner de 500 mL com microcarregadores Cytoline 1 em meio DMEM em pH variando entre 7,0 e 7,4 mostraram que a baixa compatibilidade entre a célula e a matriz do microcarregador composta de polietileno e sílica foi responsável pela baixa adesão celular. Em função disso foi necessário utilizar um inóculo com alta concentração celular e um melhor controle do pH do meio para alcançar resultados satisfatórios nos cultivos. Seguindo essa estratégia foi possível conseguir velocidades específicas máximas de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para a célula CHOZMD de  $0,24\text{d}^{-1}$  enquanto que para a célula CHO-K1 selvagem obteve-se  $0,36\text{d}^{-1}$ , ambas comparáveis as de outros trabalhos encontrados na literatura. O melhor valor obtido de produtividade celular com célula recombinante foi de  $6.096$  células/mL·h e para a célula selvagem foi de  $10.569$  células/mL·h. As maiores concentrações de células aderidas aos microcarregadores foram obtidas nos experimentos que utilizaram inóculos concentrados, no caso da célula recombinante obteve-se  $1,39 \cdot 10^6$  células/mL e no caso com célula selvagem  $1,65 \cdot 10^6$  células/mL. Para o preparo de um inóculo adequado para um biorreator de leito fixo quando preparado no spinner com microcarregador Cytoline 1 recomenda-se a adoção de um inóculo em torno de  $2,0 \cdot 10^6$  células/mL na fase exponencial de crescimento e controle rigoroso do pH do meio em 7,3.

## ABSTRACT

The use of the technology of animal cell culture for the expression of recombinant proteins has been gaining major interest within biotechnology due the obtation of recent efficient medicaments in the chronic diseases. In this work was utilized the recombinant lineage CHO-K1, denominate CHOZMD, anchorage-dependent. It is capable of expressing a disintegrin with antimetastics properties. Knowing the precedent of well performance of fixed bed bioreactors with utilization of microcarriers in large scale animals cells cultures. It was fixed as purpose of this work the definition of a method to prepare of inoculum to this bioreactor utilizing Cytoline 1 commercial macroporous microcarrier in spinner flask. The cultures realized in spinner flasks of 500 mL with Cytoline 1 microcarriers with DMEM medium in range of pH in 7.0 to 7.4. It showed that the electrostatic incompatibility between the cell and the microcarrier matrix composed of polyethylene and silica was responsible by decreased adhesion cell and, consequently, by intense cell death for firsts hours of experiments. In function this was necessary to utilize an inoculum with high cell concentration and a better pH medium control to reach satisfactory results in the culture. Following this strategy was possible to achieve highest maximum specific growth cell rate ( $\mu_{\text{máx}}$ ) for the CHOZMD cell of  $0.24\text{d}^{-1}$  while for wild CHO-K1 cell was obtained  $0.36\text{d}^{-1}$ , both comparable with other works encounter in the literature. The best value obtained of cell productivity with recombinant cell was of  $6,096\text{ cel/mL}\cdot\text{h}$  and for wild cell was of  $10,596\text{ cel/mL}\cdot\text{h}$ . The lager concentrations of adherents cells on microcarriers were obtained in this experiments that utilized concentrated inoculums, in the case of recombinant cell was obtained  $1.39\cdot 10^6\text{ cel/mL}$  and in the case with wild cell of  $1.65\cdot 10^6\text{ cel/mL}$ . For the preparation of an inoculum for a fixed bed bioreactor when prepared in spinner with Cytoline 1 microcarrier recommend: adoption of an inoculum approximate of  $2.0\cdot 10^6\text{ cel/mL}$  in exponential growth phase and with rigorous control of pH medium in 7.3.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1	Micrografia das células CHO ( <i>Chinese hamster ovary</i> ) confluentes. Extraído de Atkinson e Mavituna (1991). .....	8
Figura 3.2	Fotos do microcarregador Cytoline 1 sem células (A) e com células CHO (B). Fonte: Pharmacia Biotech. ....	18
Figura 3.3	Foto e representação esquemática do biorreator Cytopilot Mini utilizado para o cultivo de células animais ancorantes em escala laboratorial, da empresa GE Healthcare Co. ....	20
Figura 3.4	Crescimento da célula recombinante CHO-K1 no biorreator Cytopilot contendo microcarregadores Cytoline 1. Adaptado de Goldman (1998). .....	22
Figura 3.5	Evolução do crescimento celular da célula CHO em biorreator Cytopilot contendo microcarregador Cytoline 1 e em biorreator de tanque agitado contendo microcarregador Cytodex 1. Adaptado de Kong et al. (1999). ....	23
Figura 3.6	Resultados do cultivo no biorreator Cytopilot com leito fluidizado de microcarregador Cytoline 1, apresentando o crescimento celular e o consumo de glicose das células CHO. Adptado de Wang et al., 2002. ....	26
Figura 3.7	Crescimento da célula CHO cultivada em Cytopilot, após remoção de 150 mL de microcarregadores colonizados por célula e substituição por igual quantidade de microcarregadores não colonizados. (A) Fase de crescimento logaritmo do começo do bioprocesso; (B) Fase de crescimento logaritmo após a adição de microcarredagores frescos; e (C) Fase estável do bioprocesso. Adaptado de Dürschmid <i>et al.</i> (2003). ....	29
Figura 3.8	Aumento das células CHO em Cytopilot após a adição de 300 mL de microcarregadores Cytoline 1 não colonizados. (A) Fase de crescimento logaritmo do começo do bioprocesso; (B) Fase de crescimento logaritmo após a adição de microcarredagores frescos; e (C) Fase estável do bioprocesso. Adaptado de Dürschmid <i>et al.</i> (2003). ....	30
Figura 3.9	Produção de lactato, consumo de glicose e crescimento celular do cultivo das células CHO-K1 em biorreator de leito fluidizado Cytopilot contendo microcarregadores Cytoline 1	

	realizado pela empresa GE Healthcare Co. ....	31
Figura 3.10	Resultados dos experimentos em frasco spinner contendo células CHO recombinante. Os microcarregadores porosos estão em destaque. Adaptado de Kong <i>et al.</i> (1999). ....	32
Figura 3.11	Resultados dos cultivos da célula CHOZMD em frasco spinner com diferentes microcarregadores, por Swiech (2003). ....	34
Figura 4.1	Procedimento para a utilização do microcarregador Cytoline 1 para cultivos de célula animal em frasco spinner. ....	43
Figura 4.2	Representação esquemática do procedimento de preparo de inóculo em frasco spinner com utilização de células CHOZMD e CHO-K1. ....	44
Figura 5.1	Foto do biorreator de leito fixo contendo microcarregadores Cytoline 1 e, em detalhe, estrangulamento do tubo de vidro para fixação da tela de aço inox. ....	51
Figura 5.2	Vistas isométricas do reservatório de meio de cultura adaptado para ser utilizado junto com o biorreator de leito fixo de vidro. ....	52
Figura 5.3	Biorreator de leito fixo e reservatório de meio de cultura em operação. ....	54
Figura 5.4	Montagem experimental do leito fixo e aparelhagem complementar para realização dos experimentos de cultivo com a célula CHOZMD. ....	55
Figura 5.5	Fluxograma da montagem experimental para o cultivo de célula animal CHOZMD em biorreator de leito fixo com microcarregador Cytoline 1. ....	56
Figura 5.6	Resultados do experimento 1 no cultivo da célula CHOZMD utilizando microcarregador Cytoline 1 (20,67 g/L) em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM. Experimento realizado a 60 rpm, NaHCO <sub>3</sub> 3,7 g/L e 10 % CO <sub>2</sub> . D indica a diluição de 1:3 realizada na fase de adesão, enquanto que T1 e T2 as trocas de meio de cultura. ....	60
Figura 5.7	Determinação da taxa específica de adesão (k <sub>A</sub> ) do experimento 1. A reta pontilhada foi obtida através de regressão linear. ....	61

Figura 5.8	Resultados do experimento 2 no cultivo da célula CHOZMD utilizando microcarregador Cytoline 1 (20,67 g/L) em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM. Experimento realizado a 60 rpm, NaHCO <sub>3</sub> 3,7 g/L e 14 % CO <sub>2</sub> . D indica a diluição de 1:3 realizada na fase de adesão. ....	63
Figura 5.9	Resultados do experimento 3 no cultivo da célula CHOZMD utilizando microcarregador Cytoline 1 (20,67 g/L) em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM. Experimento realizado a 60 rpm, NaHCO <sub>3</sub> 1,850 g/L e 12% CO <sub>2</sub> . D indica a diluição de 1:3 realizada na fase de adesão. ....	65
Figura 5.10	Resultados do experimento 4 no cultivo da célula CHOZMD utilizando microcarregador Cytoline 1 (20,67 g/L) em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM. Experimento realizado a 60 rpm, NaHCO <sub>3</sub> 0,925 g/L e 10 % CO <sub>2</sub> . D indica a diluição de 1:3 realizada na fase de adesão. T1 a T7 representam as trocas de meio. A partir de 96 horas as trocas de meio foram realizadas contendo 1,85 g/L de NaHCO <sub>3</sub> . ....	67
Figura 5.11	Determinação da taxa específica máxima de crescimento celular do experimento 4. A reta pontilhada foi obtida através de regressão linear utilizando somente os pontos negros. ....	69
Figura 5.12	Relação células por microcarregador ou células por partícula obtida durante o experimento 4. ....	70
Figura 5.13	Resultados do experimento 5 no cultivo da célula CHOZMD utilizando microcarregador Cytoline 1 (20,67 g/L) em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM. Experimento realizado a 40 rpm, NaHCO <sub>3</sub> 0,925 g/L, 5 % CO <sub>2</sub> e inóculo de 15,3·10 <sup>6</sup> células/mL. D indica a diluição de 1:3 realizada na fase de adesão. As setas das cores vermelhas, rosas, e pretas representam os instantes de troca de meio contendo NaHCO <sub>3</sub> em diferentes concentrações, 0,925 g/L, 1,85 g/L e 3,7 g/L, respectivamente. As setas azuis consistiam de trocas 1:1 de 1,85 g/L e 3,7 g/L. A partir do tempo de 252 horas o volume foi reduzido para 200 mL. ....	72
Figura 5.14	Determinação da taxa específica máxima de crescimento celular do experimento 5. A reta pontilhada foi obtida através de regressão linear utilizando somente os pontos negros. ....	74

Figura 5.15	Relação células por microcarregador ( $R_{c/m}$ ) ou células por partícula obtida durante o experimento 5. ....	76
Figura 5.16	Concentração das células aderidas por mL de microcarregador obtida durante o experimento 5. ....	76
Figura 5.17	Resultados do experimento 6 no cultivo da célula selvagem CHO-K1 utilizando microcarregador Cytoline 1 (20,67 g/L) em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM. Experimento realizado a 40 rpm (0–272 h), a 60 rpm (272–360h), $\text{NaHCO}_3$ 0,925 g/L, 5 % $\text{CO}_2$ e inóculo de $2,84 \cdot 10^6$ células/mL. D indica a diluição de 1:3 realizada na fase adesão. As setas das cores vermelhas, rosas e pretas representam os instantes de troca de meio contendo $\text{NaHCO}_3$ em diferentes concentrações, 0,925 g/L, 1,85 g/L e 3,7 g/L, respectivamente. A partir do tempo de 312 horas o volume foi reduzido para 200 mL. ....	78
Figura 5.18	Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular do experimento 6. A reta pontilhada foi obtida através da regressão linear utilizando somente os pontos negros. ....	80
Figura 5.19	Relação célula por microcarregador ( $R_{c/m}$ ) ou célula por partícula obtida durante o experimento 6. ....	81
Figura 5.20	Concentração das células aderidas por mL de microcarregador durante o experimento 6. ....	81
Figura 5.21	Resultados do experimento 7 no cultivo da célula selvagem CHO-K1 utilizando microcarregador Cytoline 1 (20,67 g/L) em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM. Experimento realizado a 40 rpm (0–144 h), a 60 rpm (144–300h), $\text{NaHCO}_3$ 0,925 g/L, 5 % $\text{CO}_2$ e inóculo de $7,0 \cdot 10^5$ células/mL. D indica a diluição de 1:3 realizada na fase adesão. As setas das cores vermelhas, rosas e pretas representam os instantes de troca de meio contendo $\text{NaHCO}_3$ em diferentes concentrações, 0,925 g/L, 1,85 g/L e 3,7 g/L, respectivamente. ....	83
Figura 5.22	Determinação da velocidade específica de crescimento celular do experimento 7. A reta pontilhada foi obtida através da regressão linear utilizando somente os pontos negros. ....	84
Figura 5.23	Relação célula por microcarregador ( $R_{c/m}$ ) ou célula por partícula obtida durante o experimento 7. ....	84

Figura 5.24	Concentração de células aderidas por mL de microcarregador durante o experimento 7. ....	85
Figura 5.25	Imagem ampliada em 100 vezes das células CHO-K1 aderidas à parede interna do frasco spinner adquirida ao término do experimento 7. As células coradas em azul representam células não viáveis e as demais são células viáveis. ....	86
Figura 5.26	Desempenho do crescimento das células aderidas aos microcarregadores realizado nos 7 experimentos em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM. ....	87
Figura 5.27	Desempenho do consumo de glicose ao longo dos 7 experimentos realizados em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura. ....	89
Figura 5.28	Desempenho da relação células por partícula dos 7 experimentos realizados em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura. ....	90
Figura 5.29	Superfície porosa do microcarregador Cytoline 1 com um aumento de 100 vezes. ....	91
Figura 5.30	Superfície relativa ao retângulo vermelho da Figura 5.29. ....	92

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1	Principais produtos no cultivo de células CHO, adaptado de Yang e Butler (2000). .....	9
Tabela 3.2	Exemplos de microcarregadores não porosos comerciais disponíveis para o cultivo de células animais (Doyle & Griffiths, 1998). .....	15
Tabela 3.3	Exemplos de microcarregadores porosos disponíveis comercialmente para o cultivo de células animais (Doyle & Griffiths, 1998). .....	15
Tabela 3.4	Especificações do microcarregador Cytoline 1 de acordo com o fabricante (Pharmacia Biotec). .....	17
Tabela 3.5	Comparação do crescimento celular e produção de EPO em diversos sistemas de cultura de célula CHO. Adaptado de Wang <i>et al.</i> (2002). .....	26
Tabela 3.6	Velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) nos bioprocessos A (Figura 3.8 A e B) e B (Figura 3.9 A e B) em diferentes fases de crescimento da cultura. Adaptado de Dürschmid <i>et al.</i> (2003). .....	30
Tabela 3.7	Parâmetros cinéticos e produtividade obtidos no cultivo de célula recombinante CHO-K1. Adaptado de Swiech (2003). ..	34
Tabela 4.1	Composição do meio DMEM utilizado no cultivo de célula CHOZMD (Cultilab). .....	38
Tabela 4.2	Composição da solução de PBS utilizada na hidratação do microcarregador. .....	39
Tabela 4.3	Composição da solução de tripsina utilizada nas etapas de desadesão da célula CHO. .....	39
Tabela 5.1	Comparação dos valores de $\mu_{\text{máx}}$ do experimento 5 com os valores encontrados na literatura para cultivos realizados com Cytoline 1. .....	75
Tabela 5.2	Comparação das principais características dos experimentos realizados. ....	87
Tabela 5.3	Comparação de alguns parâmetros de cultivo importantes dos 7 experimentos realizados. ....	90

## NOMENCLATURA

BHK	Baby hamster kidney (célula de rim de master jovem)
BioFlo	Biorreator com agitação magnética
CHO-K1	Chinese hamster ovary (célula de ovário de hamster chinês)
CHOZMD	Células CHO-K1 contendo DNA característico da desintegrina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Médium (meio de cultura)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FMD	Food and mouth disease (vírus da febre aftosa)
Ham's F12	Meio de cultura
huATP	Antitrombina III humana
huEPO	Eritropoietina humana
HFSH	Hormônio estimulante do folículo humano
huIFN- $\gamma$	$\gamma$ -interfeon humana
huIL-2	Interleucina-2 humana
huIL-6	Interleucina-6 humana
huTK	Calicreína tecidual humana
Micro	Microcarregador Cytoline 1
PBS	Phosphate buffer solution (solução tampão de fosfato)
SFB	Soro fetal bovino
tPA	Ativador de plasminogênio tissular

Nomenclatura e unidades		
Símbolo	Definição	Unidades
$C_{GLI}$	Concentração de glicose	[g/L]
$P_{m\acute{a}x}$	Produtividade máxima de células	[cel/mL·h]
$R_{c/m}$	Relação células por microcarregador	[cel/partícula]
T	Tempo	[h]
VIA	Viabilidade celular das células em suspensão	[%]
$X_{AD}$	Erro padrão da concentração de células aderidas	[cel/mL]
$X_{ADE}$	Concentração de células aderidas	[cel/mL]
$X_{ADEm}$	Concentração de células aderidas	[cel/ mL de micro]
$X_{SU}$	Erro padrão da concentração celular na suspensão	[cel/mL]
$X_{SUS}$	Concentração celular na suspensão	[cel/mL]
$X_{SUS0}$	Concentração inicial celular na suspensão	[cel/mL]
Símbolo grego		
$\mu_{m\acute{a}x}$	Taxa específica máxima de crescimento celular	[1/h]

## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

### 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 20 anos, a cultura de células animais tem passado de uma mera ferramenta utilizada em alguns campos de pesquisa especializada para uma das áreas mais pujantes da indústria biotecnológica, considerada atualmente a de maior crescimento mundial (Doyle e Griffiths, 1998).

Destaca-se nesse cenário o uso de células animais na produção de vários produtos como anticorpos, enzimas, hormônios e proteínas. Dentre essa ampla gama de produtos, um fato relevante é que a produção de muitas proteínas recombinantes só é possível por células animais. As células animais as produzem e as fazem passar por uma série de modificações pós-traducionais, antes de a proteína ser secretada, em geral extracelularmente, conferindo-lhe a estrutura molecular apropriada para garantir uma adequada atividade biológica. Isto não ocorre quando se utilizam células microbianas por estas apresentarem capacidade biossintética mais simplificada (Cartwright, 1994).

Mais de 200 anticorpos monoclonais e mais de 20 proteínas recombinantes estão disponíveis no mercado. A demanda e o preço destes produtos é variável, com produção em torno de  $10^{-1}$  a  $10^3$  Kg/ano e valor de mercado entre  $10^4$  a  $10^9$  UUS\$/Kg, respectivamente (Kretzmer, 2002). O faturamento do parque nacional de biotecnologia, incipiente, oscilou no ano de 2000 entre os valores de R\$ 5,4 bilhões a R\$ 9 bilhões, contribuindo ao produto interno bruto brasileiro na ordem

de 0,38 % a 0,65 % (Mascarenhas, 2001). O incremento do desenvolvimento da Biotecnologia no país é essencial para melhorar a qualidade de vida de seus habitantes. Para tanto, é de primordial importância que as instituições de ensino e pesquisa Brasileiras estimulem e priorizem nessa área a realização de pesquisas aplicadas e a formação de recursos humanos capacitados.

Com essa preocupação foi criado no Departamento de Engenharia Química da UFSCar o Laboratório de Tecnologia de Cultivo Celular do grupo de pesquisa de Engenharia Bioquímica, aonde vem se desenvolvendo como um dos principais projetos de pesquisa um processo de cultivo de uma célula animal CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*) recombinante, visando o aumento de escala para produção de uma proteína recombinante com propriedade antimetastática.

O desenvolvimento da linhagem recombinante da célula animal CHO-K1 foi feito pela Prof<sup>a</sup> Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar. A linhagem CHO-K1 é atualmente a mais utilizada em processos industriais apresentando como principais características boa estabilidade, crescimento por ancoragem e expressão da proteína de maneira extracelular (Doyle & Griffiths, 1998). A proteína de interesse, que foi clonada a partir do DNA de células das glândulas veneníferas da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*, trata-se de uma desintegrina, que ao ligar-se às integrinas existentes na superfície das células impede a adesão de uma célula à matriz extracelular, tendo a promissora possibilidade de sua utilização no tratamento de pacientes com câncer devido ao potencial antimetastático constatado (Iemma, 2002).

Como uma típica célula dependente de ancoramento, a CHO-K1 necessita ancorar a uma superfície sólida para crescer, sobreviver e manter suas funções vitais, porém o ancoramento é feito em monocamadas, não resultando em grande rendimento de células, pois há nos suportes convencionais de imobilização uma baixa relação superfície/volume. Este problema é superado pelo cultivo de células utilizando a nova tecnologia de cultivo em microcarregadores, partículas geralmente porosas, que permitem que as células cresçam no interior dos poros, fornecendo um local protegido de danos mecânicos e um aumento da relação superfície/volume, contribuindo assim para a produção substancial de células e produto (Lubiniecki, 1990).

Assim, após os primeiros estudos de Swiech (2003), realizados no Laboratório de Tecnologia de Cultivo Celular do DEQ/UFSCar, onde foram testados vários microcarregadores de baixa densidade ( $\sim 1,03 \text{ g.cm}^{-3}$ ) em frasco spinner no cultivo da célula CHO-K1 recombinante, decidiu-se também avaliar o microcarregador de alta densidade ( $1,32 \text{ g.cm}^{-3}$ ) Cytoline 1, especialmente concebido para ser utilizado em biorreatores de tipo torre como o de leito fixo e o de leito fluidizado. Este microcarregador possui estrutura porosa e distingue-se dos microcarregadores estudados por Swiech (2003) por ter alta densidade e formato lenticular.

Um dos inconvenientes na operação de um processo com biorreator de leito fixo com célula ancorante é a inoculação com um número suficiente de células viáveis para se aderirem aos microcarregadores e iniciarem o processo de crescimento e biossíntese do produto até saturar a superfície disponível para ancoramento, evento que define o final do processo de cultivo. Normalmente o

biorreator de leito fixo é operado com um tanque agitado auxiliar onde acontece a oxigenação por borbulhamento do meio, assim como o controle de pH e de temperatura. Como exemplo de biorreatores de leito fixo comerciais pode-se citar, o sistema da empresa Verax Corporation, tendo um microcarregador de colágeno como matriz de adesão celular (Ray, 1990), e o biorreator Cytopilot da GE Healthcare Company, projetado para ser utilizado com o microcarregador Cytoline 1 (Goldman *et al.*, 1998; Kong *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002; Landauer *et al.*, 2002;. Dürrschmid *et al.*, 2003).

Testes feitos em nossos laboratórios com um biorreator de leito fixo revelaram a existência de intensa morte das células inoculadas que se mantinham suspensas no meio sem poder ancorar nos microcarregadores, causada pelo borbulhamento de ar durante a fase inicial do processo. Também se verificou abundante morte celular durante a preparação do inóculo em spinner pela dificuldade de adesão da célula à superfície do microcarregador Cytoline 1. Por outro lado, a revisão da literatura confirma a dificuldade encontrada na iniciação de cultivos em grande escala com o microcarregador Cytoline 1 em função da demanda de grande quantidade de células no inóculo (Goldman *et al.*, 1998; Kong *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002; Landauer *et al.*, 2002;. Dürrschmid *et al.*, 2003).

O estado do inóculo é o fator mais crítico para iniciar a cultura em microcarregador. A utilização de um inóculo com alta viabilidade e com a adequada concentração de células deve gerar uma boa adesão, um bom crescimento e, conseqüentemente, uma boa produtividade de bioproduto. Para tal, é de crucial importância que se definam estratégias apropriadas de preparação de inóculo, especialmente quando se trata de equipamentos de grande escala, que

conduzam a um melhor aproveitamento das potencialidades do biorreator de leito fixo.

## **CAPÍTULO 2 - OBJETIVO**

### **2 OBJETIVO**

O objetivo geral desta pesquisa é avaliar o desempenho do microcarregador poroso Cytoline 1 no cultivo de células CHO-K1 recombinante, em frasco spinner, visando o desenvolvimento de processo de inoculação para ser utilizado na operação de um biorreator de leito fixo.

## CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Faz-se a seguir uma análise da literatura abordando os assuntos relacionados com a tecnologia de cultivo de célula animal, especialmente no que se refere à utilização do microcarregador Cytoline 1 em biorreator de leito fixo e fluidizado.

#### 3.1 *Célula animal CHO*

A linhagem de células animais CHO (*Chinese Hamster Ovary*) pode expressar glicoproteínas humanas recombinantes, devido às modificações pós-traducionais que estas sofrem antes de serem secretadas pela célula. As modificações são processos enzimáticos como a glicosilação,  $\gamma$ -carboxilação do ácido glutâmico,  $\beta$ -hidroxilação do ácido aspártico, amidação e fosforilação (Cartwright, 1994). Por isso, há semelhança entre essas glicoproteínas expressas pela célula animal com aquelas encontradas nas células humanas. Devido a isto, há o interesse em se obter essas glicoproteínas para serem utilizadas especialmente no tratamento de várias doenças humanas. As células CHO podem ser classificadas como linhagens de células estabelecidas ou células transformadas; podem ser cultivadas indefinidamente e muitas, são de origem tumoral. Linhagens de células pertencentes a esta categoria crescem mais facilmente e são mais estáveis que células primárias e células diplóides

(Freshney, 1994). A Figura 3.1 apresenta uma micrografia da célula CHO confluyente, isto é, aderida a uma superfície (Atkinson e Mavituna, 1991).

As proteínas recombinantes podem ser produzidas por bactérias, leveduras, células de plantas ou culturas de células animais, e a escolha da linhagem são determinadas por vários fatores. Se a quantidade de proteína total a ser secretada é alta, bactérias e leveduras possuem vantagem pois crescem mais rápido e possuem níveis de expressão mais elevados. Porém, as proteínas devem sofrer modificações pós-traducionais e não devem apresentar contaminação por endotoxinas. Deste modo, os produtos da cultura celular passam a ter um apropriado tempo de meia-vida, além de uma atividade específica máxima não sendo imunogênicos. Em virtude dessas características as proteínas recombinantes produzidas por essas células podem ser utilizadas tanto para produção de vacinas de doenças humanas quanto animais.

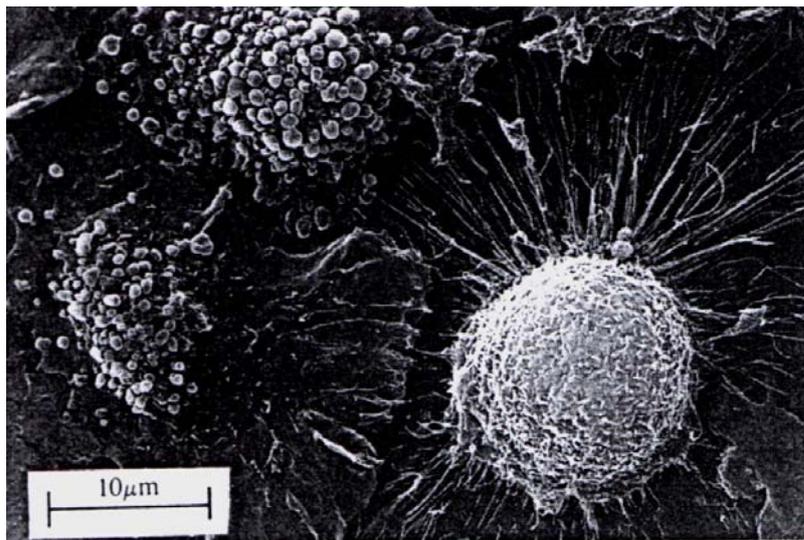


Figura 3.1 – Micrografia das células CHO (Chinese hamster ovary) confluentes. Extraído de Atkinson e Mavituna (1991).

Yang e Butler (2000) fizeram uma classificação dos principais produtos

obtidos pelo cultivo de células CHO como mostra a Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Principais produtos derivados de cultivos com células CHO e respectivas aplicações medicinais, adaptado de Yang e Butler (2000).

Proteínas recombinantes	Uso medicinal
Hormônio do folículo humano (huFSH)	Fertilização
Interleucina-2 humana (huIL-2)	Contra HIV
Ativador de plasminogênio tecidual (tPA)	Arteriosclerose
Eritropoietina humana (huEPO)	Produção de glóbulos vermelhos
Interleucina-6 humana (huIL-6)	Contra HIV
$\gamma$ -interferon humana (huIFN- $\gamma$ )	Contra tuberculose
Caliceína tecidual humana (huTK)	Contra tumor de próstata
Antitrombina III humana (huATP)	Contra câncer

Para ocorrer a adesão de uma célula animal a um suporte de acordo com Tampion e Tampion (1987) é necessário que nesta superfície estejam adsorvidos fatores de adesão, que podem estar presentes no meio de cultura quando este possui soro fetal bovino, por exemplo, ou podem ser fabricados pelas células. As células devem entrar em contato com esta superfície, verificando a compatibilidade de adesão com a superfície com carga positiva, já que de maneira geral as células animais possuem carga elétrica negativa. A ausência de parede celular possibilita que as células se espalhem por sobre a superfície, desta maneira tornam o processo de adesão mais firme. E por fim, quando diminui a disponibilidade de área para adesão ocorre a inibição do crescimento celular ocasionada pelo contato de uma célula à outra.

### **3.2 *Microcarregadores no cultivo de célula animal***

A imobilização de células animais dependentes de ancoramento na superfície de uma partícula ou no seu interior é uma exigência para a proliferação de células e produção de bioprodutos. Muitos métodos de imobilização são baseados no uso de sólidos, géis, ou partículas de biomassa como suporte. Os resultados da imobilização podem ser aplicados a uma ampla faixa de reações biológicas e fornecer bases para o desenvolvimento de processos e também de equipamentos (Atkinson & Mavituna, 1991).

Em princípio, a imobilização celular permite que partículas biológicas de qualquer tamanho, forma e densidade sejam apropriadas à produção, incorporando uma ampla variedade de células. Quando tais partículas estão em movimento, uma relativa às outras, como em um leito fluidizado, o excesso de crescimento pode ser removido por atrito. O resultado global é que é possível manter uma quantidade constante (*hold-up*) de biomassa dentro de um reator contínuo. Alternativamente, ainda em leitos, pode-se permitir a acumulação de biomassa, as partículas são removidas periodicamente juntamente com a biomassa (Atkinson & Mavituna, 1991).

#### **3.2.1 Vantagens e desvantagens na utilização de microcarregadores**

Os microcarregadores são partículas que permitem que as células dependentes de ancoramento, que necessitam de uma superfície para se proliferarem e produzirem bioprodutos (Cartwright, 1994), apresentando como vantagens da sua adesão: 1) para todos os cultivos de células, a imobilização permite uma separação mais simples dessas células com respeito ao meio. Quando

as células estão aderidas numa superfície ou mantidas no interior das partículas o meio de cultura líquido é mais facilmente removido e o desprendimento das células é reduzido. Centrifugação e/ou filtração são passos que podem ser requeridos para separar o fluido das células; 2) as células podem ser imobilizadas em regiões onde elas não estão expostas a bolhas ou a altas tensões de cisalhamento, caso contrário, as células podem ser danificadas, por exemplo, no caso de ficarem na região de descida do biorreator airlift operando como leito fixo; 3) a imobilização pode conduzir a alta produção de proteína celular, e até mesmo favorecer mudanças no metabolismo celular. Porém há algumas desvantagens na utilização de células imobilizadas: 1) células imobilizadas devem ser freqüentemente separadas, removidas e/ou desagregadas numa suspensão de células antes que possam ser utilizadas para inocular novas culturas, no caso da transferência de microcarregador para microcarregador esta desvantagem não existe; 2) no interior dos microcarregadores porosos podem surgir gradientes de substrato e oxigênio consumidos pelas células ocasionando limitação no crescimento celular.

### **3.2.2 Requisitos de um bom microcarregador**

Os microcarregadores são usados para propagação de células primárias e secundárias de linhagens celulares estabelecidas e transformadas e linhagens celulares humanas diplóides (Atkinson & Mavituna, 1991). Para isso ser possível são necessárias algumas exigências para os microcarregadores de acordo com Lubiniecki (1990):

- Carga elétrica mais baixa permite a aderência e crescimento da célula com uma adsorção mínima dos ingredientes do meio. Células dependentes de

ancoramento podem crescer nas superfícies de microcarregadores derivada de vários grupos funcionais: carregados positivamente (aminas primárias, terciárias ou quartenárias), carregadas negativamente (poliestireno ou vidro tratados para cultura de tecidos), derivadas de colágeno e outras proteínas e aminoácidos polimerizados nos carregadores. Esses grupos funcionais devem permitir uma ótima adesão da célula e crescimento sob condições de agitação. No caso de usar microcarregadores carregados positivamente ou negativamente, a menor carga do microcarregador que permite a célula aderir e crescer com um mínimo de adsorção de ingredientes do meio nos microcarregadores deve ser utilizada;

- Densidade específica entre 1,03 a 1,10 para permitir a suspensão para uma baixa agitação, a densidade do microcarregador deve ser um pouco mais alta do que a densidade do meio de cultura. Com baixa densidade os microcarregadores ficarão suspensos na superfície do líquido, enquanto que com alta densidade serão necessárias altas velocidades de agitação para manter os microcarregadores em suspensão causando desprendimento das células devido às forças de cisalhamento;
- Dimensões aproximadas entre 100 a 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro para que os microcarregadores carreguem centenas ou até milhares de células e que ainda sejam facilmente suspensos. As dimensões dos microcarregadores devem maximizar a superfície de crescimento por unidade de volume, deste modo utiliza-se uma quantidade menor de microcarregadores. Escolhendo-se o ótimo diâmetro do microcarregador é possível reduzir a quantidade de inóculo necessária para a inoculação da cultura;

- A distribuição de tamanho deve garantir a homogeneidade da cultura. A distribuição de tamanho do microcarregador deve ser tão estreita quanto possível e preferivelmente dentro da faixa de  $\pm 25 \mu\text{m}$ . Uma distribuição de tamanho desigual dos microcarregadores resulta numa distribuição do inóculo desigual com seletividade maior de células aderidas a partículas pequenas. Além disso, pode resultar em uma menor velocidade de filtração durante a lavagem do leito de microcarregadores;
- Transparência para permitir observações ao microscópio das células nos microcarregadores. Microcarregadores porosos geralmente são completamente transparentes, para que a observação de células aderidas às esferas seja alcançada com grande clareza. Com microcarregadores opacos as células podem ser vistas ao microscópio ótico apenas na superfície do microcarregador ou por aplicação de um dispositivo luminoso especial;
- Não ser tóxico para a célula e ter seu uso autorizado para a produção de compostos de uso humano;
- Não ser rígido, para reduzir a possibilidade de prejuízo as células, devido à colisão durante a agitação.
- Os microcarregadores porosos podem aumentar de tamanho em soluções aquosas, podendo encolher ou aumentar de tamanho devido a mudanças de pH. Alguns microcarregadores disponíveis comercialmente já não apresentam estas características.

Os microcarregadores podem ser feitos utilizando uma grande variedade de materiais, como vidro, sílica, dextrana e plásticos. Células crescendo na superfície dos microcarregadores provavelmente são mais suscetíveis aos

prejuízos associados às bolhas. Em particular, a formação de espuma é prejudicial, pois os microcarregadores concentram-se na camada da espuma, (Fleischaker e Sinskey, 1981) depositando-se na parede do vaso devido ao estouro das bolhas. Mesmo com antiespumante a concentração de células CHO em microcarregadores cultivados em biorreatores com injeção de ar com uma baixa velocidade superficial de gás (0,02 cm/s) foi 50% menor do que a cultura com aeração superficial, também com antiespumante (Crougham e Wang, 1991, *apud* Doyle & Griffiths, 1998). A cultura de células em microcarregadores pode ser beneficiada com o uso de agentes protetores ao cisalhamento, tais como Pluronic F-68 ou polietileno glicol (Papoutsakis, 1991), que aumentam a viscosidade do meio de cultura, sendo utilizados na concentração entre 0,1-0,2% (massa/volume).

### **3.2.3 Microcarregadores disponíveis comercialmente**

Há dois tipos de microcarregadores comercialmente disponíveis: os microcarregadores não porosos, nos quais as células crescem apenas na superfície externa das partículas, e os microcarregadores porosos nos quais as células crescem predominantemente no interior de sua estrutura porosa. Na Tabela 3.2 estão relacionados alguns tipos de microcarregadores comerciais não porosos.

Para microcarregadores não porosos, em contraste com as culturas de células em suspensão, o prejuízo para as células aderidas aos microcarregadores ocorre para uma baixa agitação, pois as bolhas podem rompê-las. Assim, a intensidade máxima de agitação é muito menor para culturas em microcarregadores do que para culturas em suspensão. Como um ponto inicial, a taxa de agitação que apenas mantém os microcarregadores em suspensão deveria ser escolhida (Doyle & Griffiths, 1998), quando a agitação provoca excessivo

cisalhamento, as células devem desaderir-se da superfície dos microcarregadores. Isto é um problema crítico, especialmente quando células nos microcarregadores são usadas para a expressão de proteínas recombinantes em alguns tipos de meio livre de soro que não permite um bom crescimento celular.

Tabela 3.2: Exemplos de microcarregadores não porosos comerciais disponíveis para o cultivo de células animais (Doyle & Griffiths, 1998).

Nome Comercial	Fabricante	Matriz	Área superficial ( cm <sup>2</sup> /g )	Densidade específica
Biosilon	Nunc	Poliestireno	255	1,05
Cytodex 1; 2	GE Healthcare Co.	Dextrana	4400; 3300	1,03; 1,04
Cytodex 3	GE Healthcare Co.	Colágeno	2700	1,04
Microdex	Dextran Products	Dextrana	250	1,03
Pronectin F	Sigma Solohill	Fibronectina	n.d.	1,02

n.d. – não disponível

Na Tabela 3.3 são apresentados alguns tipos de microcarregadores porosos utilizados comercialmente.

Tabela 3.3: Exemplos de microcarregadores porosos disponíveis comercialmente para o cultivo de células animais (Doyle & Griffiths, 1998).

Nome comercial	Fabricante	Matriz	Densidade específica
Cellsnow	Kirin Ltd	Cellulose	n.d.
Cultispher	Hyclone	Gelatina	1,04
Cytoline 1	GE Healthcare Co.	Polietileno/sílica	1,32
ImmobaSil	Ashby Scientific	Silicone	n.d.
Cytoline 2	GE Healthcare Co.	Polietileno/sílica	1,03
Siran	Schott Glasswerke	Vidro	n.d.

n.d. – não disponível

Para os microcarregadores porosos, a questão essencial é a agitação para manter uma boa suspensão das partículas e a intensidade de agitação que as mesmas suportam sem prejuízos mecânicos. As células nos poros das partículas estão bem protegidas de forças mecânicas e, obviamente, nenhuma célula será capaz de crescer na superfície externa das partículas se a agitação for muito alta. É conveniente usar a mais alta agitação possível com a finalidade de aumentar a transferência de massa de nutrientes e metabólitos para dentro e fora da estrutura porosa. A melhor estratégia é testar as partículas sem células para variar a intensidade de agitação/mistura antes de usá-las e examinar as partículas microscopicamente, para verificar a ocorrência de danos mecânicos (Doyle & Griffiths, 1998).

#### **3.2.4 O microcarregador Cytoline 1**

O microcarregador Cytoline 1, fabricado pela empresa GE Healthcare Co., está otimizado para culturas de célula CHO em leito fluidizado. Sendo macroporoso, fornece uma maior área de superfície para o crescimento celular. Este suporte possibilita a utilização de meio de cultura livre de proteína, pois no interior dos poros o contato entre as células é favorecido, fornecendo proteção às células contra cisalhamento e permitindo o prolongamento do tempo de duração do cultivo, seja este realizado em leito fluidizado ou em leito fixo.

Outras características do microcarregador são: esterilizável a 121°C e 1 bar; resistente a ácidos e bases fortes; rígido, portanto não altera seu volume após hidratação; não contém material biológico em sua composição; formato lenticular, possibilitando a difusão de oxigênio e nutrientes para o interior da estrutura; adequado para utilização em biorreatores industriais, tais como, tanque agitado,

airlift e leito fluidizado. Outras especificações, de acordo com o fabricante, são apresentadas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Especificações do microcarregador Cytoline 1 de acordo com o fabricante (GE Healthcare Co.).

Comprimento (mm)	1,7 – 2,5
Espessura (mm)	0,4 – 1,1
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,32
Tamanho de poro (μm)	1 – 400
Área superficial (m <sup>2</sup> /g)	>0,3

Contrasta-se com relação à maioria dos microcarregadores porosos disponíveis comercialmente pela alta densidade depois de hidratado, sendo de 1,32 g/cm<sup>3</sup>. Por este motivo a taxa de sedimentação do microcarregador encontra-se na faixa entre 120 a 220 cm/min, permitindo desta forma que ao operar-se um biorreator de leito fluidizado a taxa de recirculação do meio de cultura seja adequada para o fornecimento de oxigênio às células. É recomendada, pelo fabricante, antes da realização de experimentos em larga-escala, a avaliação da performance do microcarregador em pequena escala, por exemplo, em frasco shaker ou spinner.

A Figura 3.2 apresenta duas fotos do microcarregador Cytoline 1, em uma delas há células CHO aderidas ao microcarregador.

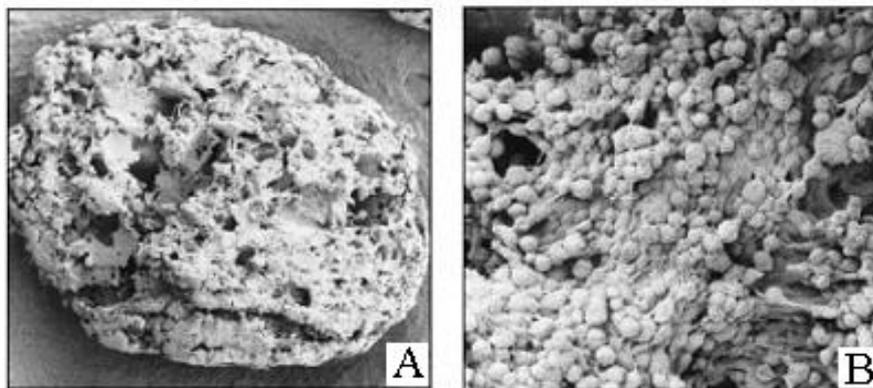


Figura 3.2 – Fotos do microcarregador Cytoline 1 sem células (A) e com células CHO (B). Fonte: GE Healthcare Co.

### 3.3 *Biorreatores*

Uma grande variedade de biorreatores mostra-se eficiente para o cultivo de células animais dependentes de ancoramento, sendo que diferentes tipos de células animais têm-se adaptado a condições particulares de cada cultivo. No caso de biorreatores tipo tanque agitado, por exemplo, foi desenvolvido um novo impelidor do tipo hélice marinha, fazendo com que as partículas em suspensão não sejam danificadas pela agitação. Outro biorreator com promissor desenvolvimento no cultivo de célula animal é o airlift. Esses biorreatores são equipamentos de contato gás-líquido que pertencem à família das colunas de bolhas, isto é, vasos geralmente cilíndricos, de elevada relação altura/diâmetro providos de agitação pneumática. São originários de uma modificação sofrida pela coluna de bolhas com a introdução de um tubo vertical central, proporcionando aumento da taxa de transferência de massa e fluxo padrão de líquido no reator (Chisti, 1989).

Destaca-se em escala laboratorial e industrial o uso de biorreatores de leito fixo. O leito fixo pode ser definido como um arranjo das partículas, por onde

escoa um fluido, neste caso o meio de cultivo. Portanto a configuração do leito consiste de uma coluna cilíndrica preenchida com partículas, tendo como vantagens de sua utilização uma boa performance e baixo custo de operação, além de um requerimento menor de energia (Bailey & Ollis, 1986). Este tipo de sistema pode ser operado de várias maneiras, em modo batelada, em modo batelada alimentada com retirada de produto e em modo contínuo. Em escala industrial há um sistema que opera da forma mencionada, conhecido como Verax, da empresa Cellex Biosciences Inc (Orr, 1988).

### **3.3.1 Biorreator Cytopilot**

Outro modo de operação para cultivar células animais é o de leito fluidizado. Destaca-se comercialmente o biorreator Cytopilot, da empresa GE Healthcare Co., projetado especialmente para o cultivo de células animais em microcarregadores Cytoline. A descrição a seguir é do modelo Cytopilot Mini utilizado em escala de laboratório, composto por duas câmaras cilíndricas, como pode ser observado através da foto do equipamento e da representação esquemática na Figura 3.3.

O modo de operação do biorreator pode ser contínuo ou em batelada. No menor modelo do biorreator pode ser utilizado até 2 litros de meio de cultura e um volume de microcarregador variando entre 100 a 500 mL. O sistema também pode ser operado como leito fixo, bastando para isso diminuir a taxa de escoamento de líquido, o que é alcançado ao diminuir o número de rotações do impelidor.

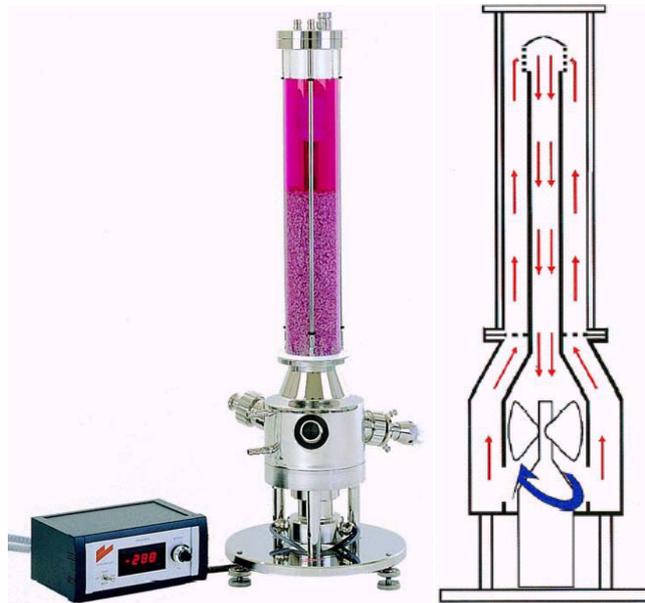


Figura 3.3 - Foto e representação esquemática do biorreator Cytopilot Mini utilizado para o cultivo de células animais ancorantes em escala laboratorial, da empresa GE Healthcare Co.

Quanto à adição de oxigênio ao sistema, esta é feita através de microaspersores que possuem poros com diâmetro na faixa de 0,3 a 0,5  $\mu\text{m}$ . O controle de temperatura é realizado na câmara inferior, através de uma manta térmica. O biorreator é composto por duas câmaras cilíndricas, sendo que a base do reator foi projetada para fornecer condições especiais de escoamento de meio. Na parte superior a tampa é equipada com diferentes tubos para distintos propósitos (troca de meio, aspersão de ar, retirada de produto). Há entre as duas câmaras um distribuidor poroso, que garante o escoamento do líquido entre as áreas abaixo e acima do leito dos microcarregadores. Um agitador magnético provoca a recirculação dos nutrientes do meio de cultura e, desta forma, a fluidização dos microcarregadores.

### 3.4 *Cultivo de célula animal CHO em microcarregador Cytoline 1*

Goldman *et al.* (1998) cultivaram células recombinantes CHO-K1 aderidas ao microcarregador Cytoline 1 em biorreator agitado em batelada e biorreator de leito fluidizado Cytopilot para produção de  $\gamma$ -interferon, ambos os biorreatores eram comerciais, das empresas InCeltech e Pharmacia Biotech (atual GE Healthcare Co.), respectivamente. Para a cultura em batelada a concentração de glicose foi de 9 mM. Trabalhou-se com um volume de meio de 12 L, enquanto o reator possuía 15 L de capacidade volumétrica. O inóculo da cultura foi de  $1,5 \cdot 10^5$  cel/mL, a temperatura mantida a 37°C e o pH em 7,2.

No biorreator de leito fluidizado trabalhou-se com um volume de cultura de 2 L, sendo 200 mL o volume do leito contendo os microcarregadores do tipo Cytoline 1, manteve-se a temperatura a 37°C e o pH a 7,2. A concentração do inóculo empregada foi de  $2,0 \cdot 10^6$  células/mL de microcarregador. Ambos os sistemas foram operados no sistema contínuo com retenção de células, denominado de perfusão. Para o biorreator de leito fluidizado foi mantida a concentração de glicose a 2mM, assumindo-se que a concentração de glicose fosse o fator limitante para o crescimento celular.

Após 400 h de cultivo alcançou-se  $3,8 \cdot 10^7$  cel/mL de microcarregador. A taxa específica de crescimento da cultura em perfusão no Cytopilot foi de  $0,010 \text{ h}^{-1}$ . No reator em batelada trabalhou-se com uma taxa de crescimento específico variando entre  $0,020$  a  $0,030 \text{ h}^{-1}$ . Após 90 h de cultivo alcançou-se a densidade celular máxima de  $0,54 \cdot 10^6$  células/mL. O biorreator em batelada forneceu  $1,0 \cdot 10^4$  IU/mL de  $\gamma$ -interferon, enquanto que o leito fluidizado resultou em  $2,0 \cdot 10^4$  IU/mL.

Ressalta-se porém que os dados iniciais do número de células aderidas ao microcarregador Cytoline 1 no biorreator Cytopilot foram os únicos dados não mostrados, como pode ser observado na Figura 3.4.

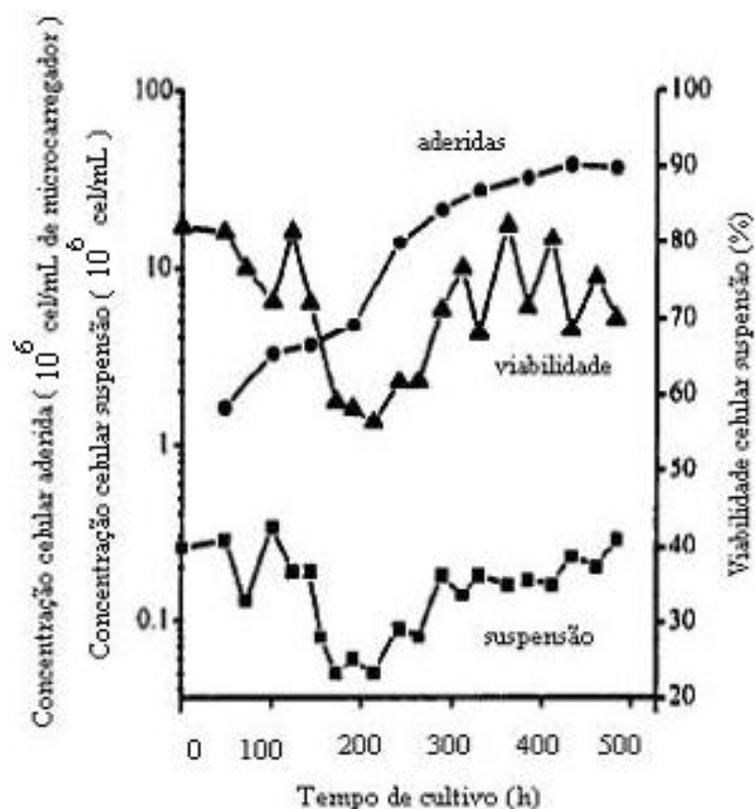


Figura 3.4 – Crescimento da célula recombinante CHO-K1 no biorreator Cytopilot contendo microcarregadores Cytoline 1. Adaptado de Goldman (1998).

Kong *et al.* (1999) compararam o crescimento e produtividade de células recombinante CHO em dois sistemas de perfusão, o biorreator de leito fluidizado Cytopilot e o biorreator de tanque agitado com retenção de célula, tendo sido utilizados dois microcarregadores, Cytoline 1 e Cytodex 1, respectivamente. O biorreator de tanque agitado possuía um volume útil de 8 litros, e a concentração de Cytodex 1 foi de 5 g/L, tendo como inóculo  $3,8 \cdot 10^5$  células/mL.

O biorreator Cytopilot foi carregado com 300 mL de microcarregador Cytoline 1, em um volume útil de 1,5 litros, assim a concentração de microcarregador utilizada foi de 86 g/L. O inóculo foi de  $0,82 \cdot 10^6$  células/mL vindos diretamente de 36 frascos T de 225 cm<sup>2</sup>. Os resultados do crescimento celular são apresentados na Figura 3.5 entretanto, a unidade de concentração celular do Cytopilot é mostrada em função do número de células aderidas por mL de microcarregador. Também neste trabalho não foram mostrados os primeiros pontos de ambos os cultivos.

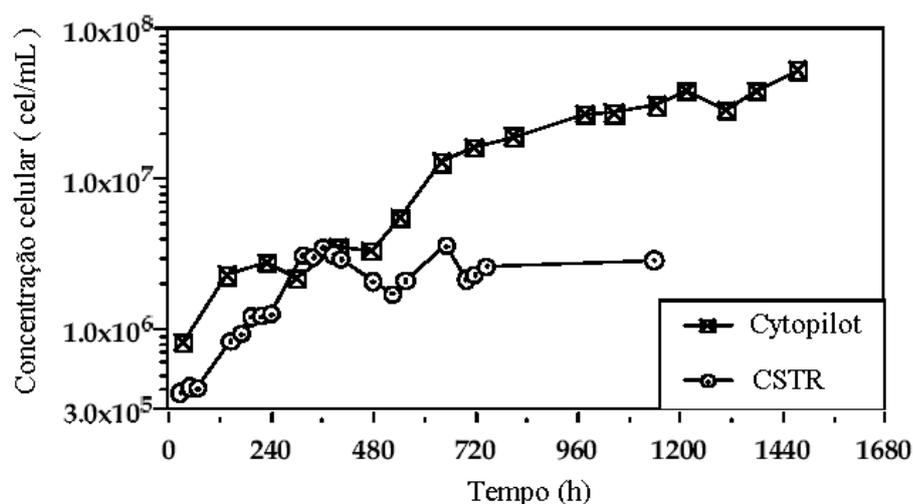


Figura 3.5 – Evolução do crescimento celular da célula CHO em biorreator Cytopilot contendo microcarregador Cytoline 1 e em biorreator de tanque agitado contendo microcarregador Cytodex 1. Adaptado de Kong *et al.* (1999).

A quantidade máxima de células no biorreator Cytopilot e a produtividade foram respectivamente de  $0,98 \cdot 10^{10}$  células (equivalente a  $6,53 \cdot 10^6$  cel/mL) e  $3,49$  mg/ $10^6$  cel·d, ao passo que no biorreator de tanque agitado alcançou-se  $2,11 \cdot 10^{10}$  células (equivalente a  $2,63 \cdot 10^6$  cel/mL) e  $0,63$  mg/ $10^6$  cel·d. Os autores especulam que a adoção de agitação mais branda e o melhoramento da oxigenação no biorreator Cytopilot forneceriam um aumento maior na produtividade e no

crescimento celular, melhorando ainda mais o desempenho deste comparado ao biorreator de tanque agitado.

Wang *et al.* (2002) cultivaram a linhagem celular CHO para expressar eritropoietina humana (huEPO) em um biorreator de leito fluidizado Cytosilot de 2 L de volume contendo 400 mL do microcarregador macroporoso Cytoline 1, alterando a taxa de perfusão do meio livre de soro por 48 dias. A concentração de EPO atingiu 980 IU/mL. Além disso, compararam este cultivo com outros sistemas de produção de EPO, entre eles, frascos T de 75 cm<sup>2</sup> e frascos spinners de 100 mL de capacidade. Em ambos, o inóculo foi de  $1,0 \cdot 10^5$  células/mL. O frasco spinner foi agitado a 45 rpm. As culturas foram mantidas a 37°C em uma incubadora de 10% de CO<sub>2</sub>. Os autores comparam o cultivo do biorreator Cytosilot a uma cultura em batelada com células em suspensão, com inóculo de células de  $1,0 \cdot 10^5$  células/mL, e volume de trabalho de 2,5 L. Uma cultura contínua foi realizada em um biorreator CSTR de 4 L de volume, com volume de trabalho de 2,4 L, tendo como inóculo  $1,0 \cdot 10^5$  células/mL. As condições de cultura foram mantidas a 37°C, pH de 7,2 e oxigênio dissolvido a 50% da saturação.

A cultura em perfusão estabelecida no biorreator de leito fluidizado Cytosilot com volume de trabalho de 2 L, continha 400 mL de microcarregador macroporoso Cytoline 1 e foi inoculada com  $1,0 \cdot 10^5$  células/mL. As primeiras 6 horas do experimento permitiram que as células aderissem aos microcarregadores, durante esta fase o agitador foi ajustado para uma velocidade de 150 rpm, e a cada 30 minutos a velocidade de agitação era aumentada para 350 rpm por alguns segundos. A velocidade de agitação foi mantida a 230 rpm após a fase de adesão

celular. O oxigênio dissolvido foi mantido a 50% da saturação de ar pela aspersão de oxigênio puro e o pH mantido a 7,1. A taxa de perfusão do meio foi ajustada manualmente por uma bomba peristáltica, com base em análises diárias de glicose. Os resultados obtidos para a cultura do biorreator de leito fluidizado estão na Figura 3.6.

Os autores observaram que o leito contendo os microcarregadores aumentou em aproximadamente 25% sua altura, após a fase inicial de 6 horas necessária para as células se aderirem à superfície do microcarregador. A concentração celular nos microcarregadores aumentou de  $0,5 \cdot 10^6$  células/mL por microcarregador para  $23,0 \cdot 10^6$  células/mL por microcarregador no 27º dia, conforme a Figura 3.6.

A perfusão foi iniciada com 1,5 L/d a partir do nono dia com meio de cultura contendo 25 mM de glicose. A taxa de perfusão foi ajustada diariamente na tentativa de manter a concentração de glicose do experimento entre 10 a 20 mM. A retenção celular na coluna de leito fluidizado durante o período de perfusão foi elevada (>99%).

O crescimento das células CHO no Cytopilot foi comparado aos outros quatro sistemas, e os resultados são apresentados na Tabela 3.5. No frasco spinner as células foram mantidas em suspensão, sem microcarregadores. O biorreator de batelada foi operado com sistemas de controles de temperatura, oxigênio dissolvido, e pH similares aos utilizados no biorreator Cytopilot. O mesmo ocorreu com o biorreator CSTR. A única diferença era que apenas o biorreator Cytopilot utilizava microcarregadores Cytoline 1 para a produção de

EPO. A densidade celular máxima alcançada foi significativamente mais alta para o biorreator Cytosilot comparando-se aos outros modos de cultura.

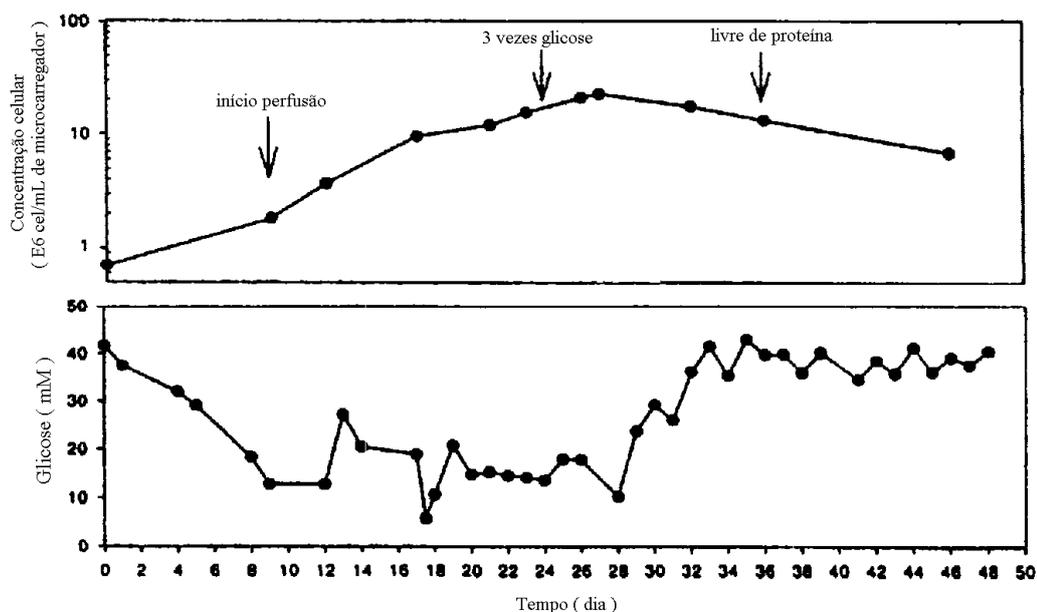


Figura 3.6 - Resultados do cultivo no biorreator Cytosilot, em leito fluidizado de microcarregador Cytoline 1, apresentando o crescimento celular e o consumo de glicose das células CHO. Adaptado de Wang *et al.*, 2002.

Tabela 3.5: Comparação do crescimento celular e produção de EPO em diversos sistemas de cultura da célula CHO. Adaptado de Wang *et al.* (2002).

Cultura	Concentração celular máxima ( $\cdot 10^6$ células/mL)	Concentração máxima de EPO (IU/mL)
Cytosilot	5,5	980
CSTR	1,5	394
Batelada	2,0	425
Spinner	0,8	200
Frasco T	0,7	211

As influências dos fatores de desadesão celular na transferência de microcarregador para microcarregador no cultivo de linhagens CHO em garrafas

rotatórias visando o scale-up ao biorreator Cytopilot, contendo Cytoline 1, foram estudadas por Landauer *et al.* (2002). Duas linhagens, CHO-K1 e CHO-MPS, foram examinadas, com relação ao crescimento celular no microcarregador Cytoline 1 em garrafas rotatórias.

Como meio de cultivo foi utilizado um mistura 1:1 (v/v) de meio DMEM e de HamF12 livres de proteínas. Às garrafas rotatórias foram adicionados 3 mL de microcarregador Cytoline 1 para 50 mL de meio e a agitação foi mantida a 2 rpm após a fase de adesão de 24 horas. Ressalta-se que o fabricante do microcarregador recomenda 5 horas para fase de adesão no cultivo da célula CHO. Para simular as condições de um leito fluidizado, provocou-se um aumento na tensão de cisalhamento usando-se as garrafas rotatórias na posição vertical a 43 rpm.

Dentre os fatores de desadesão, a tripsina e dextransulfato apresentaram os melhores resultados para a transferência de microcarregador para microcarregador. A taxa máxima de crescimento das células com 2% de dextransulfato foram de  $0,25\text{ d}^{-1}$  e  $0,27\text{ d}^{-1}$  para CHO-MPS e CHO-K1, respectivamente, em garrafas rotatórias. A célula CHO-K1 apresentou um melhor crescimento depois da desadesão com tripsina, a taxa específica de crescimento foi de  $0,36\text{ d}^{-1}$  em garrafa rotatória.

Os autores concluíram que um dos parâmetros relevantes na transferência de microcarregador para microcarregador é a distribuição uniforme das células nos microcarregadores durante a fase inicial do cultivo. Assim, quando a distribuição pode ser melhorada, as taxas de crescimento aumentam, resultando em processos mais rápidos e mais estáveis.

Com o intuito de minimizar o volume de inóculo em sistemas de leiteo fluidizado para aplicações industriais, Dürschmid et al. (2003) estudaram os efeitos do aumento do volume de leiteo do biorreator durante o processo de cultivo de célula CHO recombinante. A célula estava adaptada para crescer em condições de meio livre de soro. Foi utilizada uma mistura 1:1 (v/v) de meio DMEM e meio Ham F12, iniciando o preparo do inóculo em frasco de cultura de tecido, seguido por cultivo em spinner contendo o microcarregador Cytoline 1 e por fim sendo inoculado o biorreator Cytopilot. Os autores alteraram a quantidade inicial de microcarregador contido no biorreator e adotaram a estratégia de transferência de microcarregadores colonizados contendo células aderidas para microcarregadores livres de células ou não colonizados. Foi testada a remoção da metade da quantidade de microcarregadores completamente colonizados, seguido pela adição da mesma quantidade de microcarregadores livre de células, como se observa na Figura 3.7, bioprocesso A. Os autores testaram a adição de seis vezes sobre a quantidade de microcarregadores já completamente colonizados no biorreator, como apresenta a Figura 3.8, bioprocesso B.

O bioprocesso A, Figura 3.7, foi iniciado com 300 mL de Cytoline 1 contendo um inóculo de  $2,0 \cdot 10^6$  células/mL de microcarregador. O bioprocesso B, Figura 3.8, foi iniciado com apenas 50 mL de Cytoline 1 contendo como inóculo  $8 \cdot 10^5$  células/mL. As velocidades específicas de crescimento da célula CHO foram significativamente diferentes nas fases de crescimento exponencial e de estabilidade do bioprocesso, os valores são apresentados na Tabela 3.6.

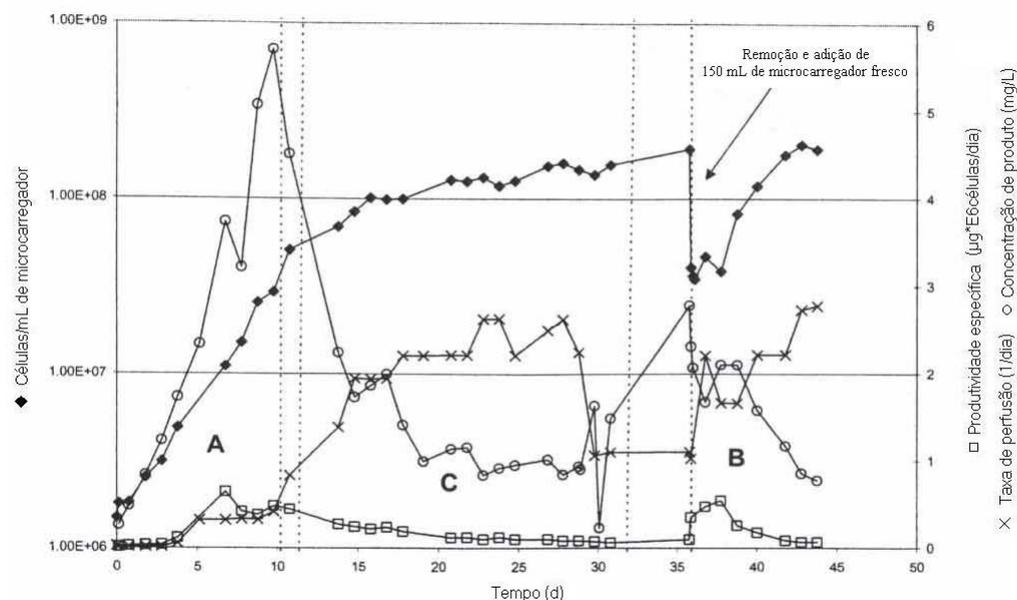


Figura 3.7 – Crescimento da célula CHO cultivada em Cytopilot, após remoção de 150 mL de microcarregadores colonizados por célula e substituição por igual quantidade de microcarregadores não colonizados. (A) Fase de crescimento logarítmico do começo do bioprocessamento; (B) Fase de crescimento logarítmico após a adição de microcarregadores frescos; e (C) Fase estável do bioprocessamento. Adaptado de Dürschmid *et al.* (2003).

O sucesso e a rápida recolonização dos microcarregadores foi dependente do volume inicial de microcarregador, da concentração do inóculo e da quantidade de microcarregadores não colonizados adicionados para o aumento de escala.

Alguns resultados obtidos com o cultivo de célula animal CHO-K1 pela empresa GE Healthcare Co. são apresentados na Figura 3.9. Os dados foram retirados do endereço eletrônico da empresa disponível na internet. O cultivo no biorreator Cytopilot Mini durou mais de 45 dias. A Figura 3.9 apresenta o crescimento das células CHO-K1 e os dados de consumo de glicose e produção de lactato para o cultivo.

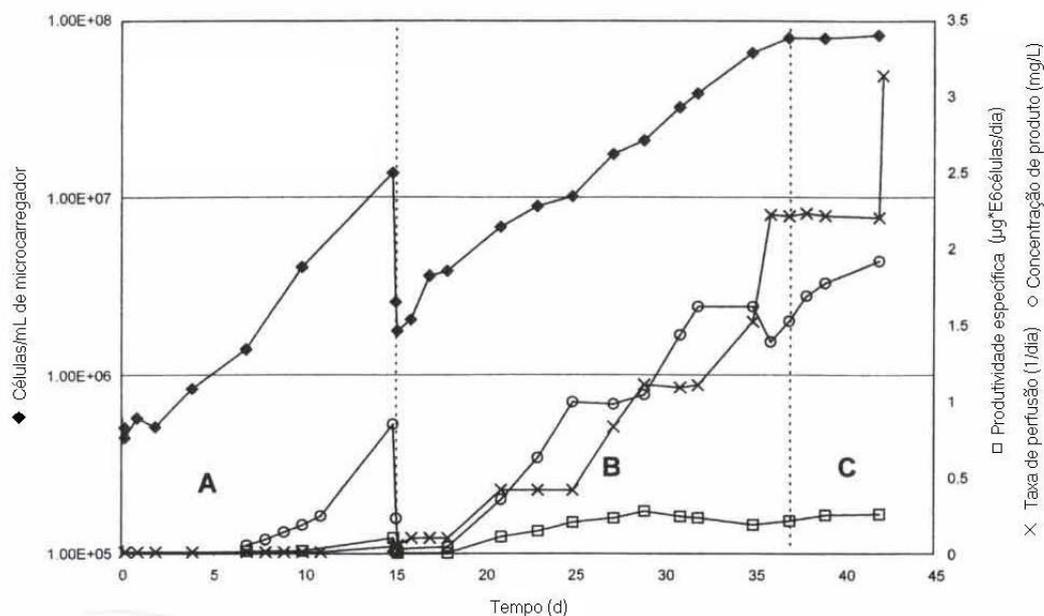


Figura 3.8 –Aumento das células CHO em Cytopilot após a adição de 300 mL de microcarregadores Cytoline 1 não colonizados. (A) Fase de crescimento logarítmico do começo do bioprocessamento; (B) Fase de crescimento logarítmico após a adição de microcarregadores frescos; e (C) Fase estável do bioprocessamento. Adaptado de Dürschmid *et al.* (2003).

Tabela 3.6 – Velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) nos bioprocessos A (Figura 3.8 A e B) e B (Figura 3.9 A e B) em diferentes fases de crescimento da cultura. Adaptado de Dürschmid *et al.* (2003).

	$\mu(d^{-1})$	$\mu(d^{-1})$
	Bioprocesso A	Bioprocesso B
Fase de crescimento exponencial no começo dos bioprocessos (Figura 3.8 e 3.9, marcados com a letra A)	Até 0,5	Até 0,7
Fase de crescimento após a adição de microcarregadores (Figura 3.8 e 3.9, marcados com a letra B)	Até 0,75	Até 0,54
Fase estável do bioprocessamento (Figura 3.8 e 3.9, marcados com a letra C)	Até 0,2	Até 0,18

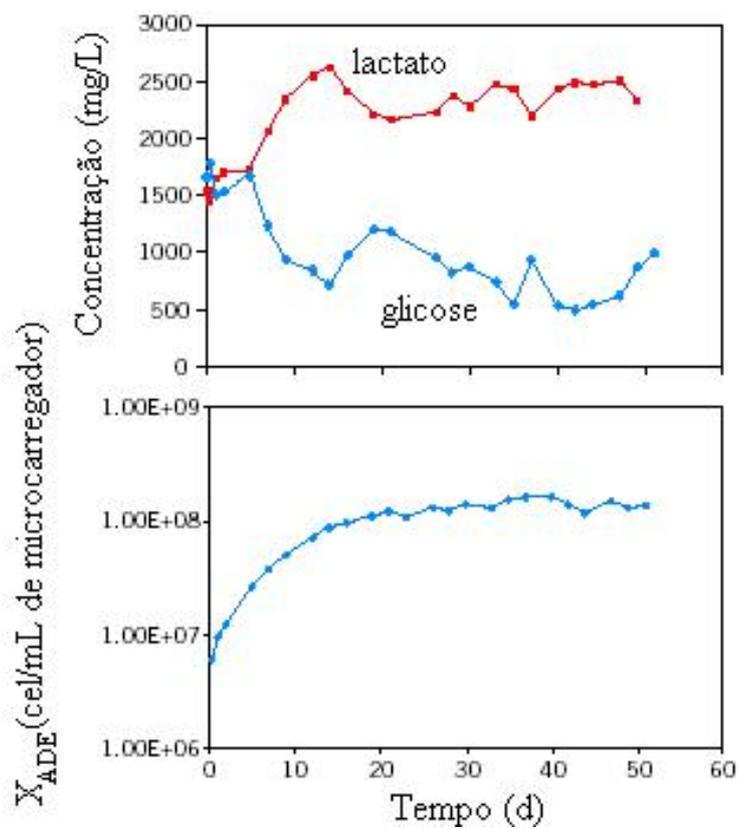


Figura 3.9 – Produção de lactato, consumo de glicose e crescimento celular do cultivo das células CHO-K1 em biorreator de leite fluidizado Cytopilot contendo microcarregadores Cytoline 1 realizado pela empresa GE Healthcare Co.

Convém ressaltar que esses dados referem-se ao cultivo de células CHO-K1 em biorreator Cytopilot contendo microcarregadores Cytoline 1 realizado pela empresa fabricante tanto do microcarregador quanto do biorreator. Assim a empresa provavelmente esteve trabalhando com o biorreator na forma otimizada, como, por exemplo, taxa de oxigenação empregada, quantidade de microcarregador utilizada, vazão de operação. A empresa não apresentou o modo pelo qual o inóculo foi preparado.

Vários microcarregadores disponíveis comercialmente foram testados por Kong *et al.* (1999) com respeito à capacidade de proliferação das células recombinantes CHO. Os experimentos foram realizados em frascos spinner

contendo meio de cultivo DMEM/F12 na proporção de 1 :1, suplementado com 1% de soro fetal bovino. Foram testados treze microcarregadores preparados de acordo com as recomendações dos respectivos fabricantes. A Figura 3.10 apresenta a quantidade de produto formado e a produtividade específica celular dos experimentos realizados, na legenda os microcarregadores porosos estão sublinhados.

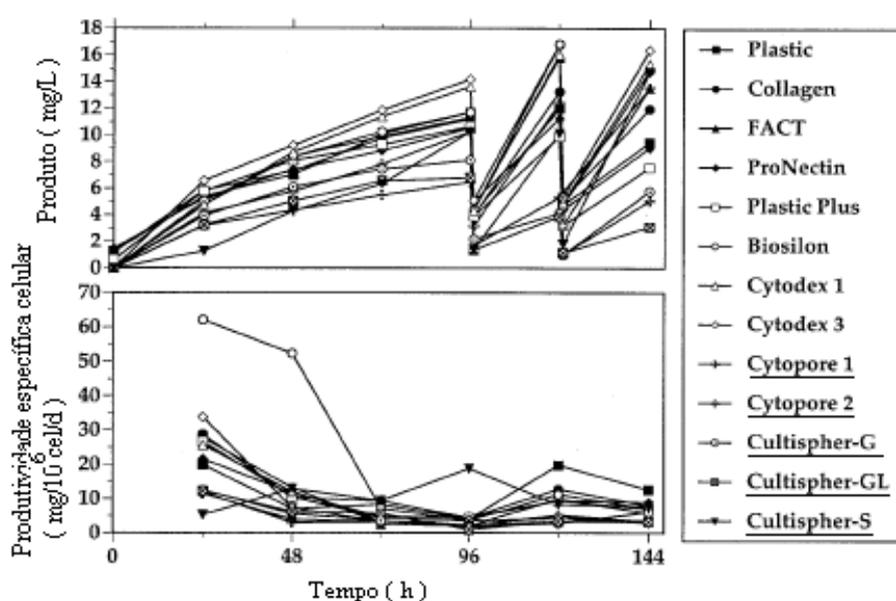


Figura 3.10 – Resultados dos experimentos em frasco spinner contendo células CHO recombinantes. Os microcarregadores porosos estão sublinhados. Adaptado de Kong *et al.* (1999).

Os objetivos dos experimentos foram de aumentar a produtividade específica celular e a formação de produto. Uma alta densidade celular não implica no alcance do objetivo final, mas contribui para atingí-lo. Destacaram-se, com respeito à densidade celular, os microcarregadores Cytodex 3 e Cytopore 1, para os quais os valores das densidades celulares foram de  $1,73 \cdot 10^6$  células/mL e  $2,32 \cdot 10^6$  células/mL, respectivamente, obtendo como produtividade volumétrica os valores de 4,22 mg/L·d e 5,54 mg/L·d. Os microcarregadores Biosilon, Cultispher-S e FACT tiveram baixas densidades celulares, apenas a metade dos

valores do Cytodex 3, porém tiveram produtividades volumétricas de 5,08 mg/L·d, 6,74 mg/L·d e 3,89 mg/L·d, respectivamente.

Os resultados mostraram que não basta apenas identificar o microcarregador mais apropriado para uma determinada linhagem celular, mas deve-se também levar em consideração outros aspectos do processo como o modo de operação do biorreator. No trabalho de Kong *et al.* (1999), os autores não identificaram qual seria o microcarregador com melhor relação custo-benefício.

Swiech (2003) testou quatro microcarregadores quanto a estimular a adesão e o crescimento de célula recombinante CHO-K1 para aumento de escala de produção de uma desintegrina recombinante. Os cultivos foram realizados em frasco spinner com volume de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino a 37°C, pH 7,4, em condições brandas de agitação e atmosfera de 10 % de CO<sub>2</sub>. Os resultados da etapa de crescimento celular são apresentados na Figura 3.11. Foram determinadas as taxas específicas de adesão ( $k_a$ ) e de crescimento celular ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) e a produtividade ( $P_{m\acute{a}x}$ ) dos microcarregadores testados, os valores estão na Tabela 3.7.

Foi indicado o microcarregador Pronectin como mais adequado para um aumento de escala baseando-se nos dados obtidos pelos experimentos. Ressaltam-se os resultados obtidos com o microcarregador Immobasil, por ter em sua matriz silicone, que é o mesmo material encontrado no microcarregador Cytoline 1, que apresentou o pior desempenho.

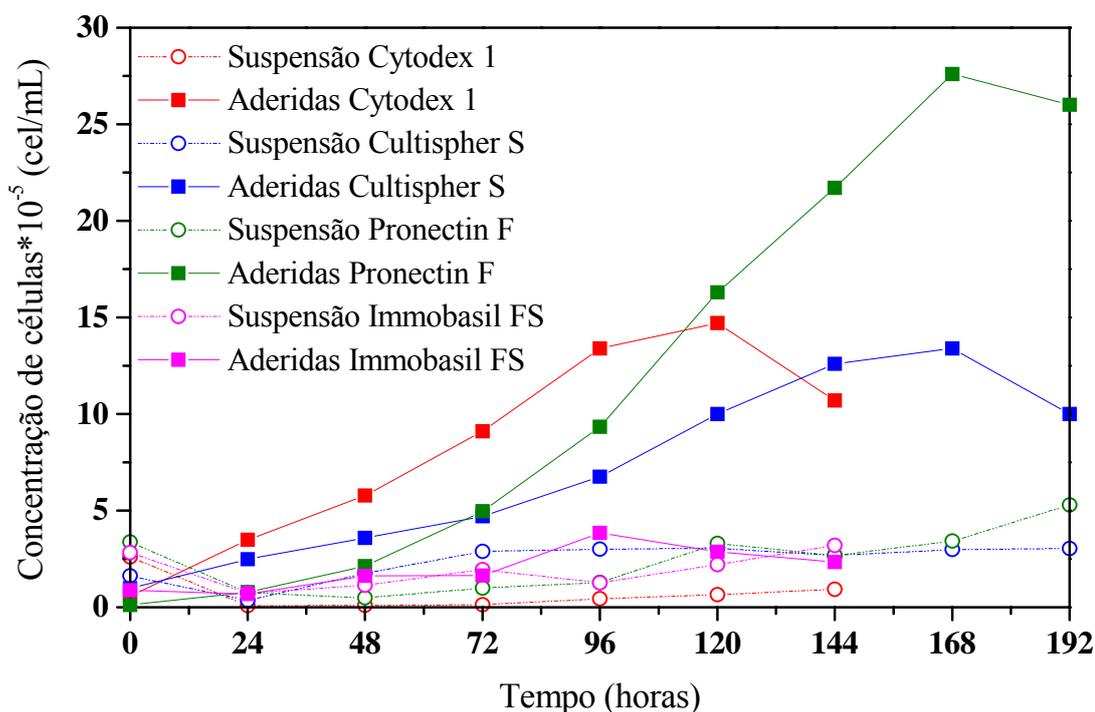


Figura 3.11 – Resultados dos cultivos da célula CHOZMD em frasco spinner com diferentes microcarregadores, Swiech (2003).

Tabela 3.7: Parâmetros cinéticos e produtividade obtidos no cultivo de célula recombinante CHO-K1. Adaptado de Swiech (2003).

Microcarregador	Taxa específica de adesão ( $k_a$ ) ( $h^{-1}$ )	Velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{máx}$ ) ( $d^{-1}$ )	Produtividade (P) ( $células.mL^{-1}.h^{-1}$ )
Cytodex 1	0,37	0,45	14.088
CultiSpher-S	0,32	0,34	9.882
Immobasil	0,27	0,52	4.587
Pronectin	0,13	0,67	17.181

### 3.5 Avaliação da revisão bibliográfica

Os itens abordados nesta revisão bibliográfica mostram que o cultivo da célula animal CHO em biorreatores, em especial em leito fluidizado,

utilizando-se como suporte de imobilização o microcarregador Cytoline 1 têm sido estudados por quase uma década. Nenhum trabalho menciona a utilização do biorreator de leito fixo contendo microcarregador Cytoline 1. Alguns trabalhos omitem os dados das primeiras horas dos cultivos realizados com célula CHO em microcarregadores Cytoline 1 e não mostram os resultados da etapa de preparação do inóculo ao utilizar-se o biorreator Cytopilot. Também foram avaliados pré-cultivos em spinners, garrafas rotatórias e até mesmo em frascos T para preparar o inóculo nos trabalhos de Dürrschmid *et al.* (2003), Landauer *et al.* (2002) e Kong *et al.* (1999), respectivamente. No trabalho de Kong *et al.* (1999) é provável que o elevado número de frascos manipulados aumentem a probabilidade de contaminação. Portanto, torna-se imprescindível o estabelecimento de uma metodologia para preparo de um inóculo de célula CHO-K1 que torne possível a operação eficiente de um biorreator de leito fixo utilizando o microcarregador Cytoline 1.

## CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este trabalho envolve uma pesquisa eminentemente experimental na tentativa de identificar condições favoráveis para preparar um inóculo para cultivo da célula CHO-K1 em frasco spinner, um equipamento de fácil manipulação e disponível em qualquer laboratório de cultivo de células animais. Para chegar-se à etapa de cultivo no spinner há a necessidade de um pré-cultivo de baixa densidade em frascos T, no qual as células crescem aderidas à superfície do frasco e, a seguir, inocula-se o spinner contendo meio de cultura e microcarregador. Após o microcarregador ser colonizado por células ativas e atingir um alto número de células aderidas, as partículas devem ser transferidas para o biorreator de leito fixo onde o processo de cultivo deve prosseguir em condições controladas para propiciar um bom crescimento celular. A seguir se descrevem detalhadamente os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

#### 4.1 *Materials*

##### 4.1.1 Células animais utilizadas neste trabalho

Foi utilizada a linhagem recombinante de CHO-K1, denominada CHOZMD, que já possui em seu material genético as modificações necessárias para a expressão e secreção extracelular de uma proteína recombinante,

denominada de desintegrina. A linhagem recombinante CHO-K1 foi cedida pelo Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, assim como a linhagem selvagem da célula CHO-K1. As linhagens estão disponíveis no laboratório de Tecnologia de Cultivo de Célula Animal, do Departamento de Engenharia Química.

#### **4.1.2 Meio de cultura**

O cultivo das células foi feito no meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) adquirido da empresa Cultilab. O meio foi suplementado com o aminoácido L-glutamina (Ajinomoto Co.) e com 10% em volume de soro fetal bovino (Cultilab) e com os antibióticos, penicilina (Sigma) e estreptomicina (Sigma). A composição do meio de cultura é apresentada na Tabela 4.1. Foi adicionada, ao meio de cultura, quantidade variável de bicarbonato de sódio, com o objetivo de manter o pH entre os valores de 7,3 a 7,4.

O aminoácido L-glutamina é um complemento nutricional para as células, o soro fetal bovino fornece glicoproteínas, fatores de crescimento e outros componentes e os antibióticos permitem que não haja a proliferação de microorganismos prejudiciais ao cultivo, como bactérias. Para a utilização do meio no cultivo foi necessária a esterilização através da passagem por um sistema de filtração, provido de uma membrana de nylon com diâmetro de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  da marca Framer (Alemanha).

Tabela 4.1: Composição do meio DMEM utilizado no cultivo da célula CHOZMD (Cultilab).

<b>Aminoácidos</b>	<b>mg/L</b>	Fé(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0,10
L-arginina·HCl	84,00	KCl	400,00
L-cistina	62,57	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200,00
L-glutamina	548,00	NaCl	6.400,00
Glicina	30,00	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	125,00
L-histidina·HCl·H <sub>2</sub> O	42,00	<b>Vitaminas</b>	<b>mg/L</b>
L-isoleucina	105,00	Cloreto de colina	4,00
L-leucina	105,00	Pantotenato de cálcio	4,00
L-lisina·HCl	146,00	Ácido fólico	4,00
L-metionina	30,00	Inositol	7,20
L-fenilalanina	66,00	Nicotinamida	4,00
L-serina	42,00	Piridoxal·HCl	4,00
L-treonina	95,00	Riboflavina	0,40
L-triptofano	16,00	Tiamina·HCl	4,00
L-tirosina	104,20	<b>Outros Componentes</b>	<b>mg/L</b>
L-valina	94,00	Glicose	4.500,00
<b>Sais Inorgânicos</b>	<b>mg/L</b>	Piruvato de sódio	110,00
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	265,00	Vermelho de fenol	15,00

### 4.1.3 Outros reagentes

Outras soluções foram utilizadas para a adequada manipulação das células. Estas soluções também foram filtradas e armazenadas em frascos autoclavados. Dentre as soluções tem-se o PBS (*phosphate-buffered saline*) que funciona como solução tampão, para o pH de 7,4. A composição da solução de PBS para cada litro de solução é fornecida na Tabela 4.2 (Freshney, 1994) e foi utilizada nas etapas de preparação do microcarregador. Utilizou-se solução de tripsina 0,25% em massa, tendo pH de 7,4, para desprender ou desaderir as células do frasco

spinner e do microcarregador. A composição para cada litro de solução é apresentada na Tabela 4.3 (Freshney, 1994).

Tabela 4.2: Composição da solução de PBS utilizadas na hidratação do microcarregador (Cultilab).

Composto	Quantidade
NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
Água milli-Q	1,0 L

Tabela 4.3: Composição da solução de tripsina utilizada para desaderir as células CHO do frasco T (Cultilab).

Composto	Quantidade
NaCl	8,0 g
KCl	0,38 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 g
Dextrose	1,0 g
Trizma base	3,0 g
Tripsina 1:250	2,5 g
Água milli-Q	1,0 L

#### 4.1.4 Preservação das células

As células de CHO-K1 e CHOZMD foram conservadas a -196°C em criotubos (Corning) de aproximadamente 2 mL imersos num recipiente de nitrogênio líquido da marca Barnstead Thermolyne. A concentração celular no criotubo foi de  $1,0 \cdot 10^6$  células/mL. Foi utilizado como criopreservante o DMSO-dimetil sulfóxido (Mecker), a 10% em volume.

#### **4.1.5 Manipulação das células**

Para a correta manipulação das células foi necessário o preparo dos materiais biológicos em capela de fluxo laminar de classe II, a fim de prevenir exposições a contaminações. A capela foi adquirida da empresa The Baker Company, sendo conhecida comercialmente pelo nome de *SterilGARD III Advance*.

#### **4.1.6 Cultivo celular em frascos T**

A inicialização da cultura foi realizada em frascos de cultura revestidos por poliestireno da marca Corning, tendo as seguintes áreas superficiais de 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> e 150 cm<sup>2</sup>. Durante este período as células foram cultivadas em uma incubadora de CO<sub>2</sub> controlada em 10% v/v, além do controle da temperatura de incubação mantido a 37°. A incubadora da série 310, foi adquirida da empresa Thermo Forma.

O pH do meio nos frascos de cultura foi acompanhado pela alteração da coloração do meio de cultura. À medida que o mesmo perde a coloração vermelha, o meio torna-se acidificado, indicando que o meio de cultura deve ser trocado. As células foram cultivadas nos frascos de cultura até atingirem a confluência, ou seja, até a superfície do frasco estar totalmente recoberta de células.

A partir deste ponto as células foram tripsinizadas, ou seja, era adicionado ao frasco T, após a retirada do meio de cultivo consumido pela célula, o mesmo volume da solução de tripsina. As células eram transferidas para um frasco de

cultura maior, por exemplo, na passagem das células do frasco de 25 cm<sup>2</sup> para um frasco de 75 cm<sup>2</sup>. Na tripsinização das células confluentes faz-se a lavagem com solução de PBS (*phosphate-buffered saline*) e acompanha-se ao microscópio as células desaderidas, o meio torna-se turvo indicando que a etapa de tripsinização, cujo objetivo é fazer com que as células fiquem em suspensão, foi bem sucedida. Posteriormente as células foram centrifugadas por 5 min a 1500 rpm, utilizando-se a centrífuga da empresa Incibrás, modelo Spin VI, sendo ressuspendidas na quantidade de meio adequada para início do cultivo em outros frascos de cultura ou para o congelamento. Nesta etapa foi retirada uma pequena amostra para quantificar o número de células viáveis e/ou não viáveis, como também quantificar o número total de células em suspensão. A manipulação das células foi realizada na capela de fluxo laminar. Durante toda a etapa do cultivo, as soluções e equipamentos em contato com as células animais foram esterilizados.

#### **4.1.7 Cultivo celular em frasco spinner**

Com o crescimento celular no frasco T preferencialmente na fase exponencial foi iniciado o cultivo no frasco spinner (Wheaton) de capacidade volumétrica igual a 500 mL, sendo utilizado 300 mL para o cultivo. As mesmas condições para o cultivo em frascos T foram utilizadas para o cultivo das células CHO-K1 e CHOZMD no frasco spinner, a única diferença era a presença do microcarregador Cytoline 1, adquirido da empresa GE Healthcare Co. A concentração de Cytoline 1 nessa etapa do cultivo foi de aproximadamente 20,67 g/L, recomendado pelo fabricante do microcarregador para o cultivo em frascos spinners. Assim, para 300 mL de meio de cultivo a área disponível para a adesão e

o crescimento da célula corresponde a 124 frascos T de 150 cm<sup>2</sup>. A agitação do meio no frasco spinner foi variável entre 40 rpm a 60 rpm.

A Figura 4.1 apresenta o procedimento necessário para a adequada preparação do microcarregador Cytoline 1, conforme a recomendação do fabricante, para sua utilização em frasco spinner. À quantidade de microcarregador a ser utilizada deve-se adicionar o dobro da quantidade em volume de água destilada, ambos no frasco spinner. Realiza-se a esterilização do equipamento por 10 min a 120°C tornando-se visível o início da hidratação do microcarregador. Em seguida lava-se com água destilada a solução ligando-se a agitação magnética para 40 rpm por 10 minutos e peneirando-se a solução em seguida. Após a lavagem adiciona-se hidróxido de sódio a 0,1 M correspondente ao dobro da quantidade em volume do microcarregador adicionado no spinner. A mistura deve permanecer de um dia para o outro, 12 horas, sem ser agitada. Procede-se a lavagem com água destilada até o momento em que o pH da mistura esteja menor que 8,5. Permitindo a esterilização do spinner em autoclave por 30 minutos a 120°C contendo os microcarregadores em solução tampão de fosfato. Substitui-se a solução tampão de fosfato por meio de cultura e incuba-se o spinner na incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C e agitação magnética a 40 rpm durante 12 horas. Por fim remove-se o meio de cultura e adiciona-se o inóculo.

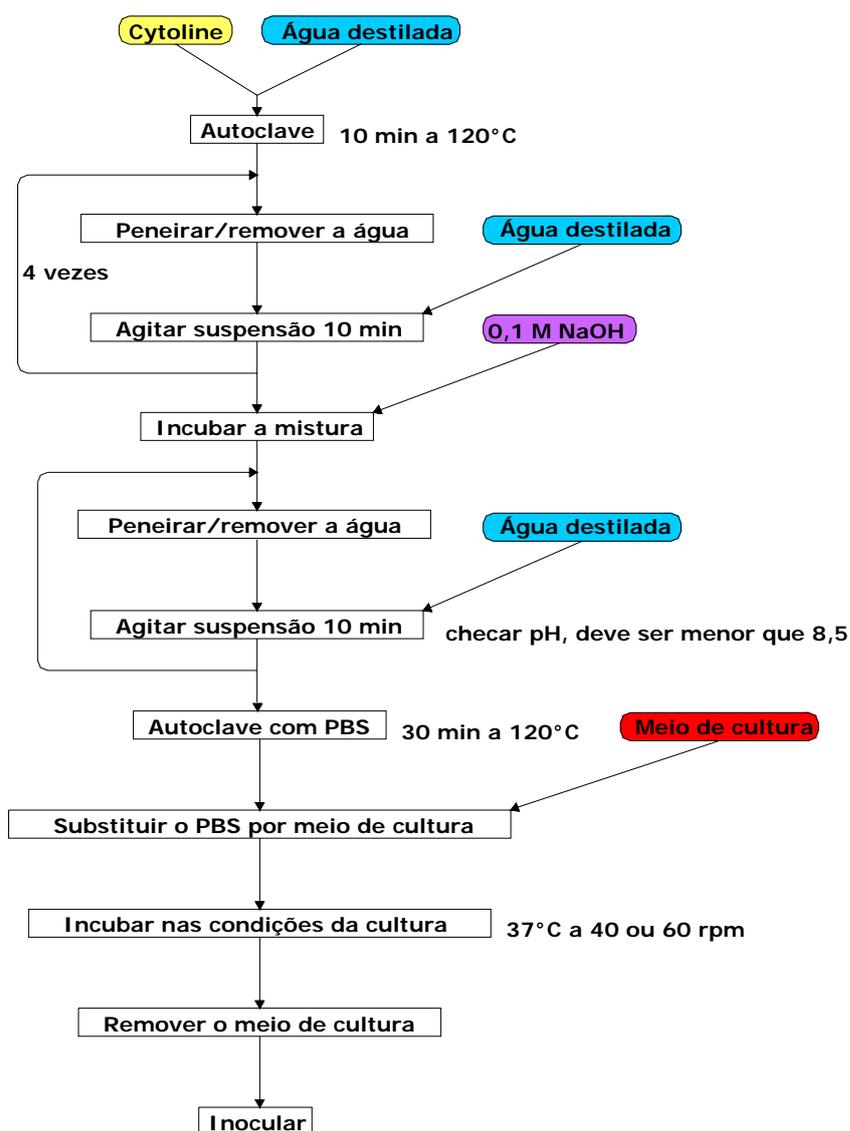


Figura 4.1 – Procedimento para a utilização do microcarregador Cytoline 1 para cultivos da célula animal CHO-K1 em frasco spinner.

O procedimento para a obtenção do inóculo das células CHOZMD e CHO-K1 foi feito de acordo com a Figura 4.2, sendo variável apenas o número de frascos T conforme a necessidade de cada inóculo para os microcarregadores Cytoline 1 contidos no frasco spinner. Por exemplo, dois frascos T de 150 cm<sup>2</sup> são suficientes para inocular um spinner contendo 300 mL de meio de cultura, tendo como inóculo  $1,0 \cdot 10^5$  células/mL.

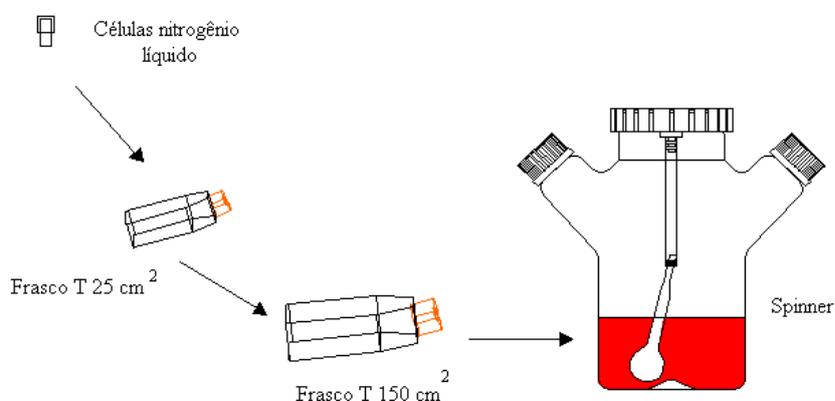


Figura 4.2 – Representação esquemática do procedimento de preparo de inoculo em frasco spinner com utilização de células CHOZMD e CHO-K1.

## 4.2 Métodos analíticos

### 4.2.1 Determinação do número de células em suspensão

A determinação da concentração de células em suspensão foi realizada em câmara de Neubauer (Freshney, 1994). As células foram colocadas na câmara de volume conhecido e, a seguir, foram contadas no microscópio invertido Olympus CK30, com uma magnificação de 100 vezes.

### 4.2.2 Determinação da viabilidade celular

Foi utilizado o método de exclusão do corante azul de tripan (Freshney, 1994) para determinar a viabilidade. Para tal, contou-se como células viáveis àquelas não coradas, refráteis e tendo formato esférico, enquanto que as células não viáveis estavam coradas. Determinou-se em seguida a porcentagem das células viáveis com relação às células totais, ou seja, a soma das quantidades de células viáveis e de células não viáveis.

### 4.2.3 Determinação da concentração de células aderidas

A concentração de células aderidas ao microcarregador foi determinada através da contagem de seus núcleos (Pharmacia, 1981). Amostras de 2 mL de suspensão foram retiradas, centrifugadas e ressuspensas em 2 mL de solução 0,1 M de ácido cítrico contendo 0,1% (m/v) de violeta cristal por 1 hora a 37°C. O ácido cítrico provoca o rompimento das células e o violeta cristal tingem o núcleo, possibilitando sua contagem pelo hemacitômetro ou câmara de Neubauer.

Convém esclarecer que a concentração de células aderidas ao microcarregador é expressa de duas maneiras distintas. Tradicionalmente, conta-se o número de núcleos para cada mL de meio de cultura. É comum, devido às características de porosidade do microcarregador Cytoline1, expressar a mesma quantidade de núcleos para cada mL de microcarregador. Deste modo, foram utilizadas as seguintes equações (1) e (2) para quantificar o número de células aderidas:

$$X_{ADE} = \frac{\text{Número de células}}{\text{Volume de meio}} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \cdot \frac{1}{10^4} \quad \left[ \frac{\text{células}}{\text{mL}} \right] \quad (1)$$

$n$ .....número de contagens realizadas, sendo 32 o valor máximo

$X_i$ .....resultado da contagem direta [células]

$1/10^4$ .....refere-se ao volume da câmara de Neubauer [mL]

$$X_{ADEm} = \frac{\text{Número de células}}{\text{Volume de microcarregador}} = X_{ADE} \cdot \frac{2 \cdot \rho_m}{\text{micro}} \quad \left[ \frac{\text{células}}{\text{mL de micro}} \right] \quad (2)$$

$X_{ADE}$ .....Concentração das células aderidas [células/mL]

2.....refere-se ao volume de corante adicionado à amostra contendo microcarregadores [mL]

$\rho_m$ .....quantidade de partículas de microcarregador presentes em 1 mL de microcarregador [partículas/mL de micro]

micro.....quantidade de partículas presentes na amostra [partículas]

#### 4.2.4 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose durante o cultivo em frasco spinner foi realizada através da leitura da absorbância das amostras em HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho), utilizando cromatógrafo da marca Shimadzu com coluna da marca Shodex® modelo KS-803, a 80°C, o volume da amostra era de 20  $\mu$ L, utilizou-se solução de NaOH  $10^{-3}$  M como fase móvel.

#### 4.2.5 Caracterização do microcarregador Cytoline 1

Para a caracterização superficial do microcarregador Cytoline 1 foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura modelo PHILIPS XL-30 FEG. A amostra do microcarregador não passou por nenhum tratamento prévio.

Fez-se a medida do potencial zeta da partícula utilizando-se o zetâmetro da marca Malvern Instruments. As amostras foram previamente trituradas na presença de nitrogênio líquido em um cadinho, em seguida foi necessária adicionar água milli-Q a amostra para fornecer uma concentração abaixo de 0,5% sendo filtrada a solução em membrana de nitrocelulose de 0,22  $\mu$ m de diâmetro de poro.

### 4.3 Métodos de análise dos resultados

A constante de adesão celular,  $k_a$ , foi determinada quantificando o desaparecimento de células em suspensão seguindo a relação de primeira ordem utilizada por Ng *et al.*, 1996, de acordo com a equação (3):

$$\frac{X_{SUS}}{X_{SUS0}} = e^{-k_a \cdot t} \quad (3)$$

onde:  $X_{SUS}$  é a concentração de células em suspensão no tempo  $t$  (cel/mL),  $X_{SUS0}$  é a concentração inicial de células em suspensão (cel/mL), ou seja, a concentração do inóculo utilizado e,  $k_a$  é a constante de adesão celular ( $h^{-1}$ ). Logo, a constante  $k_a$  pode ser determinada pelo coeficiente angular da linha reta de  $-\ln(X_{SUS}/X_{SUS0})$  em função do tempo. O valor de  $k_a$  é interpretado como a taxa específica de adesão.

Para a determinação da velocidade específica máxima de crescimento da célula, foi utilizada a seguinte equação (4):

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (4)$$

Que depois de integrada fornece a equação (5):

$$\ln X_{ADE} = \ln X_{ADE0} + \mu_{m\acute{a}x} \cdot t \quad (5)$$

Nesta última expressão, o valor de  $\mu_{m\acute{a}x}$  é o coeficiente angular do gráfico de  $\ln(X_{ADE})$  em função do tempo, onde  $X_{ADE}$  é a concentração de células aderidas no tempo  $t$  (cel/mL) e  $X_{ADE0}$  é a concentração inicial de células aderidas (cel/mL), que é teoricamente igual a zero, pois não há células aderidas aos microcarregadores no início do cultivo.

Para caracterizar a capacidade de produção de células durante o cultivo utilizou-se a produtividade máxima tal como definida por Wang *et al.* (1979), a qual pode ser determinada traçando uma linha a partir da origem, tangenciando a curva de concentração de células em função do tempo, no ponto de maior inclinação.

#### **4.3.1 Análise dos resultados**

Os dados obtidos através dos experimentos com as células CHOZMD e CHO-K1, por exemplo, o consumo de glicose, crescimento celular, viabilidade celular foram analisados fazendo-se uso de técnicas de Engenharia das Reações Bioquímicas, utilizando-se os software Statistics 5.0 e Origin 7.0 para o tratamento matemático e elaboração de gráficos, respectivamente.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Antes de abordar os experimentos realizados em frasco spinner com microcarregadores Cytoline 1 para o cultivo da célula recombinante CHO-K1, discutir-se-á a primeira fase do trabalho, na qual pretendia-se cultivar as células em um biorreator de leito fixo. Após a montagem e a realização de alguns testes neste biorreator detectaram-se alguns problemas na etapa de inoculação que fizeram com que os objetivos originais deste trabalho fossem modificados.

#### 5.1 *Plano inicial de trabalho*

Constava no plano inicial de trabalho a construção de um biorreator de leito fixo e realização das adaptações do reservatório de meio de cultura, bem como a realização de experimentos de cultivo da célula animal CHO-K1. A seguir se descrevem de forma mais detalhada essas etapas.

##### 5.1.1 **Sobre o projeto e a construção do biorreator de leito fixo**

Para o dimensionamento do biorreator de leito fixo foram utilizadas as instruções especificadas do fabricante do microcarregador Cytoline 1 e as instruções de operação do biorreator Cytopilot, ambas instruções da empresa GE

Healthcare Co., assim como fundamentos da engenharia química para a construção de biorreatores.

Para o dimensionamento do biorreator de leito fixo levou-se em conta que o volume máximo ocupado pelo leito de microcarregadores deveria corresponder a 75% do volume total do biorreator e, de acordo com Doyle & Griffiths (1998), que fornecem o diâmetro equivalente do microcarregador Cytoline 1 como sendo de 1,5 mm, a relação entre o diâmetro interno do leito fixo e o diâmetro equivalente da partícula ( $d_t/d_p$ ) deve ser maior que 10, para se obter uma porosidade de 39% de acordo com Rouiller (2000). Desta forma o diâmetro do leito foi fixado em 20,0 mm. Como consequência disso a área transversal do tubo foi de 3,14 cm<sup>2</sup>. Assim, definindo um volume útil do biorreator de 70,0 mL, o comprimento foi de 22,3 cm.

A construção do biorreator de leito fixo foi realizada na oficina de vidro do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, utilizando-se vidro borossilicato para ser utilizado com fluxo ascendente de meio. No interior do biorreator de leito fixo foi acoplada uma tela de aço inox 316 na parte inferior, para servir de suporte para o leito de microcarregadores e para permitir uma distribuição do meio de cultura de forma uniforme. A Figura 5.1 apresenta uma foto do biorreator de leito fixo construído tendo em seu interior microcarregadores Cytoline 1. Apresenta também, em detalhe, o modo como foi fixada a tela de aço inox 316, destacando-se os suaves estrangulamentos do biorreator feitos tanto na parte superior e inferior onde se encontra fixada a tela de aço inox.

### 5.1.2 Sobre o projeto e construção do reservatório de meio

Além da construção do biorreator de leito fixo foi necessária a adaptação do reservatório de meio para permitir a realização dos experimentos. Assim um recipiente feito em vidro borosilicato tendo volume total de 1 litro, bem como uma flange em aço inox 316, foram dimensionados e construídos. A Figura 5.2 apresenta as vistas isométricas das peças mencionadas. As peças depois de confeccionadas foram devidamente testadas quanto à capacidade de manter a esterilidade devido a possíveis falhas decorrentes do processo de soldagem no momento da construção.

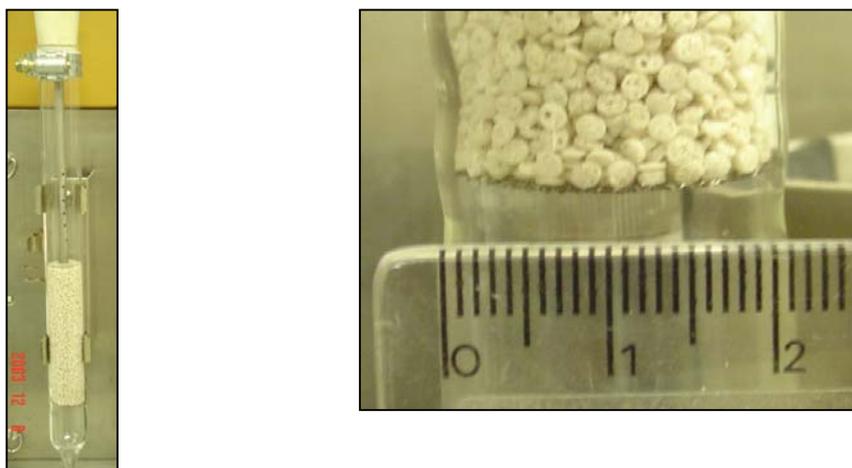
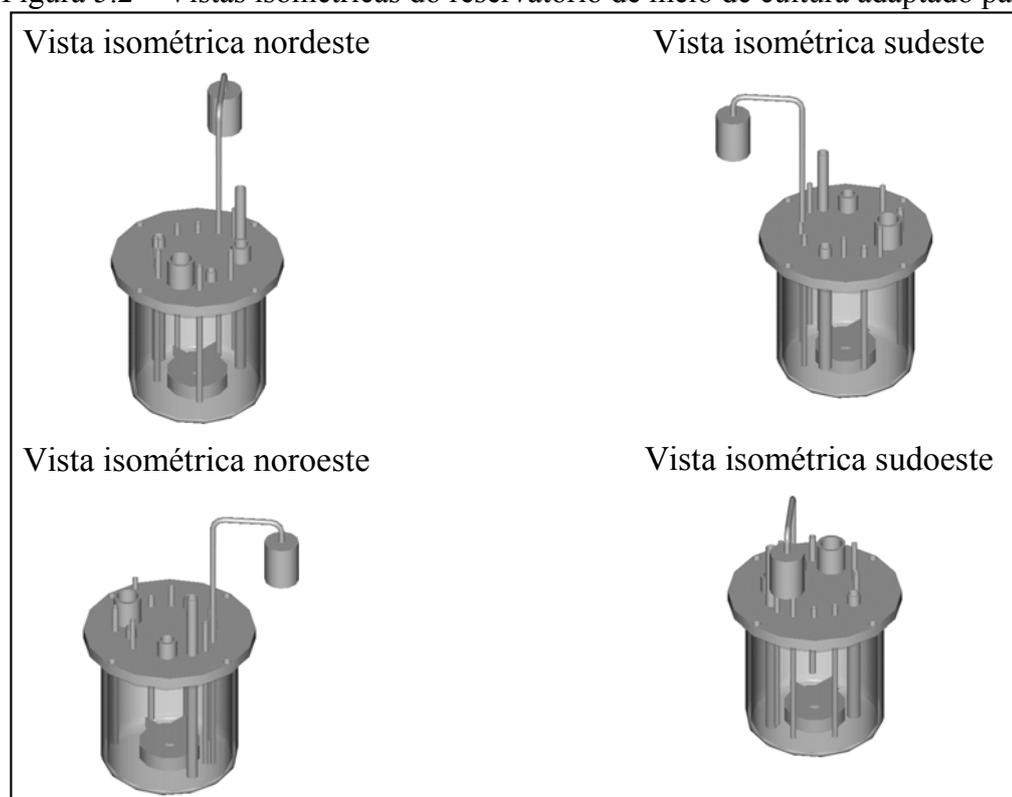


Figura 5.1 – Foto do biorreator de leito fixo contendo microcarregadores Cytoline 1 e, em detalhe, estrangulamento do tubo de vidro para fixação da tela de aço inox

### 5.1.3 Adaptações e montagem do equipamento

São descritas, nos próximos itens, as principais características técnicas do fermentador BioFlo I da empresa New Brunswick Scientific que foi adaptado para servir como equipamento auxiliar do biorreator de leito fixo de vidro mostrado na Figura 5.5.

Figura 5.2 – Vistas isométricas do reservatório de meio de cultura adaptado para



ser utilizado junto com o biorreator de leito fixo de vidro.

### 5.1.3.1 Escoamento do meio de cultura

A velocidade de escoamento do meio de cultura no biorreator de leito fixo foi projetada para ser superior a 10 cm/min, visando à obtenção de baixa resistência externa à transferência de massa. Desta forma, a mínima vazão de operação seria de 32,0 mL/min. Nas operações envolvendo transferência do meio de cultura, como, reciclo, retirada e reposição, foram utilizadas mangueiras de silicone da marca Masterflex. Para o reciclo trabalhou-se com mangueiras de 3,1 mm de diâmetro interno, Masterflex modelo 96400-16. Esta permitia operar com faixas de vazões entre 1 mL/min a 80 mL/min. O reciclo tinha a função de fornecer às células no biorreator de leito fixo os nutrientes para seu crescimento, assim como retirar os produtos formados. O reciclo tinha também a função de

possibilitar no reservatório o controle da concentração do oxigênio dissolvido, do pH e da temperatura do meio.

### 5.1.3.2 Circulação de meio de cultura e fornecimento de ar

A entrada e saída de meio do reservatório foram realizadas através da bomba peristáltica existente no BioFlo I. O reservatório também possuía um sistema de controle de temperatura, permitindo a operação a 37°C. A agitação era feita com turbina acionada magneticamente com velocidade de até 1000 rpm, valor suficiente para a realização dos experimentos.

Quanto ao ar, este passava por um rotâmetro para manter o registro da vazão, sendo posteriormente esterilizado através de membranas de nitrocelulose com diâmetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  da Cole-Parmer. Também se acoplou ao recipiente um eletrodo de oxigênio dissolvido, da marca Mettler Toledo, modelo E20204, com diâmetro de 19 mm. O eletrodo era ligado a um registrador de oxigênio dissolvido da marca B & C Electronics, modelo OD 7685.

### 5.1.3.3 Monitoração e controle do pH

A monitoração e o controle do pH ocorreu no reservatório de meio acoplado ao biorreator. Para isso utilizou-se um eletrodo da marca Mettler Toledo, modelo 465-k9, com diâmetro de 12 mm, que enviava sinais elétricos para um controlador de pH da marca New Brunswick Scientific. Este último, por sua vez, acionava um módulo contendo duas bombas peristálticas que dosavam conforme necessário soluções de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio, ambas com concentração de 0,1 mol/L.

#### 5.1.4 Equipamento completo para o cultivo de célula animal CHO-K1

A Figura 5.3 mostra o biorreator de leito fixo e o recipiente que foram dimensionados e construídos. A aparelhagem experimental para o cultivo de célula animal CHO-K1 em operação pode ser visualizada na Figura 5.4. É também apresentado um fluxograma da aparelhagem experimental na Figura 5.5.



Figura 5.3 – Biorreator de leito fixo e reservatório de meio de cultura em operação.

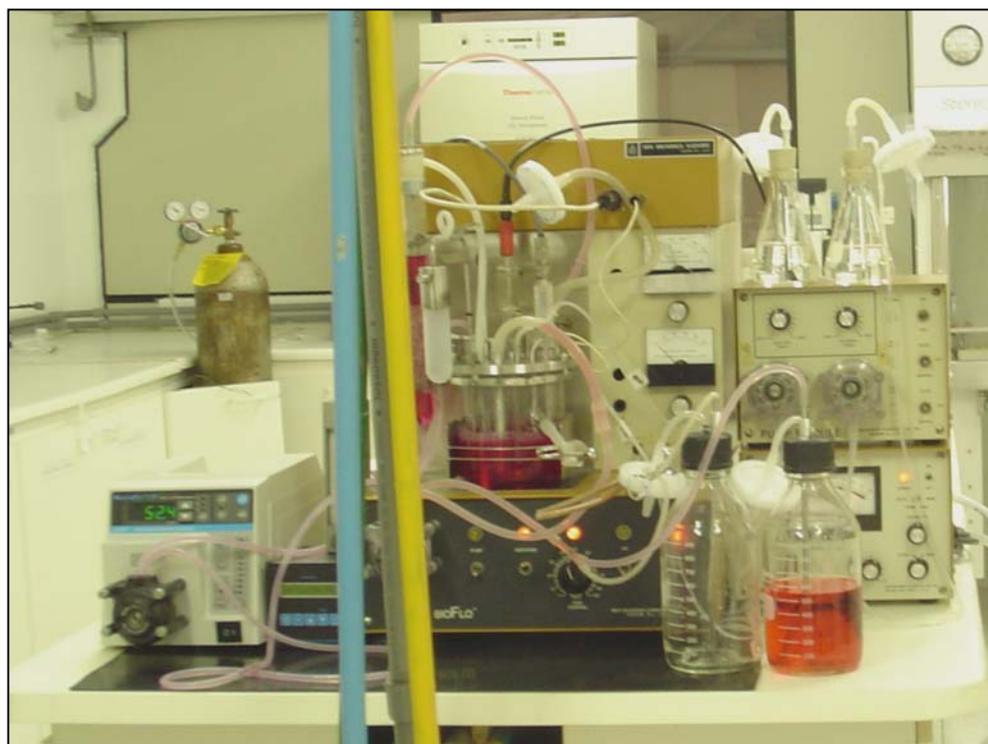


Figura 5.4 – Montagem experimental do leito fixo e aparelhagem complementar para realização dos experimentos de cultivo com a célula CHOZMD.

### 5.1.5 Testes preliminares e dificuldades encontradas

Foram realizados testes preliminares com o intuito de verificar as condições da adaptação e operação do BioFlo I levando-se em conta o controle e manutenção dos parâmetros de operação do biorreator de leito fixo. Inicialmente fez-se um teste utilizando-se água destilada, e por fim o meio de cultivo. Os testes serviram para o melhor entendimento das variáveis de operação e utilização dos instrumentos de controle, como os eletrodos, por exemplo, além de indicarem possíveis pontos frágeis quanto à esterilidade. Devido ao alto custo e escassez não foi utilizado o microcarregador Cytoline 1 nos testes preliminares, mas utilizou-se um biorreator de leito fixo contendo em seu interior esferas de vidro sinterizadas, simulando um leito de microcarregadores.

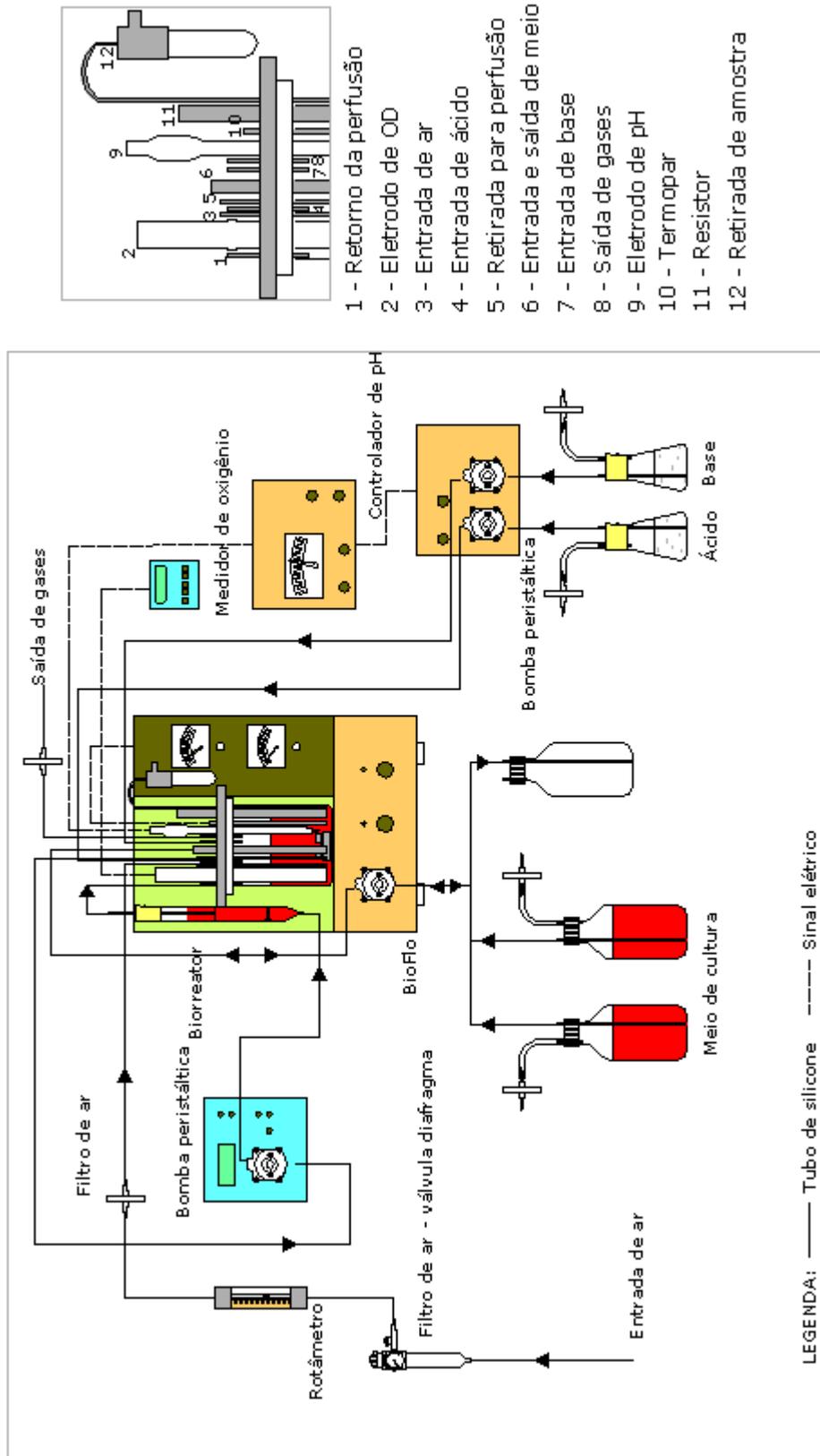


Figura 5.5 – Fluxograma da montagem experimental para o cultivo de célula animal CHOZMD em biorreator de leito fixo com microcarregador Cytoline 1.

O sistema foi operado da seguinte maneira: após as etapas iniciais de preparo de meio de cultura, inóculo e autoclavagem dos equipamentos, foi adicionado ao recipiente de meio de cultivo 500 mL de meio de cultura através da bomba peristáltica. Em seguida era ligada a bomba de recirculação que alimentava o biorreator de leito fixo utilizando uma vazão de 32 mL/min. O “set point” do controle de temperatura presente no BioFlo I era fixado em 37°C. Caso o valor do pH estivesse fora da faixa de controle (entre 7,3 a 7,4) era acionada automaticamente uma bomba de dosagem de ácido ou base sendo o eletrodo calibrado antes da autoclavagem. Fornecia-se ar ao sistema com vazão de 1 mL/min, procedendo-se à calibração do eletrodo de oxigênio dissolvido depois de esterilizado.

O próximo passo era a inoculação do biorreator, fazendo a transferência de microcarregador para microcarregador, ou seja, o inóculo para o biorreator de leito fixo seria preparado pelo cultivo da célula CHOZMD em frasco spinner contendo microcarregador Cytoline 1. Quando no frasco spinner as células atingissem a fase de crescimento exponencial, seria realizada a transferência dos microcarregadores colonizados pelas células CHOZMD contidos no frasco spinner para o biorreator de leito fixo. Para isto ser possível era necessário retirar a rolha de borracha do biorreator de leito fixo e adicionar os microcarregadores já colonizados, disponíveis no frasco spinner, adicionando-se microcarregadores frescos para completar a quantidade necessária à operação do biorreator. Porém vários problemas surgiram no início da operação do biorreator.

Um dos principais problemas foi a formação de espuma, causada pela aeração, ao utilizar-se o meio de cultura contendo soro fetal bovino, que promovia

o entupimento do filtro de saída de ar e, como conseqüência, o aumento da pressão no interior do sistema, tendo como resultado final a perda da esterilidade. Em especial, ocorria o desprendimento da rolha de borracha no biorreator de leito fixo. Como a taxa específica de consumo de oxigênio da célula CHO é baixa, de acordo com Griffiths (1998)  $10^6$  células consomem  $0,15 \mu\text{M/h}$  de oxigênio, a aeração de  $1 \text{ mL/min}$  foi estimada como suficiente para a realização dos experimentos, porém mesmo nessa baixa vazão observou-se a formação de espuma. Este problema poderia ser resolvido com a adição de antiespumante ou pela utilização de oxigenação do meio com mangueiras de silicone.

Outro problema, e com certeza o mais preocupante, foi a inexistência de uma metodologia padronizada e confiável de preparação de inóculo, uma vez que as informações encontradas na literatura se restringiam ao uso do microcarregador Cytoline 1 juntamente com o biorreator de laboratório Cytopilot, ambos do mesmo fabricante.

Em função deste último problema optou-se pela mudança de enfoque do trabalho. O inóculo do biorreator de leito fixo seria feito com a transferência dos microcarregadores Cytoline 1 do frasco spinner. Por este motivo foram programados experimentos em frasco spinner para avaliar o desempenho do microcarregador Cytoline 1.

## **5.2 Desempenho do microcarregador Cytoline 1 em frasco spinner**

Serão apresentados, em ordem cronológica de realização, os sete experimentos realizados em frasco spinner contendo microcarregadores Cytoline

1 utilizando-se as células CHOZMD e CHO-K1. Os cinco primeiros cultivos foram realizados com a célula recombinante CHOZMD e os dois últimos com a célula selvagem CHO-K1.

### **5.2.1 Resultados e análise do primeiro experimento**

Para o primeiro experimento foram adotadas as mesmas condições empregadas no trabalho de Swiech (2003), que consistiam na utilização de 300 mL de meio de cultivo, agitação do frasco spinner a 60 rpm, fase de adesão celular com agitação intermitente, 2 minutos de agitação a cada 30 minutos sem agitação, para as 6 primeiras horas do experimento, atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub>, inóculo de  $3,0 \cdot 10^5$  células/mL e concentração de NaHCO<sub>3</sub> de 3,7 g/L. A única exceção foi a utilização do microcarregador Cytoline 1, cuja concentração foi de 20,67 g/L. O gráfico dos resultados obtidos no primeiro experimento está representado na Figura 5.6. Neste cultivo foi utilizada a linhagem recombinante CHOZMD.

O crescimento celular no microcarregador não foi significativo ao longo de todo o experimento. Surpreendentemente, após a inoculação houve pouca adesão e intensa queda na concentração de células em suspensão. Aparentemente, grandes quantidades de células CHO-K1 não se aderiram ao microcarregador. A concentração celular das células aderidas ao longo do experimento foi 6 vezes menor do que o inóculo ( $3,0 \cdot 10^5$  células/mL). Em nenhum momento houve tendência para crescimento exponencial.

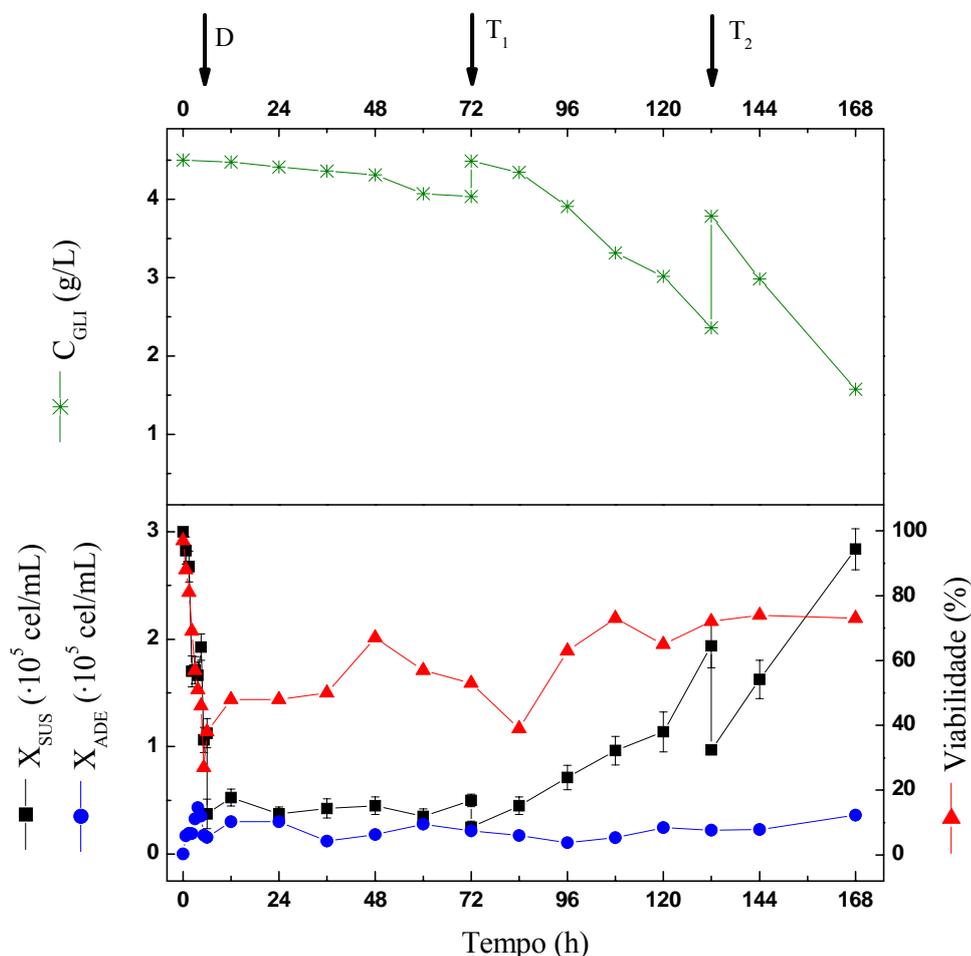


Figura 5.6 – Resultados do experimento 1 no cultivo da célula CHOZMD utilizando microcarregador Cytoline 1 (20,67 g/L) em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM. O experimento foi realizado a 60 rpm,  $NaHCO_3$  3,7 g/L e 10%  $CO_2$ . D indica a diluição de 1:3 realizada na fase de adesão, enquanto que  $T_1$  e  $T_2$  as trocas de meio de cultura.

A viabilidade celular apresentou uma queda expressiva na etapa de adesão, que é explicada pelos valores de pH do meio acima de 8, desde o início do experimento. Este valor contribuiu para a não adesão das células, já que é superior ao valor adotado em cultivos de célula CHO entre 7,0 a 7,4. Na etapa de preparação do microcarregador foi adicionada uma solução de NaOH de 0,1 M, e nas etapas seguintes não houve êxito ao se fazer a eliminação deste.

As células em suspensão apresentaram aumento de concentração só após 60 horas de cultivo. Possivelmente, as poucas células precariamente aderidas

começaram a se multiplicar e algumas migraram para a suspensão provocando um leve aumento da concentração. O consumo de glicose acompanhou o crescimento das células em suspensão, sendo este fato visível especialmente nas últimas 50 horas do cultivo.

Foi feita uma tentativa de cálculo da constante de adesão celular, porém realizando uma análise crítica dos dados experimentais, percebe-se que este valor está mascarado pela intensa queda de concentração de células em suspensão ocorrida na fase de adesão. Assim, este parâmetro passa a não ter sentido e, portanto, não será utilizado quando houver queda intensa da concentração celular. A Figura 5.7 mostra o resultado da taxa específica de adesão, que foi de  $0,163 \text{ h}^{-1}$ .

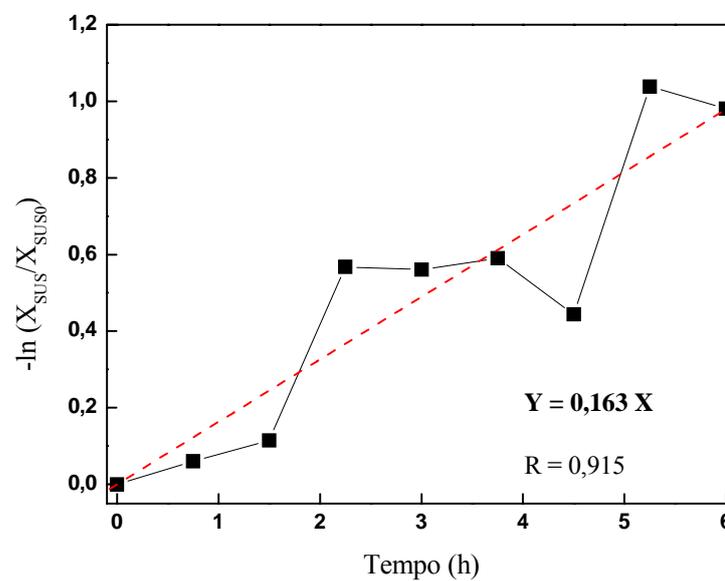


Figura 5.7 – Determinação da taxa específica de adesão ( $k_A$ ) do experimento 1. A reta pontilhada foi obtida através de regressão linear.

Os resultados obtidos no experimento 1 serviram para mudanças quanto à realização dos próximos experimentos, como alteração da quantidade de  $\text{CO}_2$  presente na atmosfera da incubadora. Assegurou-se que o pH, após a adição de

NaOH na fase de preparo do microcarregador, estivesse em torno de 7,0 e não a 8,5 como recomenda o fabricante.

### **5.2.2 Resultados e análise do segundo experimento**

O segundo experimento foi realizado nas mesmas condições do experimento 1, excetuando-se a quantidade de CO<sub>2</sub> presente na atmosfera da incubadora. Pensava-se que, desta maneira, poder-se-ia controlar de forma adequada o pH, desde o início do experimento. No preparo do microcarregador procurou-se que o pH da solução, da água destilada e dos microcarregadores, após a incubação em hidróxido de sódio, estivesse em torno de 7,0 e não no valor de 8,5 recomendado pelo fabricante do microcarregador. Assim, o experimento 2 foi inoculado com  $3,0 \cdot 10^5$  células/mL, em atmosfera de 14 % de CO<sub>2</sub>, agitação magnética de 60 rpm, concentração de NaHCO<sub>3</sub> de 3,7 g/L em 300 mL de meio de cultura. O resultado geral obtido no experimento 2 pode ser visualizado na Figura 5.8.

A nova estratégia adotada, no experimento 2, de aumentar a quantidade de CO<sub>2</sub> na estufa revelou-se pouco adequada, pelo menos com respeito à concentração das células aderidas. Estas foram em média 18 vezes menores que a quantidade inicial de inóculo. Por outro lado, a viabilidade das células em suspensão apresentou um melhoramento comparado ao experimento 1. Também ocorreu uma queda significativa na viabilidade após 48 horas de cultivo.

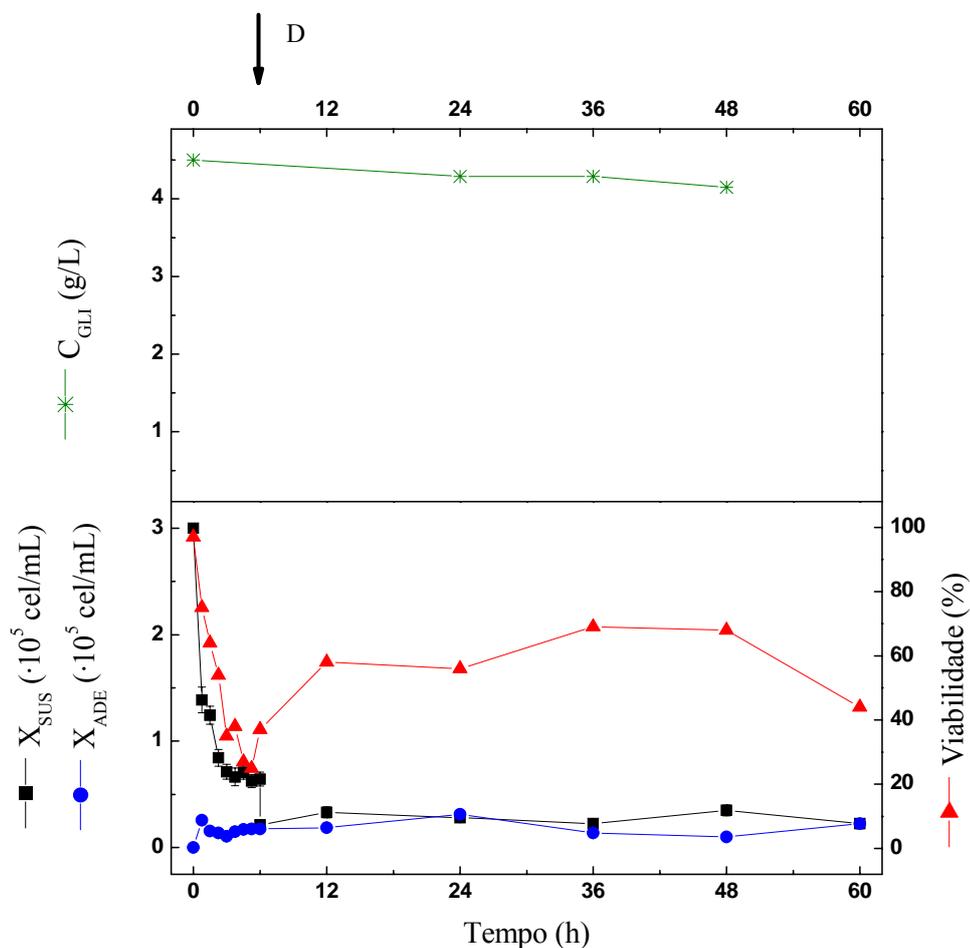


Figura 5.8 – Resultados do experimento 2 no cultivo da célula CHOZMD utilizando microcarregador Cytoline 1 (20,67 g/L) em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM. O experimento foi realizado a 60 rpm,  $\text{NaHCO}_3$  3,7 g/L e 14 %  $\text{CO}_2$ . D indica a diluição de 1:3 realizada na fase de adesão.

Nota-se uma acentuada queda no valor da concentração das células em suspensão para os primeiros 45 minutos do cultivo. Através de um simples balanço de massa celular, sem considerar crescimento neste curto intervalo de tempo, avalia-se que a queda em aproximadamente  $1,0 \cdot 10^5$  células/mL, uma vez que no tempo de 45 minutos a quantidade de células aderidas aos microcarregadores é irrisória e não aumenta com o passar do tempo.

Neste experimento estabeleceu-se um equilíbrio entre as células aderidas aos microcarregadores e as células em suspensão. Mesmo assim, optou-se em não

prosseguir com o experimento 2 pois os valores de concentração das células aderidas eram tão ruins quanto as do experimento 1.

Em função dos resultados obtidos, procedeu-se a novas alterações nas condições de cultivo para alcançar-se um desempenho satisfatório nos futuros experimentos.

### **5.2.3 Resultados e análise do terceiro experimento**

A alteração mais simples e barata para ser implementada na realização de novas condições dos cultivos foi de diminuir a quantidade de  $\text{NaHCO}_3$  acrescentada ao meio de cultura. Reduziu-se a concentração de  $\text{NaHCO}_3$  de 3,7 g/L para 1,85 g/L. Por tratar-se de uma redução significativa na quantidade de  $\text{NaHCO}_3$  contido no meio de cultura, metade do valor inicial, também foi diminuído a atmosfera de  $\text{CO}_2$  de 14% para 12%. Isto foi realizado para um possibilitar um melhor tamponamento do pH do meio de cultura. Mantendo-se as demais condições dos cultivos realizados anteriormente, inóculo de  $3,0 \cdot 10^5$  células/mL concentração de microcarregador de 20,67 g/L e agitação de 60 rpm. A Figura 5.9 apresenta os resultados do experimento 3.

Não se notou nenhuma alteração dos resultados comparados ao experimento 2. A concentração média de células aderidas, ao longo de experimento 3, correspondeu a um valor 20 vezes menor que o respectivo inóculo. A viabilidade das células em suspensão apresentou um comportamento semelhante ao experimento 2, porém com uma suave queda após 48 horas de cultivo.

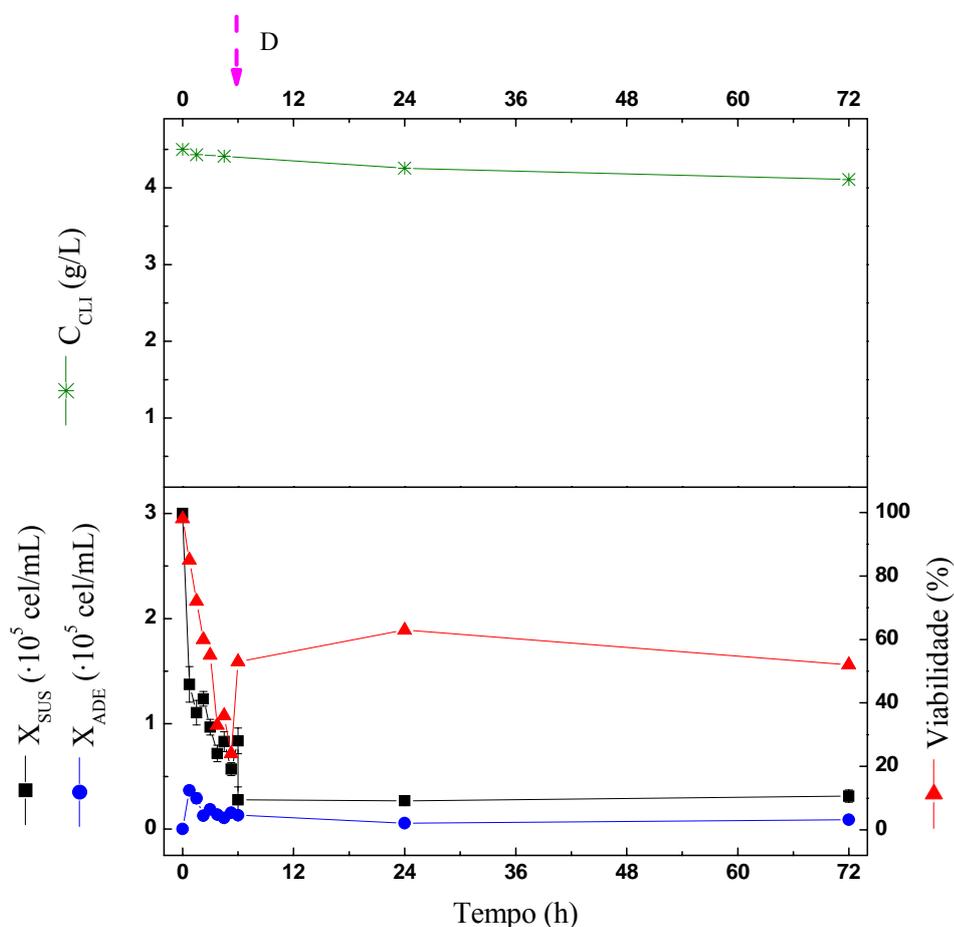


Figura 5.9 - Resultados do experimento 3 no cultivo da célula CHOZMD utilizando microcarregador Cytoline 1 (20,67 g/L) em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM. Experimento realizado a 60 rpm,  $\text{NaHCO}_3$  1,85 g/L e 12 %  $\text{CO}_2$ . D indica a diluição de 1:3 realizada na fase de adesão.

Estabeleceu-se o equilíbrio entre as células aderidas aos microcarregadores e as células em suspensão após a fase de adesão celular (6 primeiras horas) indicando que o pH manteve-se, de uma forma geral, com o mesmo valor no meio de cultura.

Observou-se também uma taxa elevada de queda de concentração celular, podendo ser verificada por um balanço de massa celular na fase de adesão do experimento 3. A queda neste caso pode ter sofrido influência do equilíbrio estabelecido entre a atmosfera de  $\text{CO}_2$ , mantida em 12%, e a quantidade de

NaHCO<sub>3</sub> presente no meio de cultura, ou seja do pH, comprovando assim a necessidade de se controlar com maior rigor o pH do experimento.

A redução da quantidade de NaHCO<sub>3</sub> no meio de cultivo pode ter favorecido a adesão e, portanto, uma menor queda, porém não foi o suficiente para que o cultivo evoluísse com um bom padrão de crescimento.

Novas mudanças nas condições do cultivo da célula CHOZMD foram necessárias. A principal delas foi o melhor acompanhamento e controle do pH, e a diminuição da quantidade de NaHCO<sub>3</sub> para ¼ do valor habitual empregado.

#### **5.2.4 Resultados e análise do quarto experimento**

O quarto experimento foi realizado tendo como mudanças principais a diminuição da quantidade de NaHCO<sub>3</sub> para 0,925 g/L, e o acompanhamento e controle do pH através de um maior número de trocas de meio ao longo do experimento. Eram retirados 150 mL de meio de cultura do frasco spinner, sendo substituídos pela mesma quantidade de meio de cultura fresco, para controlar o pH do meio de cultura no spinner. Utilizou-se um inóculo de  $3,0 \cdot 10^5$  células/mL, rotação do agitador magnético de 60 rpm, concentração de microcarregador de 20,67 g/L e atmosfera de CO<sub>2</sub> a 10%. Os resultados do experimento 4 são apresentados na Figura 5.10.

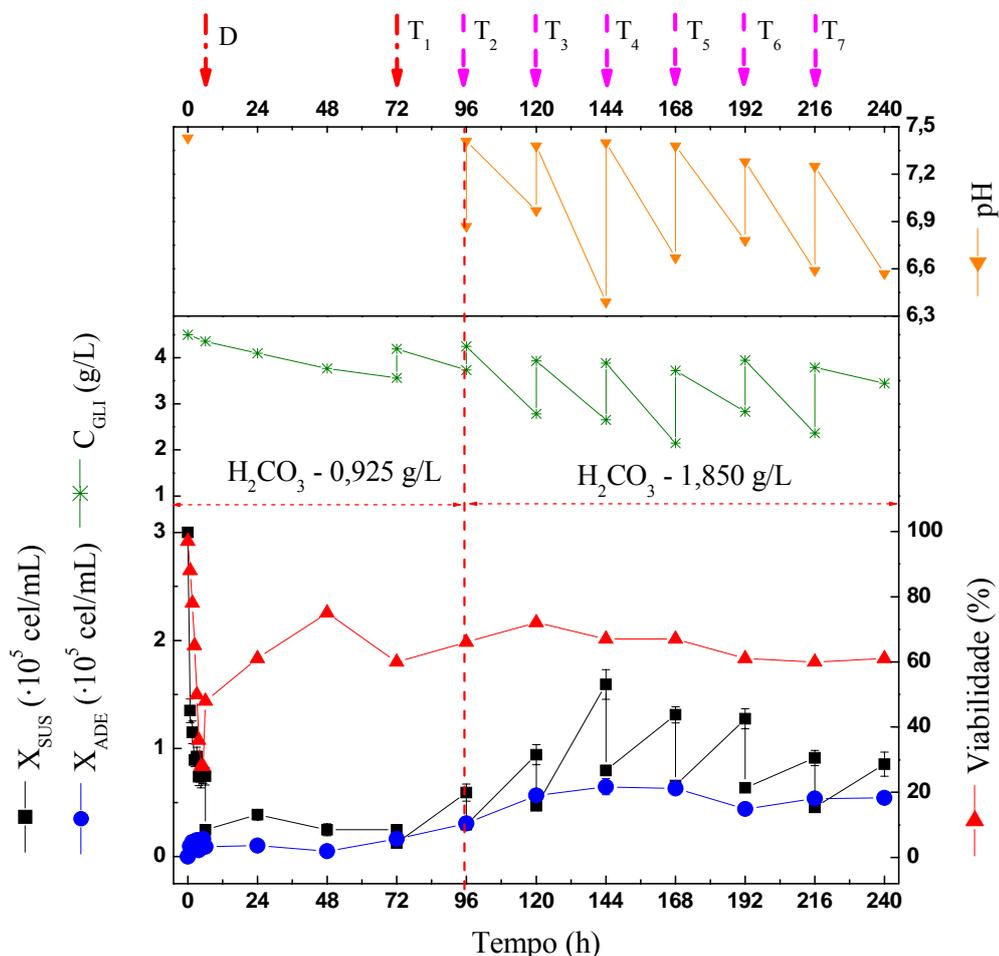


Figura 5.10 - Resultados do experimento 4 no cultivo da célula CHOZMD utilizando microcarregador Cytoline 1 (20,67 g/L) em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM. Experimento realizado a 60 rpm,  $NaHCO_3$  0,925 g/L e 10%  $CO_2$ . D indica a diluição de 1:3 realizada na fase de adesão. T<sub>1</sub> a T<sub>7</sub> representam as trocas de meio. A partir de 96 horas as trocas de meio foram realizadas contendo 1,85 g/L de  $NaHCO_3$ .

Foi possível observar algum progresso no crescimento das células aderidas no experimento 4, apesar da fase lag ter se prolongado por dois dias. O valor máximo atingido após 144 horas de cultivo foi de  $0,64 \cdot 10^5$  células/mL, este valor foi 4,6 vezes menor que o inóculo adicionado. O monitoramento e o controle de pH também contribuíram para a melhor adaptação das células. Assim, o consumo de glicose pelas células foi significativamente aumentado como consequência do crescimento das células.

Pode-se observar neste experimento que a viabilidade celular recua a partir do segundo dia, assim como apresentado nos cultivos anteriores, porém, a queda está acompanhada da adesão das células aos microcarregadores, como pode ser observado na Figura 5.10 para o tempo de 72 horas.

O número elevado de trocas de meio de cultura é justificado pelo controle implementado para diminuir as oscilações de pH ao longo do cultivo. Foi necessário adicionar quantidades extras de  $\text{NaHCO}_3$  ao meio de cultura, isto é as trocas de meio foram repostas com 1,85 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  a partir do tempo de 96 horas, e não mais com o valor de 0,925 g/L de  $\text{NaHCO}_3$ .

Continuou existindo intensa queda celular na fase de adesão (6 primeiras horas do cultivo) apesar de todas as modificações implementadas, contribuindo para aumentar as suspeitas da rejeição da célula pela matriz do microcarregador e também da possibilidade da modificação genética introduzida na linhagem celular, por envolver produção de moléculas que afetam a adesão celular, estar relacionada com a pobre adesão das células aos microcarregadores.

Foi possível, pela primeira vez, devido ao crescimento das células aderidas, estimar os valores da velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e a produtividade máxima celular ( $P_{\text{máx}}$ ). A Figura 5.11 apresenta os resultados da estimativa do valor da velocidade específica máxima de crescimento celular, considerando apenas o intervalo de tempo entre 72 e 120 horas. O valor obtido para  $\mu_{\text{máx}}$  foi de  $0,025 \text{ h}^{-1}$  ou  $0,60 \text{ d}^{-1}$ . Não é recomendável realizar comparações do valor obtido para a taxa máxima específica de crescimento celular com outros trabalhos, uma vez que o crescimento das células aderidas neste experimento está aquém do satisfatório.

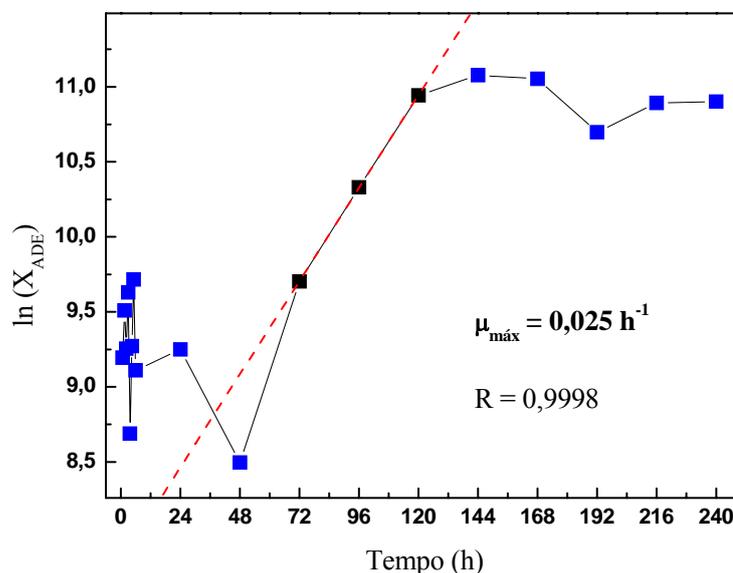


Figura 5.11 – Determinação da taxa específica máxima de crescimento celular do experimento 4. A reta pontilhada foi obtida através de regressão linear utilizando somente os pontos negros.

O valor da produtividade foi calculado a partir da análise da Figura 5.10, utilizando-se o tempo de 144 horas, com respeito às células aderidas. A produtividade celular estimada foi de 444 cel/mL·h.

Outra relação importante do ponto de vista da engenharia é a relação células aderidas por microcarregador, também conhecida como células aderidas por partículas. Como o microcarregador Cytoline 1 é maior que muitos microcarregadores disponíveis comercialmente, a comparação com a maioria dos outros microcarregadores torna-se impraticável. Neste experimento, para a correta estimativa da relação célula por partícula foram pesadas 7 amostras de microcarregadores e em seguida contadas manualmente. Por fim, o valor médio encontrado do número de partículas presentes em 1 grama de microcarregador Cytoline 1 foi de 1075 partículas. A relação célula/partícula pode ser observada na

Figura 5.12. O valor máximo alcançado foi de 3257 células para cada partícula de microcarregador.

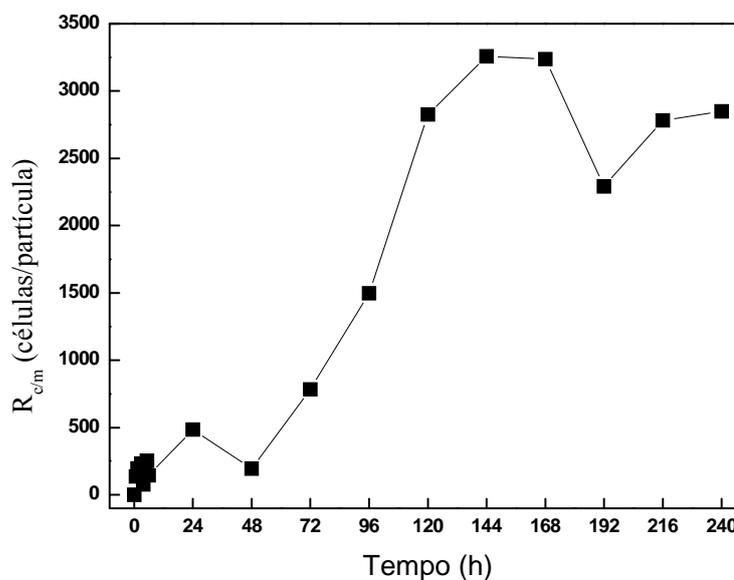


Figura 5.12 – Relação células por microcarregador ou células por partícula obtida durante o experimento 4.

Apesar das modificações realizadas para o cultivo celular no experimento 4, adoção de menos  $\text{NaHCO}_3$  ao meio de cultura e controle do pH, os resultados ainda não foram satisfatórios. Deste modo foi realizada uma revisão mais crítica da literatura com o intuito de solucionar o problema da concentração das células aderidas. Verificou-se que seria necessário um inóculo significativamente mais elevado, em torno de  $2,0 \cdot 10^6$  células/mL, porém, alguns autores não dizem como obtêm este valor de inóculo e alguns omitem as primeiras horas de cultivo. Ou seja, o inóculo deveria ser multiplicado por um fator 6,6 vezes maior do que o adotado em todos os experimentos anteriores. Isto implica na manipulação de um grande número de frascos T.

### 5.2.5 Resultados e análise do quinto experimento

O quinto experimento foi conduzido após duas outras tentativas, nas quais houve contaminação dos frascos T, devido ao número elevado destes necessários para produzirem um inóculo de  $2,0 \cdot 10^6$  células/mL. Normalmente utiliza-se entre 2 a 3 frascos T de  $150 \text{ cm}^2$  de área superficial, neste experimento foram utilizados 14 frascos T para o preparo do inóculo. O valor obtido como inóculo do experimento 5 foi de  $1,53 \cdot 10^6$  células/mL, que corresponde a 76,5% do valor encontrado na literatura. Adotou-se a concentração de  $\text{NaHCO}_3$  do experimento 4, 0,925 g/L. Foi alterada a rotação magnética para 40 rpm, valor recomendado pelo fabricante do microcarregador Cytoline1. Pois, inicialmente, pretendia-se comparar os experimentos anteriores com o trabalho de Swiech (2003), no qual os cultivos também foram realizados a 60 rpm. Durante o preparo do inóculo as células cresceram em atmosfera de  $\text{CO}_2$  a 5%, e portanto o experimento 5 foi realizado nestas novas condições. O resultado geral obtido durante o experimento 5 pode ser visto na Figura 5.13.

O crescimento das células aderidas no experimento 5 foi maior e mais prolongado. A quantidade máxima obtida foi de  $1,39 \cdot 10^6$  células/mL no tempo de 228 horas, sendo este valor menor que o inóculo. As células apresentaram uma fase lag de 48 horas, como nos demais experimentos. A partir das 48 horas observa-se uma queda na viabilidade na suspensão, ocasionando o início do crescimento das células aderidas, sendo visível o surgimento de um crescimento exponencial logo em seguida.

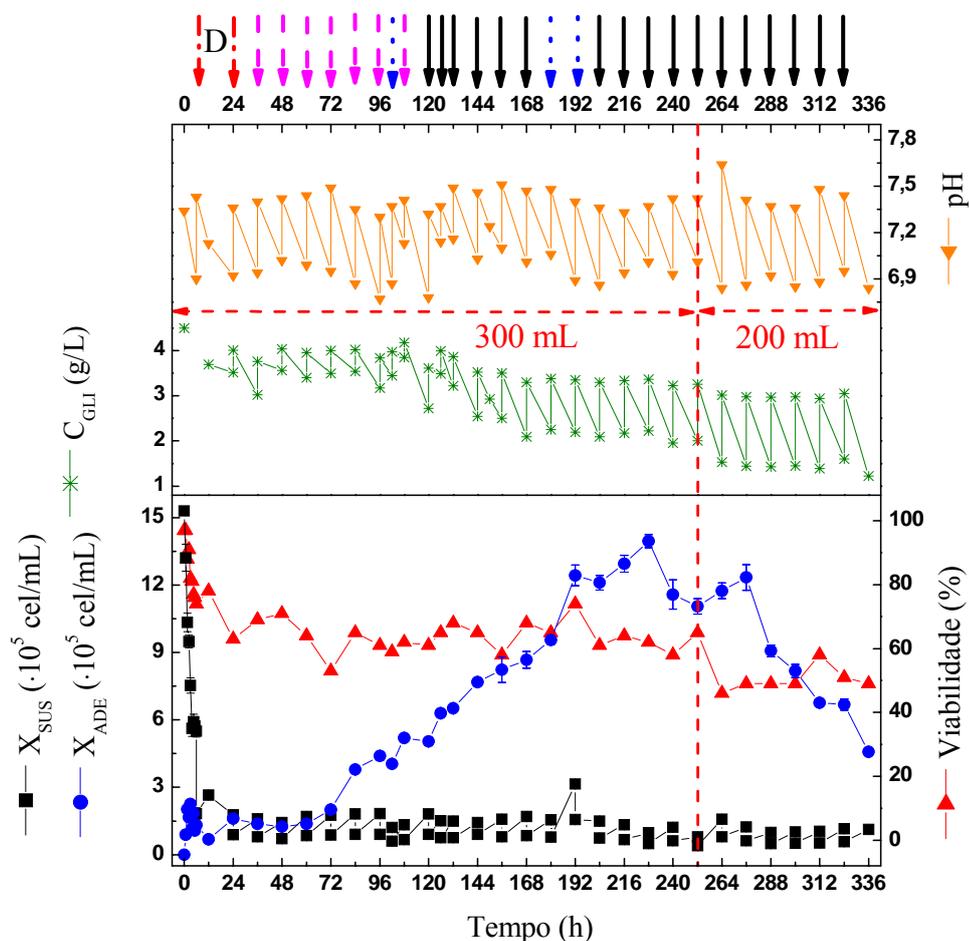


Figura 5.13 - Resultados do experimento 5 no cultivo da célula CHOZMD utilizando microcarregador Cytoline 1 (20,67 g/L) em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM. Experimento realizado a 40 rpm,  $\text{NaHCO}_3$  0,925 g/L, 5 %  $\text{CO}_2$  e inóculo de  $1,53 \cdot 10^6$  células/mL. D indica a diluição de 1:3 realizada na fase de adesão. As setas das cores vermelhas, rosas, e pretas representam os instantes de troca de meio contendo  $\text{NaHCO}_3$  em diferentes concentrações, 0,925 g/L, 1,85 g/L e 3,7 g/L, respectivamente. As setas azuis consistiam de trocas 1:1 de 1,85 g/L e 3,7 g/L. A partir do tempo de 252 horas o volume foi reduzido para 200 mL.

Para conseguir-se o adequado monitoramento e controle do pH do meio de cultivo no frasco spinner foi necessária a realização de várias trocas de meio ao longo do experimento 5. Ao todo foram realizadas 28 trocas de meio, correspondente à utilização de aproximadamente 4 litros de meio de cultura. Além disso, os valores de  $\text{NaHCO}_3$  adicionados em cada troca foram determinados em virtude da oscilação ocorrida nas medidas do pH. A partir de 252 horas foi

diminuído o volume de meio presente no frasco spinner com o intuito de controlar satisfatoriamente o pH. Observa-se, contudo, que o pH após a adição do meio de cultura na troca realizada às 264 horas apresentou o maior valor de todo experimento 5. Este valor pode ser explicado pelo fato da troca ter sido realizada com o meio de cultura tendo a coloração vermelho-rósea, indicando um pH em torno de 8.

As células em suspensão tiveram uma acentuada queda da concentração celular nas primeiras horas do cultivo, tendo se estabilizado posteriormente. Na época da realização do ensaio, duas explicações foram encontradas como mais possíveis. A primeira especulava que a causa da queda da concentração celular possa ser devido a ausência de compatibilidade entre a célula e a matriz do microcarregador, já que ambas são negativamente carregadas. A segunda sustentava que a modificação genética da linhagem CHO-K1 pode ter afetado a adesão celular através da desintegrina recombinante e como consequência contribuir para a queda da concentração celular.

A agitação branda adotada durante a realização do experimento 5 ocasionou uma melhora na viabilidade das células em suspensão, em especial no período de adesão celular. Mas, não mostrou influência na queda da concentração celular, já que a concentração das células da suspensão foi diminuída por um fator de 5,6.

Foi estimado o valor da velocidade específica máxima de crescimento celular para as células aderidas aos microcarregadores como sendo de  $0,01 \text{ h}^{-1}$  ou  $0,24 \text{ d}^{-1}$ . A região de interesse utilizada na estimativa de  $\mu_{\text{máx}}$  está apresentada na Figura 5.14, e corresponde aos valores de 84 horas a 192 horas. Este resultado

pode apenas ser comparado ao experimento 4, pois nos demais casos não houve crescimento exponencial.

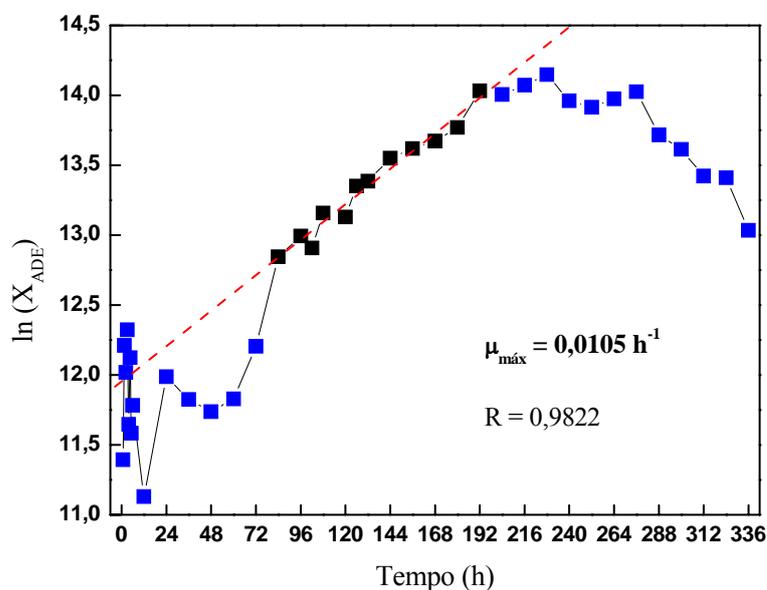


Figura 5.14 – Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular do experimento 5. A reta pontilhada foi obtida através de regressão linear utilizando somente os pontos negros.

O valor da taxa específica de crescimento celular do experimento 5 foi comparado aos valores reportados na literatura para cultivos empregando o microcarregador Cytoline 1, como pode ser observado na Tabela 5.1.

O valor encontrado para  $\mu_{máx}$  no experimento 5 mostrou-se coerente após a comparação com os dados da literatura, apesar de que outras linhagens celulares e equipamentos terem sido utilizados para a realização dos cultivos. Isto implica que possam ocorrer problemas similares ao encontrado nos experimentos realizados neste trabalho, frente os cultivos apresentados na literatura, uma vez que os trabalhos encontrados utilizavam inóculos com alta concentração celular. Assim, pode ser explicada a necessidade do alto inóculo de  $2,0 \cdot 10^6$  células/mL recomendado pelo próprio fabricante do microcarregador.

Tabela 5.1 – Comparação dos valores de  $\mu_{\text{máx}}$  do experimento 5 com os valores encontrados na literatura para cultivos realizados com Cytoline 1.

Referência	$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{d}^{-1}$ )	Equipamento	Célula
Presente trabalho	0,24	Spinner	CHOZMD
Goldman <i>et al.</i> (1998)	0,24	Cytopilot	rCHO-K1
Landauer <i>et al.</i> (2002)	0,36	Garrafa rotatória	CHO-K1
Durrschmid <i>et al.</i> (2003)	0,18 a 0,7	Cytopilot	RCHO

Com relação à produtividade, esta foi estimada a partir da análise da Figura 5.13 utilizando-se o intervalo entre 0 horas e 228 horas, com respeito às células aderidas. A produtividade estimada foi de 6096 cel/mL.h.

A relação célula/partícula pode ser observada na Figura 5.15, o valor máximo alcançado foi de aproximadamente 83000 células/partícula, no tempo de 228 horas. A fase de crescimento iniciou com 6000 células/partícula, logo, durante o experimento houve um aumento das células aderidas aos microcarregadores em 13 vezes.

Com o intuito de comparar os valores obtidos na concentração das células aderidas aos microcarregadores deste experimento com os trabalhos da literatura foram definidas, no item 4.2.3, duas formas distintas de apresentar a concentração das células aderidas. A Figura 5.16 apresenta a concentração das células aderidas por mL de microcarregador, esta é a forma mais usual, apresentada ao utilizarmos o microcarregador Cytoline 1, para expressar  $X_{\text{ADEm}}$ . O valor máximo encontrado foi de  $1,96 \cdot 10^7$  células/mL de microcarregador, no tempo de 204 horas.

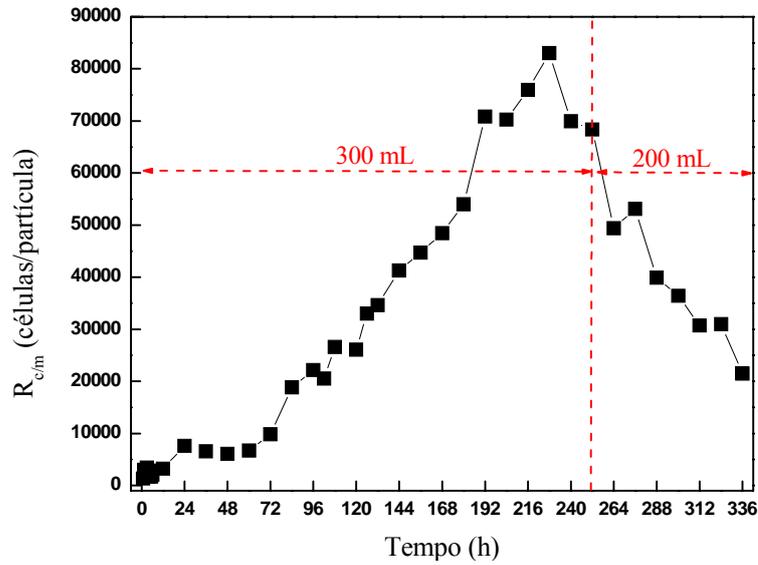


Figura 5.15 – Relação células por microcarregador ( $R_{c/m}$ ) ou células por partícula obtida durante o experimento 5.

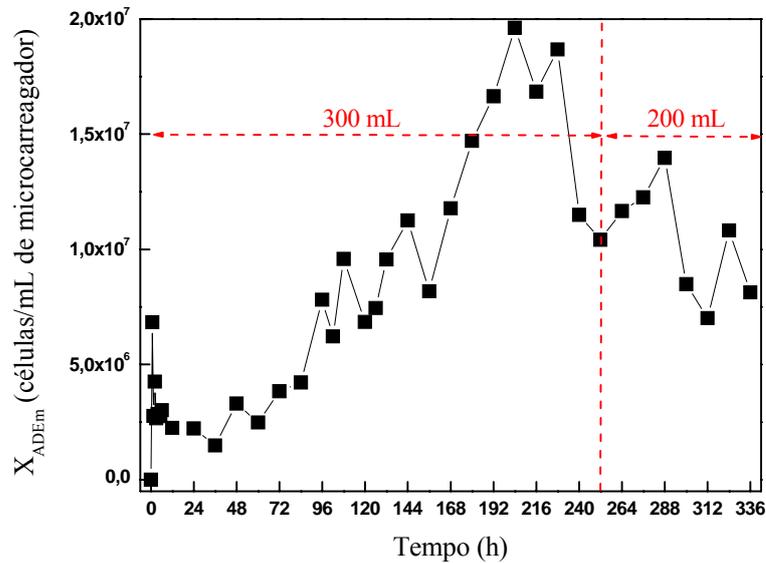


Figura 5.16 – Concentração das células aderidas por mL de microcarregador obtida durante o experimento 5.

De um modo geral, o experimento 5 mostrou a forte dependência da concentração das células aderidas ao microcarregador Cytoline 1 com respeito ao inóculo utilizado, o que é confirmado pelos dados da literatura ao utilizarem o inóculo de  $2,0 \cdot 10^6$  células/mL.

### 5.2.6 Resultados e análise do sexto experimento

O sexto experimento foi realizado usando a linhagem selvagem CHO-K1, ao invés da célula recombinante CHOZMD. O objetivo era verificar a existência da possível influência da modificação genética na adesão celular ao microcarregador Cytoline 1, ou melhor, a interferência da desintegrina recombinante produzida ou de moléculas similares na adesão da célula CHOZMD. Foram adotadas as mesmas condições iniciais do experimento 5, exceto o valor do inóculo. Neste experimento foram utilizados 14 frascos T de 150 cm<sup>2</sup> para o preparo do inóculo, cujo valor foi de  $2,84 \cdot 10^6$  células/mL. Novamente a incubadora de CO<sub>2</sub> foi mantida em 5%, pois as células depois de descongeladas adaptaram-se a essa condição satisfatoriamente. O resultado geral obtido durante o experimento 6 pode ser visualizado na Figura 5.17.

O crescimento das células CHO-K1 aderidas aos microcarregadores no sexto experimento apresentou uma fase lag menor, e como consequência, a concentração máxima foi obtida em um tempo mais curto quando comparado com o quinto experimento.

A concentração máxima das células aderidas foi de  $1,65 \cdot 10^6$  células/mL no tempo de 156 horas, sendo este valor o mais alto alcançado em todos os experimentos realizados. Contudo, o crescimento celular ficou aquém do imaginado, nem ao menos foi atingido o valor do inóculo. Isto implica que a modificação genética introduzida na linhagem CHOZMD não influenciou a adesão celular. Por este motivo a incompatibilidade entre a célula e a matriz do microcarregador permanece como suspeita do pobre crescimento celular, contrariando, deste modo, o fabricante do microcarregador Cytoline 1.

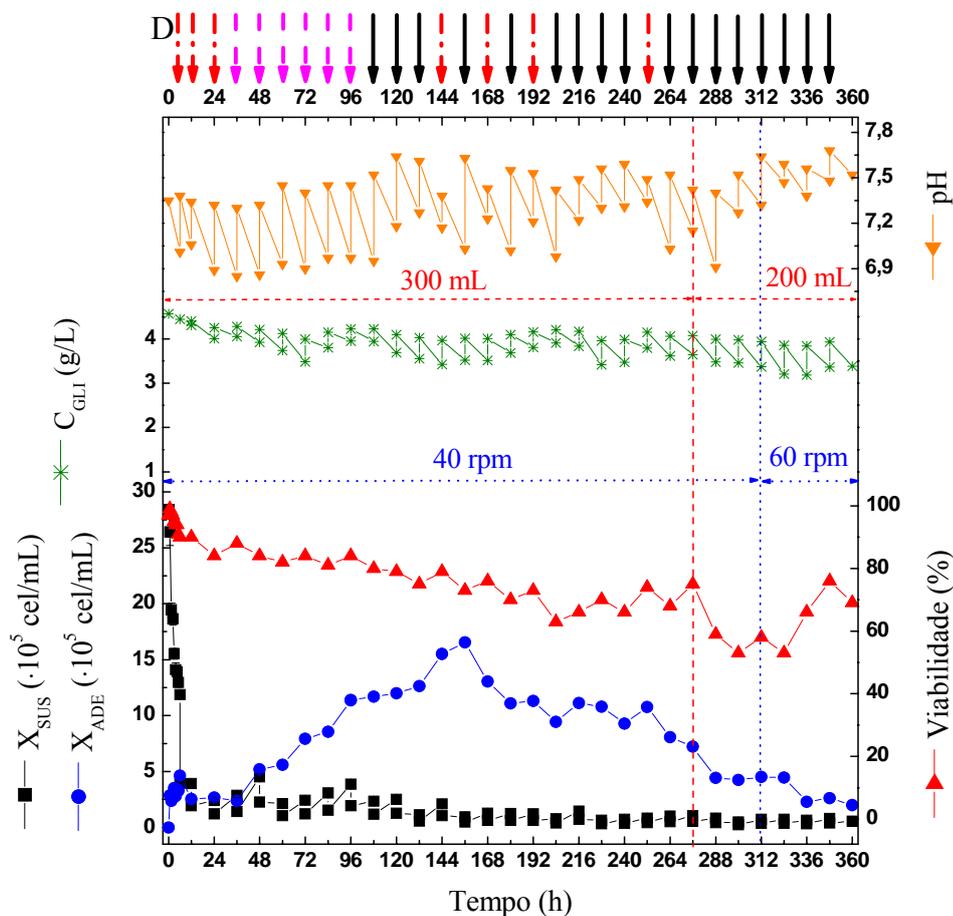


Figura 5.17 – Resultados do experimento 6 no cultivo da célula selvagem CHO-K1 utilizando microcarregador Cytoline 1 (20,67 g/L) em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM. Experimento realizado a 40 rpm (0–272 h), a 60 rpm (272–360h),  $\text{NaHCO}_3$  0,925 g/L, 5 %  $\text{CO}_2$  e inóculo de  $2,84 \cdot 10^6$  células/mL. D indica a diluição de 1:3 realizada na fase adesão. As setas das cores vermelhas, rosas e pretas representam os instantes de troca de meio contendo  $\text{NaHCO}_3$  em diferentes concentrações, 0,925 g/L, 1,85 g/L e 3,7 g/L, respectivamente. A partir do tempo de 312 horas o volume foi reduzido para 200 mL.

Quanto à viabilidade, esta se manteve num decréscimo suave até o tempo de 312 horas, onde se aumentou a agitação para 60 rpm. Imaginava-se que com o aumento da agitação houvesse uma melhora na quantidade de células aderidas, já que esta proporcionaria um aumento na transferência de oxigênio para o meio de cultura, o que não acabou ocorrendo. É muito provável que, devido à alta concentração de células no meio de cultura desde o início e ao longo do

experimento, houvesse o acúmulo de metabólitos prejudiciais ao crescimento da célula, como amônia e ácido láctico, principais subprodutos do metabolismo celular. A diminuição do volume foi realizada para reduzir a quantidade de trocas de meio de cultura, que passou a ser de 100 mL, ao invés de 150 mL.

Foram realizadas 29 trocas de meio de cultura, correspondente à utilização 4 litros de meio de cultura, para monitorar e controlar o pH do experimento 6. Houve porém uma tendência de aumento no valor do pH, o que pode ser explicado devido ao armazenamento do meio de cultura a 4°C, em geladeira. Nestas situação, o meio torna-se básico, passando de uma coloração de vermelha para vermelho-rósea. As trocas de meio de cultura correspondentes, na Figura 5.17, ao intervalo de tempo entre 132 a 184 horas mostram a forte influência do  $\text{NaHCO}_3$  no controle do pH, podendo desta forma atenuar o problema de alteração de pH do meio de cultura quando armazenado a 4°C.

A velocidade específica máxima de crescimento celular foi estimada, para o intervalo de tempo entre 48 a 108 horas, em  $0,015 \text{ h}^{-1}$  ou  $0,36 \text{ d}^{-1}$ , sendo apresentada na Figura 5.18. O valor é superior ao encontrado no quinto experimento que foi realizado com a linhagem CHO-K1 recombinante. O valor estimado é, portanto, representativo, devido à semelhança com valores de outros trabalhos da literatura. A produtividade com respeito às células aderidas foi de  $10596 \text{ células/mL}\cdot\text{h}$ .

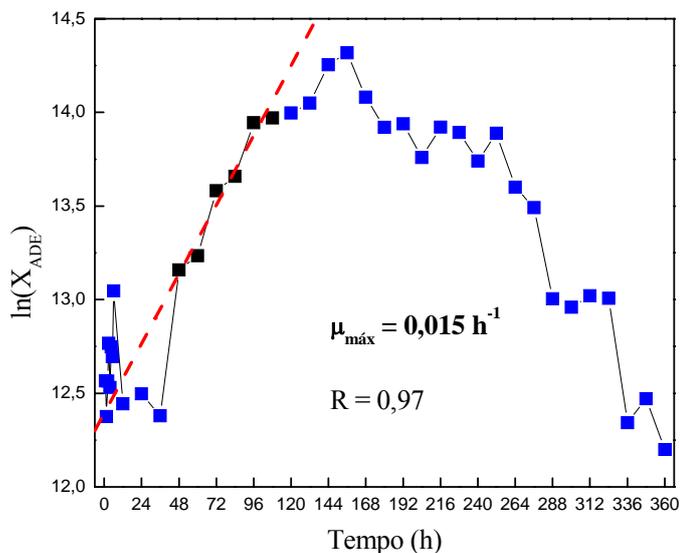


Figura 5.18 – Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular do experimento 6. A reta pontilhada foi obtida através de regressão linear utilizando somente os pontos negros.

O comportamento da relação célula/partícula pode ser observada na Figura 5.19, o valor máximo alcançado corresponde a aproximadamente 97000 células por partícula, para o tempo de 156 horas. A fase de crescimento iniciou com 13000 células/partícula, durante o experimento houve um aumento das células aderidas aos microcarregadores de 7 vezes.

A Figura 5.20 apresenta a concentração das células aderidas por mL de microcarregador, o valor máximo encontrado foi de  $1,71 \cdot 10^7$  células/mL de microcarregador, no tempo de 156 horas.

A célula selvagem CHO-K1 apresentou, de uma forma geral, os mesmos problemas que a linhagem recombinante CHOZMD, ausência de adesão celular e intensa queda da concentração celular nas primeiras horas de cultivo. Neste experimento a alta concentração de inóculo utilizada,  $2,84 \cdot 10^6$  células/mL, proporcionou uma menor fase lag e por isto a concentração máxima de células

aderidas foi atingida em um intervalo de tempo menor, 156 horas, comparado ao experimento anterior de 228 horas.

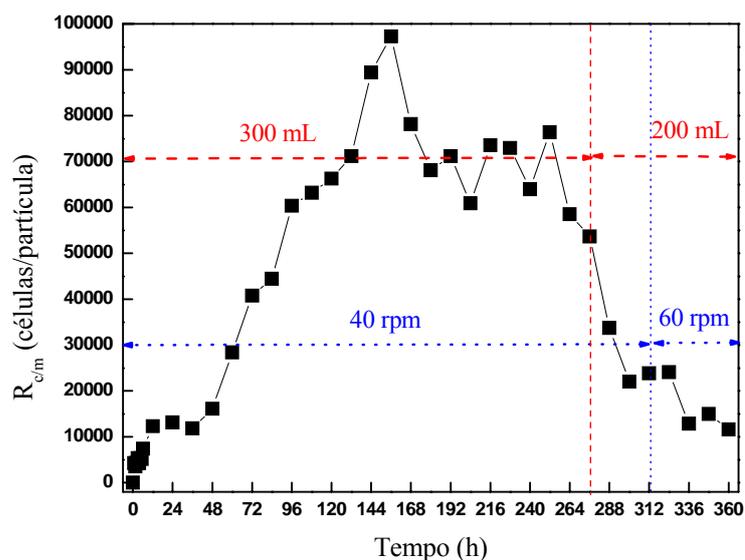


Figura 5.19 – Relação célula por microcarregador ( $R_{c/m}$ ) ou célula por partícula obtida durante o experimento 6.

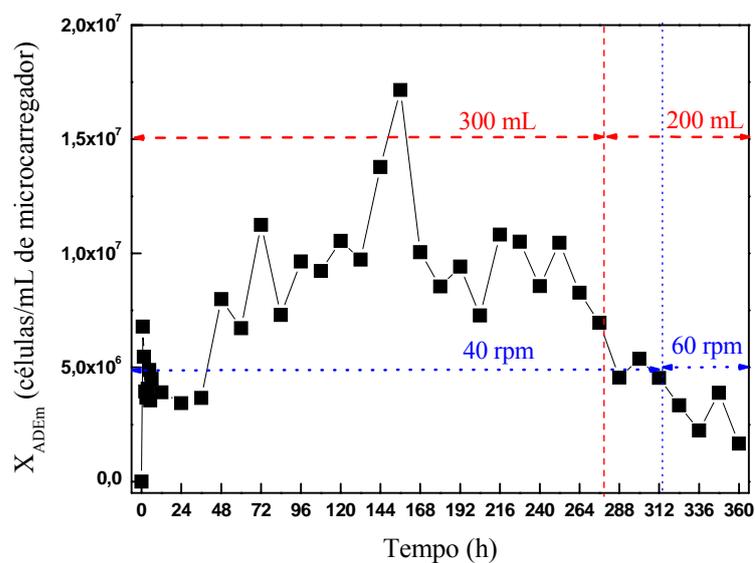


Figura 5.20 – Concentração das células aderidas por mL de microcarregador durante o experimento 6.

### 5.2.7 Resultados e análise do sétimo experimento

O sétimo experimento foi realizado com a linhagem CHO-K1 selvagem tendo como inóculo  $7,0 \cdot 10^5$  células/mL. As mesmas condições iniciais dos experimentos 5 e 6 foram adotadas, isto é, meio de cultura DMEM contendo  $\text{NaHCO}_3$  a 0,925 g/L, agitação de 40 rpm, incubadora de  $\text{CO}_2$  a 5%, fase de adesão celular nas primeiras seis horas do experimento, e a realização de trocas do meio de cultura visando a correção do pH. O resultado do experimento 7 é apresentado na Figura 5.21.

Observou-se que o crescimento das células aderidas no experimento 7 foi baixo, pois, após a fase lag, de dois dias, o valor máximo da concentração de  $4,90 \cdot 10^5$  células/mL, para 84 horas de cultivo, correspondeu a 70 % do valor do inóculo.

A viabilidade da suspensão manteve-se acima de 60 %, sendo reflexo do monitoramento e o controle do pH devido ao grande número de trocas de meio de cultura. Porém, a intensa queda da concentração celular ocorrida na fase inicial (seis primeiras horas do cultivo) foi também confirmada. Esse comportamento, desta vez, só pode ser atribuído à incompatibilidade entre a célula CHO-K1 e a matriz do microcarregador, composta de polietileno e sílica. Este resultado é coerente com o obtido por Swiech (2003) que, ao utilizar o microcarregador Immobasil FS, cuja matriz é à base de sílica, obteve o pior desempenho na comparação com os demais microcarregadores testados.

O valor da velocidade específica máxima de crescimento das células aderidas foi de  $0,023 \text{ h}^{-1}$ , Figura 5.22. Porém, este valor não é representativo pois

na sua estimativa foram utilizados apenas três pontos, correspondentes ao intervalo entre 48 a 84 horas.

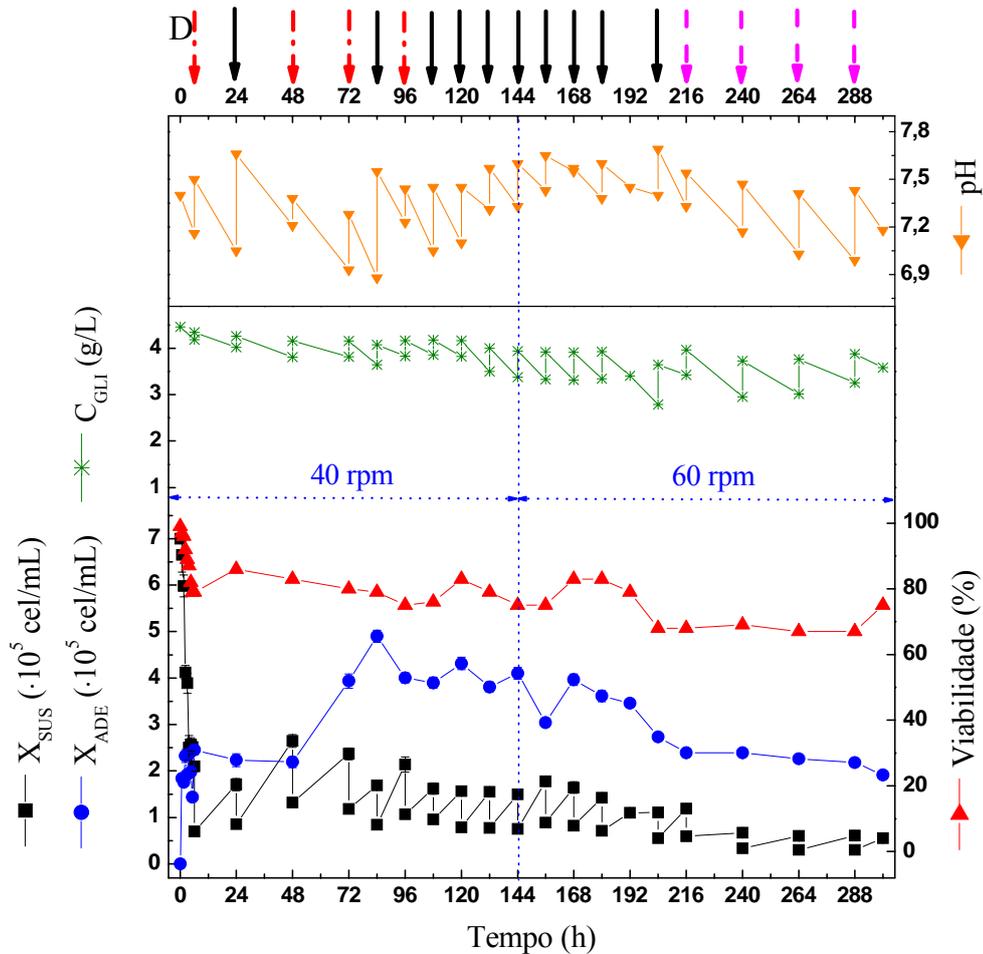


Figura 5.21 – Resultados do experimento 7 no cultivo da célula selvagem CHO-K1 utilizando microcarregador Cytoline 1 (20,67 g/L) em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM. Experimento realizado a 40 rpm (0–144 h), a 60 rpm (144–300h),  $\text{NaHCO}_3$  0,925 g/L, 5%  $\text{CO}_2$  e inóculo de  $7,0 \cdot 10^5$  células/mL. D indica a diluição de 1:3 realizada na fase adesão. As setas das cores vermelhas, rosas e pretas representam os instantes de troca de meio contendo  $\text{NaHCO}_3$  em diferentes concentrações, 0,925 g/L, 1,85 g/L e 3,7 g/L, respectivamente.

A relação célula/partícula pode ser observada na Figura 5.23, o valor máximo alcançado corresponde a aproximadamente 26500 células por partícula, para o tempo de 84 horas. A Figura 5.24 apresenta a concentração das células

aderidas por mL de microcarregador, o valor máximo encontrado foi de  $4,87 \cdot 10^6$  células/mL de microcarregador, no tempo de 84 horas.

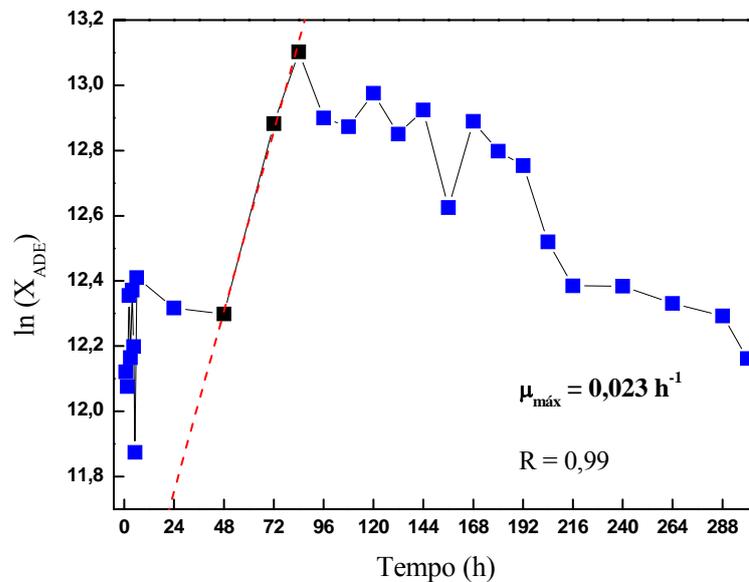


Figura 5.22 – Determinação da velocidade específica de crescimento celular do experimento 7. A reta pontilhada foi obtida através da regressão linear utilizando somente os pontos negros.

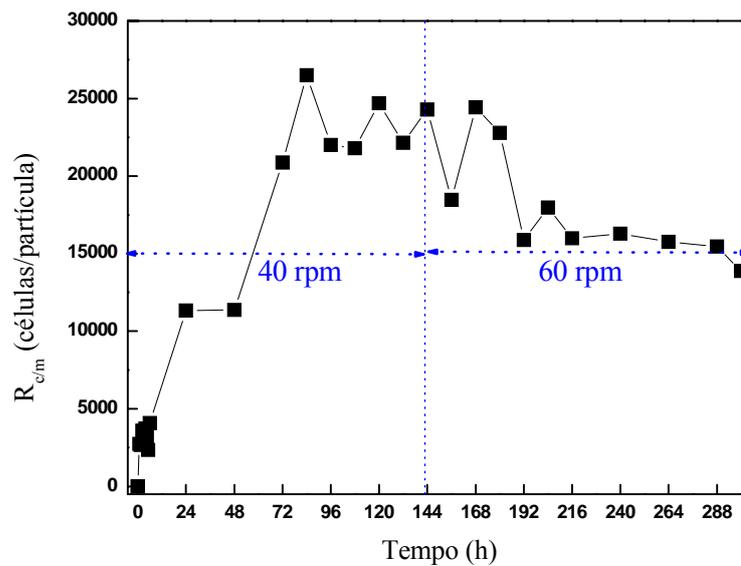


Figura 5.23 – Relação células por microcarregador ( $R_{c/m}$ ) ou células por partícula obtida durante o experimento 7.

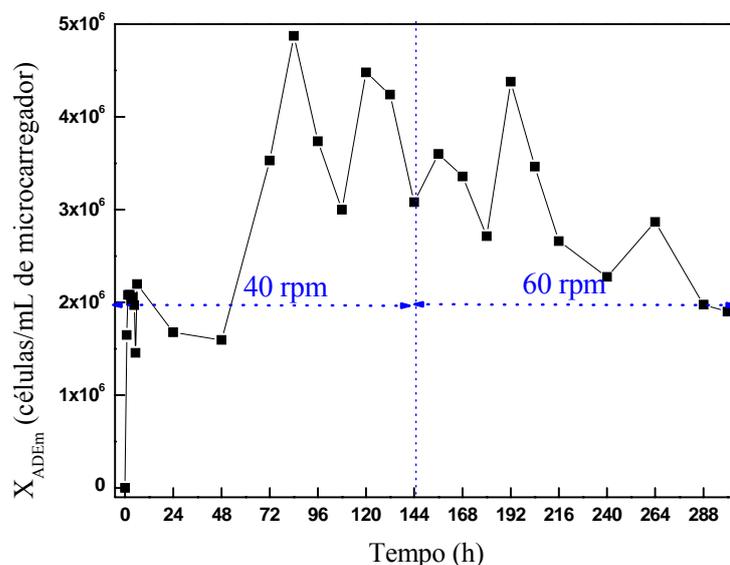


Figura 5.24 – Concentração das células aderidas por mL de microcarregador durante o experimento 7.

Ao fim deste experimento era visível a presença de uma crosta de cor branca acinzentada presente na parte interna do frasco spinner. As imagens adquiridas por microscópio revelaram a presença de células viáveis aderidas à parede do frasco confirmada pela Figura 5.25. Além deste experimento, os experimentos 6 e 7 apresentaram a formação da crosta branca acinzentada na parede interna do frasco spinner. A presença de células aderidas à parede do frasco spinner contribuiu para a queda da concentração celular nas primeiras horas dos experimentos realizados. Salienta-se que o frasco não passou por nenhum tipo de tratamento além do procedimento de autoclavagem como apresentado na Figura 4.1.

Após o experimento 7 fez-se um experimento visando verificar a presença de células aderidas à parede do frasco spinner após as 6 primeiras horas de cultivo. Assim após a fase de adesão o meio de cultura foi substituído por tripsina sendo feita em seguida a quantificação das células viáveis e não viáveis. Os

valores encontrados não permitiram o fechamento do balanço celular. Isto é, houve a queda da concentração celular e estas células não foram quantificadas por estarem aderidas à parede do frasco spinner.

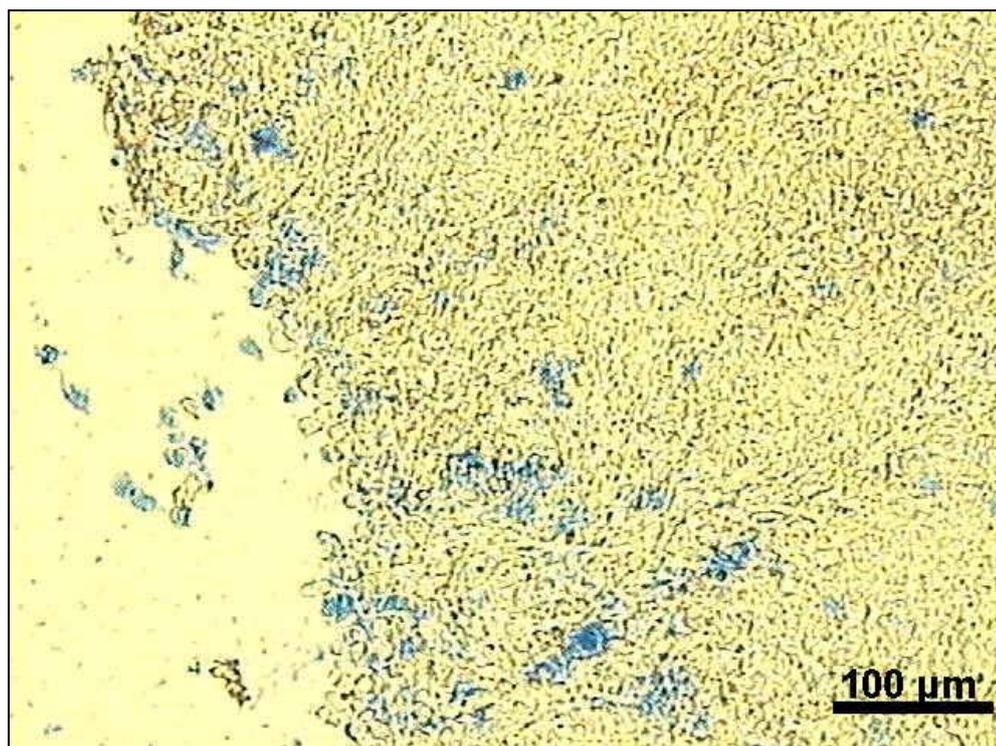


Figura 5.25 – Imagem ampliada em 100 vezes das células CHO-K1 aderidas à parede interna do frasco spinner adquirida ao término do experimento 7. As células coradas em azul representam células não viáveis e as demais são células viáveis.

### ***5.3 Comparação do desempenho do microcarregador Cytoline 1 nos experimentos com as células CHOZMD e CHO-K1 e considerações gerais***

Os experimentos foram comparados com respeito ao crescimento das células aderidas aos microcarregadores, o consumo de glicose e relação entre

células/partícula. A Tabela 5.2 apresenta as principais características dos experimentos realizados.

Tabela 5.2 – Comparação das principais características dos experimentos realizados.

Experimento	Célula	Inóculo (células/mL)	Agitação (rpm)	CO <sub>2</sub> (%)	NaHCO <sub>3</sub> (g/L)	pH
E1	CHOZMD	$3,0 \cdot 10^5$	60	10	3,700	sem
E2	CHOZMD	$3,0 \cdot 10^5$	60	14	3,700	sem
E3	CHOZMD	$3,0 \cdot 10^5$	60	12	1,850	sem
E4	CHOZMD	$3,0 \cdot 10^5$	60	10	0,925	com
E5	CHOZMD	$1,5 \cdot 10^6$	40	5	0,925	com
E6	CHO-K1	$2,8 \cdot 10^6$	40 e 60	5	0,925	com
E7	CHO-K1	$7,0 \cdot 10^5$	40 e 60	5	0,925	com

Na coluna do pH, sem e com referem-se a se houve ou não controle do pH do experimento.

A Figura 5.26 apresenta os valores de comparação do crescimento das células aderidas de todos os experimentos realizados. A diminuição da concentração de NaHCO<sub>3</sub> utilizada nos experimentos favorece o crescimento das células aderidas, pois possibilita um melhor monitoramento e controle do pH do meio de cultivo, este fato é observado ao comparar-se o experimento 4, com os experimentos 1, 2 e 3, na Figura 5.26. A célula CHOZMD demonstra possuir as fases lag e estacionária mais longas que as da célula CHO-K1, isto é observado ao compararmos os experimentos 4 e 5 e com os experimentos 6 e 7.

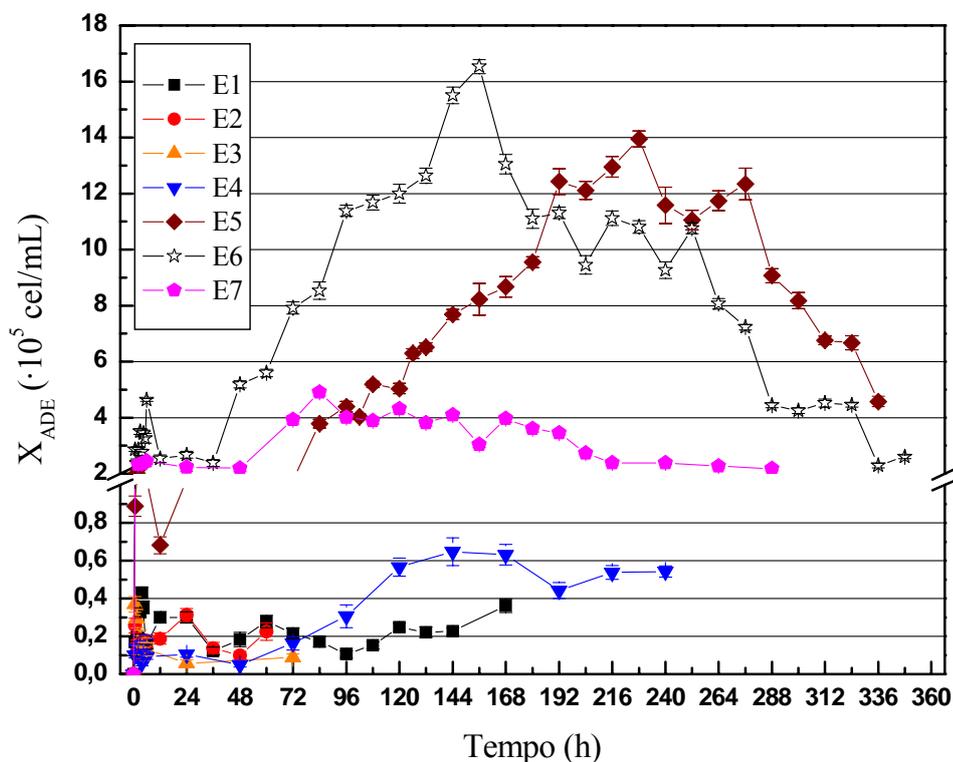


Figura 5.26 – Desempenho do crescimento das células aderidas aos microcarregadores realizado nos 7 experimentos em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura DMEM.

A Figura 5.27 apresenta os valores do consumo de glicose nos experimentos realizados com célula CHOZMD e CHO-K1. Os valores de concentração de glicose final foram superiores a 1 g/L em todos os experimentos. O experimento 4 quando comparado com os experimentos 1, 2 e 3, nas primeiras 72 horas, mostrou-se mais eficiente, pois mais células foram formadas nesse período de tempo. O valor alcançado para a concentração de glicose no tempo de 72 horas para o experimento 4 foi de 3,5 g/L, enquanto que os experimentos 1, 2 e 3 permaneceram acima de 4 g/L, comprovando a existência de melhores condições de cultivo quando se inicia a cultura com concentração de  $\text{NaHCO}_3$  de 0,92 g/L. A linhagem CHO-K1 selvagem apresentou um melhor rendimento que a CHOZMD no consumo de glicose para produção de células, pois os valores finais

da concentração de glicose foram, de modo geral, superiores a 3,0 g/L, não existindo limitação de crescimento celular por carência de substrato.

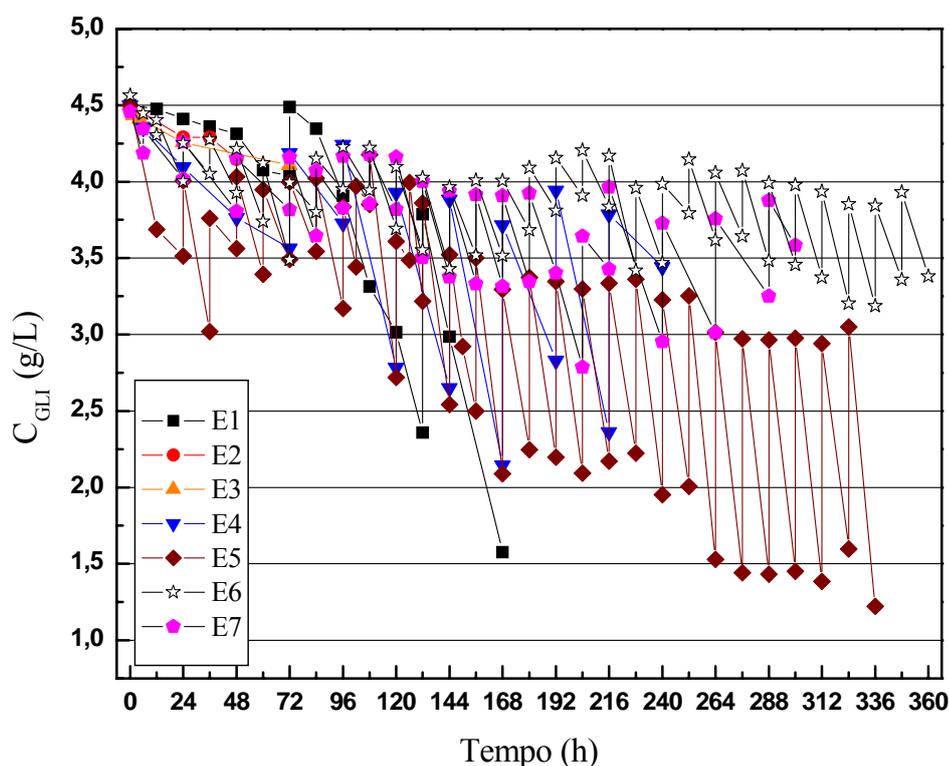


Figura 5.27 – Desempenho do consumo de glicose ao longo dos 7 experimentos realizados em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura.

É claramente visível para ambas as células, na análise da Figura 5.27, a forte dependência existente entre o consumo de glicose pelas células e o aumento do número de trocas do meio de cultura com a concentração de células no inóculo.

A relação células por partícula ou células por microcarregador obtidas nos experimentos são apresentadas na Figura 5.28. Novamente, torna-se evidente o progresso alcançado durante a execução de experimentos com alto valor de inóculo, e a adoção de estratégias de controle do pH do meio de cultivo, como as inúmeras trocas de meio realizadas.

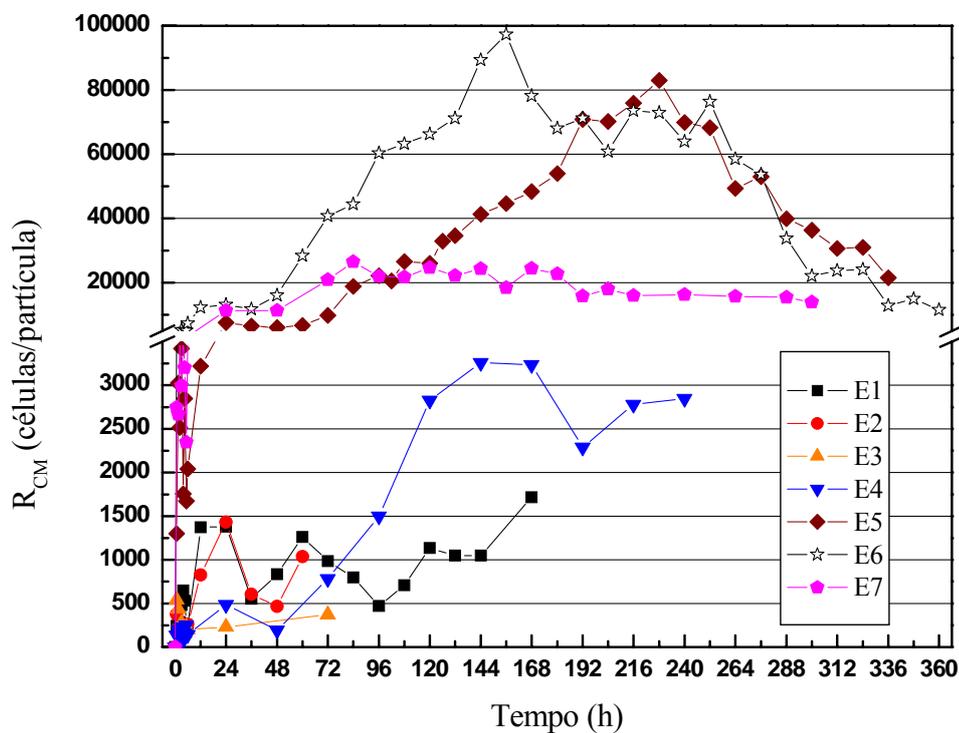


Figura 5.28 – Desempenho da relação células por partícula dos 7 experimentos realizados em frasco spinner de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura.

Por fim, são apresentados na Tabela 5.3 os valores das constantes estimadas,  $\mu_{\text{máx}}$ ,  $P_{\text{máx}}$  e o maior valor encontrado para a concentração de células aderidas.

Por meio de imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do aparelho PHILIPS XL-30 FEG, realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural vinculado ao Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, pode-se observar algumas características do microcarregador Cytoline1, apresentadas nas Figuras 5.29 e 5.30. Na Figura 5.29 houve uma ampliação de 100 vezes, o retângulo vermelho refere-se a superfície onde foi feita a ampliação de 200 vezes, Figura 5.30.

Tabela 5.3 – Comparação de alguns parâmetros de cultivo importantes dos 7 experimentos realizados.

Experimento	$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$P_{\text{máx}}$ (células/mL·h)	$X_{\text{ADE}}$ (células/mL)
E4	0,025	444	$0,64 \cdot 10^5$
E5	0,010	6096	$1,39 \cdot 10^6$
E6	0,010	10596	$1,65 \cdot 10^6$
E7	0,023	5833	$4,90 \cdot 10^5$

OBS: Nos experimentos E1, E2 e E3  $\mu_{\text{máx}}$  e  $P_{\text{máx}}$  não foram calculados, enquanto que  $X_{\text{ADE}}$  não estava disponível.

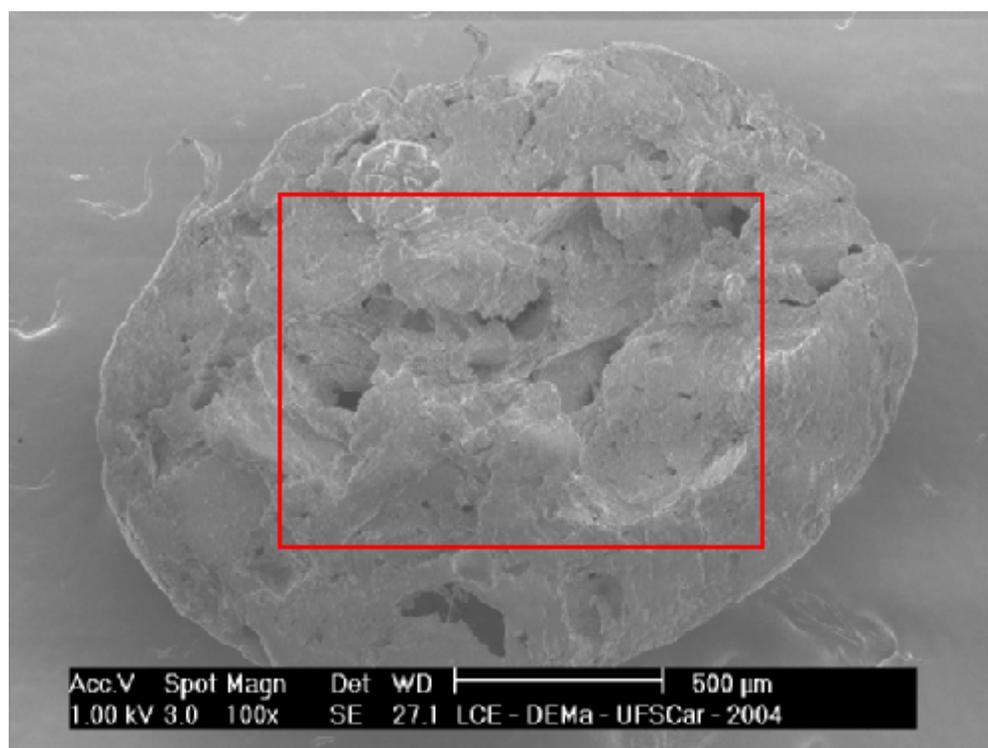


Figura 5.29 – Superfície porosa do microcarregador Cytoline 1 com um aumento de 100 vezes.

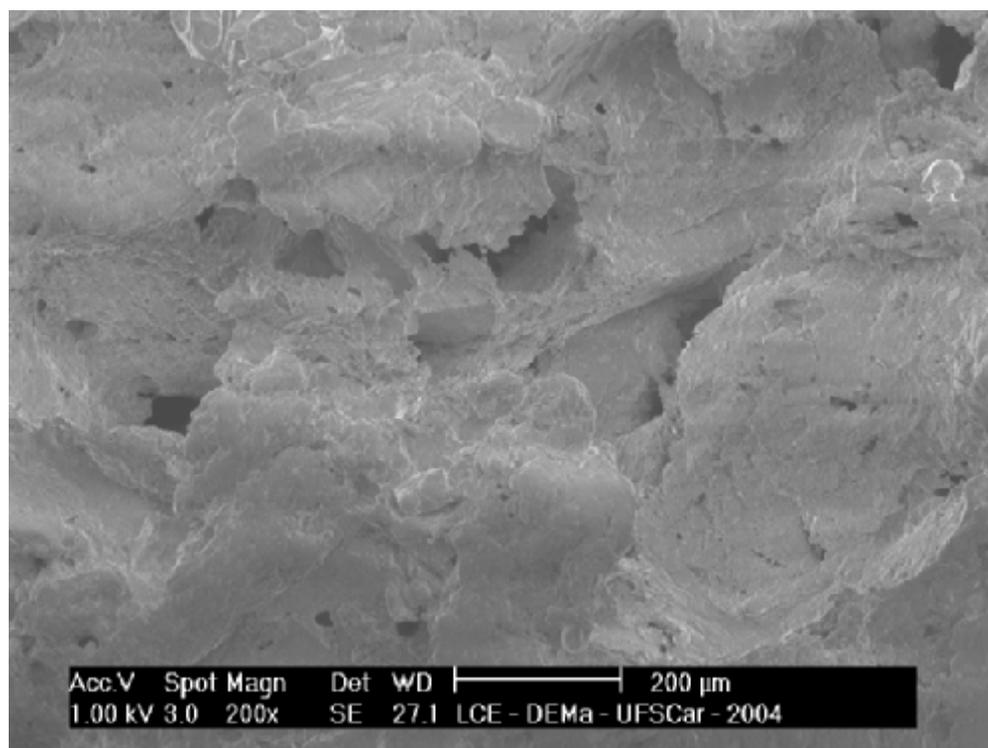


Figura 5.30 – Superfície relativa ao retângulo vermelho da Figura 5.29.

Nota-se a estrutura porosa e superfície irregular do microcarregador, sendo o diâmetro médio seco de 2 mm, concordando com os dados do fabricante.

Tentou-se caracterizar a carga elétrica superficial do microcarregador Cytoline 1 através de medidas do potencial zeta utilizando um zetâmetro da marca Malvern Instruments. O resultado da medida do potencial zeta em água milli-q encontrado foi de  $-19,65$  mV. Este valor é a média de três medidas realizadas ( $-24,57$  mV,  $-16,83$  mV e  $-17,55$  mV) para a mesma amostra. Assim, o número da carga elétrica superficial do microcarregador acentua a baixa adesão celular da linhagem CHO-K1.

Sabe-se, por meio dos resultados obtidos por Swiech (2003) e Castelo da Silva (2004), realizados no laboratório de Cultivo de Tecnologia de Célula Animal do DEQ/UFSCar, que a detecção da desintegrina foi conseguida através

de reação de imunodeteção em membrana de nitrocelulose, no cultivo da célula CHOZMD utilizando o microcarregador Cytodex 1. Ressalta-se que o meio de cultivo utilizado, CHO-SFMII, não continha proteínas, uma vez que a presença das mesmas dificulta a detecção da desintegrina.

Nos experimentos realizados neste trabalho com as células CHOZMD não foi feita detecção da proteína em virtude de, primeiro, não ter ocorrido um crescimento satisfatório das células aderidas, já que em todos os experimentos os valores alcançados estiveram abaixo do inóculo. Segundo, por não ter sido utilizado meio livre de soro e, terceiro, por estar em fase de execução o desenvolvimento de uma metodologia para a separação e purificação da desintegrina.

#### **5.4 *Recomendações a serem seguidas no preparo do inóculo em spinner***

Para um satisfatório cultivo de célula CHOZMD em frasco spinner contendo microcarregadores Cytoline 1 é imprescindível um inóculo na magnitude de  $2,0 \cdot 10^6$  células/mL, bem como, o controle e o monitoramento adequados do pH e a utilização de meio de cultura contendo inicialmente 0,92 g/L de  $\text{NaHCO}_3$ . Desta forma, após o início da fase exponencial de crescimento celular proceder-se-ia a transferência dos microcarregadores colonizados para o biorreator de leito fixo.

## CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES

### 6 CONCLUSÕES

A respeito dos experimentos realizados em frasco spinner utilizando o microcarregador Cytoline 1 no cultivo da célula recombinante CHOZMD pode-se dizer que a adesão celular não é satisfatória ao utilizar-se a concentração de inóculo na ordem de  $3,0 \cdot 10^5$  células/mL. Ao utilizar um inóculo significativamente maior, aproximadamente  $2,0 \cdot 10^6$  células/mL, a baixa adesão celular é compensada pelo elevado número de células presentes na suspensão.

O crescimento da célula CHOZMD nos microcarregadores possui uma forte dependência da concentração do inóculo. O resultado mais expressivo foi obtido no experimento 5, onde estimou-se em  $0,01 \text{ h}^{-1}$  ( $0,24 \text{ d}^{-1}$ ) o valor da taxa específica máxima de crescimento celular,  $\mu_{\text{máx}}$ . Este valor foi obtido por outros autores, embora em outras condições experimentais, mas tendo em comum a presença do microcarregador Cytoline 1 e da linhagem celular CHO.

A melhor produtividade com respeito às células CHOZMD aderidas foi de 6096 células/mL·h para o experimento 5 realizado a 40 rpm,  $\text{NaHCO}_3$  0,925 g/L, 5%  $\text{CO}_2$  e inóculo de  $1,53 \cdot 10^6$  células/mL.

A respeito dos experimentos realizados com a célula selvagem CHO-K1 em frasco spinner contendo os microcarregadores Cytoline 1 pode-se afirmar que a matriz do microcarregador, composta de polietileno e sílica, é responsável pelos níveis discretos de adesão e crescimento celular, por isso a célula adere-se à

parede do frasco spinner. A modificação genética existente na linhagem CHOZMD não causou modificações perceptíveis nas características de adesão celular da linhagem selvagem CHO-K1.

O crescimento celular da célula CHO-K1 nos microcarregadores possui uma forte dependência da concentração do inóculo. O valor encontrado da velocidade é superior ao valor da célula CHOZMD, correspondendo a  $0,015 \text{ h}^{-1}$  ou  $0,36 \text{ d}^{-1}$ .

## CAPÍTULO 7 – SUGESTÕES

### 7 SUGESTÕES

Testar o procedimento de preparo de inóculo utilizado para a realização do experimento 5 realizado a 40 rpm,  $\text{NaHCO}_3$  0,925 g/L, 5%  $\text{CO}_2$  e inóculo em torno de  $2,0 \cdot 10^6$  células/mL num biorreator de leito fixo. Para evitar os problemas de formação de espuma detectados neste trabalho recomenda-se a utilização de meio livre de soro. Caso o meio livre de soro ainda apresente formação excessiva de espuma, recomenda-se a adição de um agente antiespumante ou a adoção de um sistema de oxigenação sem borbulhamento. Neste último caso, a utilização de membranas de silicone pode ser uma alternativa eficiente, barata e sem estar sujeita a restrições pelos órgãos reguladores por utilização de aditivos químicos.

## CAPÍTULO 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amersham Biosciences [online]. <http://www.amershambiosciences.com>, acessado em dezembro de 2002.

ATKINSON, B. e MAVITUNA, F.. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. Stockton Press, 1991.

BAILEY, J. E., e OLLIS, D. F.. Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill Book Company, New York, 1986.

CARTWRIGHT, T.. Animal Cells as Bioreactors. U.S.A., Cambridge University Press, 1994.

CASTELO da SILVA, G. M.. Contribuição ao desenvolvimento de metodologia de detecção de desintegrina recombinante produzida em cultivos de célula CHO-K1. São Carlos: UFSCar, 2004. Dissertação de Mestrado.

CHISTI, M. Y.. Airlift Bioreactors. London: Elsevier Applied Science, 1989.

DOYLE, A. e GRIFFITHS, J. B.. Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. John Wiley & Sons, 1998.

DÜRRSCHMID, M.; LANDAUER, K.; SIMIC, G.; BLÜML, G. e DOBLHOFF-DIER, O.. Scalable Inoculation Strategies for Microcarrier-Based Animal Cell Bioprocesses. Biotechnology and Bioengineering, v. 83, n. 6, p. 681-686, 2003.

FLEISCHAKER R. J. e SINSKEY, A. J.. Oxygen demand and supply in cell culture. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, v. 12, p. 193-197, 1981.

FRESHNEY, R. I.. Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique. Wiley-Liss, 1994.

GOLDMAN, M. H.; JAMES, D. C.; RENDALL, M.; ISON, A. P.; HOARE, M. e BULL, A. T.. Monitoring Recombinant Human Interferon-Gamma N-Glycosylation During Perfused Fluidized-Bed and Stirred-Tank Batch Culture of CHO Cells. Biotechnology and Bioengineering, v. 60, p. 596-607, 1998.

KENNARD, M. L. e PIRET, J. M.. Glycolipid Membrane Anchored Recombinant Protein Production from CHO Cells Cultured on Porous Microcarriers. Biotechnology and Bioengineering, v. 44, p. 45-54, 1994.

KONG, D.; CARDAK, S.; CHEN, M.; GENTZ, R. e ZHANG, J.. High cell density and productivity culture of Chinese hamster ovary cells in a fluidized bed bioreactor. Cytotechnology, v. 29, p. 215-220, 1999.

KRETZMER, G.. Industrial processes with animal cells. Applied Microbiology Biotechnology, v. 59, p. 135-142, 2002.

IEMMA, M. R. C.. Estudo das atividades biológicas de uma metaloproteinase desintegrina de veneno de serpente. São Carlos: UFSCar, 2002. Tese de Doutorado.

LANDAUER, K.; DÜRRSCHMID, M.; KLUG, H.; WIEDERKUM, S.; BLÜML, G. e DOBLHOFF-DIER, O.. Detachment factors for enhanced carrier to carrier transfer of CHO cell lines on macroporous microcarriers. Cytotechnology, v. 39, p. 37-45, 2002.

LUBINIECKI, A. S.. Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology. Marcel Dekker, Inc., 1990.

MASCARENHAS, P.. Parque nacional de empresas de biotecnologia, Fundação Biominas, Belo Horizonte, 2001. Disponível em [www.mct.gov.br](http://www.mct.gov.br), acessado em junho de 2004.

NG, Y.C.; BERRY, J. M. e BUTLER, M.. Optimization of physical parameters for cell attachment and growth on macroporous microcarriers. Biotechnology and Bioengineering, v. 50, p. 627-235, 1996.

ORR, T.. Verax System Scale-ups Recombinant Cell Culture-derived T-PA. Genetic Engineering News, v. 8 (2), p. 22-23, 1988.

PAPOUTSAKIS, E. T.. Media additives for protecting freely suspended animal cells against agitation and aeration damage. Trends in Biotechnology, v. 9, p. 316-324, 1991.

PHARMACIA, Microcarrier cell culture: principles and methods, 1981.

ROUILLER, C. O.. Análise, via modelação pseudo-homogênea, da transferência de calor em leito fixo e escoamento monofásico. São Carlos: UFSCar, 2000. Tese de Doutorado.

SPIER, R. E. e KADOURI, A.. The Evolution of Processes for the Commercial Exploitation of Anchorage-Dependent Animal Cells. Enzyme and Microbial Technology, v. 21, p. 2-8, 1997.

SWIECH, K.. Aumento de escala de frasco T para frasco spinner do cultivo da célula CHO-K1 para produção de uma proteína recombinante. São Carlos: UFSCar, 2003. Dissertação de Mestrado.

TAMPION, J. e TAMPION, M. D.. Immobilized cells: principles and applications, 1987.

WANG, M-D.; YANG, M.; NUZEL, N. e BUTLER, M.. Erythropoietin Production from CHO Cells Grown by Continuous Culture in a Fluidized-Bed Bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, v. 77 (2), p.194-203, 2002.

YANG, M. e BUTLER, M.. Effects of Ammonia on CHO Cell growth, Erythropoietin Production, and Glycosylation. Biotechnology and Bioengineering, v. 68, p. 370-380, 2000.

# APÊNDICE

Dados experimentais obtidos durante o experimento 1.

Tempo (h)	$X_{SUS} \cdot 10^5$ (cel/mL)	$X_{SU} \cdot 10^5$ (cel/mL)	Micro	$X_{ADE} \cdot 10^5$ (cel/mL)	$X_{AD} \cdot 10^5$ (cel/mL)	VIA (%)	Tempo (h)	$C_{GLI}$ (g/L)
0	3	0	0	0	0	97	0	4,49
0,75	2,825	0,127	8	0,168	0,025	88	12	4,47
1,5	2,675	0,142	5	0,193	0,021	81	24	4,41
2,25	1,700	0,143	15	0,190	0,023	69	36	4,35
3	1,712	0,126	10	0,328	0,023	57	48	4,31
3,75	1,662	0,122	30	0,431	0,027	51	60	4,07
4,5	1,925	0,122	8	0,353	0,032	46	72	4,03
5,25	1,062	0,116	5	0,175	0,021	27	72	4,48
6	1,125	0,136	30	0,156	0,021	38	84	4,34
6	0,375			0,156		38	84	4,34
12	0,525	0,079	34	0,300	0,030	48	96	3,90
24	0,375	0,062	12	0,300	0,030	48	108	3,31
36	0,425	0,089	20	0,121	0,021	50	120	3,01
48	0,450	0,082	57	0,185	0,038	67	132	2,35
60	0,350	0,071	33	0,278	0,031	57	132	3,78
72	0,500	0,057	15	0,215	0,026	53	144	2,98
72	0,250			0,215		53	144	2,98
84	0,450	0,082	16	0,171	0,027	39	168	1,57
96	0,712	0,112	7	0,106	0,017	63		
108	0,962	0,133	21	0,153	0,019	73		
120	1,137	0,185	30	0,246	0,022	65		
132	1,937	0,204	8	0,221	0,027	72		
132	0,968			0,221		72		
144	1,625	0,178	11	0,227	0,019	74		
168	2,837	0,190	34	0,362	0,036	73		

Dados experimentais obtidos durante o experimento 2.

Tempo (h)	$X_{SUS} \cdot 10^5$ (cel/mL)	$X_{SU} \cdot 10^5$ (cel/mL)	Micro	$X_{ADE} \cdot 10^5$ (cel/mL)	$X_{AD} \cdot 10^5$ (cel/mL)	VIA (%)	Tempo (h)	$C_{GLI}$ (g/L)
0	3	0	0	0	0	97	0	4,49
0,75	1,387	0,121	15	0,256	0,039	75	24	4,28
1,5	1,243	0,085	9	0,156	0,024	64	36	4,28
2,25	0,843	0,078	11	0,137	0,024	54	48	4,14
3	0,712	0,070	13	0,106	0,023	35		
3,75	0,664	0,082	24	0,150	0,032	38		
4,5	0,706	0,062	32	0,168	0,029	27		
5,25	0,625	0,060	30	0,175	0,029	25		
6	0,643	0,064	11	0,175	0,032	37		
6	0,214			0,175		37		
12	0,331	0,050	24	0,187	0,029	58		

Cont.

24	0,281	0,041	53	0,312	0,033	56
36	0,225	0,039	26	0,137	0,030	69
48	0,350	0,051	55	0,100	0,020	68
60	0,225	0,045	6	0,225	0,045	44

Dados experimentais obtidos durante o experimento 3.

Tempo (h)	$X_{SUS} \cdot 10^5$ (cel/mL)	$X_{SU} \cdot 10^5$ (cel/mL)	Micro	$X_{ADE} \cdot 10^5$ (cel/mL)	$X_{AD} \cdot 10^5$ (cel/mL)	VIA (%)	Tempo (h)	$C_{GLI}$ (g/L)
0	3	0	0	0	0	98	0	4,49
0,75	1,375	0,170	20	0,368	0,041	85	1,5	4,43
1,5	1,106	0,116	34	0,293	0,047	72	4,5	4,41
2,25	1,237	0,069	22	0,125	0,025	60	24	4,25
3	0,968	0,074	44	0,187	0,043	55	72	4,10
3,75	0,718	0,078	16	0,137	0,034	33		
4,5	0,831	0,095	4	0,106	0,033	36		
5,25	0,568	0,061	28	0,156	0,033	24		
6	0,837	0,122	24	0,131	0,034	53		
6	0,279	0,122		0,131	0,034	53		
24	0,268	0,043	43	0,056	0,020	63		
72	0,312	0,057	13	0,087	0,019	52		

Dados experimentais obtidos durante o experimento 4.

Tempo (h)	$X_{SUS} \cdot 10^5$ (cel/mL)	$X_{SU} \cdot 10^5$ (cel/mL)	Micro	$X_{ADE} \cdot 10^5$ (cel/mL)	$X_{AD} \cdot 10^5$ (cel/mL)	VIA (%)	Tempo (h)	$C_{GLI}$ (g/L)	pH
0	3	0	0	0	0	97	0	4,5	7,43
0,75	1,35	0,108	91	0,098	0,013	88	6	4,35	
1,5	1,15	0,105	39	0,135	0,023	78	24	4,09	
2,25	0,893	0,061	19	0,104	0,010	65	48	3,76	
3	0,925	0,086	125	0,152	0,022	50	72	3,56	
3,75	0,737	0,079	20	0,059	0,015	36	72	4,18	
4,5	0,737	0,102	72	0,106	0,020	28	96	3,72	6,87
5,25	0,756	0,078	62	0,165	0,039	28	96	4,24	7,41
6	0,743	0,079	30	0,090	0,011	48	120	2,78	6,97
6	0,247			0,090		48	120	2,78	6,97
24	0,387	0,049	26	0,104	0,014	61	120	3,92	7,38
48	0,250	0,055	39	0,049	0,011	75	144	2,65	6,39
72	0,250	0,035	106	0,163	0,035	60	144	3,88	7,4
72	0,125			0,163		60	144	3,88	7,4
96	0,593	0,078	65	0,306	0,059	66	168	2,14	6,67
96	0,296			0,306		66	168	2,14	6,67

Cont.									
120	0,943	0,093	50	0,565	0,047	72	168	3,71	7,38
120	0,471			0,565		72	168	3,71	7,38
144	1,593	0,137	56	0,646	0,073	67	192	2,82	6,78
144	0,796			0,646		67	192	2,82	6,78
168	1,312	0,075	75	0,631	0,054	67	192	3,94	7,28
168	0,656			0,631		67	192	3,94	7,28
192	1,275	0,092	49	0,442	0,042	61	216	2,36	6,59
192	0,637			0,442		61	216	2,36	6,59
216	0,912	0,071	28	0,537	0,035	60	216	3,78	7,25
216	0,456			0,537		60	216	3,78	7,25
240	0,856	0,110	68	0,542	0,029	61	240	3,44	6,57

Dados experimentais obtidos durante o experimento 5.

Tempo (h)	$X_{SUS} \cdot 10^5$ (cel/mL)	$X_{SU} \cdot 10^5$ (cel/mL)	Micro	$X_{ADE} \cdot 10^5$ (cel/mL)	$X_{AD} \cdot 10^5$ (cel/mL)	VIA (%)	Tempo (h)	$C_{GLI}$ (g/L)	pH
0	15,3	0	0	0	0	97	0	4,5	7,34
0,75	13,214	0,603	12	0,887	0,054	97	6		6,9
1,5	10,328	0,412	67	2,012	0,093	88	6		7,43
2,25	9,487	0,286	10	1,657	0,031	91	12	3,68	7,13
3	7,531	0,346	78	2,250	0,079	82	24	3,51	6,92
3,75	5,612	0,352	37	1,143	0,068	81	24	4,00	7,36
4,5	5,921	0,325	61	1,843	0,072	77	36	3,02	6,94
5,25	5,735	0,347	28	1,072	0,053	76	36	3,76	7,4
6	5,490	0,259	40	1,309	0,058	74	48	3,56	7,02
6	1,830			1,309		74	48	4,03	7,42
12	2,643	0,139	28	0,681	0,044	78	60	3,39	6,99
24	1,775	0,143	67	1,609	0,079	63	60	3,94	7,44
24	0,887			1,609		63	72	3,49	6,95
36	1,587	0,105	85	1,365	0,073	69	72	3,99	7,49
36	0,793			1,365		69	84	3,54	6,87
48	1,431	0,099	35	1,253	0,068	71	84	4,02	7,35
48	0,715			1,253		71	96	3,17	6,77
60	1,693	0,097	51	1,371	0,073	64	96	3,83	7,3
60	0,846			1,371		64	102	3,44	6,87
72	1,756	0,123	48	1,996	0,080	53	102	3,97	7,37
72	0,878			1,996		53	108	3,85	7,13
84	1,806	0,122	83	3,787	0,151	65	108	4,17	7,41
84	0,903			3,787		65	120	2,72	6,78
96	1,818	0,115	52	4,396	0,194	61	120	3,61	7,32
96	0,909			4,396		61	126	3,48	7,14
102	1,200	0,099	44	4,037	0,095	59	126	3,99	7,37
102	0,600			4,037		59	132	3,21	7,16
108	1,331	0,122	50	5,187	0,110	62	132	3,85	7,49
108	0,665			5,187		62	144	2,54	7,03

Cont.									
120	1,812	0,155	68	5,037	0,186	61	144	3,52	7,46
120	0,906			5,037		61	150	2,92	7,24
126	1,512	0,121	78	6,290	0,170	65	156	2,50	7,1
126	0,756			6,290		65	156	3,50	7,51
132	1,493	0,085	63	6,515	0,147	68	168	2,08	7,01
132	0,746			6,515		68	168	3,29	7,47
144	1,418	0,089	63	7,681	0,181	65	180	2,24	7,06
144	0,907			7,681		65	180	3,37	7,48
156	1,575	0,103	147	8,228	0,565	58	192	2,19	6,89
156	0,787			8,228		58	192	3,34	7,4
168	1,700	0,101	68	8,671	0,366	68	204	2,09	6,86
168	0,850			8,671		68	204	3,29	7,36
180	1,550	0,127	43	9,549	0,190	65	216	2,17	6,94
180	0,775			9,549		65	216	3,33	7,33
192	3,137	0,164	91	12,427	0,459	74	228	2,22	7,01
192	1,568			12,427		74	228	3,36	7,37
204	1,487	0,111	57	12,106	0,322	61	240	1,95	6,93
204	0,743			12,106		61	240	3,22	7,42
216	1,331	0,084	71	12,946	0,366	64	252	2,00	7,01
216	0,665			12,946		64	252	3,25	7,42
228	0,975	0,085	78	13,950	0,287	62	264	1,52	6,84
228	0,487			13,950		62	264	3,01	7,64
240	1,218	0,090	112	11,577	0,652	58	276	1,44	6,86
240	0,609			11,577		58	276	2,97	7,41
252	0,793	0,087	98	11,050	0,346	65	288	1,43	6,92
252	0,396			11,050		65	288	2,96	7,37
264	1,581	0,098	107	11,742	0,349	46	300	1,45	6,85
264	0,790			11,742		46	300	2,97	7,36
276	1,231	0,088	106	12,339	0,569	49	312	1,38	6,88
276	0,615			12,339		49	312	2,94	7,48
288	0,987	0,083	54	9,069	0,254	49	324	1,59	6,95
288	0,493			9,069		49	324	3,04	7,44
300	1,012	0,087	89	8,175	0,288	49	336	1,22	6,84
300	0,506			8,175		49			
312	1,043	0,072	89	6,756	0,152	58			
312	0,521			6,756		58			
324	1,143	0,091	57	6,675	0,248	51			
324	0,571			6,675		51			
336	1,125	0,094	52	4,578	0,188	49			

Dados experimentais obtidos durante o experimento 6.

Tempo (h)	$X_{SUS} \cdot 10^5$ (cel/mL)	$X_{SU} \cdot 10^5$ (cel/mL)	Micro	$X_{ADE} \cdot 10^5$ (cel/mL)	$X_{AD} \cdot 10^5$ (cel/mL)	VIA (%)	Tempo (h)	$C_{GLI}$ (g/L)	pH
0	28,4	0	0	0	0	97	0	4,56	7,35
0,75	26,43	1,220	39	2,865	0,096	99	6	4,44	7,01
1,5	19,45	0,611	14	2,368	0,068	98	6	4,44	7,38
2,25	18,64	0,563	67	2,862	0,158	97	12	4,30	7,06
3	15,52	0,479	88	3,503	0,097	95	12	4,40	7,34
3,75	14,09	0,593	63	2,768	0,100	94	24	4,00	6,89
4,5	13,91	0,305	65	3,437	0,109	94	24	4,25	7,32
5,25	12,95	0,427	85	3,265	0,119	91	36	4,05	6,85
6	11,88	0,327	95	4,634	0,176	90	36	4,27	7,30
6	3,940			4,634		90	48	3,92	6,86
12	3,906	0,181	60	2,536	0,054	90	48	4,21	7,32
12	1,953			2,536		90	60	3,73	6,93
24	2,406	0,134	72	2,675	0,131	84	60	4,11	7,45
24	1,203			2,675		84	72	3,48	6,90
36	2,856	0,194	61	2,379	0,119	88	72	3,99	7,40
36	1,428			2,379		88	84	3,80	6,97
48	4,512	0,277	58	5,187	0,126	84	84	4,15	7,45
48	2,256			5,187		84	96	3,95	6,97
60	2,118	0,167	77	5,596	0,131	82	96	4,22	7,45
60	1,059			5,596		82	108	3,94	6,95
72	2,418	0,189	60	7,915	0,134	84	108	4,22	7,52
72	1,209			7,915		84	120	3,69	7,18
84	3,068	0,190	108	8,537	0,220	81	120	4,09	7,64
84	1,534			8,537		81	132	3,55	7,27
96	3,868	0,190	109	11,37	0,306	84	132	4,02	7,61
96	1,934			11,37		84	144	3,42	7,17
108	2,356	0,149	117	11,68	0,201	80	144	3,96	7,38
108	1,178			11,68		80	156	3,51	7,03
120	2,512	0,129	105	11,99	0,263	79	156	4,00	7,63
120	1,256			11,99		79	168	3,51	7,23
132	1,137	0,159	120	12,63	0,334	75	168	4,00	7,43
132	0,568			12,63		75	180	3,68	7,02
144	2,106	0,146	104	15,50	0,270	79	180	4,09	7,55
144	1,054			15,50		79	192	3,81	7,21
156	0,937	0,068	89	16,53	0,295	73	192	4,15	7,53
156	0,468			16,53		73	204	3,90	6,98
168	1,250	0,094	120	13,05	0,254	76	204	4,20	7,42
168	0,625			13,05		76	216	3,83	7,22
180	1,237	0,090	118	11,10	0,347	70	216	4,16	7,49
180	0,618			11,10		70	228	3,41	7,30
192	1,218	0,133	111	11,31	0,337	73	228	3,95	7,56
192	0,609			11,31		73	240	3,46	7,31
204	0,787	0,068	120	9,453	0,211	63	240	3,98	7,59

Cont.

204	0,393			9,453		63	252	3,79	7,34
216	1,456	0,108	95	11,12	0,322	66	252	4,14	7,49
216	0,728			11,12		66	264	3,61	7,03
228	0,637	0,083	94	10,80	0,252	70	264	4,05	7,52
228	0,318			10,80		70	276	3,64	7,15
240	0,731	0,057	119	9,270	0,225	66	276	4,07	7,42
240	0,356			9,270		66	288	3,48	6,91
252	0,831	0,063	95	10,76	0,297	74	288	3,99	7,40
252	0,415			10,76		74	300	3,45	7,27
264	1,006	0,076	90	8,065	0,187	68	300	3,97	7,52
264	0,500			8,065		68	312	3,37	7,32
276	1,037	0,093	96	7,231	0,182	75	312	3,93	7,64
276	0,518			7,231		75	324	3,20	7,47
288	0,831	0,072	90	4,440	0,093	59	324	3,85	7,59
288	0,415			4,440		59	336	3,18	7,38
300	0,468	0,051	73	4,250	0,090	53	336	3,84	7,56
300	0,234			4,250		53	348	3,36	7,48
312	0,712	0,052	92	4,518	0,104	58	348	3,93	7,68
312	0,356			4,518		58	360	3,38	7,52
324	0,725	0,065	123	4,453	0,142	53			
324	0,362			4,453		53			
336	0,643	0,064	95	2,293	0,078	66			
336	0,321			2,293		66			
348	0,800	0,060	62	2,606	0,085	76			
348	0,400			2,606		76			
360	0,562	0,078	110	1,985	0,063	69			

Dados experimentais obtidos durante o experimento 7.

Tempo (h)	$X_{SUS} \cdot 10^5$ (cel/mL)	$X_{SU} \cdot 10^5$ (cel/mL)	Micro	$X_{ADE} \cdot 10^5$ (cel/mL)	$X_{AD} \cdot 10^5$ (cel/mL)	VIA (%)	Tempo (h)	$C_{GLI}$ (g/L)	PH
0	7,000	0	0	0	0	99	0	4,45	7,40
0,75	6,650	0,368	103	1,837	0,075	97	6	4,18	7,16
1,5	5,981	0,237	78	1,756	0,076	96	6	4,34	7,50
2,25	4,118	0,150	103	2,322	0,138	92	24	4,01	7,05
3	3,885	0,214	88	1,918	0,081	89	24	4,25	7,66
3,75	2,500	0,260	106	2,359	0,089	87	48	3,80	7,21
4,5	2,568	0,144	93	1,984	0,095	82	48	4,15	7,38
5,25	2,512	0,146	91	1,434	0,074	79	72	3,81	6,93
6	2,100	0,100	101	2,452	0,099	79	72	4,15	7,28
6	0,700			2,452		79	84	3,64	6,88
24	1,706	0,132	123	2,234	0,139	86	84	4,07	7,55
24	0,853			2,234		86	96	3,82	7,23
48	2,643	0,136	127	2,193	0,119	83	96	4,16	7,44
48	1,321			2,193		83	108	3,85	7,05

Cont.									
72	2,368	0,124	103	3,934	0,153	80	108	4,17	7,45
72	1,184			3,934		80	120	3,81	7,10
84	1,687	0,086	93	4,903	0,130	79	120	4,15	7,45
84	0,843			4,903		79	132	3,50	7,31
96	2,137	0,163	99	4,003	0,109	75	132	4,00	7,57
96	1,068			4,003		75	144	3,37	7,33
108	1,618	0,121	120	3,896	0,120	76	144	3,93	7,60
108	0,959			3,896		76	156	3,33	7,43
120	1,568	0,101	89	4,315	0,130	83	156	3,91	7,65
120	0,784			4,315		83	168	3,31	7,55
132	1,550	0,095	83	3,809	0,107	79	168	3,90	7,57
132	0,775			3,809		79	180	3,34	7,38
144	1,500	0,106	123	4,100	0,128	75	180	3,92	7,60
144	0,750			4,100		75	192	3,40	7,45
156	1,775	0,099	78	3,040	0,095	75	204	2,78	7,40
156	0,887			3,040		75	204	3,64	7,69
168	1,643	0,127	109	3,962	0,124	83	216	3,42	7,33
168	0,821			3,962		83	216	3,96	7,54
180	1,418	0,094	121	3,613	0,119	83	240	2,95	7,17
180	0,709			3,613		83	240	3,72	7,47
192	1,101	0,084	73	3,459	0,081	79	264	3,01	7,03
204	1,106	0,080	74	2,736	0,071	68	264	3,75	7,41
204	0,553			2,736		68	288	3,25	6,99
216	1,187	0,096	83	2,390	0,090	68	288	3,87	7,43
216	0,593			2,390		68	300	3,58	7,18
240	0,668	0,072	97	2,390	0,066	69			
240	0,334			2,390		69			
264	0,600	0,068	73	2,265	0,075	67			
264	0,300			2,265		67			
288	0,606	0,047	102	2,181	0,078	67			
288	0,302			2,181		67			
300	0,556	0,048	93	1,913	0,074	75			