UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

FRANCIMAURA CARVALHO MEDEIROS

PRODUÇÃO *IN VITRO* DOS BACULOVÍRUS ANTICARSIA E CHRYSODEIXIS EM CÉLULAS Sf21

JOÃO PESSOA – PB 2022

FRANCIMAURA CARVALHO MEDEIROS

PRODUÇÃO *IN VITRO* DOS BACULOVÍRUS ANTICARSIA E CHRYSODEIXIS EM CÉLULAS Sf21.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química

Orientadora: Dr[a.] Andréa Farias de Almeida
Co-orientadora: Dr[a]. Sharline Florentino de Melo Santos

JOÃO PESSOA-PB

2022

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M488p Medeiros, Francimaura Carvalho.
Produção in vitro dos baculovírus Anticarsia e Chrysodeixis em células Sf21 / Francimaura Carvalho Medeiros. - João Pessoa, 2022.
87 f. : il.

Orientação: Andréa Farias de Almeida.
Coorientação: Sharline Florentino de Melo Santos.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Controle de pragas - Alternativa sustentável. 2. Bioinseticida viral. 3. AgMNPV e ChinSNPV. 4. Partículas virais. I. Almeida, Andréa Farias de. II. Santos, Sharline Florentino de Melo. III. Título.

UFPB/BC CDU 632.93(043)

Elaborado por WALQUELINE DA SILVA ARAUJO - CRB-15/514

FRANCIMAURA CARVALHO MEDEIROS

PRODUÇÃO *IN VITRO* DOS BACULOVÍRUS ANTICARSIA E CHRYSODEIXIS EM CÉLULAS Sf21.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química

Aprovada em 30 de junho de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Andréa Farias de Almeida
Profa. Dra. Andréa Farias de Almeida – PPGEQ/CT/UFPB
(Orientadora)

Profa. Dra. Sharline Florentino de Melo Santos – PPGEQ/CT/UFPB
(Coorientadora)

Adna Cristina Barbosa de Sousa
Profa. Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa – DBCM/CBiotec/UFPB
(Examinadora Externa)

Prof. Dr. Luciano Coutinho Silva – DBCM/CBiotec/UFPB
(Examinador Externo)

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho algumas pessoas me ajudaram e sem as quais não teria sido possível concluir. A todas elas, minha gratidão.

Primeiramente, agradeço:

A Deus por me abençoar e guiar durante toda a trajetória dessa pós-graduação;

Aos meus pais por sempre me apoiarem e incentivarem em todos os âmbitos da minha vida;

Ao meu esposo, Kelwyn, por acreditar em meu potencial e me motivar todos os dias;

Aos meus familiares por sempre se fazerem presente e oferecer uma palavra amiga;

À minha Orientadora, Drª. Andréa Farias de Almeida por ser um grande exemplo profissional, e ter me ajudado bastante durante toda trajetória do mestrado;

À minha Co-orientadora, Drª. Sharline Florentino de Melo Santos pela troca de conhecimentos fornecida;

À Drª. Marlinda e à EMBRAPA por fornecer as células de estudo e garantir o progresso dessa dissertação;

Aos meus colegas de laboratório, Lucas e Daniel que sempre estavam presentes auxiliando e pesquisando para conseguirmos os bons resultados,

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química - PPGEQ por proporcionar um ótimo desenvolvimento acadêmico.

RESUMO

A soja [*Glycine max* (L.) Merril] é uma das cultivares de maior importância para a humanidade, sendo a responsável por suprir metade da demanda mundial de proteínas e óleos vegetais. O Brasil é considerado o maior exportador de soja do mundo, sendo responsável por um terço de toda a sua produção mundial. Contudo, o cultivo de soja no Brasil encontra-se constantemente ameaçado por pragas, que colocam em risco a produtividade desta planta, sendo os insetos-praga, os principais causadores de danos. O método mais usual de controle de pragas utilizado no Brasil é o uso de pesticidas químicos, entretanto, estas substâncias químicas possuem impactos a saúde humana e ao meio ambiente, o que demonstra a necessidade de desenvolver métodos de controle de pragas alternativos e sustentáveis. Os insetos *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: *Erebidae*) e *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: *Noctuidae*) são as pragas desfolhantes responsáveis pelos danos as plantações de soja não apenas no Brasil, mas em todo hemisfério ocidental, sendo o seu controle de difícil realização, principalmente ao se considerar a lagarta do *C. includens* que apresenta resistência aos inseticidas químicos comumente utilizados. Diante desta problemática, corpos de oclusão (OB) dos baculovírus, uma família de vírus que infectam especificamente insetos, podem ser utilizados como um método de controle biológico alternativo para estas pragas, uma vez que são específicos para seus insetos-hospedeiro, não representando riscos para o ambiente ou para o ser humano. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo a produção *in vitro* dos baculovirus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) *e Chrysodeixis includens single nucleopolyhedrovirus* (ChinSNPV), utilizando células do inseto *Spodoptera frugiperda*, linhagem Sf21, que foram adaptadas ao cultivo em suspensão sem soro fetal bovino. Para a produção de baculovírus, as células foram adaptadas para cultura em suspensão com o meio SF900II, utilizando-se frascos *Erlenmeyers* em *shaker* sob condições controladas de 120 rpm e 28ºC (±2ºC), e infectadas com dois diferentes fenótipos virais: vírus extracelular (BV) e vírus derivado da oclusão (ODV) AgMNPV e ChinSNPV, individualizados e simultaneamente. As amostras foram retiradas a cada 24 horas para determinação da viabilidade, concentração celular e dos corpos de oclusão (OB). Utilizando o BV do AgMNPV (da segunda passagem) obteve-se ao fim do processo, uma produção volumétrica máxima de $1{,}38 \times 10^7$ OB/mL. Esta produção foi menor quando observada a produção de OB a partir do ODV ($2{,}8 \times 10^7$OB/mL). Pode-se inferir que a partícula viral ODV extraído do processo *in vitro*, proporcionou uma oferta maior de OBs, contribuindo para a produção do AgMNPV. Já com o BV do ChinSNPV, a produção volumétrica máxima de OB foi de $1{,}34 \times 10^7$OB/mL. O resultado obtido da infecção com ODV do ChinSNPV foi de uma concentração final de $6{,}01 \times 10^6$ OB/mL. Portanto, conclui-se que os dois fenótipos de vírus (BV e ODV) são infectivos nas células de Sf21 cultivadas em suspensão.

Palavras-chave: bioinseticida viral; AgMNPV e ChinSNPV; partículas virais

ABSTRACT

Soybean [Glycine max (L.) Merril] is one of the most important cultivars for humanity, being responsible for supplying half of the world demand for proteins and vegetable oils. The Brazil is considered the largest soybean exporter in the world, accounting for a third of all its world production. However, soybean cultivation in Brazil is constantly threatened by pests, which jeopardize the productivity of this plant, with insect pests being the main cause of damage. The most common method of pest control used in Brazil is the use of chemical pesticides, however, these chemicals have impacts on human health and the environment, which demonstrates the need to develop alternative and sustainable pest control methods. The insects *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidae) and *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) are the defoliating pests responsible for damage to soybean plantations not only in Brazil, but throughout the western hemisphere, being its control is difficult to perform, especially when considering the caterpillar of *C. includens*, which is resistant to commonly used chemical insecticides. Faced with this problem, occlusion bodies (OB) of baculoviruses, a family of viruses that specifically infect insects, can be used as an alternative biological control method for these pests, since they are specific to their host insects, not representing risks. to the environment or to humans. This, the present work aimed at the in vitro production of the baculovirus Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) and Chrysodeixis includens single nucleopolyhedrovirus (ChinSNPV), using cells from the insect Spodoptera frugiperda, cell line Sf21, which were adapted to suspension culture without fetal bovine serum. For baculovirus production, cells were adapted for suspension culture with SF900II medium, using Erlenmeyer flasks in a shaker under controlled conditions of 120 rpm and 28ºC (±2ºC), and infected with two different viral phenotypes: extracellular virus (BV) and occlusion-derived virus (ODV) AgMNPV and ChinSNPV, individually and simultaneously. Samples were taken every 24 hours to determine viability, cell concentration and occlusion bodies (OB). Using the BV of AgMNPV (from the second pass) a maximum volumetric production of $1.38x10^7$ OB/mL was obtained at the end of the process. This production was lower when observing the production of OB from ODV ($2.8x10^7$OB/mL). It can be inferred that the ODV viral particle extracted from the in vitro process provided a greater supply of OBs, contributing to the production of AgMNPV. With the ChinSNPV BV, the maximum volumetric production of OB was $1.34x10^7$OB/mL. The result obtained from ODV infection of ChinSNPV was a final concentration of 6.01×10^6 OB/mL. Therefore, it is concluded that the two virus phenotypes (BV and ODV) are infective in suspension cultured Sf21 cells.

Keywords: biopesticides; AgMNPV and ChinSNPV; viral particles.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AgMNPV – *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyedrovirus*

BV – Virus extracelular

ChinSNPV – *Chrysodeixis includens single nucleopolyedrovirus*

MIP – Manejo Integrado de Pragas

NPV - Nucleopoliedrovirus

ODV – Vírus Derivado da Oclusão

OB – Corpos de Oclusão

SFB – Soro Fetal Bovino

SUMÁRIO

2. OBJETIVOS **12**
2.1 OBJETIVO GERAL **12**
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS **12**
3. REVISÃO DA LITERATURA **13**
3.1 SOJA [*Glycine max* (L.) Merril] E SUAS PRINCIPAIS PRAGAS **13**
3.1.1 *Anticarsia gemmatalis* 13
3.1.2 *Chrysodeixis includens* 15
3.2 BACULOVÍRUS **16**
3.2.1 Replicação viral **21**
3.3. CONTROLE BIOLÓGICO **23**
3.3.1 Baculovírus como agente de biocontrole **24**
3.4. PRODUÇÃO DE BACULOVÍRUS **26**
3.4.1. Produção *in vivo* 26
3.4.2. Produção *in vitro* 27
3.5. CINÉTICA DOS PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE BACULOVIRUS 30
4. MATERIAL E MÉTODOS **32**
4.1 LINHAGEM CELULAR **32**
4.2 ISOLADOS VIRAIS **32**
4.3 PROCESSOS *IN VITRO* DE INFECÇÃO COM OS BACULOVIRUS ANTICARSIA e CHRYSODEIXIS **33**
4.3.1 Infecções com vírus derivado da oclusão dos baculovírus AgMNPV e ChinSNPV **34**
4.3.2 Infecções com vírus extracelulares dos baculovírus AgMNPV e ChinSNPV **34**
4.3.3 Co-Infecções com vírus extracelular dos baculovírus AgMNPV e ChinSNPV **35**
4.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS **36**
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO **37**
5.1. ARTIGO 1 Processo *in vitro* de infecção do AgMNPV-2D em células Sf21 ..... **37**
5.2 ARTIGO 2 - Avaliação da infectividade do baculovírus Chrysodeixis em células Sf21 cultivadas em suspensão **52**
5.3 ARTIGO 3 – Análise da estratégia de co-infecção dos baculovírus AgMNPV e ChinSNPV **66**
6. CONCLUSÕES **78**
REFERÊNCIAS **79**

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine Max* (L.) Merrill) é o quarto grão mais consumido do mundo, estando atrás apenas do milho, trigo e arroz. A partir do processamento dos grãos desta planta oleaginosa são obtidos o farelo e o óleo de soja. Logo, o óleo de soja é importante para o consumo humano e, uma parcela do óleo de soja é também utilizado na cadeia produtiva de biocombustíveis. Já o farelo é amplamente usado na fabricação de rações animais, o que estabelece uma dependência entre o mercado pecuarista e a produção da soja. Além disso, os grãos de soja são também consumidos de forma *in natura*. Tendo em vista essa ampla rede de produtos dependentes da soja e das necessidades globais por alimentos, identifica-se a importância econômica, social e alimentícia desta planta (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014).

Toda riqueza nutricional faz com seus grãos sejam os mais utilizados na alimentação humana e animal. Assim, a soja configura uma das principais *commodities* mundiais.

O Brasil é considerado maior produtor mundial de soja, na safra 2021/2022, o país colheu 124,27 milhões de toneladas de soja ocupando uma área cultivada de 36,843 milhões de hectares, com elevação de 2,7% sobre o ano anterior, quando foram cultivados 40,9 milhões de hectares. Assim, a produtividade teve 3.032 quilos por hectare (CONAB, 2022).

Cerca de 40% da produção agrícola do mundo é perdida todos os anos pelo ataque de pragas, de acordo com a FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura). E com a lavoura da soja não é diferente, pragas como *Anticarsia gemmatalis* (HUBNER, 1818) (Lepidoptera*: Erebidae)* e *Chrysodeixis includens* (WALKER, 1858) (Lepidoptera*: Noctuidae*) são as principais desfolhadoras, cujo controle é realizado, majoritariamente, por pesticidas químicos. O uso excessivo e crescente de pesticidas químicos tem provocado a redução dos inimigos naturais e pode ocasionar uma série de problemáticas em relação à resistência e surgimento de novas pragas.

Em vista da alta produção e o custo elevado com pesticidas sintéticos, é relevante ter investimentos em agricultura mais sustentável, portanto, torna-se imperativo buscar alternativas ao uso indiscriminado de pesticidas químicos no País. O controle biológico das populações de insetos-praga é uma dessas alternativas. Assim, a utilização de agentes entomopatogênicos, tais como: vírus, fungos, nematoides ou bactérias, são eficientes e ecologicamente corretos no biocontrole de pragas agrícolas e, por consequência, diminui uso de pesticidas químicos (OLIVEIRA et al., 2006).

Os baculovírus são um grupo de vírus que infectam artrópodes, principalmente insetos, utilizados como biopesticidas virais para biocontrole de pragas na agricultura. Têm como característica dois fenótipos virais, vírus extracelular e corpos de oclusão, que promovem os

processos de infecção na própria lagarta (Sistema *in vivo*) ou em cultivo de células originárias de insetos hospedeiros (Sistema *in vitro*). A principal vantagem na utilização desses bioinseticidas virais para o controle de pragas é a sua alta especificidade, o que os tornam extremamente atrativos sob o ponto de vista de segurança biológica, pois é inofensivo ao humano, e preserva o meio ambiente por não agredirem organismos benéficos a cultura (FUXA e TANADA, 1987).

Neste contexto, este estudo teve como estratégia analisar a produção de biopesticidas virais a partir dos fenótipos virais, vírus extracelular e vírus derivado dos corpos de oclusão, dos baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* e *Chrysodeixis includens single nucleopolyhedrovirus* em células de *Spodoptera frugiperda*, linhagem Sf21, cultivadas em suspensão.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir *in vitro* os baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) e *Chrysodeixis includens single nucleopolyhedrovirus* (ChinSNPV) utilizando células Sf21 em suspensão com meio de cultura sem soro fetal bovino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar os processos de infecção dos baculovírus AgMNPV e ChinSNPV em células Sf21, utilizando como inóculo viral o vírus extracelular (BV);
- Realizar os processos de infecção dos baculovírus AgMNPV e ChinSNPV em células Sf21, utilizando como inóculo viral o vírus derivado da oclusão (ODV);
- Realizar os processos de co-infecção dos baculovírus AgMNPV e ChinSNPV, utilizando como inóculo viral BV de ambos a 10% (v/v) em células Sf21;
- Quantificar os corpos de oclusão (OB) produzidos nos sistemas de cultivo *in vitro*;
- Determinar os parâmetros cinéticos (velocidade específica de crescimento celular – células controle e infectadas, velocidade média de infecção, consumo de glicose das células controle e infectadas).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SOJA [*Glycine max* (L.) Merril] E SUAS PRINCIPAIS PRAGAS

A soja (*Glycine max* (L.) Merril) é uma planta herbácea cujos grãos são ricos em proteínas de boa qualidade, lipídios, ácidos graxos poliinsaturados e fibras, apresentam também uma excelente quantidade de minerais como cobre, ferro, fósforo, potássio, magnésio, manganês e vitaminas do complexo B (VIEIRA; CABRAL; PAULA, 1999; FRENCH-CONSTANT, 2013). Possuindo uma produção mundial de grãos acima de 360 milhões de toneladas. (USDA, 2019). Os seus grãos são fundamental fonte de proteína vegetal, componente essencial na produção de ração animal e sua vasta utilização na alimentação humana (CATTELAN; DALL''AGNOL, 2018).

O cultivo comercial da soja no Brasil teve seu início em 1914, na região Sul, somente a partir dos anos 1940 sua produção assumiu importância econômica. Nesse mesmo ano, foi construída a primeira indústria processadora de soja no País. Quase uma década depois a produção de soja atingiu significância internacional que até hoje tem sua relevância. Contudo, durante os anos do ciclo produtivo da cultura, fatores fitossanitários que comprometem sua produtividade. Dentre eles, a presença constante de insetos-praga, que pode comprometer desde a semeadura até a maturação dos grãos, atribuindo-se como um dos principais motivos limitantes para a exploração da cultura, colocando em risco à produção e qualidade dos cultivos das variedades da planta (ÁVILA; SCHLICK-SOUZA, 2015; HUSCH et al., 2018).

Vários insetos-praga podem danificar a plantação, mas é durante as fases vegetativa e de floração que ocorrem as maiores perdas. As principais pragas desfolhadoras encontradas na lavoura da soja são a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* e a lagarta falsa-medideira *Chrysodeixis includens* (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; BUENO et al., 2011; CONTE et al., 2014).

3.1.1 *Anticarsia gemmatalis*

A lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Walker, 1858) (Lepidoptera: *Noctuidae*) é umas das principais pragas da soja. No entanto, mesmo existindo outras plantas hospedeiras, essa espécie se alimenta preferencialmente de leguminosas e a sua grande relevância está relacionada à sua abundância e ocorrência frequente em todas as regiões do Brasil (MOSCARDI et al., 2013). Esta espécie caracteriza-se por possuir quatro pares de falsas pernas,

coloração geralmente verde contendo estrias longitudinais no dorso, podendo atingir até 40 mm de comprimento, características que podem ser observadas na Figura 3.1.

Figura 3.1 - *Anticarsia gemmatalis* em estágio larval. (a) Segundo instar; (b) Quinto instar.

Fonte: Praça et al. (2006)

A. gemmatalis chega a consumir individualmente cerca de 90 cm² de folhas durante o seu desenvolvimento, que pode durar de 12 a 14 dias, podendo o desfolhamento chegar a 100% (CAMPO et al., 2000; GALLO et al., 2002). Ainda, segundo Moscardi (1998), a lagarta da soja pode ser responsável por até 50% das aplicações de inseticidas químicos na cultura da soja. Para o seu controle recomenda-se o manejo integrado de pragas (MIP), que implica na integração de técnicas disponíveis no controle das pragas de uma determinada cultura para evitar o uso exclusivo de produtos químicos. O controle biológico da *A. gemmatalis* pode ser efetuado através do microrganismo *Bacillus thuringiensis* e do baculovírus Anticarsia.

Os baculovírus compreendem o maior grupo dentre os vírus de insetos utilizados como biopesticidas virais, sendo o baculovírus Anticarsia (*Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* - AgMNPV). O AgMNPV foi diagnosticado em 1962 no Peru por Steinhaus e Marsh. No Brasil, este vírus é conhecido desde 1972 e foi isolado de lagartas mortas coletadas em lavoura de soja em Campinas, no Estado de São Paulo, e posteriormente detectadas em outras regiões do País (MOSCARDI, 1983). Após sua descoberta no Brasil, foi utilizado desde 1984, para o controle da lagarta da soja. Sua produção é realizada pelo sistema *in vivo*, trabalhando com condições de campo ou de criação massal do inseto em laboratório. O preparo do material deve ser feito batendo-se a quantidade de lagartas mortas ou o pó molhado (oriundo da liofilização de larvas infectadas coletadas) com um pouco de água, em um liquidificador, e coando-se a calda obtida em um pano bem fino tipo gaze e deve-se misturar o líquido coado com 100 a 200 litros de água, para ser aplicado em um hectare (MOSCARDI e SOUZA, 2002).

A partir disto, sabe-se que a utilização dos baculovírus já evitaram que cerca de 11 milhões de litros de pesticidas químicos fossem lançados no ambiente, proporcionando uma economia superior a 100 milhões de dólares (MOSCARDI e SOUZA, 2002; PENTEADO, 2010).

3.1.2 *Chrysodeixis includens*

A lagarta *Chrysodeixis includens* (WALKER, 1858) (Lepidoptera: *Noctuidae*), denominada popularmente como falsa-medideira por causa da sua locomoção ser em "mede palmo", pertence à família *Noctuidae* e subfamília *Plusiinae*. Ela já foi conhecida como *Pseudoplusia includens*; no entanto, com o avanço da biologia molecular, sua identificação foi reavaliada e alterada para *Chrysodeixis includens* (GOATER et al., 2003; S0SA-GÓMEZ et al., 2014). Possuem o hábito de ficarem abrigadas sob a copa das plantas de soja (Figura 3.2), desta forma ficando menos expostas à pulverização com pesticidas, implicando na eficiência de controle (BERNARDI et al., 2012; ZULIN et al., 2018).

Figura 3.2 – Estágio larval da *Chrysodeixis includens*.

Fonte: Sosa-Gómez (2012)

C. includens é conhecida como polífaga, pois apresenta mais de 170 espécies vegetais como plantas hospedeiras, alcançando aproximadamente, 30 famílias botânicas, incluindo algumas cepas grande importância econômica, como soja (*Glycine max*), algodão (*Gossypium hirsutum*), feijão (*Phaseolus* spp.), fumo (*Nicotiana* spp.), girassol (*Helianthus* spp.), tomate (*Cyphomandra betacea* e *Lycopersicum esculentum*) e batata (*Solanum* spp.) (SPECHT et al., 2015). A lagarta *C. includens* está presente no Hemisfério Ocidental, aparecendo desde o norte

dos Estados Unidos até o sul da América do Sul. Já no Brasil, é encontrada em diversas regiões produtoras de soja, cultura pela qual apresenta bastante preferência alimentar e melhor adaptação biológica, sua infestação pode promover graves danos econômicos (SOSA-GÓMEZ et al., 2010).

Os baculovírus que infectam *C. includens* foram citados como ocorrência natural no Brasil (ALEXANDRE et al., 2010; SOUZA et al., 2016; CRAVEIRO et al., 2016). Esses isolados de baculovírus são denominados de *Chrysodeixis includens single nucleopolyhedrovirus* (ChinSNPV) (SOUZA et al., 2016). O isolado foi identificado e expressou satisfatória patogenicidade e aptidão na produção em células *in vitro* (SANCHES et al., 2019). Embora, ainda existem algumas restrições em relação à produção de baculovírus em cultivo celular, como: a perda da estabilidade genética e custo de produção, estes fatores influenciam na atuação total dessa técnica nas plantações, pois à medida que ocorrem passagens celulares infectadas, os vírus que estão presentes eles sofrem alterações e causando a desestabilização genética (REID et al., 2014).

3.2 BACULOVÍRUS

A descoberta dos baculovírus aconteceu a partir do desenvolvimento da indústria da seda que ocorreu na China antiga, a mais de 5000 anos atrás. Desde então, a cultura do bicho-da-seda se espalhou por toda a Ásia chegando ao Japão por volta de 300 anos dC e na Europa em torno de 550 anos dC. Na indústria agrícola, houve vários problemas por causa de uma de uma diversidade em doenças, comprometendo a economia local. A partir do surgimento de novas ferramentas de análises, tal como a microscopia de luz, uma característica típica de um dos tipos de doença pode ser confirmada (ROHRMANN, 2019).

Observou-se a presença de corpos de oclusão (OB) sendo definidos como estruturas altamente refratárias e sintomáticas nos insetos afetados pelo agente infeccioso. Desta forma, pode-se identificar as estruturas devido a sua apresentação ser em forma poliédrica e foi em meados do século XIX que essas constatações levaram à nomenclatura das doenças associadas a essas estruturas, denominadas de poliedroses (ROHRMANN, 2019).

Mesmo que tenha sido debatido a existência de partículas infecciosas dentro dos corpos de oclusão (OB), somente ao final da década de 1940 que pode se comprovar a presença de uma partícula completa de um vírus em estrutura de bastonete sendo definitivamente demonstrada por meio da microscopia eletrônica (BERGOLD, 1947).

Logo, após alguns anos, pode-se diferenciar essas duas doenças de poliedrose, respectivamente: aquelas em que os corpos de oclusão estavam no citoplasma da célula hospedeira do animal infectado, denominadas poliedroses citoplasmáticas (CPVs) e as outras em que as estruturas poliédricas se desenvolviam nos núcleos, denominadas poliedroses nucleares (NPVs) (XEROS, 1952). Portanto, os NPVs são determinados como em forma de bastonetes, cujo material genético é o DNA, enquanto os CPVs possuem capsídeos de estrutura icosaedral e foram introduzidos na família *Reoviridae* (gênero *Cypovirus*), na qual estão inseridas partículas virais cujo genoma é constituído de fitas duplas de RNA segmentadas (VAN OERS e VLAK, 2007).

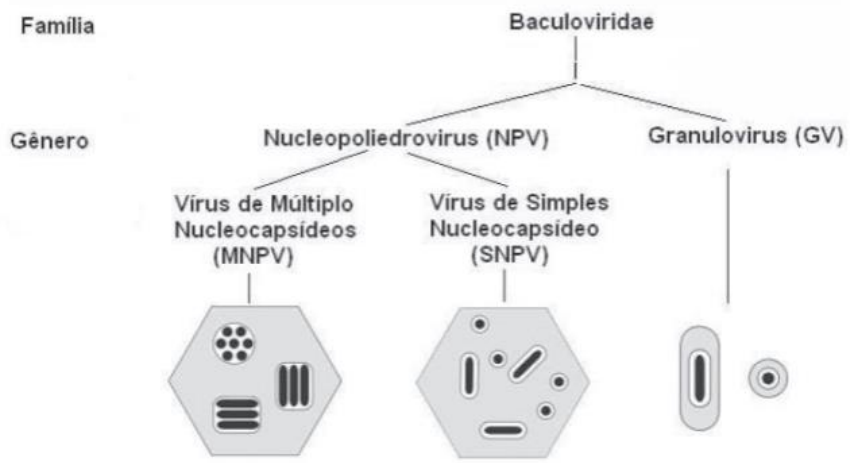
Por volta da década de 1920, descreveu-se uma segunda categoria de baculovírus cujas características são dadas pela presença de OBs em forma helicoidal, pequenos e granulares (PAILLOT, 1926; DANTAS e VIEIRA, 2020), assim denominada vírus da granulose (GV).

Parte fundamental para a divisão em dois grandes grupos de vírus foi a morfologia observada nos OBs, sendo estes: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV) representado na Figura 3.3. Entretanto, a partir dos avanços das técnicas de biologia molecular foram surgindo outros critérios para subdivisão das diferentes categorias de vírus. A terminologia para esses vírus passou por uma série de nomes, incluindo *Borrelinavirus*, *Bergoldiavirus*, *Smithiavirus*, *Moratorvirus* e *Vagoiavirus* até que, iniciando os anos 70, a nomenclatura foi alterada e unificada dando origem então à família *Baculoviridae* (VAGO et al., 1974).

Os baculovírus representam um grande e diversificado grupo de vírus patogênicos para artrópodes, fundamentalmente insetos das ordens *Lepidoptera*, *Hymenoptera e Diptera*. Possuindo assim mais de 700 baculovírus diferentes já foram identificados, analisados e isolados de invertebrados (HERNIOU e JEHLE, 2007).

Os NPVs, são incorporados em OBs, possuem dimensões podendo ter tamanhos que variam de 0,15 μm até 15 μm de comprimento, enquanto os GVs são menores, obtendo aproximadamente 0,3 × 0,5 μm (largura x comprimento), e sendo representado com apenas um único *virion* (HERNIOU et al., 2012). Os nucleocapsídeos do baculovírus possuem um diâmetro que varia entre 30 a 60 nm e comprimento de 250 a 300 nm (Figura 3.3).

Figura 3.3 - Família dos baculovírus.

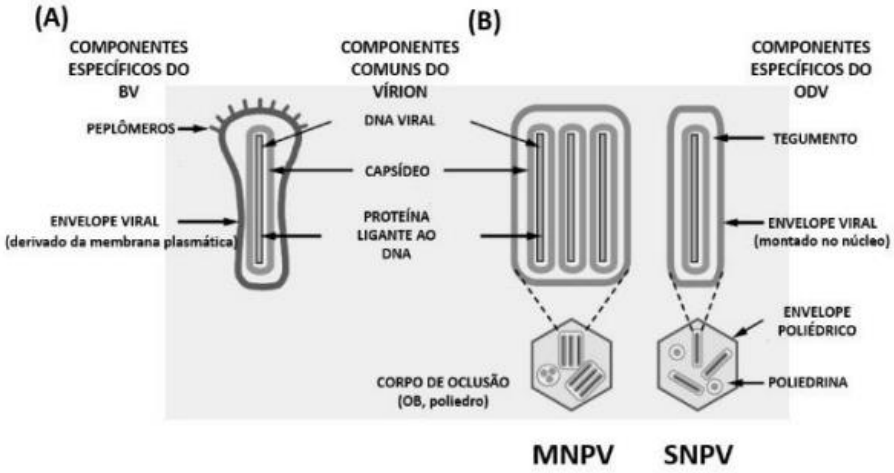


Fonte: Almeida (2005).

Eles possuem como uma das fundamentais características, um *virion* com envelope em forma de bastão e um DNA circular, dupla-fita, "supercoiled" contendo entre 90 e 200 quilobases (ARIF, 1986; MARUNIAK et al., 2004). Os baculovírus são da família *Baculoviridae* que é dividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV) (VAN REGERNMORTEL et al., 2000).

Essas estruturas estão presentes no interior de um envelope para formar um *virion* (partícula viral completa) (HERNIOU et al., 2012). Possuem duas formas distintas de produção dos *virions* que ocorre durante o processo de infecção: vírus extracelular que brota da membrana plasmática da célula infectada para o meio extracelular, o qual possui estruturas denominadas peplômeros (contendo, por exemplo, a glicoproteína GP64 e a proteína-F), sendo envelopados individualmente (*budded virus*-BV ou *extracellular virus*- BV); e *virions* derivados de OB (ODVs). Ambos possuem genótipos idênticos, no entanto, possuem fenótipos distintos apresentados na Figura 3.4.

Figura 3.4 Dois fenótipos distintos de NPV produzidos durante a infecção. (A) Vírus extracelular (BV) e (B) Vírus derivado da oclusão (ODV).



Fonte: Adaptado de Ikeda, Hamajima e Kobayashi (2015).

Embora os BVs e ODVs possuam o mesmo nucleocapsídeo, eles são diferentes por causa da origem de seus envelopes (MCWILLIAM, 2007). Sabendo que os envelopes do BV são derivados de membranas plasmáticas modificadas pelo brotamento do nucleocapsídeo, já os envelopes do ODVs são produzidos a partir de membranas montadas dentro da região nuclear da célula infectada. Outra diferença é que os BVs consistem em apenas um único nucleocapsídeo rodeado por um envelope, enquanto os ODVs inseridos dentro dos OBs que possuem nucleocapsídeos únicos (S) ou múltiplos (M) são referidos como NPVs únicos (SNPVs) ou NPVs múltiplos (MNPVs), respectivamente (IKEDA, HAMJIMA e KOBAYASHI, 2015).

Os nomes das diferentes espécies de baculovírus são dados adicionando as iniciais dos nomes dos insetos de onde eles foram isolados inicialmente, tais como *Autographa californica* MNPV (AcMNPV), *Bombyx mori* NPV (BmNPV) e *Anticarsia gemmatalis* MNPV (AgMNPV), os quais foram isolados pela primeira vez a partir da alfafa looper (*A. californica*), bicho-da-seda (*B. mori*) e mariposa-cigana (*L. dispar*), respectivamente (THEILMANN et al., 2005; JEHLE et al., 2006). O mesmo ocorre com os representantes da classe GVs, tais como *Agrotis segetum* GV (AgseGV); *Choristoneura occidentalis* GV (ChocGV); *Cryptophlebia leucotreta* GV (CrleGV).

No entanto, este método de nomenclatura ocasionalmente cria confusão, pois os baculovírus podem possuir uma grande diversidade de hospedeiros ou ainda quando insetos são permissivos a infecções por múltiplas espécies de baculovírus (JEHLE et al., 2006)

Jehle et al. (2006) revisaram a taxonomia e classificação da família *Baculoviridae* a partir das análises de sequência genômica de alguns baculovírus. Comparações de 29 genomas indicaram que a filogenia dos baculovírus seguia a classificação dos hospedeiros mais próximos do que as características morfológicas que foram anteriormente utilizadas. De acordo com a nova proposta de classificação são incluídos mais quatro tipos, conforme Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Classificação e membros da família *Baculoviridae.*

Classificação	Membros
Alfabaculovirus	NPVs de Lepidópteros
Betabaculovirus	GVs de Lepidópteros
Gamabaculovirus	NPVs de Hymenópteros
Deltabaculovirus	NPVs de Dípteros

Legenda: NPVs – *Nucleopolyhedrovirus.* GVs – *Granulovirus.*

A família *Baculoviridae* possuem os vírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) que são responsáveis por infectar uma grande diversidade de espécies de insetos, principalmente os da ordem dos Lepidópteros (THEILMANN et al., 2005; HERNIOU et al., 2012). A ação dos vírus no inseto-praga proporcionaa redução do consumo foliar e elevando o índice de mortalidade na fase larval (MOSCARDI et al., 2011).

O processo de replicação viral ocorre no núcleo das células infectadas e possuem material genômico na forma de DNA fita dupla e circular, possuindo tamanho variável entre 80 a 180 kpb de extensão, codificando entre 100 a 180 proteínas diferentes (THEILMANN et al., 2005). Cerca de 50 espécies já tiveram seus genomas sequenciados (bases de dados do NCBI).

Para o gênero *Alphabaculovirus,* os *virions* são designados como únicos (S) ou múltiplos (M) dependendo do número de nucleocapsídeos por ODV (vírus derivados da oclusão), e os dos gêneros *Delta* e *Gammabaculovirus* normalmente contêm um único nucleocapsídeo por ODV (VOLKMAN e SUMMERS, 1977).

O ciclo de replicação do baculovírus dentro da célula do inseto infectado é caracterizado por ser bifásico e envolve a formação de dois tipos de *virions*, os quais são produzidos em fases distintas do ciclo de infecção. Os ODVs são adaptados para terem estabilidade e viabilidade no meio ambiente externo ao inseto hospedeiro e os *virions* que brotam da membrana plasmática (BVs), que não estão ocluídos e são, portanto, responsáveis pela disseminação sistêmica de célula a célula dentro do inseto. Contudo, o ciclo de replicação do vírus pode ser dividido em três fases sequenciais de acordo com a programação da expressão gênica (imediata-precoce/precoce; tardia e muito tardia) (PASSARELLI e GUARINO, 2007).

O processo de infecção viral pelo baculovírus inicia-se quando as larvas de insetos ingerem os corpos de oclusão que foram adicionados nas folhagens dos vegetais (KEDDIE; APONTE e VOLKMAN, 1989). Para Wang e Granados (1997), os corpos derivados da oclusão (ODVs) são compactados por uma matriz proteica composta principalmente pela proteína poliedrina, a qual é expressa na fase muito tardia do ciclo de infecção. Quando os ODVs entram em contato com as condições alcalinas presentes no intestino médio do inseto, o corpo de oclusão se dissolve ocorrendo a liberação dos ODVs, e a matriz proteica de poliedrina é, então, degradada por proteínas presentes no intestino do inseto ou por aquelas que estão associadas aos *virions*.

3.2.1 Replicação viral

O processo de replicação viral ocorre no núcleo das células infectadas e possuem material genômico na forma de DNA fita dupla e circular, cujo tamanho pode variar entre 80 a 180 Kpb de extensão, codificando entre 100 a 180 proteínas diferentes (THEILMANN et al., 2005). Aproximadamente 50 espécies já tiveram seus genomas sequenciados (bases de dados do NCBI).

O ciclo de replicação do baculovírus dentro da célula do inseto infectado é um procedimento classificado como bifásico e envolve a formação de dois tipos de *virions*, e essas estruturas são produzidas em etapas distintas do ciclo de infecção. Os corpos derivados da oclusão (ODVs) são formados para terem estabilidade e viabilidade no meio ambiente externo ao inseto hospedeiro e os *virions* que brotam da membrana plasmática, chamados vírus extracelular (BVs), que não estão ocluídos e são, portanto, responsáveis pela disseminação sistêmica de célula a célula dentro do inseto, desta forma cada um atinge o hospedeiro de uma forma diferente, mas com a mesma função, que é causar a sua morte. Além do mais, o ciclo de replicação do vírus é dividido em três fases consecutivas de acordo com a programação da expressão gênica (imediata-precoce/precoce; tardia e muito tardia) (PASSARELLI e GUARINO, 2007).

Logo, os ODVs se aderem à microvilosidade das células epiteliais colunares do intestino médio do inseto. Eles possuem um conjunto de proteínas específicas associadas ao envelope, chamadas de fatores de infectividade *peros (pif*), que intermediam o ancoramento do vírus aos receptores localizados na superfície da membrana das células epiteliais (HORTON e BURAND, 1993; KIKHNO et al., 2002). Posteriormente, a entrada do vírus ocorre através da fusão da membrana do envelope viral com as microvilosidades de células epiteliais (via não

endocítica), seguida do rompimento da matriz proteica e proporcionando a liberação dos nucleocapsídeos na região citoplasmática, descapsidação e liberação do DNA viral (OHKAWA, VOLKMAN e WELCH, 2010).

Após a infecção e liberação dos nucleocapsídeos, a próxima fase é atingir o núcleo, e então o processo de transcrição dos genes virais imediato-precoce inicia-se com auxílio da RNA polimerase da célula hospedeira (até 6 horas pós-infecção). Esses genes são responsáveis por codificarem principalmente para proteínas transativadoras necessárias para uma subsequente expressão de genes virais e provocando um distúrbio da atividade normal da célula hospedeira (PASSARELLI e MILLER, 1993).

O processo de transição da fase precoce para a fase tardia da infecção é marcado pelo início da replicação do DNA viral que ocorre dentro de 6h a 18h após a etapa de infecção, juntamente com o início da atividade de uma RNA polimerase codificada pelo vírus (GRULA, BULLER e WEAVER, 1981). Essa última etapa inicia com uma ordem de expressão de genes necessários para a formação de componentes virais na etapa de montagem de novos nucleocapsídeos. E os nucleocapsídeos recém montados são direcionados do núcleo para a membrana plasmática, onde ocorrerá o brotamento dos *virions* (BV) (PASSARELLI, 2012).

Portanto, os corpos de derivados da oclusão (ODVs) originados nos corpos de oclusão (OBs) desempenham um papel na transmissão horizontal viral, que ocorre de insetos para insetos, enquanto os BVs são responsáveis pela transmissão viral de célula a célula dentro da larva do inseto infectado. Diferente do que acontece com os ODVs, onde a entrada do baculovírus se dá por fusão de membranas, já os BVs entram nas células por meio da endocitose (KATOU, IKEDA e KOBAYASH, 2006; LONG et al., 2006).

3.3. CONTROLE BIOLÓGICO

O processo de utilizar inimigos naturais para reduzir ou eliminar a sociedade de pragas, patógenos e ervas daninhas que possam prejudicar a produção agrícola é denominado de controle biológico (LENTEREN, 2003). É uma técnica essencial para proteção de plantas contra o ataque de pragas, sendo um processo eficiente, permanente, econômico e sem danos ambientais (BERTI, 2010).

Portanto, ferramentas como o controle biológico natural podem elevar a variedade de inimigos naturais de insetos fitófagos, permitindo a aplicação e manutenção de sistemas agroecológicos sustentáveis. Associado a isso, o uso do manejo integrado de pragas (MIP) também pode ser uma alternativa viável para o aumento da diversidade de inimigos naturais em agroecossistemas (CRUZ, 2015).

Após a implementação do primeiro programa de MIP da Soja, houve uma intensa produção científica por parte da Embrapa, de Universidades e Instituições de Pesquisa que permitiram o aprimoramento do programa MIP-Soja (BUENO et al., 2012). Naquele período, inseticidas eram constantemente analisados a fim de definir seu potencial uso no MIP-Soja, conforme sua eficiência biológica, efeito residual, seletividade, impacto ambiental e toxicidade (OLIVEIRA et al., 1988). E, nesta década, começou o uso de baculovírus para realizar o controle biológico de pragas. O exemplo é o AgMNPV, baculovírus que infecta naturalmente a lagarta-da-soja (*A. gemmatalis*) e foi iniciado a sua ampla utilização pelo MIP, no controle desta lagarta, em várias plantações de soja, pois como apresentado por Moscardi (1983) o uso do AgMNPV para o controle da *A. gemmatalis* era ideal, por causa da especificidade do baculovírus com este inseto, ausência de riscos ao homem, outros vertebrados, invertebrados e plantas, de forma a não afetar organismos responsáveis pelo controle natural das pragas e não impactarem negativamente ao ecossistema, além disso, o seu custo é inferior aos outros métodos de controle biológico convencionais.

A utilização do baculovírus AgMNPV no MIP se expandiu e a partir dos anos 2000, uma área de aproximadamente 2 milhões de hectares era tratada com baculovírus, economizando cerca de 2 milhões de litros de inseticidas (MOSCARDI, 2003). No entanto, os 7 anos subsequentes, vivenciou uma redução no uso do AgMNPV chegando a apenas 300 mil hectares em 2011, em consequência das mudanças nas práticas dos agricultores responsáveis pelo plantio da soja (MOSCARDI et al., 2011).

Com isto, os microrganismos entomopatogênicos raramente são utilizados de forma isolada no controle de pragas, enfatizando que o mesmo precisa fazer parte de um conjunto de medidas para atuar em harmonia com o ambiente e diminuindo assim a população de pragas a níveis de danos não econômicos (GALLO et al., 2002). E, portanto, os patógenos, também são conhecidos como entomopatógenos, são organismos como fungos, vírus, bactérias e protozoários, além de nematoides que causam doenças e mortalidade nos insetos (VALICENTE, 2009).

3.3.1 Baculovírus como agente de biocontrole

Há uma rigorosa regulamentação em vários países relacionada a fabricação, registro e uso de pesticidas, resultando em custos elevados e, por isso, evidencia-se a ausência dessas ferramentas em campo de trabalho. Várias espécies de insetos, que compreendem algumas pragas da agricultura, pode se tornar resistentes aos inseticidas químicos devido ao uso constante nas lavouras (RANSON et al., 2010; RIVERO et al., 2010; FRENCH-CONSTANT, 2013).

A fabricação em ampla escala e a utilização frequente de inseticidas químicos têm ocasionado seu acúmulo nos ecossistemas, sucedendo em contaminação ambiental e toxicidade para muitas espécies diferentes e, também para os seres humanos. A dispersão da resistência a pesticidas sintéticos também ameaça a eficiência dos biopesticidas atualmente utilizados (RANSON et al., 2010; RIVERO et al., 2010; FFRENCH-CONSTANT, 2013).

Com a grande variedade de estudos desenvolvidos sobre o uso dos baculovírus como agentes de biocontrole, tanto do tipo GV quanto NPV, são alternativas favoráveis economicamente e na redução da aplicação de produtos químicos no controle biológico de insetos (WHALON, MOTASANCHEZ e HOLLINGWORTH, 2008; STERNBERG e THOMAS, 2018).

Com isto, os estudos abordam a utilização de organismos entomopatógenos no controle biológico e como podem se desenvolver na população de pragas e colaborar para a proteção das culturas a longo prazo. Muitos patógenos, tais como fungos, nematoides, bactérias e vírus podem ser usados para controlar as pragas de modo eficiente quando aplicados de uma forma artificial como pesticidas (SAXENA, 2008; VASANTHARAJ, 2008).

A primeira observação da aplicação de um baculovírus no meio ambiente, no controle de pragas, deu-se na década de 1930 de forma acidental, sendo quando um parasitoide foi importado da Europa para os EUA e Canadá para ser usado no controle do mosquito da espécie

Diprion hercyniae. Observou-se uma inibição efetiva do crescimento dessa praga. E o baculovírus acidentalmente introduzido foi do tipo NPV específico para esse inseto. Portanto, ao passar dos anos não se fez a necessidade de adicionar um tipo de controle contra a *Diprion hercyniae* (BIRD e ELGEE, 1957).

Normalmente são abordadas duas estratégias para o manejo de pragas: a primeira é responsável pela pulverização das áreas infestadas com formulações concentradas de pesticidas numa tentativa de controlar a praga imediatamente, ou as áreas são pulverizadas com baixas concentrações de baculovírus, proporcionando à permanência do vírus por várias gerações de insetos (FUXA, 2004). Embora a prática do uso de baculovírus como pesticida para a proteção de cultivos agrícolas não tenha sido tão extensa quanto se esperava, existem vários relatos de práticas bem-sucedidas do uso de diferentes espécies dessa família na América Latina, tais como, *Anticarsia Gemmatalis* MNPV, *Spodoptera albula* NPV, *Spodoptera sunia* NPV, *Cydia pomonella* GV, entre vários outras (HAASE, SCIOCCO-CAP e ROMANOWSKI, 2015).

A utilização de baculovírus na produção de biopesticida viral tem sido realizada diretamente no próprio inseto hospedeiro, isto por causa da sua alta especificidade e capacidade de multiplicação *in vivo*. No entanto, existem algumas limitações que podem interferir no sucesso do experimento, como a qualidade do produto gerado, pois pode ocorrer a contaminação das lagartas com outros microrganismos coletadas no ambiente.

No entanto, as análises realizadas comprovam a variabilidade da eficiência da utilização dos baculovírus em função da concentração utilizada, embora os sintomas em relação à mortalidade das lagartas são os mesmos para todo procedimento avaliativo, tais como: descoloração, palidez, liquefação do tegumento e falta de apetite, sabendo que o processo de morte total do inseto hospedeiro vai depender do vírus utilizado, normalmente pode ocorrer em torno de 5 a 8 dias (BARRETO et al., 2005).

Nos dias atuais, empresas como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e Cooperativa Mista de Desenvolvimento do Agronegócio (Comdeagro) trabalham na área da produção de bioinseticidas a base de baculovírus, facilitando a sua utilização e uma padronização da qualidade do produto adquirido. Entretanto, os primeiros comentários sobre a prática de utilizar este vírus estão relacionados a um experimento antigo que ocorria através da maceração de lagartas para a produção de caldas de pulverização (SANTOS, 2020).

Para Cunha (2017), o processo de controle de pragas (lagartas) a partir da utilização do baculovírus proporciona uma segurança nos resultados obtidos, mas Diniz et al. (2018) informam que existem desafios sobre a utilização desse vírus, principalmente em relação a

facilidade de aplicação e a questão da compatibilidade com outras substâncias, no entanto, é um avanço para as questões ambientais e no sistema de manejo de pragas.

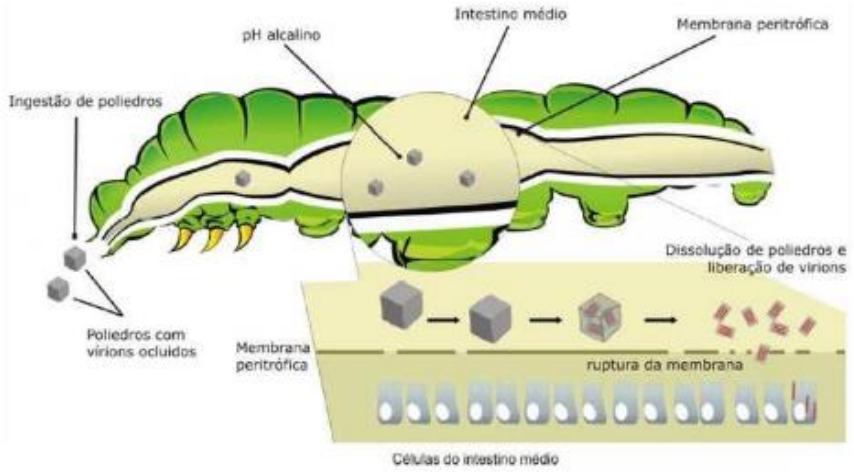
3.4. PRODUÇÃO DE BACULOVÍRUS

Há dois processos de produção de baculovírus para obtenção das partículas virais que podem ser utilizadas como biopesticida viral em controle de insetos-praga: produção *in vivo* e *in vitro*, que serão detalhadas a seguir.

3.4.1. Produção *in vivo*

O processo in *vivo* é caracterizado pela infecção por meio dos corpos de oclusão depositados na planta ou dieta artificial para o consumo das lagartas, esses poliedros mantem se viável entre 5 a 8 dias e esse tempo é determinado para cada tipo de vírus. Assim, a replicação viral ocorre em duas etapas, sendo a infecção primária iniciada quando os corpos de oclusão que estão sobre a superfície do alimento são ingeridos pela fase larval susceptível como é mostrado na Figura 3.5.

Figura 3.5 - Processo de Infecção do sistema *in vivo.*



Fonte: Kalmakoff e Ward (2003).

O modo de ação do baculovírus consiste, inicialmente, na ingestão do alimento contaminado pelas larvas do inseto, posteriormente, ocorrendo a dissolução dos corpos de oclusão, promovendo uma infecção primária no intestino médio, por causa do pH altamente alcalino, as partículas virais são liberadas, passando pela membrana peritrófica e infectando as

células colunares, e depois, são desencadeadas infecções secundárias, ocorrendo a ruptura das células (RIBEIRO et al., 1998; MOSCARDI e SOUZA, 2002). Logo, o inseto torna-se debilitado e para de se alimentar, ocasionando a morte de 5 a 8 dias após contrair a infecção, apresentando o corpo descolorido e, cerca de dois dias após a morte, acontece o rompimento do corpo da lagarta liberando uma ampla quantidade de vírus sobre a planta, servindo de inóculo para o mesmo. (CASTRO e SOUZA, 2006).

A produção do baculovírus, destinado a comercialização como biopesticida viral normalmente é realizada *in vivo*. É um processo laborioso, pois demanda muito espaço físico para atender a demanda de mercado, envolve tanto a coleta de lagartas (doentes ou mortas) no campo, quanto pela criação das lagartas em laboratório com uma dieta artificial (SZEWCZYK et al., 2011). No entanto, esse sistema apresenta alguns fatores limitantes: como dificuldade em aumentar a escala para nível industrial e a manutenção dos insetos criados em laboratório eleva custo de produção do bioinseticida viral, tornando-o menos atrativo quando comparado aos inseticidas químicos (MOSCARDI, 1999).

3.4.2. Produção *in vitro*

O processo de produção *in vitro*, baseia-se na replicação em cultivo de células, contudo é importante priorizar a etapa de escolha da célula que será usada na multiplicação do vírus, pois deve ter características como: ser susceptível ao processo, replicação em abundância e, então, garantir um elevado rendimento de OB, adaptar-se em cultivos em suspensão, possibilidade de crescimento em meio isento de soro fetal bovino e o de crescer em biorreatores industriais, além de ser geneticamente estável (CLAUS et al., 2012).

Portanto, a produção ocasiona a presença de vários ciclos de replicação, podendo ser por meio de frascos de culturas de tecidos ou biorreatores, ocasionando algumas alterações genotípicas e fenotípicas sendo denominada de efeito de passagem, isto é, mutações e redução na formação de corpos de oclusão (KRELL, 1996; CHAKRABORTY e REID, 1999; PEDRINI, WOLFF e REID, 2004).

Para replicação de baculovírus em cultura de células, o ciclo de infecção ocorre entre 7 a 10 dias em três fases distintas: inicial (*early*), tardia (*late*) e muito tardia (*very late*), essas fases correspondem biologicamente a: reprogramação da célula para replicação viral; produção de BV; produção de OB, respectivamente. Essas etapas acontecem desde o primeiro momento da infecção, e o OB é liberado no ambiente à medida que a lagarta se rompe (O´REILLY, MILLER e LUCKOW, 1994).

O sistema de infecção *in vitro* vem sendo destaque nos avanços tecnológicos da cultura de células de insetos e possuindo uma análise estrutural por microscopia, desta forma, pode-se obter um estudo mais detalhado do processo de infecção. Logo, proporcionando uma série de investigações sobre os mecanismos moleculares envolvidos na replicação dos baculovírus.

A primeira indicação de infecção (ocorre com 24 h de processo) por vírus é o inchaço do núcleo celular e a formação de um material granular no centro do núcleo que podem ser observados na fase inicial do processo. As alterações morfológicas (núcleo celular hipertrofiado) que podem ser observados com auxílio de microscopia ótica recebem o nome de efeito citopático. A próxima fase de infecção (tardia) é caracterizada pela formação de uma estrutura densa chamada de estroma virogênico, onde ocorre a intensa produção de BV e replicação do DNA viral. Já na fase muito tardia, há a síntese *de novo* da membrana que envolve os nucleocapsídeos para formação do envelope viral e posterior oclusão ou encapsulamento dos *virions* por meio da matriz proteica produzida nesse momento, formando, assim os corpos de oclusão (OB) (LUA e REID, 2000).

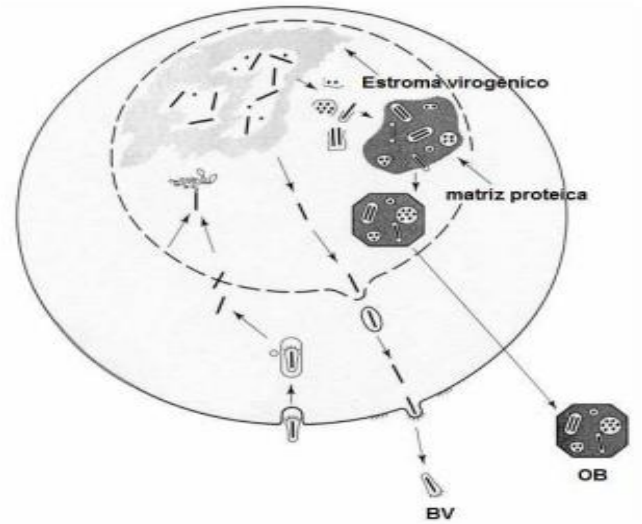
As proteínas estruturais são fundamentais para a entrada do vírus nas células. Alguns processos de infecções que foram analisados obtiveram-se como resultados: existem diferenças entre glicoproteínas relacionadas aos fenótipos infecciosos, BV e ODV. Os *virions* presentes na membrana plasmática (BV) (VOLKMAN e GOLDSMITH, 1985; VOLKMAN, 1986; CHARLTON e VOLKMAN, 1993) são constituídos por peplômeros, e estes possuem como princípio essencial a fosfoglicoproteína GP64 (ou GP67), sendo componente principal para a infectividade dos vírus, esta proteína é exclusiva dos BV (VOLKMAN, 1986; BLISSARD e ROHRMANN, 1990; BLISSARD e WENZ, 1992; CHERMOMORDIK et al., 1995).

Já os ODVs possuem proteínas distintas dos BVs, assim muitas proteínas tornaram-se conhecida como específicas de ODV. Em alguns estudos, autores encontraram proteínas virais como proteína do envelope 25-kDa (ODV-E25) (RUSSEL e ROHRMANN, 1993); a principal glicoproteína do ODV é a O-glicosilada, GP41 ou P40 (WHITFORD e FAULKNER, 1992a, 1992b; MA et al., 1993); E posteriormente com o avanço dos estudos identificaram-se outras proteínas como: proteínas ODV-E66 (HONG et al., 1994), ODV-E56 (BRAUNAGEL et al., 1996a) e ODV-E18, ODV-E35 e ODV-EC27 (BRAUNAGELl et al., 1996b).

O período do ciclo de replicação do baculovírus ocorre de duas formas infectivas: os *Budded Virus* (BV) e os *Occlusion Derived Vírus* (ODV). A segunda forma é a partir da imersão no interior de um corpo de oclusão - *Occlusion Body* (OB), também denominado de poliedro ou grânulo em relação ao gênero. Assim, as partículas virais se replicam e são empacotadas no

núcleo da célula infectada (CASTRO e SOUZA, 2006). O ciclo de infecção *in vitro* de baculovírus está esquematizado na Figura 3.6.

Figura 3.6 - Ciclo de Infecção do sistema *in vitro*



Fonte: Adaptado de Rohrmann (1999).

O ciclo de infecção *in vitro* demonstrado mimetiza o que acontece no inseto no momento da infecção (Processo de infecção *in vivo*). Sua transmissão e replicação ocorrem exclusivamente no estágio larval dos insetos e a progressão e sinais de infecção são dependentes da dose infecciosa, temperatura, grau de especificidade do vírus com o hospedeiro e características físicas e estágio da larva (MILLER, 1997; SLACK e ARIF, 2006).

A produção *in vitro* de baculovírus oferece algumas vantagens em relação ao sistema *in vivo*, como maior possibilidade de aumentar escala de produção, visando o processo industrial, controle das condições de cultivo, produção em ambiente controlado, manutenção da esterilidade do sistema, o produto obtido se encontra em seu estado puro, além de necessitar de menor espaço laboratorial e de mão de obra (ALMEIDA, 2010; SZEWCZYK et al., 2011). Por outro lado, os principais problemas encontrados são a falta de meios de cultura disponíveis com baixo custo e a perda da virulência (efeito passagem) das partículas virais devido às alterações genéticas e fisiológicas decorrentes das sucessivas passagens realizadas *in vitro* (MOSCARDI, 1999; SZEWCZYK et al., 2011).

Visando estabelecer e otimizar sistemas de produção *in vitro* de baculovírus e para atender a demanda de mercado, pode-se destacar algumas pesquisas: estudos da estabilidade do baculovírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) durante a passagem seriada utilizando células Sf9 verificaram o efeito de passagem (PEDRINI, WOLFF

e REID, 2004); a susceptibilidade de duas linhagens de células de inseto, Sf9 e Sf21, ao baculovírus SfMNPV foi verificada por meio da produção dos corpos de oclusão (poliedros) em cultivos em suspensão (ALMEIDA, 2005). Castro et al. (2006) verificaram a infectividade do baculovírus anticarsia em diferentes linhagens de células *Trichoplusia ni, Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* com a finalidade de quantificar a produção viral e a síntese de proteínas. Almeida (2010) estudou sobre os sistemas de cultivos e diferentes isolados de AgMNPV em células Sf21 e verificou a cinética de produção de poliedros do SfMNPV em células Sf9 (ALMEIDA et al., 2010). Dantas (2010) analisou a influência do hormônio ecdisona na produtividade de poliedros de SfMNPV. Del Padre (2016) pesquisou a cinética de crescimento e infecção do AgMNPV em células Sf21 utilizando biorreatores de bancada para a produção do biopesticida viral.

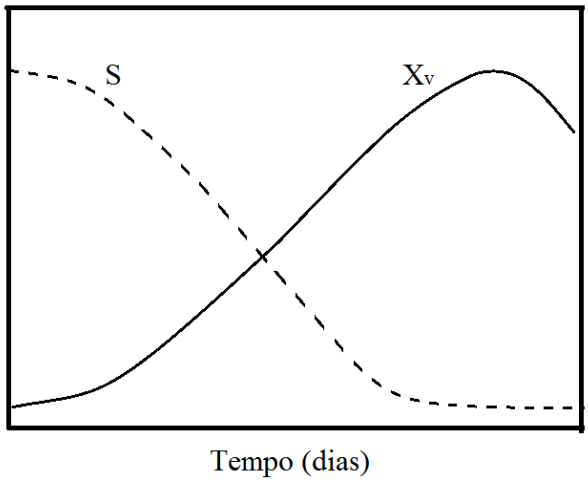
3.5. CINÉTICA DOS PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE BACULOVIRUS

A análise cinética dos processos de produção de baculovírus, normalmente, utiliza-se a estratégia de cultivo em batelada ou descontínuo, semelhante aos processos com células microbianas. Assim, os cultivos podem ser realizados em frascos de cultura (cultivo estático ou monocamadas), em frascos agitados, *Spinners* ou *Erlenmeyers* (cultivo em suspensão), e ainda, em grande escala utilizando biorreatores (ALMEIDA, 2010).

Na propagação de células de inseto em suspensão, utilizando o sistema de cultivo em batelada, geralmente, a concentração de inóculo adicionado equivale de 5-10% (v/v) podendo atingir até 20% (v/v), e os valores máximos de concentração celular variam entre 2,0 e 4,0x10^6 células viáveis/mL.

A Figura 3.7 apresenta a evolução da concentração celular e consumo de substrato ao longo do cultivo em batelada.

Figura 3.7 - Perfil da concentração celular e do substrato em um cultivo em batelada.



Fonte: Adaptado de Chico, Rodríguez e Figueredo (2014).

A curva de crescimento de células viáveis está representada por X_v e o consumo de substrato por S. A produtividade desse processo é limitada pela baixa concentração celular obtida ao final do cultivo, pois está associada à concentração inicial do substrato. No cultivo de células de inseto, a quantidade de substrato dever ser relativamente baixa para evitar problemas de morte celular por efeitos osmóticos, e por fatores ambientais que podem variar ao longo do tempo, como por exemplo, metabólitos tóxicos que podem ser sintetizados durante o processo (CHICO, RODRÍGUEZ e FIGUEREDO, 2014). Além disso, quando se trata de um processo de infecção, a produtividade viral também é dependente de outras variáveis, como: o *design* do frasco da cultura celular, a composição do meio de cultura, as condições da população celular no tempo de infecção (TOI), a multiplicidade de infecção (MOI) e o número de passagens do inóculo viral (POWER et al., 1994).

Com o estudo dos parâmetros cinéticos é possível relacionar as velocidades de crescimento, de morte, de consumo de substrato e síntese de produtos sob as condições de cultivo, permitindo prever quantitativamente o comportamento das células (AUGUSTO, BARRAL e PICCOLI, 2014). E a partir do conhecimento desses dados, promover a otimização do processo para ampliação da escala de produção de bioinseticidas virais. Assim, o acompanhamento cinético desses processos pode ser descrito matematicamente por expressões cinéticas e balanços de massa similares aos modelos matemáticos para os cultivos com células microbianas. Apenas deve-se considerar a viabilidade das células, no caso de cultivo de células animais, há sempre uma quantidade mensurável de morte celular que deve ser incluída no cálculo dos parâmetros cinéticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGEM CELULAR

A linhagem de células de inseto utilizada foi a Sf21 (VAUGHN et al, 1977), derivada do tecido embrionário da lagarta *Spodoptera frugiperda* cedida pela pesquisadora Dra. Marlinda de Souza Lobo (Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen). Esta linhagem originalmente era mantida em meio TNMFH suplementado com 10% de soro fetal bovino cultivada em garrafinhas de cultura. Para os processos de infecção desse trabalho, as células foram adaptadas ao cultivo em suspensão e ao meio SF900II (Gibco), meio livre de soro fetal bovino.

A manutenção das células utilizou o meio SF900II e *shaker* (SOLAB SL-223) com agitação de 120 rpm e temperatura controlada de 28 ºC, utilizando frascos *Erlenmeyers* (100 mL) com 20 mL de volume de suspensão celular e uma concentração de (8×10^5 a 1×10^6) células viáveis/mL. Subcultivos para a manutenção da linhagem foram realizados a cada 72 horas (ALMEIDA, 2005).

A morfologia, concentração celular e a viabilidade foram monitoradas por meio de microscopia ótica, de acordo com metodologia descrita por Nielsen, Smyth e Greenfield (1991). Amostras foram retiradas para a contagem em câmara de Neubauer, e determinada a concentração de células com o auxílio do método de exclusão de azul de tripano (0,1% v/v) para verificar a viabilidade celular (Equação 4.1).

$$Cc_{\left(\frac{células}{mL}\right)} = \frac{N\ células\ x\ D}{8\ x10^{-4}} \tag{4.1}$$

Em que:
Cc (células viáveis/mL) – concentração de células
N (células) – número de células contadas nos quadrantes
D – Fator de diluição

4.2 ISOLADOS VIRAIS

Dois baculovírus selvagens foram utilizados nos processos de infecção, *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) – Isolado AgMNPV-2D e o

Chrysodeixis includens single nucleopolyhedrovirus (ChinSNPV), fornecidos pela Embrapa – Cenargen (Recursos Genéticos e Biotecnologia).

Dois fenótipos virais dos baculovirus estudados foram utilizados no sistema de produção *in vitro*: o vírus extracelular (BV) – obtido do ciclo de infecção em células Sf21 no tempo de pós-infecção de 24 - 48 horas e o vírus derivado da oclusão (ODV) – obtido na fase final do ciclo de infecção no tempo de 7-10 dias do processo de infecção. Os ODVs foram obtidos por meio da utilização de soluções alcalinas para solubilização da matriz proteica que envolve o corpo de oclusão (OB) de modo a permitir a entrada das partículas virais nas células de inseto no processo de infecção celular (ALMEIDA, 2010).

.

Para a liberação e contagem dos corpos de oclusão (OB) produzidos pelas células infectadas, um volume igual a 1% (v/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi adicionado a 0,5 mL da suspensão de células infectadas. A mistura foi incubada a 28 ºC por duas horas para promover a dissolução das membranas celulares e liberação dos OBs. A solução contendo os OBs foi diluída com água para se obter um número de partículas de OB entre 100 e 150 com uma concentração aproximada de (1 a 1,5) x 10^7 OB/célula no quadrante central da câmara de Neubauer. Os OBs foram contados utilizando um microscópio ótico com aumento de 400 vezes e sua concentração foi estimada pela Equação 4.2, conforme descrito por Nielsen, Smyth e Greenfield (1991).

$$C_{OB\left(\frac{OB}{mL}\right)} = \frac{5 \; x \; D \; x \; M(OB)}{1x \; 10^{-4}} \tag{4.2}$$

Em que:

C_{OB} (OB/mL) – concentração de OB

D – Fator de diluição

M_{OB} – número de OB contado no quadrante central

4.3 PROCESSOS *IN VITRO* DE INFECÇÃO COM OS BACULOVIRUS ANTICARSIA E CHRYSODEIXIS

Os processos de infecção *in vitro* com AgMNPVe ChinSNPV foram realizados por meio de infecções em células Sf21 sadias cultivadas em suspensão, com viabilidade de 80% ou superior, utilizando como inóculo partículas virais do tipo vírus derivado da oclusão (ODV) e vírus extracelular (BV) dos respectivos baculovírus. Cada sistema de infecção foi analisado, separadamente, quanto ao crescimento de células viáveis (controle e infectadas), à produção

OB (volumétrica e específica). Também foi realizada a análise para o processo de co-infecção com as partículas virais. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.1 Infecções com vírus derivado da oclusão dos baculovírus AgMNPV e ChinSNPV

Para as infecções com ODV foi necessário preparar as partículas virais para promover a entrada dos *virions* nas células Sf21em cultivo. Assim, a liberação dos ODVs de ambos isolados AgMNPV-2D e ChinSNPV foi realizada conforme metodologia descrita por Lynn (1994). Uma alíquota de 300 µL de OB de cada isolado com concentração na ordem de 10^8-10^9 OB/mL foi adicionada em solução álcali para promover a dissolução da poliedrina que envolve o OB e, assim, obter o ODV para ser inoculado em suspensão de células Sf21.

Os processos de infecção foram conduzidos em frascos *Erlenmeyer* (125 mL) e com meio SF900II, contendo 25 mL ou 30 mL (o volume utilizado dependia da concentração de células presentes na cultura da manutenção celular que seria usada para o processo de infecção) de suspensão celular com viabilidade maior que 80% ou superior, incubados em *shaker* (SOLAB SL-223) a 120 rpm e 28 ºC. Para o AgMNPV-2D, o tempo de infecção (TOI) foi de $1x10^6$ células viáveis/mL, ou seja, esta foi a concentração celular em que os processos iniciaram, e para o ChinSNPV, o TOI foi $5x10^5$ células viáveis/mL, isso devido a estabilidade do crescimento das células em cada processo. Assim, obteve-se uma solução de ODV liberado do OB – AgMNPV-2D, esta solução foi inoculada em suspensão de 30mL de células Sf21sadias. Da mesma forma, considerando o processo de infecção com o ChinSNPV, a solução de ODV do ChinSNPV foi inoculada em outra suspensão de 30mL de células Sf21sadias, caracterizando os sistemas *in vitro* de infecção com cada um dos isolados virais. Amostras (200 µL) foram retiradas diariamente, de cada um dos sistemas de infecção, para acompanhamento da cinética de crescimento das células controle e infectadas, bem como, a produção de OB e consumo de glicose durante o processo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.3.2 Infecções com vírus extracelulares dos baculovírus AgMNPV e ChinSNPV

Primeiramente, suspensões de células Sf21foram infectadas com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10% (v/v) dos BVs retirados da segunda passagem seriada em células

Sf21dos isolados de AgMNPV e ChinSNPV obtidos de trabalhos anteriores do grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos do CBiotec para verificar a capacidade de infecção de inóculos mais antigos.

As infecções foram realizadas separadamente com tempo de infecção (TOI) de 1,0 x 10^6 células viáveis/mL para AgMNPV e 5,0 x 10^5 células viáveis/mL para ChinSNPV, devido a fase de adaptação das células e a sua velocidade de crescimento nas condições adotadas. Os cultivos foram conduzidos em frascos *Erlenmeyers* (100 mL) com 20 mL de suspensão celular (ALMEIDA, 2010). As amostras foram retiradas, a cada 24 horas, para a contagem das células não infectadas (controle) e infectadas, bem como, a determinação da concentração dos OBs produzidos durante o processo.

Os OBs obtidos a partir desses processos de infecção foram utilizados para liberar os ODVs para servir de inóculo viral das infecções subsequentes. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

No segundo momento, novas infecções foram realizadas a partir dos vírus extracelulares (BV) obtidos dos processos de infecção com ODV realizados previamente, tanto para o AgMNPV quanto para ChinSNPV. Para os processos de infecção as novas partículas virais do tipo BV foram utilizadas com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 20% (v/v) e tempo de infecção (TOI) de 1x10^6 células viáveis/mL para o AgMNPV e MOI de 10% (v/v) e TOI de 5x10^5células viáveis/mL para o ChinSNPV. Em ambos os sistemas foram utilizados frascos *Erlenmeyers* (125 mL) com volume de 30 mL de suspensão celular mantida em incubadora *shaker* (SOLAB SL-223) a 28 ºC e 120 rpm.

4.3.3 Co-Infecções com vírus extracelular dos baculovírus AgMNPV e ChinSNPV

As co-infecções foram realizadas a partir dos vírus extracelulares (BV) extraídos do sobrenadante da suspensão de células infectadas, com 24 horas dos processos de infecção com ODV realizados previamente, tanto para o AgMNPV quanto para ChinSNPV. Portanto, a partícula viral utilizada como inóculo viral foi denominada de vírus extracelular (BV) de passagem 1. Utilizou-se uma multiplicidade de infecção (MOI) de 20% (v/v), sendo 10% (v/v) de BV do AgMNPV-2D e 10% (v/v) de BV do ChinSNPV; e tempo de infecção (TOI) de 1x10^6 células viáveis/mL. Os cultivos foram realizados em frascos *Erlenmeyers* (125mL) com volume de 30 mL de suspensão celular mantida em incubadora *shaker* (SOLAB SL-223) a 28 ºC e 120 rpm.

4.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Os parâmetros cinéticos dos processos de infecção realizados foram estimados conforme metodologias descritas por Schmidell et al. (2001) e Almeida et al. (2010).

As velocidades máximas de crescimento específico de células não infectadas (controle) (μ_x) e células infectadas (μ_{xi}) foram estimadas por ajuste linear logarítmico Neperiano da densidade celular com o tempo de cultivo durante o crescimento exponencial, de acordo com a metodologia de Schmidell et al. (2001). Assim, o coeficiente angular desta curva ajustada foi considerado a velocidade específica máxima de crescimento das células, tanto controle quanto infectadas. A velocidade média de infecção (K_d) e a velocidade média de produção de OB (K_{OB}) foram calculadas por ajuste linear de dados experimentais durante a fase de crescimento exponencial das células infectadas (ALMEIDA et al., 2010).

O modelo cinético foi baseado no "sincronismo" da infecção celular, assim, o número de células viáveis infectadas foi igual ao número de células viáveis não infectadas no tempo de infecção (TOI) aplicado. No modelo (Equação 4.3) foi considerado que o crescimento celular sofrerá inibição após a exposição ao vírus (POWER e NIELSEN, 1996).

$$\frac{dX_{VI}}{dt} = \left(\mu(\tau) - K_d(\tau)\right) \cdot X_{VI} \tag{4.3}$$

Em que:

X_{VI}: concentração de células viáveis infectadas durante o processo de infecção;

t (dias): tempo do processo;

μ: velocidade específica de crescimento das células infectadas;

τ: tempo de exposição ao vírus;

K_d: taxa de mortalidade das células infectadas, refletindo o impacto letal do vírus.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Artigo 1: PROCESSO *IN VITRO* DE INFECÇÃO DO AGMNPV-2D EM CÉLULAS SF21 (A ser submetido. Periódico: **Biotechnology and Bioprocess Engineering.** Qualis A2 em Engenharias II)

RESUMO

Anticarsia gemmatalis Multiple Nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) é um patógeno específico da lagarta *Anticarsia gemmatalis,* uma das principais desfolhadoras da lavoura da soja. Assim, o presente trabalho teve como objetivo a produção *in vitro* dos baculovírus AgMNPV, isolado 2D, em linhagem celular Sf21cultivada em suspensão. A produção de corpos de oclusão (OB) foi analisada por processos de infecção utilizando dois fenótipos virais do AgMNPV-2D, vírus extracelular (BV) e vírus derivado de oclusão (ODV). Os cultivos foram realizados em frascos *Erlenmeyers* (125mL) com 30mL de suspensão de células Sf21, agitados em *shaker* a 120 rpm e temperatura de 28 (±1) ºC. As amostras (200µL) foram retiradas a cada 24 horas para serem analisadas quanto à concentração e viabilidade celular, e produção volumétrica e específica dos OBs produzidos. A melhor infecção em termos numéricos foi a do ODV do AgMNPV-2D sendo 21,8 OB/célula e 2,8 x 10^7 OB/mL.

Palavras-chave: biopesticidas virais; *Anticarsia gemmatalis*; cultivo em suspensão; partículas virais.

ABSTRACT

Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) is a specific pathogen of the *Anticarsia gemmatalis* caterpillar, one of the main defoliators of soybean crops. Thus, the present work aimed at the in vitro production of AgMNPV baculoviruses, isolated 2D, in suspension cultured Sf21cell line. The production of occlusion bodies (OB) was analyzed by infection processes using two viral phenotypes of AgMNPV-2D, extracellular virus (BV) and occlusion-derived virus (ODV). The cultures were carried out in Erlenmeyers flasks (125mL) with 30mL of Sf21 cell suspension, shaken in a shaker at 120 rpm and a temperature of 28 (±1) ºC. Samples (200µL) were taken every 24 hours to be analyzed for concentration and cell viability, and volumetric and specific production of the OBs produced. The best infection in numerical terms was that of the ODV of AgMNPV-2D, being 21.8 OB/cell and 2.8 x 10^7 OB/mL.

Key words: viral biopesticides; *Anticarsia gemmatalis*; suspension cultivation; viral particles.

1. INTRODUÇÃO

Possuindo uma produção mundial de grãos acima de 360 milhões de toneladas, a cultura da soja (*Glycine max* L. Merr.) é essencial economicamente [1]. Os grãos desta fabácea são fundamental fonte de proteína vegetal, componente essencial na produção de ração animal, e sua vasta utilização na alimentação humana [2]. O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, cultivando aproximadamente de 35 milhões de hectares na safra 2018/2019, tendo

como o estado de Mato Grosso o de maior produção do país [3]. Contudo, durante os anos do ciclo produtivo da cultura, a presença constante de insetos-praga, que podem ocorrer desde a semeadura até a maturação dos grãos, atribuindo-se como um dos principais motivos limitantes para a exploração da cultura e, consequentemente, de sua produção [4, 5].

Essa problemática pode ser controlada através da utilização de manejos fitossanitários, como: diversificação de plantas (enfatizando os consórcios e as rotações de culturas); utilização de sementes sadias; uso de espécies ou variedades adaptadas às condições de clima e solo locais (respeitando os requisitos referentes às estações do ano); e priorização de uso de cultivares geneticamente resistentes a fitopatógenos e insetos-praga (obtidas por métodos clássicos de melhoramento (Plantas transgênicas BTs), quando a integração dessas práticas culturais não são eficientes para evitar e conter uma doença/praga em nível tolerável, são recomendadas medidas emergenciais, nas quais incluem introdução de inimigos naturais para o controle biológico (fungos, vírus e bactérias).

A lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada a principal praga da soja, sendo um principal desfolhador desta cultura no Brasil [6-7]. No entanto, mesmo existindo outras plantas hospedeiras, essa espécie se alimenta preferencialmente de leguminosas e a sua grande relevância é relacionada à sua grande abundância e ocorrência frequente em todas as regiões do Brasil onde há a cultura [8].

Esta espécie caracteriza-se por possuir quatro pares de falsas pernas, coloração geralmente verde contendo estrias longitudinais no dorso, podendo atingir até 40 mm de comprimento. Em relação aos danos causados por este desfolhador, a lagarta da soja chega a consumir individualmente cerca de 90 cm² de folhas durante o seu desenvolvimento, podendo o desfolhamento chegar a 100% [9,10]. Ainda, segundo Moscardi [11], a lagarta da soja pode ser responsável por até 50% das aplicações de inseticidas químicos na cultura da soja. O controle biológico da *A. gemmatalis* pode ser efetuado através da bactéria *Bacillus thuringiensis* e do baculovírus Anticarsia.

Os baculovírus compreendem o maior grupo dentre os vírus de insetos utilizados como bioinseticidas, sendo o baculovírus Anticarsia (*Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* - AgMNPV) utilizado desde 1984, para o controle da lagarta da soja no Brasil. Ele vem sendo produzido *in vivo*, trabalhando com condições de campo ou de criação massal do inseto em laboratório por causa do melhor desempenho na obtenção de corpos de oclusão [12].

O modo de ação do baculovírus Anticarsia consiste, inicialmente, na ingestão do alimento contaminado pelas larvas do inseto, posteriormente, ocorrendo a dissolução dos

corpos de oclusão, promovendo uma infecção primária no intestino médio, e depois, são desencadeadas infecções secundárias, ocorrendo a ruptura das células [13, 12]. Logo, o inseto torna-se debilitado e para de se alimentar, ocasionando a morte de 5 a 8 dias após contrair a infecção, apresentando o corpo descolorido e, cerca de dois dias após a morte, acontece o rompimento do corpo da lagarta liberando uma ampla quantidade de vírus sobre a planta, servindo de inóculo para o mesmo. A partir disto, sabe-se que a utilização dos baculovírus já evitaram que cerca de 11 milhões de litros de agrotóxicos fossem lançados no ambiente, proporcionando uma economia superior a 100 milhões de dólares [12, 14].

Portanto, o desafio da pesquisa é utilizar estratégias de produção *in vitro* da baculovirus Anticarsia utilizando células em suspensão (linhagem celular Sf21) e com dois fenótipos (BV e ODV) e diferentes multiplicidades de infecção (MOI) para aumentar a produção final de OB e possibilitar a ampliação do cultivo. Assim, a infecção processo conduzido em frascos de agitação proporciona maior acesso das partículas virais às células e, consequentemente, o aumento na produção de OB de AgMNPV quando comparado à cultura em monocamada [15].

Esta pesquisa tem como finalidade a produção e quantificação de OB (corpo de oclusão) através da infecção por BV e ODV do AgMNPV-2D e posteriormente verificar o consumo de glicose nesse processo infectivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Células

A linhagem de células de inseto utilizada foi a Sf21 Vaughn et al [16], derivada do tecido embrionário da lagarta *Spodoptera frugiperda* cedida pela pesquisadora Dra. Marlinda de Souza Lobo (Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen). Esta linhagem originalmente era mantida em meio TNMFH suplementado com 10% de soro fetal bovino cultivada em garrafinhas de cultura. Para os processos de infecção desse trabalho, as células foram adaptadas ao cultivo em suspensão e ao meio SF900II (Gibco), meio livre de soro fetal bovino.

A manutenção das células utilizou o meio SF900II e *shaker* (SOLAB SL-223) com agitação de 120 rpm e temperatura controlada de 28 ºC, utilizando frascos *Erlenmeyers* (100mL) com 20mL de volume de suspensão celular e uma concentração de (8×10^5 a 1×10^6) células viáveis/mL. Subcultivos para a manutenção da linhagem foram realizados a cada 72 horas [17].

A morfologia, concentração celular e a viabilidade foram monitoradas por meio de microscopia ótica, de acordo com metodologia descrita por Nielsen, Smyth e Greenfield [18]. Amostras foram retiradas para a contagem em câmara de Neubauer, e determinada a concentração de células com o auxílio do método de exclusão de azul de tripano (0,1% v/v) para verificar a viabilidade celular (Equação 2.1).

$$Cc_{\left(\frac{células}{mL}\right)}=\frac{N\ células\ x\ D}{8\ x10^{-4}} \tag{2.1}$$

Em que:

Cc (células viáveis/mL) – concentração de células

N (células) – número de células contadas nos quadrantes

D – Fator de diluição

2.2. Vírus

O baculovírus selvagem foi utilizado no processo de infecção, *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) – Isolado AgMNPV-2D fornecido pela Embrapa – Cenargen (Recursos Genéticos e Biotecnologia).

Dois fenótipos virais dos baculovirus estudados foram utilizados no sistema de produção *in vitro*: o vírus extracelular (BV) – obtido do ciclo de infecção em células Sf21 no tempo de pós-infecção de 24 - 48 horas e o vírus derivado da oclusão (ODV) – obtido na fase final do ciclo de infecção no tempo de 7-10 dias do processo de infecção. Os ODVs foram obtidos por meio da utilização de soluções alcalinas para solubilização da matriz proteica que envolve o corpo de oclusão (OB) de modo a permitir a entrada das partículas virais nas células de inseto no processo de infecção celular.

Para a liberação e contagem dos corpos de oclusão (OB) produzidos pelas células infectadas, um volume igual a 1% (v/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi adicionado a 0,5 mL da suspensão de células infectadas. A mistura foi incubada a 28 ºC por duas horas para promover a dissolução das membranas celulares e liberação dos OBs [15].

A solução contendo os OBs foi diluída com água para se obter um número de partículas de OB entre 100 e 150 com uma concentração aproximada de (1 a 1,5) x 10^7 OB/célula no quadrante central da câmara de Neubauer. Os OBs foram contados utilizando um microscópio ótico com aumento de 400 vezes e sua concentração foi estimada pela Equação 2.2.

$$C_{OB\left(\frac{OB}{mL}\right)}=\frac{5\ x\ D\ x\ M(OB)}{1x\ 10^{-4}} \tag{2.2}$$

Em que:

C_{OB} (OB/mL) – concentração de OB

D – Fator de diluição

M_{OB} – número de OB contado no quadrante central

2.3. Processo de replicação *in vitro* do isolado AgMNPV-2D

2.3.1. Infecções com vírus extracelular (BV) do AgMNPV-2D

Os processos de infecção *in vitro* dos baculovírus AgMNPV foram realizados por meio de infecções em células Sf21 sadias cultivadas em suspensão, com viabilidade superior a 80%. As linhagens foram infectadas com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10% (v/v) dos BVs retirados da segunda passagem seriada em células Sf21 do isolado de AgMNPV-2D de cultivos anteriores, tempo de infecção (TOI) para esse processo foi de 1,0 x 10^6 células viáveis/mL. Os cultivos foram conduzidos em frascos *Erlenmeyers* de 100 mL com 20 mL de suspensão celular e o meio utilizado nessa etapa de infecção foi o SF900II [15].

As amostras foram retiradas, a cada 24 horas, para a contagem das células não infectadas (controle) e infectadas, bem como, a determinação da concentração dos OBs produzidos durante 10 dias de processo. Os OBs obtidos a partir desses processos de infecção foram utilizados para liberar os ODVs para servir de inóculo viral das infecções subsequentes. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3.2. Infecções com o vírus derivado da oclusão (ODV) do AgMNPV-2D

Os processos de infecção *in vitro* dos baculovirus AgMNPV foram realizados conforme citados anteriormente, com a alteração no inóculo viral que foi utilizado o ODV obtido produção *in vitro* de OB das infecções com os isolados estudados. A liberação dos ODVs foi realizada conforme metodologia descrita por [19].

A solução obtida de ODV foi inoculada no volume de 5-7mL em suspensão de 30mL de células Sf21. Amostras foram retiradas diariamente para acompanhamento da cinética de crescimento das células controle e infectadas, bem como, a produção de OB. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.4 Determinação da concentração da glicose na infecção do AgMNPV-2D

As alíquotas (100 µL) de cada processo de infecção foram retiradas e centrifugadas (1000 rpm por 10 minutos, MiniSpin-Eppendorf). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20ºC para posterior análise.

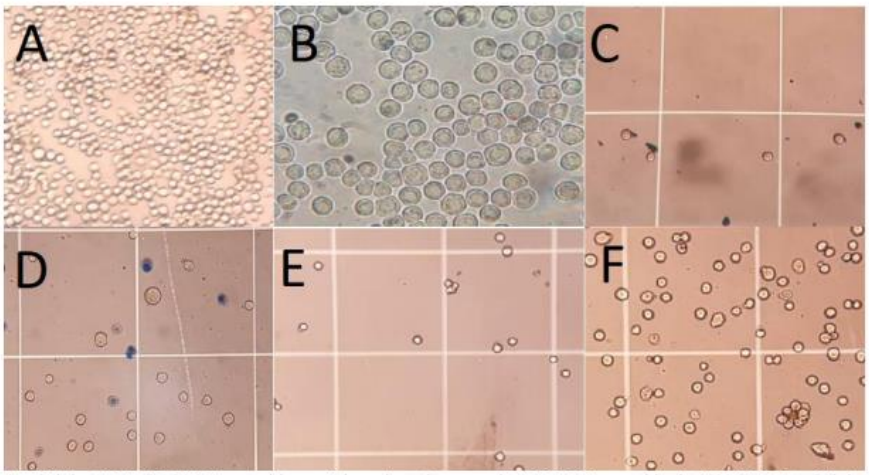
Após o descongelamento, o sobrenadante coletado foi submetido à determinação da concentração de glicose, pelo método DNS em microplacas, conforme metodologia de Santos et al. [20].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Processo de Infecção por BV do AgMNPV-2D

O processo de adaptação celular (anterior ao procedimento da infecção) para as condições de processo utilizadas, pode ter sua cronologia visualizada na figura 1. Observa-se na figura 1A, as células Sf-21 em cultivo monocamada e adaptadas ao meio TNM-FH acrescido de 10% SBF, percebe-se um bom crescimento celular, preenchendo a superfície de crescimento disponível. Na figura 1B, as células encontram-se em processo de adaptação ao meio SF900II livre de soro da GIBCO, é possível visualizar um aumento do volume celular e a presença de vesículas indicando estresse osmótico, sendo associado a mudança do meio de cultivo. Na figura 1C temos a célula translúcida, adaptada ao meio SF900II e recém transferida para o cultivo em suspensão a uma rotação inicial de 80 rpm, obtendo uma visualização de baixa confluência celular. Na figura 1D temos a célula em processo de adaptação ao cultivo em suspensão, podemos indicar a presença de células não viáveis coradas em azul, diferente do que está apresentado na figura 1E as células se encontram adaptadas ao cultivo em suspensão vemos células translúcidas de morfologia conservada, sem apresentar aumento do volume celular e com viabilidade acima de 90% e concentração celular baixa, a figura 1F, onde foi observado células cultivadas a 120 rotações por minuto, sendo essa condição ideal para o melhor desenvolvimento celular, garantindo uma boa oxigenação para as células.

Figura 1 Etapas do procedimento de adaptação celular



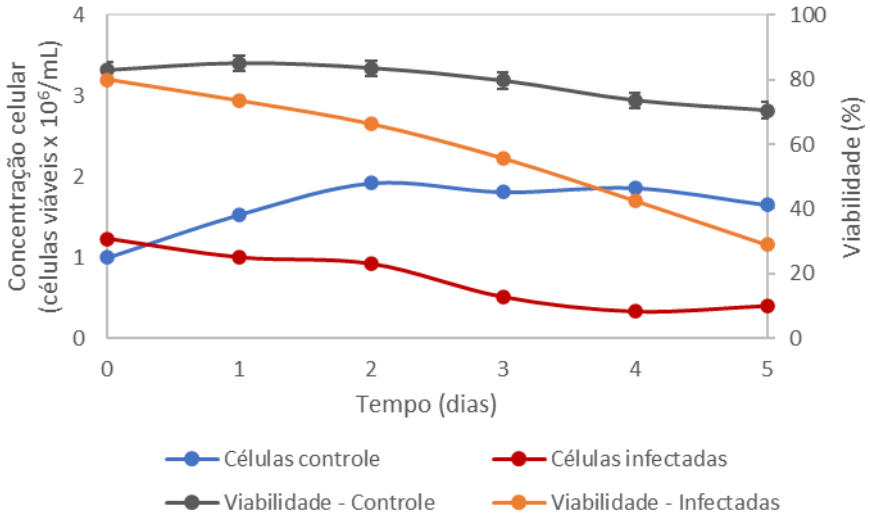
A - Células IPLB-SF-21AE em cultivo estático adaptadas ao meio TNM-FH acrescido de 10% SBF; B - Células IPLB-SF-21AE em cultivo estático em adaptação ao meio SF900II livre de soro; C - Células IPLB-SF-21AE adaptadas ao meio SF900II livre de soro e recém transferidas para cultivo em suspensão; D - Células IPLB-SF-21AE em adaptação ao cultivo em suspensão; E - Células IPLB-SF-21AE adaptadas ao cultivo em suspensão à 94.1 rotações por minuto; F - Células IPLB-SF-21AE completamente adaptadas.

Fonte: Magalhães (2022).

O processo de infecção foi realizado e as células apresentaram sinais característicos de infecção por AgMNPV, volume celular aumentado, formato irregular e estruturas escuras em seu citoplasma.

Em seguida, após a contagem das células viáveis e não viáveis e dos corpos de oclusão produzidos durante o processo infectivo, foi possível determinar a concentração e a viabilidade celular, bem como a produção volumétrica e específica dos corpos de oclusão no decorrer do tempo, utilizando como inóculo viral BVs de passagem 2. Na Figura 2 foi observada uma redução progressiva da viabilidade das células infectadas em conjunto com uma diminuição progressiva de sua concentração celular, sendo mais pronunciada da concentração celular que ocorreu com 72 horas do processo, o que é compatível com o ponto de maior produção de BVs. Por fim, as células do controle permaneceram com viabilidade acima de 60% durante todo o processo infectivo, com isto sem apresentar queda acentuada, sua concentração cresceu até o dia 3 do processo, permaneceu estável até o quarto dia e no dia 5 começou a diminuir, apresentando assim uma tendência de queda.

Figura 2. Processo de Infecção do BV em segunda passagem do AgMNPV-2D



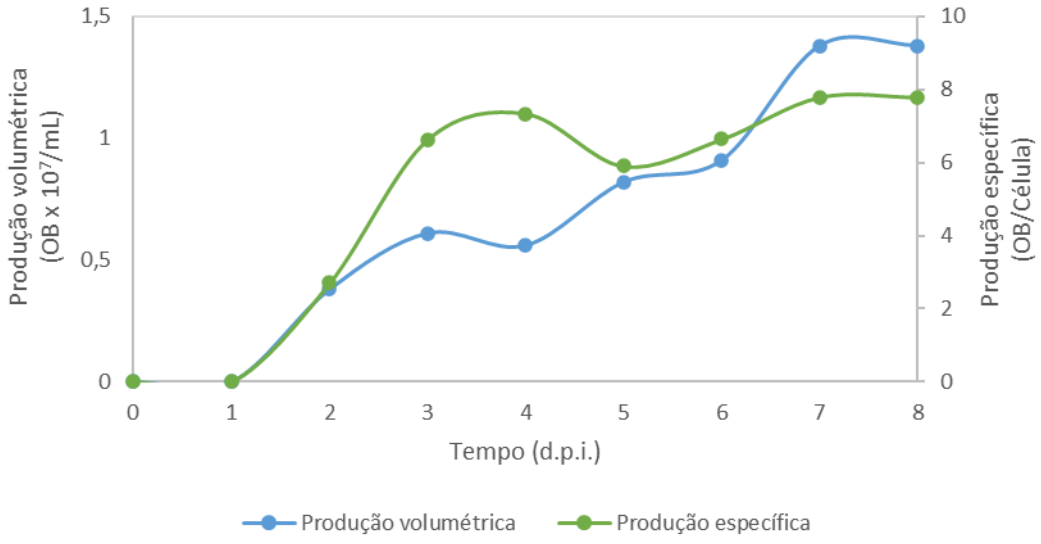
Fonte: Autoria própria, 2022.

A maior concentração de células viáveis do controle foi obtida no quarto dia de processo e foi de 3,08 x 10^6 células viáveis/mL, enquanto a maior concentração de células totais foi obtida no sétimo e último dia do processo, sendo ela de 4,075 x 10^6 células/mL, neste dia a viabilidade do controle era de 44.4%. Comparativamente, a partir do primeiro dia, as células infectadas já estavam abaixo de 70% de viabilidade, mostrando estabilidade até o sétimo dia do processo, quando a viabilidade começou a demonstrar queda linear. Este resultado está corroborando com as concentrações máximas já descritas na literatura em torno de 4,0x10^6 células viáveis/mL [21].

Portanto, foi observado a diferenciação entre a concentração e a viabilidade celular da infecção em relação a célula controle, que por sua vez apresentou maior estabilidade no decorrer do tempo, sabendo que essa representação em valores menores é a comprovação da infecção e efeitos da ação do AgMNPV-2D presente neste cultivo celular.

A Figura 2 mostra a produção específica e volumétricas de corpos de oclusão (OB) no decorrer do tempo. Sendo observado que após 48 horas do processo, tem-se início da produção de OB, tanto específica quanto volumétrica.

Figura 2. Produção dos corpos de oclusão (OB).



Fonte: Autoria própria, 2022.

Foram obtidas como resultados a concentração volumétrica máxima de 1,38x10^7 OB/mL, que foi alcançada no 7º dia do procedimento, e então ocorre a estabilização da produção da concentração volumétrica máxima que corresponde a uma produção específica de 7,7 OB/célula. Cada célula do processo produziu no máximo 7,7 corpos de oclusão. Comparativamente ao estudo de Andrade [22] que possui as mesmas condições e obteve como resultados 0,17 x 10^7 OB/mL e 5 OB/célula, com isto o valor da nossa pesquisa apresentou um aumento na produção de OB e está ocorrência pode ser relacionada a uma melhor adaptação celular ao processo e a concentração de vírus adicionado a amostra.

Com isso, a produção de OBs obtida nesse trabalho possuiu uma menor quantidade quando comparado ao estudo citado, possivelmente, devido ao processo de adaptação das células ainda não está completamente estabelecido, as células não cresceram o suficiente para atingir uma produtividade maior. Sistemas de cultivo para essa linhagem tornam-se mais produtivos quando as células estão adaptadas aos processos agitados, ou seja, agitação ajustada a 120 rpm e temperatura controlada a 28ºC, condições ótimas para o pleno desenvolvimento da linhagem Sf21 em suspensão.

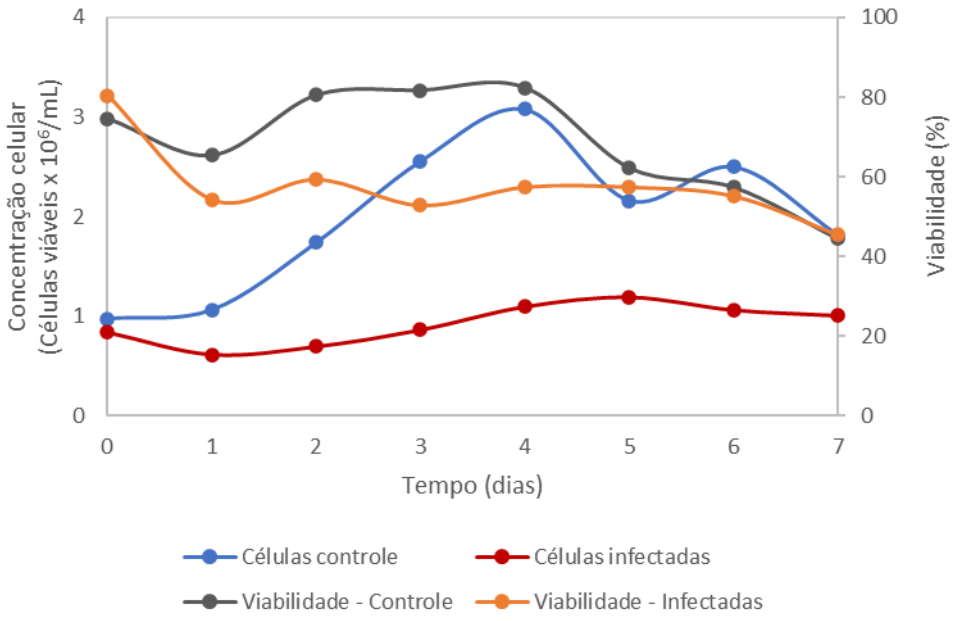
Embora tenha sido observada a infecção, demonstrada pelos efeitos citopáticos característicos e a baixa concentração de células infectadas, esse processo não foi otimizado, pois, as células que foram utilizadas estavam com viabilidade de 89% no momento da infecção e cultivadas em agitação de 80 rpm, portanto, ainda não estavam na condição ideal para atingir

a produção de OB desejada ou comparável aos sistemas já estudados com o mesmo isolado viral e células de inseto.

3.2. Infecção por ODV do AgMNPV-2D

A Figura 3, mostra o percurso coerente de um processo de infecção., A célula controle tem um crescimento na concentração de células enquanto a célula infectada começa uma queda em sua concentração devido a ação dos vírus presentes no seu interior. O mesmo se observa na viabilidade celular dessa infecção, atingindo ao fim do processo os valores de concentração celular final para a cultura de célula controle e a cultura de célula infectada, respectivamente 1,81 x 10^6 células/mL e 1,01 x 10^6 células/mL. E a viabilidade final de ambas amostras atingiram cerca de 45%.

Figura 3 Infecção por ODV do AgMNPV-2D.



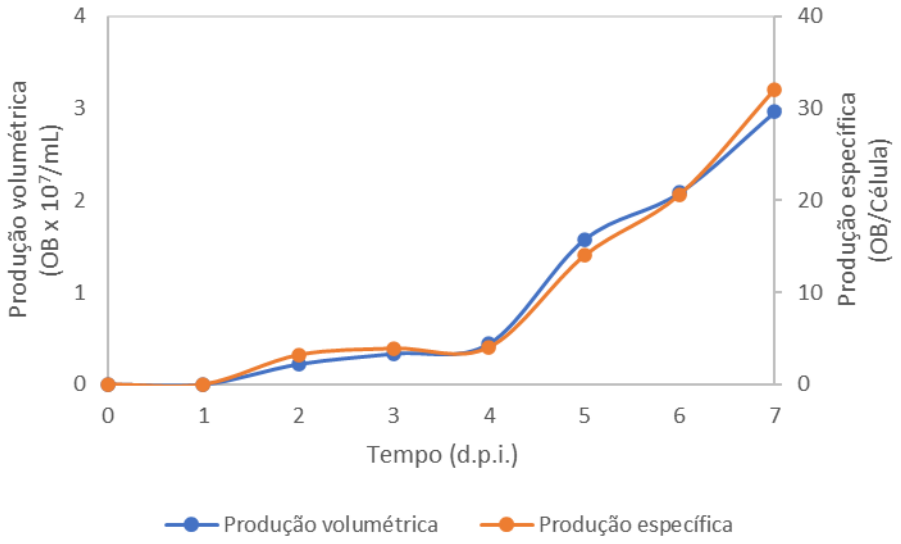
Fonte: Autoria própria, 2022.

Os resultados da produção de OB tendo como inóculo viral o ODV do AgMNPV 2D estão dispostos na (Figura 4) Os valores obtidos para essa infecção e a produção de OB identifica-se que ocorreu a infecção. Obtendo como resultados para a produção volumétrica de OB 0,22 a 2,8 x 10^7 OB/mL e para a produção específica de OB tem-se 3,2 a 21,8 OB/célula.

A produtividade das células de inseto está relacionada a quantidade subcultivos realizada no processo e sem a presença do soro fetal bovino (SBF), em maior número de passagens, ocorre uma diminuição da concentração máxima celular e na produção proteínas

recombinantes e forma inversa acontece um aumento na quantidade de proteínas celulares e o tamanho das células, relacionando-se a adaptação celular ao novo meio com ausência de SBF, e ocasionando essa diminuição na produção e alterações morfológicas [23].

Figura 4. Produção de OB com o ODV do AgMNPV 2D



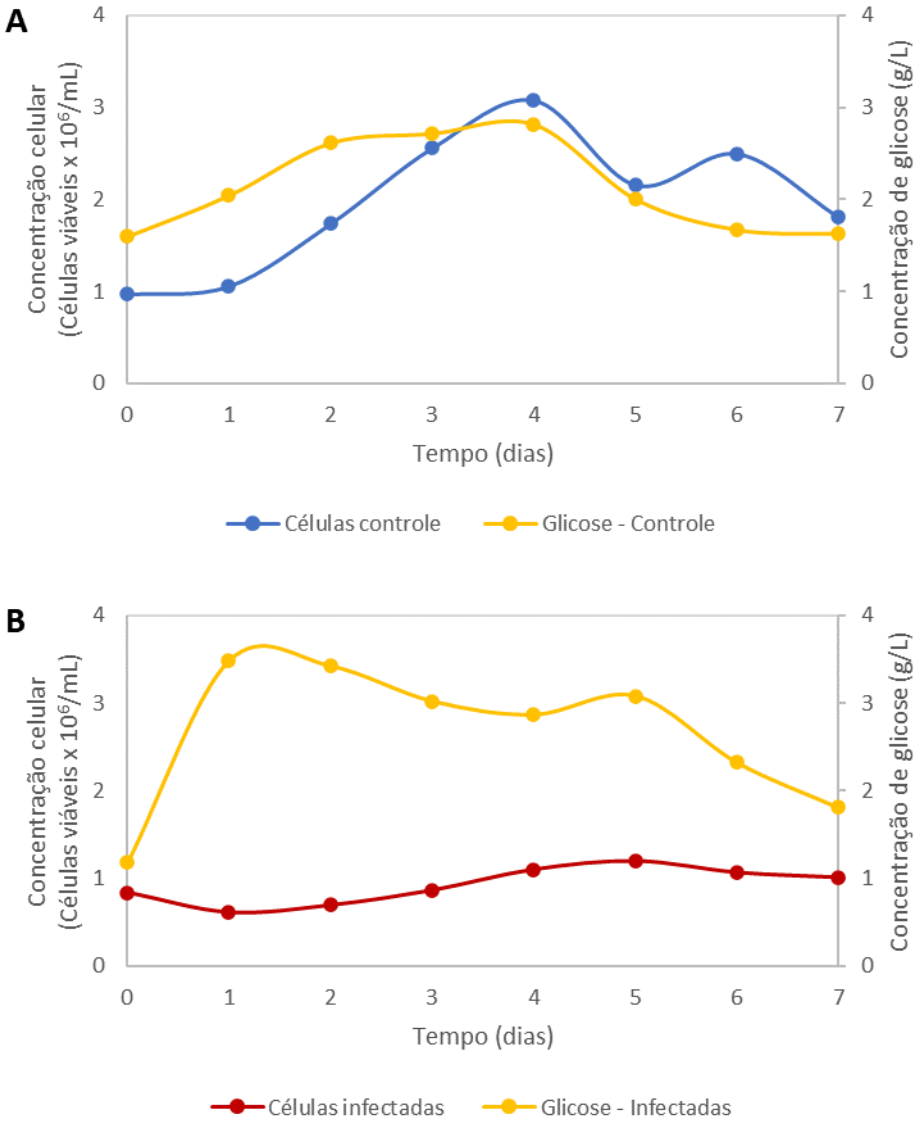
Fonte: Autoria própria, 2022.

Os resultados obtidos nessa pesquisa para o BV foram de 1,38x10^7 OB/mL e 7,7 OB/célula e para o ODV de 2,8 x 10^7 OB/mL e 21,8 OB/célula para o mesmo vírus que é o AgMNPV-2D, visto os valores obtidos a infecção por ODV apresentou um aumento na produção de OB tanto volumétrica quanto a específica, estes valores podem ser referentes a uma melhor adaptação celular ao processo ou a quantidade de vírus adicionada a solução.

3.3. Consumo de Glicose na infecção do ODV do AgMNPV 2D

A Figura 5 apresenta o consumo de glicose para a célula controle e a infectada em relação ao período de 7 dias do processo, observando que no primeiro dia as duas amostras possuíram um consumo similar, sendo de 1,5 para a controle e 1,18 para a infectada, a partir do segundo ao quinto dia de avaliação a curva de consumo da célula infectada apresentou um aumento, isto pode estar relacionado a produção de OB, pois ocorre uma mudança no maquinário celular para possibilitar essa produção. Ao fim do processo, observa-se novamente uma semelhança na curva da amostra controle e da infectada, obtendo como valores finais de 1,6 e 1,8, respectivamente.

Figura 5. Consumo de glicose no processo de infecção do ODV. (A) células controle e seu consumo de glicose; (B) células infectadas e seu consumo de glicose.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Tendo em vista a visualização da curva para a célula infectada, observa-se um aumento no consumo da glicose ao 2º dia de processo que pode ser relacionado com a ação viral presente no interior celular e sabendo que para a infecção do ODV por apresentar um resultado elevado numericamente demandou mais energia do sistema para a produção dos componentes virais.

A glicose é o carboidrato normalmente mais consumido durante os processos celulares, visto sua importância no crescimento das células [24-26]. A partir do segundo dia para a célula controle ocorre um aumento na concentração celular, isto é, a presença do nutriente influenciou para estimular o crescimento celular. E ao final do processo, encontra-se a queda do consumo, e conforme a limitação da glicose presente, estudos apontam que com uma baixa quantidade

deste carboidrato presente pode ocorrer um consumo de sacarose, proporcionando uma baixo crescimento celular [25,27].

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos visualiza-se a efetivação da infecção através dos efeitos citopáticos que foram vistos em microscópio e pela produção dos corpos de oclusão (OB), portanto pode-se concluir que as células Sf21 são suscetíveis a ação do vírus AgMNPV e apresentando melhor desempenho na infecção por ODV e este benefício pode ser por causa das proteínas virais e/ou a uma adição maior de vírus na amostra.

AGRADECIMENTOS

Dr[a]. Marlinda Lobo de Souza (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN) pelo fornecimento da linhagem celular Sf21e do isolado AgMNPV-2D.

Os autores informam que esta pesquisa teve auxílio financeiro da Universidade Federal da Paraíba, Edital – PROPESQ – (03/2020) Projeto número PII13489-2020.

REFERÊNCIAS

1. United States Department of Agriculture – USDA (2019). https://www.ers.usda.gov/topics/crops/ soja-óleo-culturas

2. Cattelan, A. J.; Dall'Agnol, A. (2018). O rápido crescimento da soja no Brasil. OCL, 25, D102. https://doi.org/10.1051/ocl/2017058

3. Lima, M., Silva-Junior, C. A.; Rausch, L.; Gibbs, H. K.; Johann, J. A. (2019). Desmistificando a soja sustentável no Brasil. *Política de Uso do Solo*, 82, 349-352. https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2018.12.016

4. Ávila, C. J.; Schlick-Souza, E. C. (2015) Ocorrência de insetos-pragas e de seus predadores em sistemas integrados de produção de soja (Documentos 137, p. 31). Embrapa Agropecuária Oeste, Brasil.

5. Husch, P.E.; Ferreira, D.G.; Seraphim, N.; Harvey, N.; Silva-Brandão, K.L.; Sosa-Goméz, D.R. (2018). Estrutura e variação genética entre populações de *Euschistus heros* de diferentes regiões geográficas do Brasil. *Entomol. Exp. Appl*., 166, 191-203. https://doi.org/10.1111/eea.12666

6. Hoffman-Campo, C. B.; Moscardi, F.; Corrêa-Ferreira, B. S.; Oliveira, L. J.; Sosa-Gómez, D. R.; Panizzi, A. R.; Corso, I. C.; Gazzoni, D. L.; Oliveira, E. B. (2000) Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. *Circular Técnica/ Embrapa Soja*, Londrina, 70 p.

7. Conte, O.; Oliveira, F. T.; Harger, N.; Corrêa-Ferreira, B. S. (2014). Resultados do manejo integrado de pragas da soja na safra 2013/2014 no Paraná. Londrina: Embrapa Soja, 56p. (*Embrapa Soja. Documentos*, 356).

8. Moscardi, F.; Bueno, A. F.; Sosa-Gómez, D. R.; Roggia, S.; Hoffman-Campo, C. B.; Pomari, A. F.; Corso, I. C.; Yano, S. A. C. (2013). Artrópodes que atacam as folhas de soja. In: Hoffman-Campo, C. B.; Corrêa-Ferreira, B. S.; Moscardi, F. (Org.). *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga.* Londrina: Embrapa Soja, v. 1, p. 213-334.

9. Campo, C.B.H.; Moscardi, F.; Ferreira, B.S.C.; Oliveira, L.J.; Gómez, D.R.S.; Panizzi, A.R.; Corso, I.C.; Gazzoni, D.C.; Oliveira, E.D. (2000) Pragas da Soja no Brasil e Seu Manejo Integrado. *Londrina: Embrapa Soja*, 70 p.

10. Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira-Neto, S.S.; Carvalho, O, R.P.L.; Baptista, G.C.; Berti-Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A., Alves, S.B.; Vendramim, J.D.; Marchini, L.C.; Lopes, J.R.S.; Omoto, C. (2002) *Entomologia Agrícola*. 1 ed. Piracicaba: Fealq, 920 p.

11. Moscardi, F. (1998). Utilização de vírus entomopatogênicos em campo, p.509-539, In: Alves, S.B. (ed.) *Controle Microbiano de Insetos*. 2. Ed. Piracicaba: Fealq, 1163 p.

12. Moscardi, F.; Souza, M. L. (2002) Baculovírus para o Controle de Pragas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, DF, v. 24, p. 22-29.

13. Ribeiro, B.M.; Souza, M.L.; Kitajima, E.W. (1998) Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos, p.481-507, In: Alves, S.B. (ed.). *Controle Microbiano de Insetos*. 2. Ed. Piracicaba: Fealq 1163 p.

14. Penteado, S.R. (2010) Defensivos Alternativos e Naturais: Para uma agricultura saudável. 4. Ed. Campinas: *Via Orgânica-Fraga Penteado & Cia LTDA*, 172 p.

15. Almeida, A.F. (2010). *Estratégias de produção in vitro de bioinseticida viral: influências do isolado, da cinética e do modo de operação*. 133p. Tese de Doutorado. – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

16. Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J. et al. The establishment of two cell lines from the insectspodoptera frugiperda (lepidoptera; noctuidae). In Vitro 13, 213–217.

17. Almeida, A. F. Avaliação preliminar viabilidade de produção in vitro de um isolado brasileiro de Baculovirus *Spodoptera frugiperda* MNPV. 2005. 97 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

18. Nielsen L.K, Smyth, G.K, Greenfield, P.F. Hemacytometer Cell Count Distributions: Implications of Non-Poisson Behavior. Biotechnol Prog. 1991;7(6):560-563. doi:10.1021/bp00012a600

19. Lynn, D. E. (1994) Enhanced infectivity of occluded virions of *Gypsy moth nuclear polyhedrosis virus* for cell culture. *Journal Invertebrate Pathology*. V.63, p. 268-274.

20. Santos, Angela Alves dos et al. Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. Brazilian Journal of Food Technology, v. 20, 2017.

21. Chico, E.; Rrodríguez, G.; Figueredo, A. Biorreatores para Células Animais. In: Tecnonologia do Cultivo de Células Animais de Biofármacos a Terapia Gênica. São Paulo: ROCA, 2014. P. 216–254.

22. Andrade, A; S; A. **Baculovírus: produção *in vitro* do bioinseticida anticarsia e construção de vetor de expressão para glicoproteína (gpv) do *rabies lyssavirus.*** Tese (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

23. Donaldson, M. S.; Shuler, M. L. (1998) Effects of long-term passaging of BTI-Tn5B1-4 insect cells on growth and recombinant protein production. *Biotechnol Prog*. Jul-Aug;14(4):543-7. Doi: 10.1021/bp9800485. PMID: 9694673.

24. Berdárd, C.; Tom, R.; Kamem, A. (1993) Growth, nutrient comsuption, and end product, accumulation in SF9 and BTI-EAA insect cell cultures: insights into growth limitation and metabolism. *Biotechnology progress*. V.9, p 615-624.

25. Grace, T.D.C.; Brzotowski, W (1966). Analysis of the aminoacids and sugar in insect cell medium during cell growth. *Journal insect physiology*. V.12, p. 625-633.

26. Mendonça, R. Z.; Palomares, L. A.; Ramírez, O. T. (1999) An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. *Journal of Biotechnology*. V.72, p 61-75.

27. Wang, M-Y.; Kwong, S.; Bentley, W. E. (1993) Effects oxygen/glucose/glutamine feeding on insect cell baculovirus protein expression: a study on epoxide hydrolase production. *Biotechnology progress*, v.9, p. 355-361.

5.2 Artigo 2: AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE DO BACULOVÍRUS CHRYSODEIXIS EM CÉLULAS Sf21 CULTIVADAS EM SUSPENSÃO (A submeter Periódico: **Biotechnology Advances**. Qualis A1 em Engenharias II)

RESUMO

Chrysodeixis includens single nucleopolyhedrovirus (ChinSNPV) é um patógeno específico da lagarta *Chrysodeixis includens*, considerada a segunda maior praga da soja no Brasil, em algumas regiões, tornou-se a principal praga, podendo atuar no seu controle biológico e/ou manejo integrado de pragas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo a produção in vitro dos baculovírus ChinSNPV, utilizando a linhagem celular Sf21 cultivada em frascos de agitação. A produção de corpos de oclusão (OB), que é utilizado como bioinseticida viral, foi realizada por processos de infecção com vírus extracelular (BV) e vírus derivado de oclusão (ODV) de ChinSNPV em linhagem celular Sf21 cultivada em frascos de agitação com 50mL de SF900II médio a 120 rpm e 28ºC. As amostras foram analisadas quanto à concentração e viabilidade celular, e produção volumétrica e específica dos OBs produzidos. O processo de infecção realizado em frascos de agitação proporciona maior acesso das partículas virais às células e, consequentemente, o aumento na produção de OB de ChinSNPV ($1{,}34x10^7$OB/mL e 20,8OB/Célula) quando comparado ao cultivo em monocamada. Assim, a análise da infectividade dessas partículas virais foi importante para um futuro aumento da produção desses biopesticidas virais.

Palavras-chave: Biopesticida. Controle biológico. Linhagem celular Sf21. Partículas virais.

ABSTRACT

Chrysodeixis includens single nucleopolyhedrovirus (ChinSNPV) is a specific pathogen of the caterpillar *Chrysodeixis includens*, considered the second largest pest of soybean in Brazil, in some regions, it has become the main pest, which can act in its biological control and/or integrated pest management. Thus, the present work aimed at the in vitro production of the baculoviruses ChinSNPV, using Sf21cell line grow in shake flasks. The production of occlusion bodies (OB), which is used as viral bioinsecticide, was performed by infection processes with budded virus (BV) and occlusion-derived-virus (ODV) of ChinSNPV in Sf21 cell line grown in shake flasks with 50mL of SF900II medium at 120 rpm and 28ºC. Samples were analyzed for cell concentration and viability, and volumetric and specific production of the OBs produced. The infection process conducted in shake flasks provides greater access for viral particles to the cells and, consequently, the increase in the production of OB of ChinSNPV($1.34x10^7$OB/mL e 20.8 OB/Cell) when compared to the monolayer culture. Thus, the analysis of the infectivity of these viral particles was important for a future scale-up of production of these viral biopesticides.

Keywords: Biopesticide. Biological control. Sf21cell line. Viral particles

DESTAQUES

• Cultivo em suspensão de células Sf21.

• Utilização de meio de cultura sem soro fetal bovino.

• Processo *in vitro* de infecção com baculovírus ChinSNPV.

• Infectividade das partículas virais: ODV e BV do ChinSNPV em células Sf21.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil poderá manter sua posição como um dos maiores produtores de soja na próxima década, o Brasil produziu um recorde de 40,994 milhões de hectares de soja, um aumento de 8,9% em relação à safra recorde de 4,587 milhões de hectares na safra 2020/2021 (Colussi e Schnitkey, 2021).

A *Chrysodeixis. includens* era uma praga secundária da cultura de soja, até meados da safra 2003/2004 (Botelho et al, 2019), isto porque as suas populações eram naturalmente controladas por predadores, parasitoides e fungos entomopatogênicos (Sosa-Goméz et al., 2010). No entanto o aparecimento e disseminação em 2001 da doença da ferrugem-asiática no Brasil, que é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P. Sydow) (Yorinori; Lazzarotto, 2004), tornou-se comum a aplicação de fungicidas não seletivos nas plantações de soja, que até então não eram utilizados, a fim de controlar a ferrugem-asiática. A partir desta ocorrência, promoveu uma redução na população de fungos entomopatogênicos, a exemplo do fungo *Nomuraea rileyi* (Sosa-Gómez, 2005). Sabendo que as populações da lagarta de *C. includens* eram controladas por estes fungos, a redução dos mesmos nas plantações de soja devido ao maior uso de fungicidas não seletivos, fez com que começassem a ocorrer surtos populacionais de *C. includens* (Moscardi et al., 2012).

O uso de inseticidas contra *C. includens* associado à sua tolerância natural às substâncias químicas favorece a evolução da resistência. No entanto, os avanços na produção de inseticidas à base de baculovírus têm desenvolvido novas estratégias de controle para o manejo de pragas de lepidópteros. Assim, estudos recentes mostram que essas pragas eram altamente suscetíveis ao ChinSNPV (Muraro et al., 2019; Sanches et al., 2019). No entanto, os fatores limitantes para o uso de ChinSNPV em comparação com AgMNPV, por exemplo, incluem a ruptura do tegumento das larvas, uma característica indesejável para a produção *in vivo*, menor virulência do que AgMNPV e restrições na criação em massa de lagartas de soja devido à endogamia e depleção de colônias (Sosa-Gómez, 2017).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagem celular

A linhagem de células de inseto utilizada foi a Sf21 (VAUGHN et al, 1977), derivada do tecido embrionário da lagarta *Spodoptera frugiperda* cedida pela pesquisadora Dra. Marlinda de Souza Lobo (Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen). Esta linhagem originalmente era mantida em meio TNMFH suplementado com 10% de soro fetal bovino cultivada em garrafinhas de cultura. Para os processos de infecção desse trabalho, as células foram adaptadas ao cultivo em suspensão e ao meio SF900II (Gibco), meio livre de soro fetal bovino.

A manutenção das células utilizou o meio SF900II e *shaker* (SOLAB SL-223) com agitação de 120 rpm e temperatura controlada de 28 ºC, utilizando frascos *Erlenmeyers* (100mL) com 20mL de volume de suspensão celular e uma concentração de (8×10^5 a 1×10^6) células viáveis/mL. Subcultivos para a manutenção da linhagem foram realizados a cada 72 horas (ALMEIDA, 2005).

A morfologia, concentração celular e a viabilidade foram monitoradas por meio de microscopia ótica, de acordo com metodologia descrita por Nielsen, Smyth e Greenfield (1991). Amostras foram retiradas para a contagem em câmara de Neubauer, e determinada a concentração de células com o auxílio do método de exclusão de azul de tripano (0,1% v/v) para verificar a viabilidade celular (Equação 2.1).

$$Cc_{\left(\frac{células}{mL}\right)} = \frac{N\ células\ x\ D}{8\ x10^{-4}} \qquad (2.1)$$

Em que:

Cc (células viáveis/mL) – concentração de células

N (células) – número de células contadas nos quadrantes

D – Fator de diluição

2.2 Estoque de Vírus

O baculovírus selvagem foi utilizado no processo de infecção, *Chrysodeixis Includens single nucleopolyhedrovirus* (ChinSNPV) fornecido pela Embrapa – Cenargen (Recursos Genéticos e Biotecnologia).

Dois fenótipos virais dos baculovirus estudados foram utilizados no sistema de produção *in vitro*: o vírus extracelular (BV) – obtido do ciclo de infecção em células Sf21 no tempo de pós-infecção de 24 - 48 horas e o vírus derivado da oclusão (ODV) – obtido na fase final do ciclo de infecção no tempo de 7-10 dias do processo de infecção. Os ODVs foram obtidos por meio da utilização de soluções alcalinas para solubilização da matriz proteica que envolve o corpo de oclusão (OB) de modo a permitir a entrada das partículas virais nas células de inseto no processo de infecção celular.

Para a liberação e contagem dos corpos de oclusão (OB) produzidos pelas células infectadas, um volume igual a 1% (v/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi adicionado a 0,5 mL da suspensão de células infectadas. A mistura foi incubada a 28 ºC por duas horas para promover a dissolução das membranas celulares e liberação dos OBs (Almeida et al., 2010).

A solução contendo os OBs foi diluída com água para se obter um número de partículas de OB entre 100 e 150 com uma concentração aproximada de (1 a 1,5) x 10^7 OB/célula no quadrante central da câmara de Neubauer. Os OBs foram contados utilizando um microscópio ótico com aumento de 400 vezes e sua concentração foi estimada pela Equação 2.2.

$$C_{OB\left(\frac{OB}{mL}\right)} = \frac{5\ x\ D\ x\ M(OB)}{1x\ 10^{-4}} \tag{2.2}$$

Em que:

C_{OB} (OB/mL) – concentração de OB

D – Fator de diluição

M_{OB} – número de OB contado no quadrante central

2.3 Processos *in vitro* de infecção de ChinSNPV

2.3.1 Processos de infecção por vírus extracelular (BV)

Os processos *in vitro* de infecção do baculovírus ChinSNPV foram conduzidos por meio de infecções em linhagem celular Sf21 saudável cultivada em suspensão, com viabilidade de 90% ou superior. As células foram infectadas com tempo de infecção (TOI) de 5,0 x 10^5 células viáveis/mL e multiplicidade de infecção (MOI) de 10% (v/v) dos BVs do ChinSNPV retirados da segunda passagem seriada em células Sf21. As culturas foram conduzidas em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 30 mL de suspensão celular em meio SF900II (Almeida, 2010).

Amostras foram coletadas a cada 24 horas para contagem de células não infectadas (controle) e infectadas, bem como para determinar a concentração de OBs produzidos durante 8 dias de processo. A concentração de OB na suspensão foi determinada usando uma câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico (Olympus), aumento de 400x. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3.2 Processos de infecção por vírus derivado de oclusão (ODV)

Os processos *in vitro* de infecção do baculovírus ChinSNPV foram conduzidos conforme mencionado anteriormente no item 2.3.1, com a mudança no inóculo viral que utilizou-se, nesse cultivo, o ODV obtido do OB ($3{,}2x10^{9}$ $OB.mL^{-1}$) produzido em sistema *in vivo* a partir de infecções com ChinSNPV. A liberação dos ODVs foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Lynn (1994).

A solução de ODV (5-7mL) foi inoculada na suspensão de células Sf21 saudáveis (30mL). Amostras foram coletadas diariamente para acompanhamento da cinética de crescimento das células controle e infectadas, bem como da produção de OB. A concentração de OB na suspensão foi determinada usando uma câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico (Olympus), aumento de 400x. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3.3 Determinação da concentração de glicose

As alíquotas (100 µL) de cada processo de infecção foram retiradas e centrifugadas (1000 rpm por 10 minutos, MiniSpin-Eppendorf). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20ºC para posterior análise.

Após o descongelamento, o sobrenadante coletado foi submetido à determinação da concentração de glicose, pelo método DNS em microplacas, conforme metodologia de Santos et al. (2017).

2.3.4 Determinação dos parâmetros cinéticos

As velocidades máximas de crescimento específico das células não infectadas (controle) (μ_x) e células infectadas (μ_{xi}) foram estimadas por ajuste linear do logarítmico neperiano da densidade celular com o tempo de cultivo durante o crescimento exponencial, conforme

metodologia de Schmidell et al. (2001). O coeficiente angular da equação da reta ajustado foi o valor estimado da velocidade máxima específica das células controle e infectadas dos processos de infecção com ChinSNPV. A velocidade média de infecção (Kd) e a velocidade média de produção de OB (K_{OB}) foram calculadas por ajuste linear de dados experimentais durante a fase de crescimento exponencial das células infectadas.

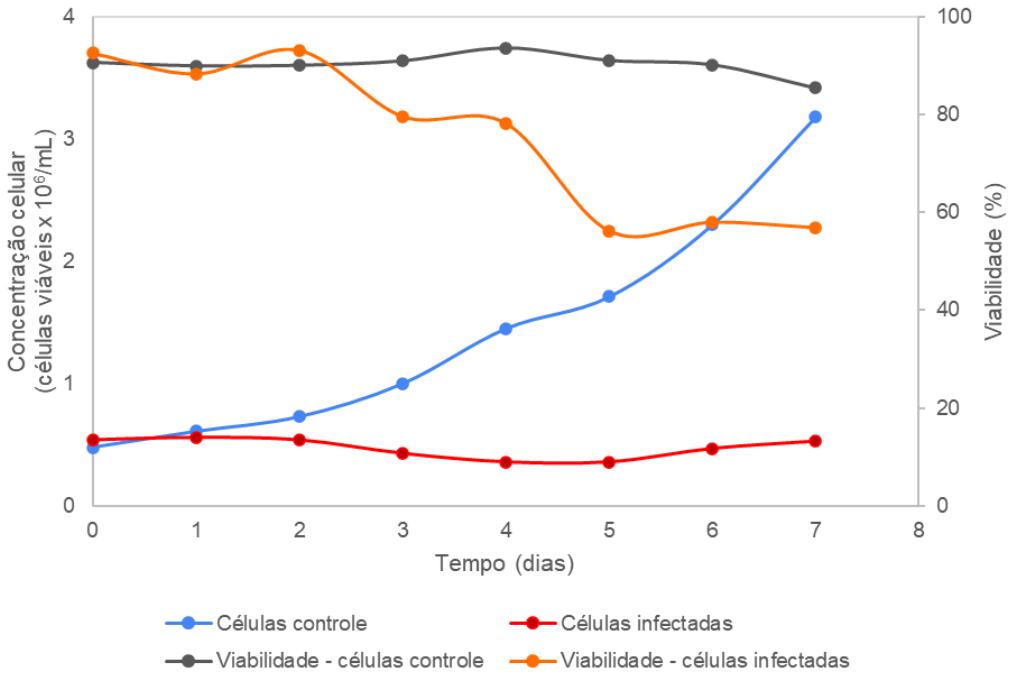
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Infecção com o vírus derivado da oclusão (ODV) do ChinSNPV

O processo de infecção do ODV ChinSNPV seguiu os mesmos parâmetros que as infecções anteriores, sendo observado no 1° dia a diferença entre a cultura de células do controle comparado a infecção (Figura 1).

No processo também foi visualizada a viabilidade inicial acima de 90% para ambas as culturas celulares, nos três primeiros dias a cultura controle cresceu muito, chegando no 4º dia uma diferenciação na viabilidade dos infectados em relação aos não infectados (controle), visualizando a ação do vírus. Além disso, observou-se no 2º dia de visualização a diferença entre a cultura de células do controle em relação à infecção mostrada na Figura 1.

Figura 1. Concentração e viabilidade celular em relação ao ODV do ChinSNPV



Fonte: Autoria própria (2022).

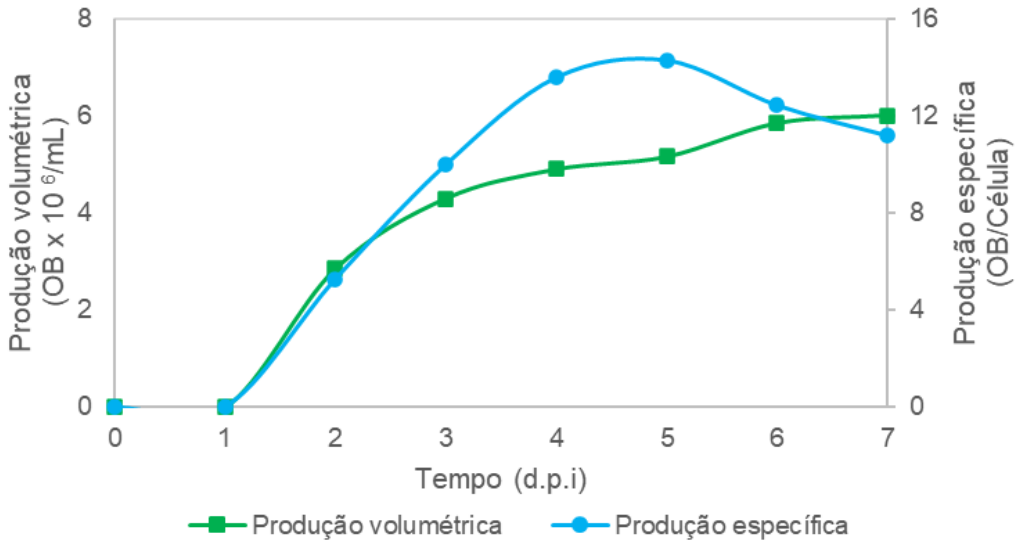
Portanto, inicialmente para o 1º dia de infecção a célula controle e a infecção obteve viabilidade similar, e do 4º dia em diante ocorreu uma redução dessa viabilidade, obtendo um resultado esperado, visto que as células presentes na infecção estão suscetíveis a ação dos vírus.

Para Klafke (2020), a adaptação celular com um novo meio, torna-se eficiente quando as curvas concentração obtém uma proximidade em termos numéricos. A Figura 1 é mostrado a concentração inicial de células de 0,5 x 10^6 células viáveis/mL e ao final do processo as células obtiveram uma concentração de 3,18 x 10^6 células viáveis/mL para a célula controle e para a célula infectada foi de 0,53 x 10^6 cel/mL.

No processo também foi visualizada a viabilidade inicial acima de 90% para ambas culturas de células, nos três primeiros dias a cultura controle cresceu bastante atingindo no 3º dia uma viabilidade cerca de 91%, já a infecção reduziu para 79,6%, e no sétimo dia do processo a controle atingiu 85,4% e a infectada 56,9%.

A concentração volumétrica de corpos de oclusão (OB), cuja produção inicia-se a partir de 48 h do início do procedimento infectivo, está exposta na Figura 2.

Figura 2. Produção de OB por ODV do ChinSNPV.



Fonte: Autoria própria (2022).

Foi observado crescente aumento no número de OBs obtidos durante o processo e em seguida uma estabilização, sendo 2,85 x 10^6 OB/mL e ao final 6,01 x10^6 OB/mL. Nas análises de Klafke (2020), encontrou-se resultados de 2,5x10^8 e 9 x10^8 OB/mL para um processo de

infecção realizado em biorreatores, o que indica que o presente trabalho apresentou bom resultado, mesmo sendo o vírus oriundo do OB *in vivo*, pois à medida que aumenta o número de passagens que a esse vírus foi submetido, consequentemente aumenta a sua concentração viral.

Nesta etapa da infecção, observou-se um aumento exponencial e posteriormente uma estabilização do valor de OB obtido, respectivamente iniciando com 5,27 OB/célula e finalizando com 11,19 OB/célula. Os resultados obtidos foram superiores em relação a primeira infecção com ODV do ChinSNPV que teve como resultados: inicial 0,6 OB/célula e final 9,7 OB/célula. Portanto, verificou-se uma melhor adaptação celular garantindo o aumento no valor final obtido.

Para Reid et al. (2014) uma célula ideal para a produção *in vitro* precisa atingir uma produção de 300 OB/célula. Contudo, o quadro de infecções foi realizado e apresentou uma infecção com efeito similar à curva da literatura (Almeida et al, 2010), logo pode-se confirmar que o vírus consegue infectar a célula e se replicar no seu interior.

De acordo com as informações de crescimento celular, pode-se realizar a análise cinética do processo de infecção com ODV-ChinSNPV. Assim, foram analisados alguns parâmetros cinéticos tais como velocidades de crescimento específicas de células não infectadas (μ_X) e infectadas (μ_{Xi}), concentrações iniciais de células controle e infectadas ($X_{inicial}$), tempo de fase exponencial (t_{exp}), produtividade máxima de células ($P_{x\ max}$), velocidade média de infecção (K_d) e velocidade média de produção de OB (K_{OB}) que podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos do processo de infecção.

Variáveis cinéticas	Células controle	Células infectadas
$X_{inicial}$ (Células.mL^{-1})	4,8x10^5	5,4x10^5
$X_{máximo}$ (Células.mL^{-1})	3,2x10^6	5,6x10^5
$\Delta X_{máximo}$ (Células.mL^{-1})	2,72x10^6	0,2x10^5
t_{exp} (dias)	5	---
$P_{x,máximo}$ (Células.mL^{-1}.d^{-1})	0,46x10^6	0,76x10^5
$\mu_{x,máximo}$ (d^{-1})	0,2775	0,2027
K_d (Células.mL^{-1}.d^{-1})	----	7,1x10^3
K_{OB} (OB.mL^{-1}.d^{-1})	---	1,025 x 10^6

Legenda: $X_{inicial}$ – concentração inicial de células; $X_{máximo}$ – concentração máxima de células $\Delta X_{máximo}$ - variação da concentração de células máxima e concentração de células iniciais; t_{exp} – tempo de duração da fase exponencial; $P_{x,máximo}$ – produtividade máxima de células; $\mu_{x,máximo}$ – velocidade específica máxima de células; K_d – velocidade média de infecção e K_{OB} – velocidade média de produção de OB.

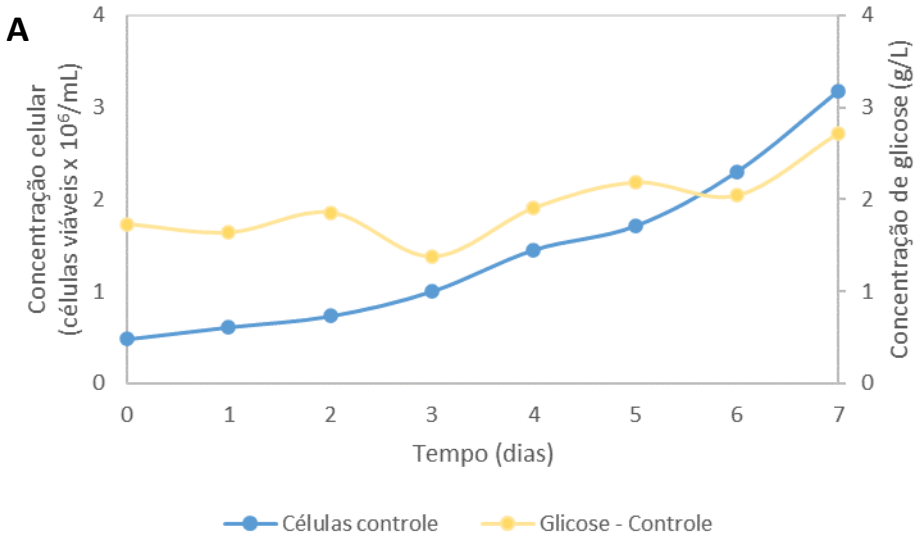
As velocidades máximas de crescimento específico de células Sf21 não infectadas (μ_X) e infectadas (μ_{Xi}) foram 0,2775d^{-1} e 0,2027d^{-1}, respectivamente, e a velocidade média de infecção (K_d) foi estimada em 7,1x10^3 células/mL. d. E ainda, a velocidade média de produção de OB foi de 1,025x10^6OB.mL^{-1}.d^{-1}, isso significa que a cada dia de processo foi infectada uma suspensão de 7,1x10^3 células por mL de meio. Parâmetros cinéticos não foram relatados na literatura do sistema de produção *in vitro* para o baculovírus ChinSNPV. Já sobre os baculovírus SfMNPV e AgMNPV existem poucos relatos na literatura que apresentam resultados cinéticos para a produção em culturas em suspensão (Almeida et al., 2010, Del Padre, 2015).

Utilizando células Sf21, Almeida et al. (2010) obtiveram valores da ordem de 0,710 d^{-1} para células não infectadas cultivadas em meio Hyclone com suplementação de FBS, o que demonstra uma maior velocidade de crescimento quando comparado ao sistema utilizado neste trabalho (0,2775d^{-1}), o que pode estar associado à suplementação de FBS e melhor adaptação às condições de crescimento. Embora tenha observado uma velocidade de crescimento mais lenta, no processo de infecção, ele pôde ver que a velocidade média de infecção seguiu a célula não infectada e melhorou o suprimento de vírus durante o processo de infecção. O que pode ser observado pelo sincronismo de infecção estabelecido nas células Sf21. Portanto, não comprometeu a replicação do baculovírus.

3.1.1 Consumo de Glicose no processo de Infecção com o ODV do ChinSNPV

A Figura 3 apresenta o consumo de glicose durante o período de 7 dias de infecção para a célula controle e célula infectada, obtendo como resultados iniciais respectivamente, 1,73 e 2,13 g/L. No 7º dia de pesquisa ambas as amostras possuíram valores de consumo próximos, sendo 2,7 g/L para a controle e para a infectada foi de 2,8 g/L. O que pode ser observado ainda, mais especificamente, nas Figuras 3A e 3B, a evolução da concentração de glicose ao longo do processo. Nas células controle, Figura 3A, percebeu-se que o consumo de glicose não sofreu grandes alterações durante o procedimento, que pode ser explicado pelo consumo diferenciado de glicose e glutamina. Os dois principais substratos, que as células de inseto podem consumir durante seu cultivo. Neste caso, a glicose não foi o substrato preferencial durante essa técnica, o que se pode inferir que a glutamina foi consumida preferencialmente.

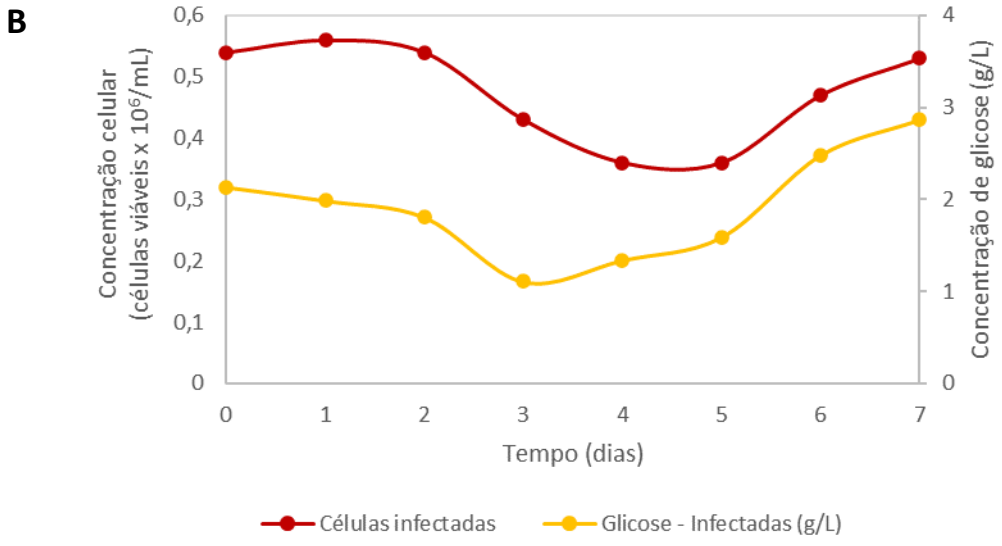
Figura 3A. Consumo de glicose por ODV do ChinSNPV. Células controle e seu consumo de glicose.



Fonte: Autoria própria (2022).

O desenvolvimento das células de inseto durante o cultivo em suspensão está limitado pela formação de metabólitos tóxicos que podem ser gerados devido ao consumo rápido de glicose e glutamina. Lactato e amônio são metabólitos que estão correlacionados diretamente, com a glicose e glutamina presentes nos meios de cultura utilizados para propagação das linhagens de células de inseto (Del Padre et al., 2015).

Figura 3B. Células infectadas e seu consumo de glicose.



Fonte: Autoria própria, 2022.

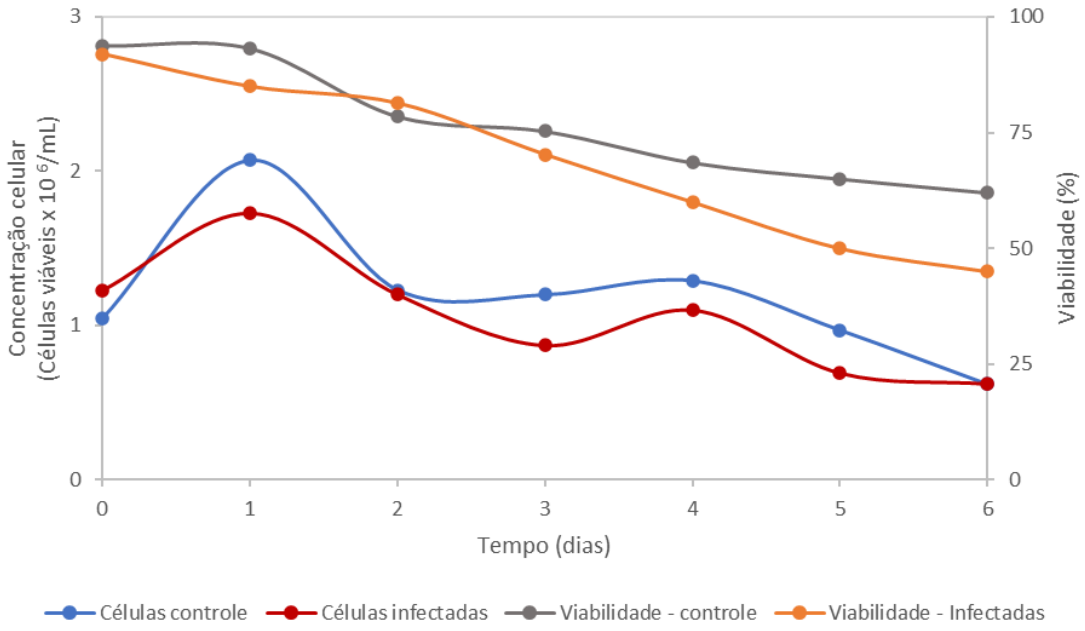
A Figura 3B mostra o comportamento das células infectadas e a evolução da concentração de glicose. A concentração de glicose apresentou uma correlação direta que mostra ao estabelecer o ritmo de infecção, perceptível na diminuição da concentração de células viáveis, a concentração de glicose também reduziu. Portanto, infere-se que as células infectadas consomem menos glicose durante o estabelecimento da infecção para o cultivo *in vitro* de baculovírus. Essa percepção também é observada no cultivo *in vivo*, onde ocorre a diminuição do consumo de alimento em lagartas infectadas com baculovírus (Maranga et al., 2003; Moscardi et al., 2013, Del Padre et al., 2015).

Ao final do processo apresentou um consumo maior, e isso pode ser explicado devido as células de insetos possuírem uma tendência maior no consumo de glicose quando comparada as células de mamíferos e elas podem crescer em um ambiente com apenas glicose como fonte de nutrição (Drugmand, Schneider, Aghatos, 2012), visto que a glicose é o nutriente preferível para algumas células animais, favorecendo o crescimento celular (Drews, Paalme, Vilu, 1995).

3.2. Infecção com vírus extracelular (BV) do ChinSNPV

Na Figura 4 está apresentada a concentração e viabilidade celular por tempo no processo de infecção por BV do ChinSNPV em segunda passagem em células Sf21.

Figura 4 – Concentração e viabilidade celular do processo de infecção com BV do ChinSNPV.



Fonte: Autoria própria (2022).

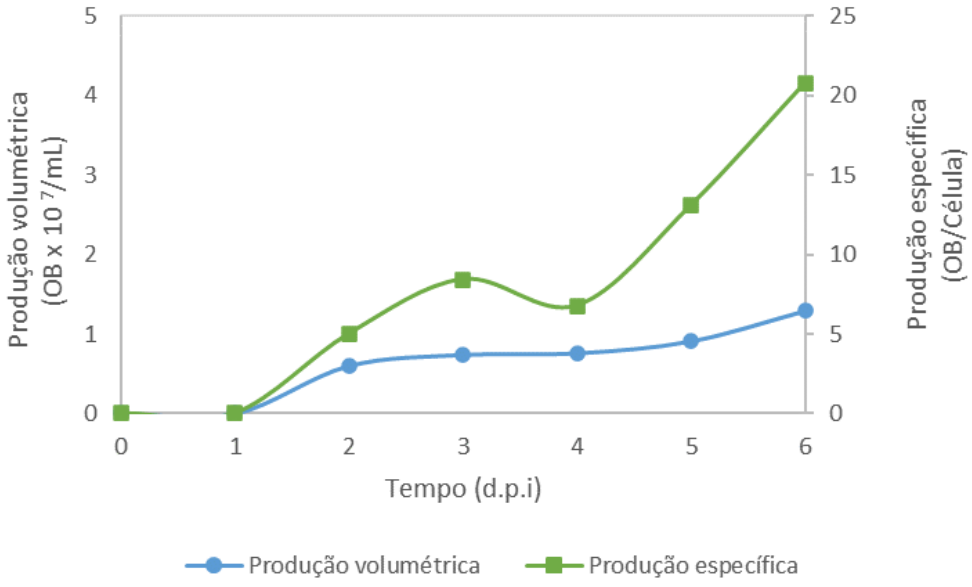
No 1° dia os grupos de controle e infecção apresentaram alta viabilidade acima de 90%. No decorrer do tempo de infecção, esses grupos apresentaram queda na viabilidade a

partir de 24 horas. A diminuição na viabilidade celular em células de *S. frugiperda* após infecção com baculovírus é conhecida na literatura, como já foi relatado por Ciccaglione et al. (2003).

No início do processo de infecção, ocorreu um aumento na concentração viável das células em ambos os grupos, sendo a maior do grupo controle de $2{,}07x10^6$ células viáveis/mL, enquanto ao grupo infecção de $1{,}73x10^6$ células viáveis/mL. Já no 2° dia, observou-se uma redução na concentração de células viáveis, que sugere que o inóculo viral apresentou uma infecção bem-sucedida nas células, dessa forma apresentando uma multiplicidade de infecção (MOI) alta. E as células do cultivo do grupo controle apresentou uma queda menor em comparação com o grupo da infecção, visto que é nesse momento em que se inicia a produção de corpos de oclusão (OB) nas células infectadas (grupo infecção). O mesmo comportamento foi observado nos resultados de Almeida et al. (2010).

A figura 5 mostra a produção de corpos de oclusão (OB) por dia de infecção. A quantificação foi iniciada após o primeiro dia de infecção, devido ao mecanismo de infecção estabelecido que os corpos de oclusão começam a ser produzidos a partir desse momento. A sua produção foi aumentando gradativamente ao decorrer dos dias, até a estabilização no sétimo dia, com uma concentração volumétrica de $1{,}34x10^7$ OB/mL.

Figura 5. Produção de OB por BV em segunda passagem do ChinSNPV.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Portanto, analisando as concentrações máximas de células viáveis e corpos de oclusão ou poliedros, pode-se relacionar a produção específica de OB/células infectadas viáveis, apresentando uma produção máxima de 20,8 OBs/célula, o que identifica uma infecção efetiva pelo baculovírus ChinSNPV. Assim, pode ser evidente que as proteínas presentes nas partículas virais BV permitem maior acesso dos *virions* à membrana das células suscetíveis, proporcionando uma produção *in vitro* de OB mais eficaz.

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que é possível produzir baculovírus ChinSNPV *in vitro* em células Sf21derivadas de *S. frugiperda*. A produção de OB pode estar relacionada às partículas virais de ODV e BV utilizadas como inóculo nos processos de infecção. O uso de BV proporcionou maior produção de OB devido à facilidade de penetração das células suscetíveis, as proteínas virais envolvidas nos processos foram mais efetivas na ação viral submetida às células Sf21.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Drª. Marlinda Lobo de Souza (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) para o fornecimento da linhagem celular Sf21e dos isolados dos baculovírus AgMNPV-2D e ChinSNPV.

Esta pesquisa teve auxílio financeiro da UFPB-Propesq, Edital de produtividade 03/2020, projeto número PII13489-2020.

REFERÊNCIAS

Almeida, A. F.; Macedo, G. R.; Chan, L. C. L.; Pedrini, M. R. S. Kinetic Analysis of in vitro Production of Wild-Type *Spodoptera frugiperda Nucleopolyhedrovirus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**., v. 53 n. 2: p. 285-291, 2010.

Castro, M. E. B. et al, 1999. Molecular Biology of Baculovirus and its use in biological pest control in Brazil. Brazilian Agricultural Research, v. 34, no. 10, p. 1733-1761.

Cicaglione, A. R.; Fulano, X. X. Expression of HCV E1 protein in baculovirus-infected cells: effects on cell viability and apoptosis induction. **Intervirology**, v. 46, n. 2, p. 121-126, 2003.

Colussi, J. and Schnitkey, G. "Brazil Likely to Remain World Leader in Soybean Production." farmdoc daily (11): 105, Department of Agricultural and Consumer Economics, University of Illinois at Urbana-Champaign, July 12, 2021.

Del Padre, G. A. Study of growth kinetics of Sf21insect cells and infection by baculovirus *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) for bioinsecticide production. 2015. Dissertation (Master's in Chemical Engineering) - Polytechnic School, University of São Paulo, São Paulo, 2015. doi:10.11606/D.3.2016.tde-08072016-162745. Access on: 2022-05-28.

Fuxa, J. R.; Tanada, Y. (Eds.). 1987. Epizootiology of Insect Diseases. Publisher: John Wiley and Sons, Inc. N.Y

Klafke, K. Development of the bioreactor production process of the bioinsecticide *Spodoptera frugiperda* MNPV in Sf9 insect cells. XXX f. Master Thesis in Chemical Engineering, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

Lynn D. E. Enhanced infectivity of occluded virions of *Gipsy Moth nuclear polyhedrosis virus* for cell cultures. Journal of Invertebrate Pathology, v. 63, p. 268-274, 1994.

Moscardi F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Annu Rev Entomol. 1999; 44:257-89.

Muraro, S. D., Giacomelli T., Stacke, F. R., Godoy, N. D., Marçon P., Popham, J. R. H., Bernardi, O. Baseline Susceptibility of Brazilian Populations of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) to *C. includens* Nucleopolyhedrovirus and Diagnostic Concentration for Resistance Monitoring, *Journal of Economic Entomology*, Volume 112, Issue 1, February 2019, Pages 349–354, https://doi.org/10.1093/jee/toy361

Nielsen L. K.; Smyth, G. K.; Greenfield, P. F. Hemacytometer Cell Count Distributions: Implications of Non-Poisson Behavior. Biotechnol Prog. 1991;7(6):560-563. doi:10.1021/bp00012a600

Reid, S.; Chan, L.; Van Oers, M. M. Production of Entomopathogenic *Viruses.* Elsevier Inc, Chapter 13 – Mass Production of benefical Organisms, 2014.

Sanches, M. M. et al. Characterization of a *Chrysodeixis includens* nucleopolyhedrovirus Isolate from Brazilian Cerrado and Assessment of its Co-Infection with *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. Brazilian Archives of Biology and Technology [online]. 2019, v. 62 [Accessed 29 May 2022], e19180688. Available from: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180688>. Epub 25 Nov 2019. ISSN 1678-4324. https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180688.

Santos, A.A.; Deoti, J.R.; Muller, G.; Dário, M.G.; Stambuk, B.U.; Alves-Junior, S.L. Microwell plate-based method for the determination of reducing sugars with the DNS reagent. Braz. J. Food Technol., v.20. e2015113, 2017.

Schmidell N. W; Lima, U. A; Aquarone, E; Borzani, W. Industrial biotechnology: biochemical engineering. [S.l: s.n.], 2001.

Sosa-Gómez DR. Microbial control of soybean pest insects and mites. In: Lacey, L.A., editor. Microbial control of insect and mite pests: from theory to practice. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2017. 199-208 p.

Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J. et al. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera; *noctuidae*). *In Vitro* 13, 213–217 (1977). https://doi.org/10.1007/BF02615077

5.3 Artigo 3: ANÁLISE DA ESTRATÉGIA DE CO-INFECÇÃO DOS BACULOVÍRUS AgMNPV e ChinSNPV (A submeter. Periódico**: Brazilian Archives of Biology and Technology – BABT.** Qualis A2 em Engenharias II)

RESUMO

A estratégia de co-infecção surge como uma nova configuração dos processos de produção *in vitro* de baculovírus, capaz de reduzir os custos de produção, uma vez que a partir dessa estratégia, dois tipos virais podem ser produzidos simultaneamente na mesma célula, tendo ainda o potencial de produzir corpos de oclusão cujas partículas virais serão capazes de atuar em dois ou mais insetos-praga, o que pode ser mais atrativo aos agricultores. Assim, este trabalho teve como objetivo se analisar a produção de corpos de oclusão (OB) mediante co-infecção dos baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV-2D) e *Chrysodeixis includens single nucleopolyhedrovirus* (ChinSNPV). Foi utilizado como inóculo viral os vírus extracelulares (BV) de cada isolado viral com concentração de 20% (v/v), sendo 10% (v/v) de BV do AgMNPV-2D e 10% (v/v) de BV do ChinSNPV para infectar uma suspensão de células Sf21 com tempo de infecção (TOI) de $1{,}0x10^6$ células viáveis/mL. Os cultivos foram realizados em frascos *Erlenmeyers* (125mL) com 30mL de volume de suspensão celular incubados em *shaker* a 120 rpm e 28ºC. Amostras foram retiradas diariamente para acompanhamento da cinética de infecção. A produtividade máxima de corpos de oclusão (OB) foi atingida em 7 dias pós-infecção, totalizando $4{,}52x10^7$ OB/mL e 11 OB/célula.

Palavras-chave: Produção *in vitro*; biopesticidas; partículas virais.

ABSTRACT

The co-infection strategy emerges as a new configuration of the *in vitro* production processes of baculovirus, capable of reducing production costs, since from this strategy, two viral types can be produced simultaneously in the same cell, still having the potential to produce occlusion bodies whose viral particles will be able to act on two or more insect pests, which may be more attractive to farmers. Thus, this study aimed to analyze the production of occlusion bodies (OB) by co-infection of the baculovirus *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV-2D) and *Chrysodeixis includens* single nucleopolyhedrovirus (ChinSNPV). Extracellular viruses (BV) of each viral isolate were used as viral inoculum with a concentration of 20% (v/v), 10% (v/v) of BV from AgMNPV-2D and 10% (v/v) of BV from ChinSNPV to infect a suspension of Sf21 cells line with a time to infection (TOI) of $1.0x10^6$ viable cells/mL. The cultures were carried out in Erlenmeyers flasks (125mL) with 30mL of cell suspension volume, incubated in a shaker at 120 rpm and 28ºC. Samples were taken daily to monitor the kinetics of infection. The maximum productivity of occlusion bodies (OB) was reached at 7 days post-infection, totaling $4.52x10^7$ OB/mL and 11 OB/cell.

Keywords: In vitro production; biopesticides; viral particles.

DESTAQUES

• Co-infecção em suspensão de células Sf21.

• Baculovírus AgMNPV e ChinSNPV simultaneamente.

• Processo *in vitro* de co-infecção com baculovírus ChinSNPV e AgMNPV.

• Infectividade das partículas virais do ODV e BV do AgMNPV e ChinSNPV em células Sf21.

1. INTRODUÇÃO

O processo de co-infecção consiste na adição simultânea dos dois vírus de estudo (AgMNPV e ChinSNPV) em células de insetos (Sf21). Com a obtenção de um resultado ótimo, ou seja, a replicação dos vírus na célula, este estudo pode proporcionar um sistema vantajoso e benéfico, pois os baculovírus atacaram apenas a praga específica, neste caso Anticarsia e Chrysodeixis, garantindo a eficiência em morte das lagartas e ainda proporcionando uma relação de baixo custo, visto que o produto obtido reagirá diretamente nessas duas pragas da soja.

Tem-se as espécies de Lepidoptera que atacam a soja no Brasil, são *Chrysodeixis includens*, *Anticarsia gemmatalis* e as espécies do gênero *Spodoptera, S. cosmioides, S. eridania, e S. albula*, todas pertencentes à família *Noctuidae*. Nas safras foram informados grandes ataques de lagartas nas culturas de soja, milho e algodão na região do cerrado. Essa intensificação populacional de lagartas é consequência de um processo acumulativo de práticas de cultivo inadequadas, condições edafoclimáticas e a utilização de inseticidas químicos, ocasionado por uma forma de controle biológico inadequado. Esses prejuízos foram caracterizados pelo plantio sucessivo de espécies vegetais hospedeiras (milho, soja e algodão). Desta forma, os insetos-pragas encontrou uma ampla disponibilidade de alimentos, sítios de reprodução e abrigo durante quase todo o ano (EMBRAPA, 2013).

Já existe no Brasil, um bioinseticida denominado baculovírus Anticarsia, cujo princípio ativo é o *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), vem sendo utilizado para o controle da lagarta da soja (MOSCARDI, 1999). Esse biopesticida faz parte do maior programa do mundo de controle biológico com vírus (MOSCARDI et al., 2011) sendo usado desde a década de 1980.

Contudo, observou-se que a área tratada com este agente de controle microbiológico foi reduzida drasticamente, devido ao desequilíbrio ecológico, proporcionando a ressurgência de pragas como a lagarta falsa-medideira, *C. includens*, portanto as populações tornaram-se mais

frequentes desde 2003/2004 (BRAGA et al. 2011, MOSCARDI et al., 2011). No ano de 2007, foi informada a ocorrência natural de *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV) em lagartas falsa-medideira no Paraná (CRAVEIRO et al., 2013) e em 2014 na região dos cerrados (SOUZA et al., 2015). Assim, estudo que promova análise de estratégia que envolve a co-infecção do AgMNPV e do ChinSNPV em células Sf21 é relevante, principalmente ao se analisar o comportamento produtivo mediante ao cultivo em suspensão, considerando as potencialidades de aumento de escala atrelados a este método de cultivo.

A estratégia de co-infecção, surge como uma nova ferramenta dos processos de produção in vitro de baculovírus, reduzindo os custos de produção, uma vez que, dois tipos virais podem ser produzidos simultaneamente na mesma célula, possuindo um potencial de produzir corpos de oclusão cujas partículas virais serão capazes de atuar em dois ou mais insetos-praga, o que pode ser mais benéfico aos agricultores (SANCHES et al., 2021).

Diante do exposto, infere-se a continuidade dos estudos envolvendo a dinâmica de co-infecção do AgMNPV e do ChinSNPV em células de inseto Sf21, principalmente ao se analisar o comportamento produtivo mediante co-infecção em cultivo em suspensão, considerando as potencialidades de aumento de escala atrelados a este método de cultivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Células

A linhagem de células de inseto utilizada foi a Sf21 (VAUGHN et al, 1977), derivada do tecido embrionário da lagarta *Spodoptera frugiperda* cedida pela pesquisadora Dra. Marlinda de Souza Lobo (Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen). Esta linhagem originalmente era mantida em meio TNMFH suplementado com 10% de soro fetal bovino cultivada em garrafinhas de cultura. Para os processos de infecção desse trabalho, as células foram adaptadas ao cultivo em suspensão e ao meio SF900II (Gibco), meio livre de soro fetal bovino.

A manutenção das células utilizou o meio SF900II e *shaker* (SOLAB SL-223) com agitação de 120 rpm e temperatura controlada de 28 ºC, utilizando frascos *Erlenmeyers* (100mL) com 20mL de volume de suspensão celular e uma concentração de (8×10^5 a 1×10^6) células viáveis/mL. Subcultivos para a manutenção da linhagem foram realizados a cada 72 horas (ALMEIDA, 2005).

A morfologia, concentração celular e a viabilidade foram monitoradas por meio de microscopia ótica, de acordo com metodologia descrita por Nielsen, Smyth e Greenfield (1991). Amostras foram retiradas para a contagem em câmara de Neubauer, e determinada a concentração de células com o auxílio do método de exclusão de azul de tripano (0,1% v/v) para verificar a viabilidade celular (Equação 2.1).

$$Cc_{\left(\frac{células}{mL}\right)}=\frac{N\ células\ x\ D}{8\ x10^{-4}} \quad (2.1)$$

Em que:

Cc (células viáveis/mL) – concentração de células

N (células) – número de células contadas nos quadrantes

D – Fator de diluição

2.2. Vírus

Dois baculovírus selvagens foram utilizados nos processos de infecção, *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) – Isolado AgMNPV-2D e o *Chrysodeixis includens single nucleopolyhedrovirus* (ChinSNPV), fornecidos pela Embrapa – Cenargen (Recursos Genéticos e Biotecnologia).

Dois fenótipos virais dos baculovirus estudados foram utilizados no sistema de produção *in vitro*: o vírus extracelular (BV) – obtido do ciclo de infecção em células Sf21 no tempo de pós-infecção de 24 - 48 horas e o vírus derivado da oclusão (ODV) – obtido na fase final do ciclo de infecção no tempo de 7-10 dias do processo de infecção. Os ODVs foram obtidos por meio da utilização de soluções alcalinas para solubilização da matriz proteica que envolve o corpo de oclusão (OB) de modo a permitir a entrada das partículas virais nas células de inseto no processo de infecção celular.

Para a liberação e contagem dos corpos de oclusão (OB) produzidos pelas células infectadas, um volume igual a 1% (v/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi adicionado a 0,5 mL da suspensão de células infectadas. A mistura foi incubada a 28 ºC por duas horas para promover a dissolução das membranas celulares e liberação dos OBs (ALMEIDA, 2010).

A solução contendo os OBs foi diluída com água para se obter um número de partículas de OB entre 100 e 150 com uma concentração aproximada de (1 a 1,5) x 10^7 OB/célula no quadrante central da câmara de Neubauer. Os OBs foram contados utilizando um microscópio ótico com aumento de 400 vezes e sua concentração foi estimada pela Equação 2.2.

$$C_{OB\left(\frac{OB}{mL}\right)} = \frac{5\ x\ D\ x\ M(OB)}{1x\ 10^{-4}} \quad (2.2)$$

Em que:

C_{OB} (OB/mL) – concentração de OB

D – Fator de diluição

M_{OB} – número de OB contado no quadrante central

2.3. Liberação do ODV

A liberação dos ODVs dos corpos de oclusão do AgMNPV e ChinNPV a fim de serem utilizados como inóculo viral foi realizada de acordo com metodologia de Lynn (1994).

Amostras de 300 μL, de suspensões contendo OB produzidos em sistema *in vitro* para o AgMNPV ($3{,}8x10^8$OB/mL) e sistema *in vivo* para o ChinSNPV ($3{,}2x10^9$ OB/mL), foram adicionados a solução álcali para dissolver a poliedrina presente na composição do OB e liberar as partículas ODV, mimetizando o ambiente do intestino médio das lagartas suscetíveis aos baculovírus.

2.4. Processos de infecção com ODV do AgMNPV e ChinSNPV

As infecções com os baculovírus individualizados AgMNPV e ChinSNPV foram feitas a partir dos ODVs liberados de corpos de oclusão (OB) de infecções anteriores. Os frascos *Erlenmeyers* (100mL) contendo 25mL de suspensão de células Sf21, com viabilidade maior que 80%. Esta suspensão celular foi inoculada com o ODV de cada isolado viral, separadamente. Os processos de infecção foram mantidos durante 7 dias, em incubadora rotativa orbital (SOLAB SL-223) sob agitação de 120 rpm, com temperatura controlada a 28ºC. A cada 24 horas, amostras foram retiradas para determinação da concentração e viabilidade celular. A concentração de OB na suspensão foi determinada usando uma câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico (Olympus), aumento de 400x. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.5. Processo de co-infecção com BV do AgMNPV e ChinSNPV

As co-infecções foram realizadas a partir dos vírus extracelulares (BV) extraídos do sobrenadante retirado com 24 horas dos processos de infecção com ODV realizados previamente, tanto para o AgMNPV quanto para ChinSNPV. Portanto, a partícula viral utilizada como inóculo viral foi o vírus extracelular (BV) de passagem 1. Utilizou-se uma

multiplicidade de infecção (MOI) de 20% (v/v), sendo 10% (v/v) de BV do AgMNPV-2D e 10% (v/v) de BV do ChinSNPV; e tempo de infecção (TOI) de $1x10^6$ células viáveis/mL. Os cultivos foram realizados em frascos *Erlenmeyers* de 125mL com volume de 30mL de suspensão celular mantida em incubadora *shaker* (SOLAB SL-223) a 28ºC e 120 rpm.

2.6. Determinação da concentração de Glicose

As alíquotas (100 µL) de cada processo de infecção foram retiradas e centrifugadas (1000 rpm por 10 minutos, MiniSpin-Eppendorf). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20ºC para posterior análise.

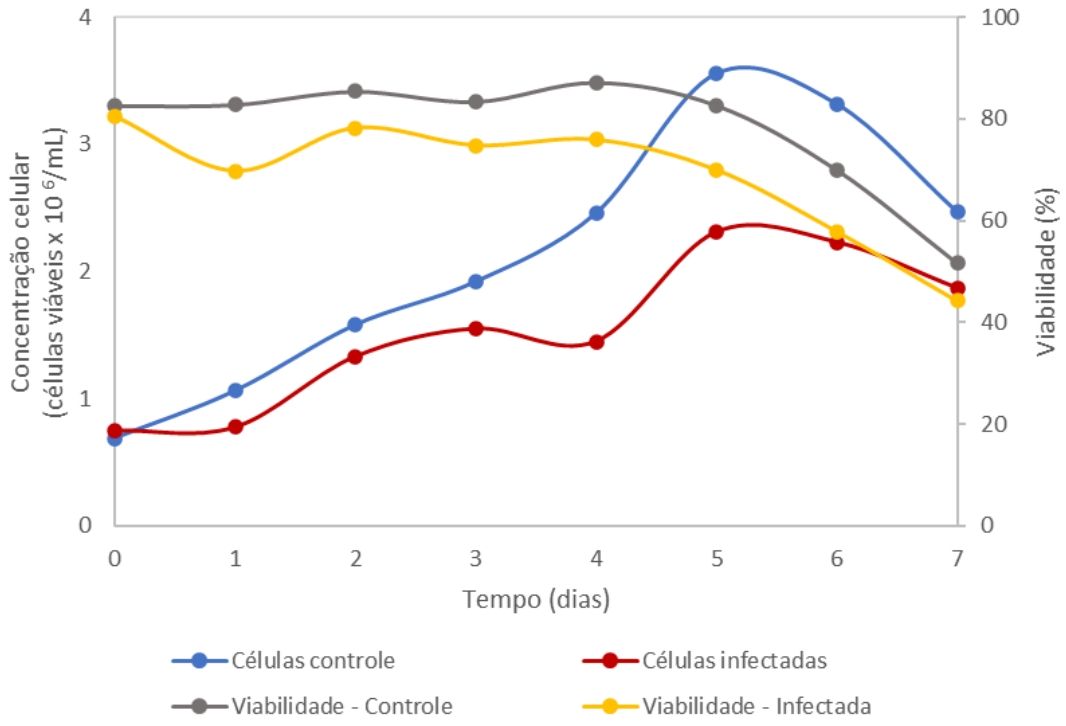
Após o descongelamento, o sobrenadante coletado foi submetido à determinação da concentração de glicose, pelo método DNS em microplacas, conforme metodologia de Santos et al. (2017).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Co-infecção com o AgMNPV e ChinSNPV

A Figura 1 apresenta a concentração e viabilidade celular para a célula controle e a infectada, onde o grupo da infectada está composta pelos dois vírus.

Figura 1. Concentração e viabilidade celular no processo de co-infecção do AgMNPV e ChinSNPV.



Fonte: Autoria própria, 2022.

A concentração celular inicial para célula controle foi de 0,687 x 10^6 células viáveis/mL e para a célula infectada foi 0,75 x 10^6 células viáveis/mL, sendo valores aproximados. A partir desses dados, observou-se um crescimento celular no controle até o 5º dia de processo obtendo o valor de 3,56 x 10^6 células viáveis/mL e sendo este o valor máximo obtido para essa etapa. Já a célula infectada apresentou um comportamento semelhante, sendo a concentração atingida foi de 2,23 x 10^6 células viáveis/mL. Em seguida, ao fim do processo, no sétimo dia a amostra de controle e infectada obtiveram estes resultados, respectivamente 2,47 x 10^6 e 1,87 x 10^6 células viáveis/mL. E a viabilidade tem-se que as duas amostras iniciaram acima de 80%, e mantiveram uma constância de aumento até o 4º dia de processo, obtendo 87,2% de viabilidade (controle) e 75,9% de viabilidade (infectada), ao fim do processo teve-se como resultado 51,6% para a controle e 44,3% para a infectada. Pode-se observar que ambas obtiveram o mesmo comportamento, aumento crescente até um certo ponto da curva e posteriormente uma queda. Também pode ser identificado que mesmo elas possuindo mesmo comportamento, os valores obtidos para a infectada foram regularmente menores que a controle, isso é admissível pela ação dos vírus no interior celular, e então admite-se o sucesso na ocorrência da infecção.

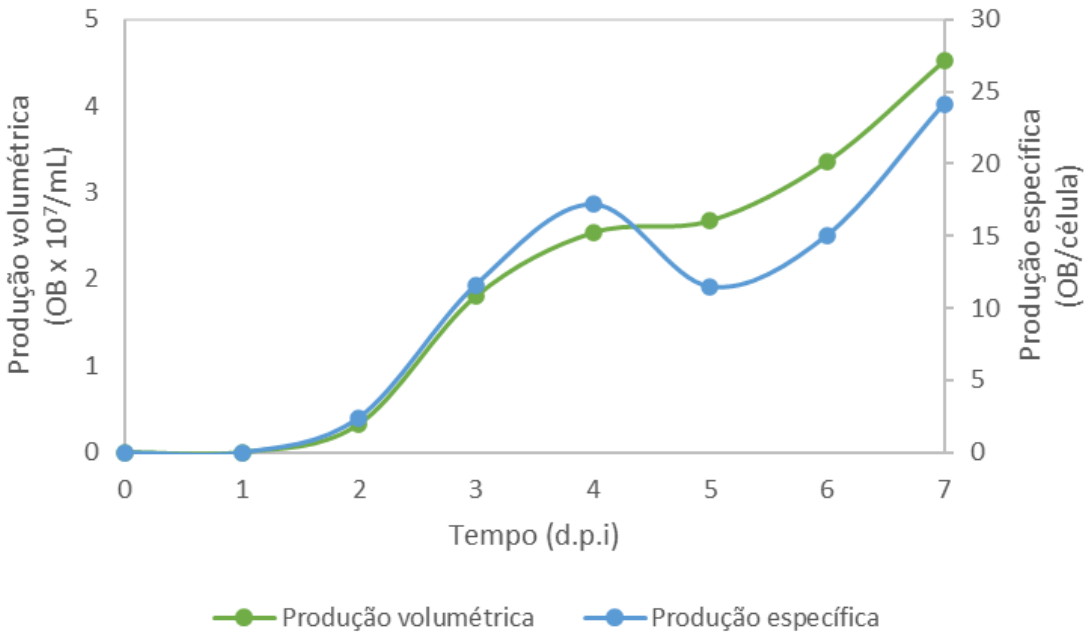
O perfil de crescimento da célula infectada está compatível com um processo sem sincronismo de infecção. As células estão infectadas, mas não ao mesmo tempo, isso pode ser evidenciado pelo comportamento similar com as células controle, mas com concentração inferior durante todo o cultivo. Embora, não observe o sincronismo de infecção, as células Sf21 foram suscetíveis a ação das partículas de virais de ambos os baculovírus AgMNPV e ChinSNPV.

Importante constatar que ao utilizar-se vírus extracelulares (BVs) de baculovírus distintos, a infecção pode ser mais evidenciada para um isolado em relação a outro. Considerando os baculovírus AgMNPV e ChinSNPV deste estudo, possuem quantidade de NPVs diferentes, pois o AgMNPV possui múltiplos *nucleopolyhedrovirus* proporcionando uma maior possibilidade de gerar mais partículas virais desse baculovírus em relação ao ChinSNPV que possui apenas um único *nucleopolyhedrovirus.*

A Figura 2 apresenta a evolução da quantificação dos corpos de oclusão do processo em co-infecção. A produção de OB atingiu uma produção volumétrica máxima no sétimo dia de processo, 4,52 x10 ^{7} OB/mL, neste mesmo dia ocorreu a produção específica de OB máxima de 11 OB/Célula.

A produção volumétrica de OB atingida neste processo foi maior do que a atingida pelos processos individuais com o ODV do AgMNPV e com o ODV do ChinNPV.

Figura 2. Produção de OB obtida a partir da co-infecção.



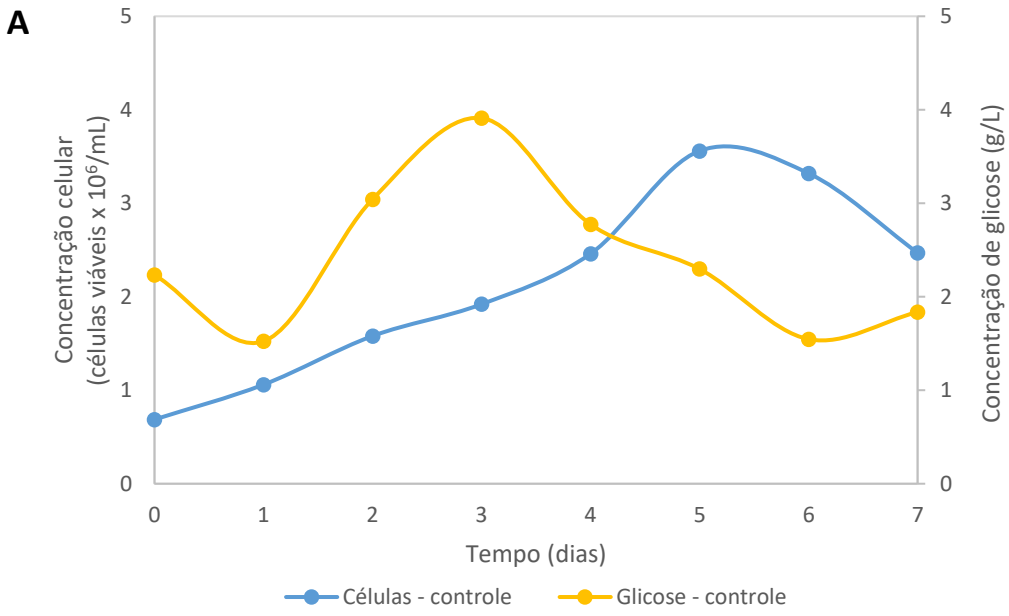
Fonte: Autoria própria, 2022.

A ausência de sincronismo de infecção, observado na Figura 1, permitiu um crescimento mais pronunciado por parte das células infectadas, o que pode ter levado a uma maior produção volumétrica de OBs em relação aos demais processos. Embora as células não estivessem em sua totalidade infectadas, aquelas infectadas ainda estavam em uma concentração celular maior do que infecções com os vírus separadamente. Tal relação entre a MOI, TOI, sincronismo de infecção e o comportamento cinético e produtivo de OB utilizando cultivos de células de inseto, já foi relatada por Maranga et al. (2003).

3.1.1. Consumo da Glicose na co-infecção do AgMNPV e ChinSNPV

A Figura 3 representa o consumo de glicose referente aos 7 dias de processo, em que foi analisado a concentração a cada 24h.

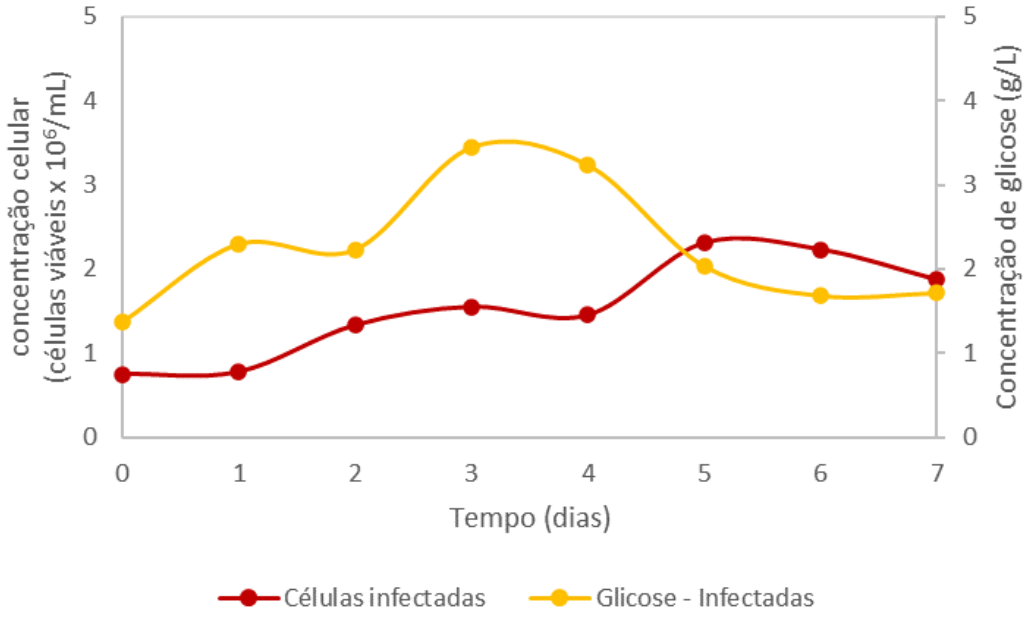
Figura 3A. Consumo de Glicose na co-infecção. Células controle e seu consumo de glicose.



Fonte: Autoria própria (2022).

B

Figura 3B: Células infectadas e seu consumo de glicose.



Fonte: Autoria própria, 2022.

O consumo inicial para a célula controle foi 2,23 g/L e para a infectada 1,37 g/L, a partir desses dados houve um aumento em ambas até o 3º dia do processo, sendo os valores obtidos de 3,91 g/L para a célula controle e de 3,44 g/L, sendo este o ponto ápice, pois foi o maior consumo durante todo o processo. Em seguida houve uma queda desta variável, chegando até o resultado final de 1,84 g/L para a célula controle e de 1,71 g/L, observa-se no gráfico que mesmo com valores distintos as duas amostras obtiveram comportamentos similares durante a avaliação, e este resultado da curva de consumo de glicose está relacionado a preferência desse nutriente para desenvolvimento celular, seja na célula controle para se replicar ou na célula infectada para a produção dos componentes virais.

4. CONCLUSÃO

A partir dos processos de co-infecção, verificou-se a possibilidade de utilizar partículas virais de diferentes baculovírus para infectar simultaneamente as células Sf21 nas condições de cultivo adotadas. Assim, desenvolver um biopesticida viral contendo dois agentes de biocontrole, e promover o controle simultâneo da *A. gemmatalis* e *C. includens* poderá ter uma melhor relação de custo-benefício para lavoura da soja.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Dr[a.] Marlinda Lobo de Souza (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) para o fornecimento da linhagem celular Sf21 e dos isolados dos baculovírus AgMNPV-2D e ChinSNPV.

Esta pesquisa teve auxílio financeiro da UFPB-PROPESQ, Edital de produtividade 03/2020, projeto número PII13489-2020.

REFERÊNCIAS

Botelho, ABRZ; Da Silva, Ivana Fernandes; Ávula, Crébio José. Aspectos biológicos da lagarta-falsa-medideira e sua criação em laboratório com dieta artificial. 2019.

Braga, M. F. (2011). Mapeamento de QTL (Quantitative Trait Loci) associados à resistência do maracujá-doce à bacteriose. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. doi:10.11606/T.11.2011.tde-02082011-103816. Recuperado em 2022-06-20, de www.teses.usp.br

Craveiro, S. R.; Melo, F. L. ; Ribeiro, Z. M. A. ; Ribeiro, B. M. ; Báo, S. N. ; Inglis, P. W. ; Castro, M. E. B. *Pseudoplusia includens single nucleopolyhedrovirus*: Genetic diversity, phylogeny and hypervariability of the pif-2 gene. Journal of Invertebrate Pathology, v. 114, p. 258-267, 2013.

Lynn, D.E. Infecciosidade aumentada de vírions ocluídos do vírus da poliedrose nuclear *Gipsy Moth* para culturas de células. Journal of Invertebrate Pathology, v. 63, p. 268-274, 1994.

Maranga, L.; Brazão, T. F.; Carrondo, M. J. T. Virus-like particle production at low multiplicities of infection with the baculovirus insect cell system. Biotechnology and bioengineering, v. 84, n. 2, p. 245-253, 2003.

Moscardi, Flavio et al. Artrópodes que atacam as folhas da soja. Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga, v. 4, p. 859, 2012.

Moscardi, F. Souza, M. L. Castro, M. E. B. Moscardi, M. L. Szecwzyk, B. 2011. Baculovirus Pesticides - Present state and future perspectives, In Microbes and Microbial Technology, Ahmad, I. F., Ahmad & J. Pichtel, (Eds.) Springer, New York, USA, p. 415-445.

Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Annual Review of Entomology, 44, p. 257-289.

Nielsen, L.K, Smyth, G.K, Greenfield, P.F. Hemacytometer Cell Count Distributions: Implications of Non-Poisson Behavior. Biotechnol Prog. 1991;7(6):560-563. doi:10.1021/bp00012a600

Sanches, M. M. et al. Successful co-infection of two different baculovirus species in the same cell line reveals a potential strategy for large in vitro production. Brazilian Journal of Microbiology, v. 52, n. 4, p. 1835-1843, 2021.

Santos, Angela Alves dos et al. Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS emmicroplaca. Brazilian Journal of Food Technology, v. 20, 2017.

Sosa-Gómez, D. R. Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos. Embrapa Soja-Outras publicações científicas (ALICE), 2005.

Souza, M. L. de; Sihler, W.; Sanches, M. M.; Schmidt, F. G. V.; Benito, N. P.; Silva, M. L.da Faria, M. R. de; Lopes, R. B. Ocorrência de baculovírus em larvas de *Chrysodeixis includens* em cultivo de soja na região do Cerrado. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2016. 19 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 313)

Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J. et al. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera; noctuidae). In Vitro 13, 213–217 (1977). https://doi.org/10.1007/BF02615077.

Yorinori, J.T; Lazzarotto, J.J. Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 27 p. (Embrapa Soja, Documentos, 236).

6. CONCLUSÕES

- Pode-se concluir que é possível produzir *in vitro* baculovírus ChinSNPV e AgMNPV em células derivadas de *S. frugiperda* Sf21. A produção de OB está relacionada ao ODV e partículas virais de BV usadas como inóculo nos processos de infecção.
- Com os resultados das infecções individualizadas com o ODV do AgMNPV-2D e do ChinSNPV, conclui-se que esta linhagem de células no regime de cultivo utilizado é suscetível a infecção com o ChinNPV e com o AgMNPV-2D, contudo, apresenta maior susceptibilidade ao AgMNPV-2D. Já para o processo infectivo com BV do AgMNPV e ChinSNPV o melhor resultado obtido foi para o BV do ChinSNPV, estes valores podem estar relacionados as proteínas dos vírus e neste caso necessita-se de uma análise para corroborar está afirmação.
- As células Sf21 apresentaram suscetibilidade a co-infecção por BV dos vírus ChinSNPV e AgMNPV na técnica de cultivo em suspensão, ocorrendo a produção de OB e demonstrando uma ausência de sincronismo, de forma que a melhor produção volumétrica em termos numéricos foi obtida nessa infecção.
- O tempo de infecção (TOI) de $1x10^6$ células viáveis /mL utilizada no processo de infecção com o ODV do AgMNPV e na co-infecção, obteve concentrações celulares elevadas na amostra controle, o fator limitante dessas concentrações foram a concentração de glicose no meio de cultivo utilizado.
- Contudo, os resultados obtidos foram satisfatórios para as condições de trabalho estabelecido. Como perspectiva futura há necessidade da realização de bioensaios para confirmar a infectividade para os baculovirus AgMNPV e ChinSNPV para as etapas individualizadas e a de ocorrência simultânea.

REFERÊNCIAS

ABREU, P. H.; ALONSO, H. G. O agricultor familiar e o uso (*in*)seguro de agrotóxicos no município de Lavras/MG. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 41, n. 18, 2016.

ALMEIDA, A. F. **Avaliação preliminar viabilidade de produção *in vitro* de um isolado brasileiro de Baculovirus *Spodoptera frugiperda* MNPV**. 97 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

ALMEIDA, A. F. **Estratégias de produção *in vitro* de bioinseticida viral: Influências do isolado, da cinética e do modo de operação**. 133p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

ALMEIDA, A. F.; MACEDO, G. R.; CHAN, L. C. L.; PEDRINI, M. R. S. Kinetic Analysis of in vitro Production of Wild-Type *Spodoptera frugiperda Nucleopolyhedrovirus*. **Brazilian Archives** of **Biology and Technology**., v. 53 n. 2: p. 285-291, 2010.

ANDRADE, A. S. A. **Baculovírus: produção in vitro do bioinseticida Anticarsia e construção de vetor de expressão para glicoproteína (GPV) do Rabies lyssavirus** 71 p. Dissertação (Mestrado em Biotecologia). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

ANGUELA, X. M. and KATHERINE, A. H. "Entering the Modern Era of Gene Therapy." **Annual review of medicine** vol. 70 (2019): 273-288. [DOI:10.1146/annurev-med-012017-043332].

AOKI, H.; SAKODA, Y.; JURUKUROKI, K.; TAKADA, A.; KIDA, H.; FUKUSHO, A. Induction of antibodies in mice by a recombinant baculovirus expressing pseudorabies virus glycoprotein B in mammalian cells. **Veterinary Microbiology**, v. 68, p. 197-207, 1999;

ARIF, B. M. The structure of the viral genomic. **Current Topics in Microbiology and Immunology,** v. 131, p. 21-29, 1986.

ÁVILA, C.J.; SANTOS, V.; VILELA, E.F. Atração fatal. **Revista Cultivar: Grandes Culturas**, n.103, p.17-19, 2008.

ÁVILA, C. J.; SCHLICK-SOUZA, E. C. Ocorrência de insetos-pragas e de seus predadores em sistemas integrados de produção de soja (Documentos 137, p. 31). **Embrapa Agropecuária Oeste**, Brasil.

BARRETO, M.R.; GUIMARÃES, C.T.; TEIXEIRA, F.F; PAIVA, E.; VALICENTE, F.H. Effect of Baculovirus Spodoptera isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera:

Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 67-75, 2005.

BERGOLD, G. H. Die isolierung des polyeder-virus and die natur der polyeder. **Zeitschrift für Naturforschung** 1947; 1947:122–143.

BERNARDI, O.; MALVESTITI, G.S.; DOURADO, P.M.; OLIVEIRA, W.S.; MARTINELLI, S.; BERGER, G.U.; HEAD, G.P.; OMOTO, C. Assessment of the high dose concept and level of control provided by MON 87701 × MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, v.68, n.7, p.1083-1091, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.3271>. Acessado em: 17 de setembro de 2020.

BERTI FILHO, E.; MACEDO, L. P. M. Fundamentos de controle biológico de insetospraga. Natal: IFRN Editora, 2011. 180p.

BIRD, J. T. and ELGEE, D. E. A virus disease and introduced parasites as factors controlling the European spruce sawfly, Diprion hercyniae Htd. in central New Brunswick. **Canadian Entomologist**, 1957; 89:371–378.

BLISSARD, G.W. Baculovirus-insect cell interactions. **Cytotechnology**, v.20, p.73- 93, 1996.

BLISSARD, G.W.; WENZ, J.R. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. **Journal of Virology**, v.66, p.6829-6835, 1992.

BLISSARD, G.W.; ROHRMANN, G.F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annual Review of Entomology**, v.35, p.127-155, 1990.

BLOMMERS, L. H. M. Integrated pest management in European apple orchards. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 39, p. 213-241, 1994.

BRANDSCH, C.; SHUKLA, A.; HIRCHE, F.; STANGL, G. I.; EDER, K. Effect of proteins from beef, pork, and turkey meat on plasma and liver lipids of rats compared with casein and soy protein. **Nutrition**, v. 22, p. 1162-1170, 2006. [DOI: 10.1016/j.nut.2006.06.009].

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2018

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Informações técnicas. Mapa, 2017. Disponível em: < https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>.

BRAUNAGEL, S.C.; ELTON, D.M.; MA, H.; SUMMERS, M.D. Identification and analysis of an Autographa californica nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56. **Virology**, v.217, p.97-110, 1996a.

BRAUNAGEL, S.C.; HE, H.; RAMAMURTHY, P.; SUMMERS, M.D. Transcription, translation, and cellular localization of three Autographa californica nuclear polyhedrosis virus structural proteins: ODV-E18, ODV-E35, and ODVEC27. **Virology**, v.222, p.100-114, 1996b.

BUENO, A. F. POMARI, A. F.; PANIZZI, A. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OMOTO, C.; OLIVEIRA, C. M.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ÁVILA, C.J.; SOSA-GOMÉZ, D. R.; GAZZONI, D.L.; HIROSE, E.; SILVA, C. F. A.; MOSCARDI, F.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; LORINI, I.; CORSO, I. C.; SALVADORI, J. R.; OLIVEIRA, L. J.; CARVALHO, M. C. C. G.; FERNANDES, P. M.; BUENO, R. C. O. F.; ROGGIA, X.; YANO, S. A. C. **Histórico e evolução do Manejo Integrado de Pragas da soja no Brasil. Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga**. Embrapa, Brasília, DF, p. 38-74, 2012.

CALTAGIRONE, L. E. Definitions and principles of biological control. In.2nd International Short Course in Biological Control, Berkeley, 1988. CHAMBERS, D. L. Quality control in mass rearing. **Annual Review Entomology**, v.22, p. 289-308, 1988.

CAMPO & NEGÓCIOS, O BRASIL É LIDER MUNDIAL EM TECNOLOGIAS DE CONTROLE BIOLÓGICO, **Revista Campo & Negócios**, Minas Gerais, 2019.

CAMPO, C.B.H.; MOSCARDI, F.; FERREIRA, B.S.C.; OLIVEIRA, L.J.; GÓMEZ, D.R.S.; PANIZZI, A.R.; CORSO, I.C.; GAZZONI, D.C.; OLIVEIRA, E.D. Pragas da Soja no Brasil e Seu Manejo Integrado. Londrina: Embrapa Soja, 2000, 70 p.

CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L. Baculovirus: agentes de controle biológico. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C.: MONNERAT, R. G (Ed). Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. cap. 8, p. 175-194.

CASTRO, M. E. B. DE et al, 1999. Biologia Molecular de Baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 1733-1761.

CHAKRABORTY, S.; REID, S. Serial Passage of a Helicoverpa armigera Nucleopolyedrovirus in Helicoverpa zea Cell Cultures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, p.303-308, 1999.

CHERNOMORDIK, L.; LEIKINA, E.; CHO, M.-S.; ZIMMERBERG, J. Control of baculovirus gp64-induced syncytium formation by membrane lipid composition. **Journal of Virology**, v.69, p.3049-3058, 1995.

CICCAGLIONE, A. R.; FULANO, X. X. Expression of HCV E1 protein in baculovirus-infected cells: effects on cell viability and apoptosis induction. **Intervirology**, v. 46, n. 2, p. 121-126, 2003.

CLAUS, J. D.; GIORIA, V.V.; MICHELOUD, G.A.; VISNOVSKY, G. Production of Insecticidal Baculoviruses in Insect Cell Cultures: Potential and Limitations. In: SOLONESKI, S. Insecticides – Basic and Other Applications. In Tech, 2012. p. 127-152.

COCK, M. J. W.; LENTEREN, J. C. ; BRODEUR, J.; BARRATT, B. I. P.; BIGLER, F.; BOLCKMANS, K.; CONSOLI, F. L.; HAAS, F.; MASON, P. G.; PARRA, J. R. P. Do new access and benefit sharing procedures under the Convention on Biological Diversity threaten the future of biological control? **Biocontrol**, Dordrecht, v. 55, n. 2, p. 199-218, 2010.

CONAB –Companhia Nacional de Abastecimento. Compêndio de estudos da Conab. 2020. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/institucional/publicacoes/compendio-de-estudos-da-conab>. Acesso em: 15 de abril de 2021.

CONTE, O.; OLIVEIRA, F. T.; HARGER, N.; CORRÊA-FERREIRA, B. S. Resultados do manejo integrado de pragas da soja na safra 2013/2014 no Paraná. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 56p. (Embrapa Soja. Documentos, 356).

CROWDER, D. W. Impact of release rates on the effectiveness of augmentative biological control agents. **Journal of Insect Science**, v. 7, p. 1-11, 2007.

CRUZ, I. Avanços e desafios no controle biológico com predadores e parasitoides na cultura do milho. In: Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso. In: SEMINÁRIO NACIONAL [DE] MILHO SAFRINHA, 13., 2015, Maringá. Anais... Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2015.

CUNHA, I. C. CONTROLE BIOLÓGICO DE SPODOPTERA FRUGIPERDA: EFICIÊNCIA DO USO DE BACULOVIRUS SPODOPTERA E OUTRAS TÉCNICAS. Universidade Federal do Triangulo Mineiro, Uberaba, 2017.

DANTAS, V. G. E FERREIRA, C. T. Baculovírus: um vírus versátil usado no controle biológico e como vetor de expressão de proteínas heterólogas aplicadas na saúde humana, 2020. Artigo de Revisão, **Revista Brasileira em Pesquisa em Ciências da Saúde**, v 7, n 13. Disponível em:<http://revistas.icesp.br/index.php/RBPeCS/article/view/886>.

DEBACH, P. Biological control of insect pests and weeds. New York, Reinhold, 844 p., 1964.

DEGRANDE, P.E.; VIVAN, L.M. *Pragas da soja*. Tecnologia e produção: soja e milho 2008/2009. Maracaju-MS: Fundação MS, 2008. p.73-108.

DOURIS, V., SWEVERS, L., ANDRONOPOULOU, E., GEORGOUSSI, Z., LATROU, K., 2006. Stably transformed insect cell lines: tools for expression of secreted and membrane-anchorade proteins amd high-throughpout screening platforms for drug and insecticide discovery. Advance in Virus research 68: 113-156.

DREWS, M.; PAALME, T.; VILU, R. The growth and nutrient utilization of the insect cell line Spodoptera frugiperda SF9 in batch and continuous culture. **Journal Biotechnology**, 1995;40: 187–98.

DRUGMAND, J.; SCHNEIDER, Y.; AGATHOS, S. N. Insect cells as factories for biomanufacturing. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 5, p. 1140-1157, 2012.

EMBRAPA, 2014. Disponível em: < https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1>. Acesso em: 08 de setembro de 2020.

FERNANDES, O. A.; CARNEIRO, T. R. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* no Brasil, p. 75-82. In: PINTO, A. S.; NAVA, D. E.; ROSSI, M. M.; MALERBO-SOUZA, D. T. (Eds.). **Controle Biológico na Prática**. ESALQ/USP, Piracicaba: CP 2, 287p., 2006.

FRENCH-CONSTANTT, R.H. The molecular genetics of insecticide resistance. Genetics. 2013; 194(4):807–15.

FUXA, J.R. Ecology of insect nucleopolyhedroviruses. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, 2004; 103:27–43.

FUXA, J. R.; TANADA, Y. (Eds.). **Epizootiology of Insect Diseases**. Publisher: John Wiley and Sons, Inc. N.Y., 1987.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; FILHO, E.B.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A., ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. Entomologia Agrícola. 1 ed. Piracicaba: Fealq, 2002. 920 p.

GOATER, B.; RONKAY, L.; FIBIGER, M. Noctuidae Europeae. Soro: **Entomological news**, 2003. 452 p.

GRACE, T. D. C. Analysis of the aminoacids and sugar in na insect cell médium during cell growth. **Journal insect physiology**, v.12, p. 625-633, 1966.

GRULA, M. A.; BULLER, P. L. and WEAVER, R. F. α-AmanitinResistant Viral RNA Synthesis in Nuclei Isolated from Nuclear Polyhedrosis Virus-Infected Heliothis zea Larvae and Spodoptera frugiperda Cells. **Journal Virology**, 1981; 38(3):916–921.

HERNIOU, E. A. and JEHLE, J. A. Baculovirus phylogeny and evolution. Current DrugTargets, 2007; 8:1043–1050.

HERNIOU, E. A.; ARIF, B. M.; BECNEL, J. J.; BILSSARD, G. W.; BONNING, B.; HARRISON, R. Family Baculoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds). Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012. 163–173. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

HITCHMAN, R. B.; LOCANTO, E.; POSSEE, R. D. and KING, L. A. Optimizing the baculovirus expression vector system. Methods, 2011; 55:52–7.

HOLLAND, E. C. Glioblastoma multiforme: the terminator. **Proceedings of National Academic Sciences of United States of America**. 2000; 97:6242–6244.

HORTON, H. M. and BURAND, J. P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Virology**, 1993; 67:1860–1868.

HU, Y. C. Baculoviral vectors for gene delivery: a **Review Current Gene Therapy**. 2008; 8:54–65.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Ibama, 2016. Disponível em: < https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores de desenvolvimento sustentável: estudos e pesquisas. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. (Informação geográfica, n. 9). ------- Censo Agropecuário 2017. Rio de Janeiro: IBGE, 2017. Disponível em:< https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>.

IKEDA, M.; HAMAJIMA, R. and KOBAYASHI, M. Baculoviruses: diversity, evolution and manipulation of insects. **Entomological Science**. 2015; 18:1–20.

JEHLE, J. A.; LANGE, M.; WANG, H.; HU, Z.; WANG, Y.; HAUSCHILD, R. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. **Virology**, 346, p. 180-193. 2006. [DOI: 10.1016/j.virol.2005.10.032].

KATOU Y, IKEDA M and KOBAYASHI M. Abortive replication of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus in SF9 and High Five cells: defective nuclear transport of the virions. **Virology**. 2006; 347:455– 465.

KIKHNO, I.; GUTIÉRREZ, S.; CROIZIER, L.; CROIZIER, G. and FERBER, M. L. Characterization of pif, a gene required for the per os infectivity of Spodoptera littoralis nucleopolyhedrovirus. **Journal Genetic Virology**, 2002; 83:3013–3022.

KLAFKE, K. **Desenvolvimento do processo de produção em biorreator do bioinseticida *Spodopetra Frugiperda* MNPV em células de inseto SF9**. Tese (Mestrado em Engenharia Química), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

KOGAN, M. Integrated pest management historical perspectives and contemporary developments. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 43, p. 243-270, 1998.

KOST, T. A.; CONDREAY, J. P. and JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nature Biotechnology**, 2005; 23:567–575.

KOMOR, A. C, KIM, Y. B, PACKER, M. S, ZURIS, J. A and LIU, D. R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. **Nature**. 2016; 533:420–424. 41.

KRELL, P.J. Passage effect of virus infection in insect cells. **Cytotechnology**, v.20, p.125-137, 1996.

KWANG, T. W.; ZENG, X. and WANG, S. Manufacturing of AcMNPV baculovirus vectors to enable gene therapy trials. **Molecular Therapy**. Methods & Clinical Development**.** 2016; 3:15050.

LENTEREN, J. C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl,** Dordrecht, v. 57, n. 1, p. 71-84. 2012.

LENTEREN, J. C. Ecology: cool science, but does it help? Wageningen: Wageningen University, 2010. 44 p.

LENTEREN, J. C. Critérios de seleção de inimigos naturais. In: BUENO, V. H. P. (Ed.). Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade. Lavras: UFLA, 2009. p. 11-32.

LENTEREN, J. C. 2003. Critérios de seleção de inimigos naturais a serem usados em programas de controle biológico. p. 1-19. In: BUENO, V.H.P. Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade. 2ª ed. Editora UFLA, Lavras. 196p.

LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; GINARTE, C. M. A.; CARREGARI, L. C.; BATISTA FILHO, A. Nematóides entomopatogênicos no controle de pragas, p. 45-53. In: PINTO, A. S.; NAVA, D. E.; ROSSI, M. M.; MALERBO-SOUZA, D. T. (Eds.). **Controle Biológico na Prática**. ESALQ/USP, Piracicaba: CP 2, 287p., 2006.

LI, Y.; WANG, X.; GUO, H. and WANG, S. Axonal transport of recombinant baculovirus vectors. **Molecular Therapy**, 2004; 10:1121–1129.

LONG, PAN, X.; KORMELINK, R.; VLAK, J. M. Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. **Virology**, 2006; 80:8830–8833.

LUA, L. H. L.; REID, S. Virus morphogenesis of Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus in Helicoverpa zea serum-free suspension culture. **Journal Genetic Virology**, 2000;81(10):2531–43.

MADHAN, S.; PRABAKARAN, M. and KWANG, J. Baculovirus as Vaccine Vectors. **Current Gene Therapy**, 2010. 10: 201-213.

MA, S.W.; CORSARO, B.G.; KLEBBA, P.E.; FRASER, M.J. Cloning and sequence analysis of a p40 structural protein gene of Helicoverpa zea nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v.192, p.224-233, 1993.

MARUNIAK, A. G, MARUNIAK, J. E, ZANOTO, P. M., DOUMBOUYA, A. E., LIU, J. C, MERRITT, T. M, LANOIE, J. S. Sequence analysis of the genome of the neodiprion sertifer nucleopolyhedrovirus. **Journal of Virology**, v. 78, p. 7036-7051, 2004.

MCWILLIAM, A. Environmental Impact of Baculoviruses. FAO. R7299_FTR_anx3. 2007. Available online: http://www.fao.org/docs/eims/upload/agrotech/2003/.

MENDONÇA, R. Z.; PALOMARES, L. A.; RAMÍREZ, O. T. An insight into insect cell metabolismo through selective nutrient manipulation. **Journal of Bitecnology**. v.72, p 61-75, 1999.

MILLER, L. K. Introduction to the baculoviruses. In: MILLER, L. K. The baculoviruses. New York: Plenum Press, 1997. P. 1-6.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B.; MOSCARDI, M. L.; SZECWZYK, B. 2011. Baculovirus Pesticides - Present state and future perspectives, In Microbes and Microbial Technology, Ahmad, I. F., Ahmad & J. Pichtel, (Eds.) Springer, New York, USA, p. 415-445.

MOSCARDI, F. O controle de pragas agrícolas e a sustentabilidade ecológica. Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2003.

MOSCARDI, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control ofLepdopetra. **Annual Review of Entomology**, 44, p. 257-289.

MOSCARDI, F. Utilização de Baculovirus anticarsia para o controle da lagarta da soja, Anticarsia gemmatalis. Embrapa Soja-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 1983.

NIELSEN L. K.; SMYTH, G. K.; GREENFIELD, P. F. Hemacytometer Cell Count Distributions: Implications of Non-Poisson Behavior. **Biotechnol Progress** 1991;7(6):560-563. [DOI:10.1021/bp00012a600].

OHKAWA, T.; VOLKMAN, L. E. and WELCH, M. D. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. **Journal of Cell Biology**, 2010; 190 (2):187–195.

OLIVEIRA, A. M.; MARACAJÁ, P. B.; FILHO, E. T. D.; LINHARES, P. C. F. Controle biológico de pragas em cultivos comerciais como alternativa ao uso de agrotóxicos. **Revista Verde**, v.1, p.01-09, 2006.

OLIVEIRA, B. E.; GAZZONI, D. L.; CORSO, I. C.; BOAS, G. V. L.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. **Pesquisa com inseticidas em soja: sumário dos resultados alcançados entre 1975 a 1987**. Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E), 1988.

PAILLOT, A. Sur une nouvelle maladie du noyau au grasserie des chenilles de P. brassicae et un nouveau groupe de microoganismes parasites. **Comptes Rendus**, 1926; 182:180–182.

PARRA, J. R.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, S.; BENTO, J. M. S. Controle Biológico no Controle biológico de insetos-pragas e suas perspectivas para o futuro. **Revista AGROTEC**, v. 36, n. 1, p. 248-258, 2015.

PASSARELLI, A. L. Barriers to success: How baculoviruses establish efficient systemic infections. **Virology**, 2012; 411:383–392.

PASSARELLI, A. L and GUARINO, L. A. Baculovirus late and very late gene regulation. **Current DrugTargets**, 2007; 8:1103–1115.

PASSARELLI, A. L and MILLER, L. K. Identification and characterization of lef-1, a baculovirus gene involved in late and very late gene expression. **Virology**, 1993; 67:3481-3488.

PEDRINI, M.R. DA S.; WOLFF, J.L.C.; REID, S. Fast accumulation of few polyhedra mutants during passage of a Spodoptera frugiperda multicapsid nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) in SF9 cell cultures. Annals of Applied Biology, n.145, p.107-112, 2004.

PENTEADO, S.R. Defensivos Alternativos e Naturais: Para uma agricultura saudável. 4º ed. Campinas: Via Orgânica-Fraga Penteado & Cia LTDA, 2010, 172 p.

POWER, J. F.; NIELSEN, L. K. Modelling baculovírus infection of insect cells in culture. **Cytotechnology**, v. 20, p. 209-219, 1996.

POWER, J. F.; REID, S.; RADFORD, K. M.; GREENFIELD, P. F.; NIELSEN, L. K. Modeling and optimization of the baculovirus expression vector system in batch suspension culture. **Biotechnology and Bioengineering**, 1994 Sep 5;44(6):710-9. doi: 10.1002/bit.260440607.

RANSON, H.; BURHANI, J.; LUMJUAN, N. Black IV WC. Insecticide resistance in dengue vectors. TropIKAnet. 2010; 1:1-12.

REID, S.; CHAN, L.; VAN OERS, M. M. **Production of Entomopathogenic Viruses**. Elsevier Inc, Chapter 13 – Mass Production of benefical Organisms, 2014.

REIS, A. C., Uso de Baculovirus Anticarsia no controle biológico da cultura da soja, 2019. Disponível: < https://maissoja.com.br/uso-de-baculovirus-anticarsia-no-controle-biologico-da-cultura-da-soja/>. Acesso em: 17 de setembro de 2020.

RITTER, T. and KUPIEC-WEHLINSKI, J. W. Gene therapy for the prevention of ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. **Current Gene Therapy**, 2005; 5:101–109.

RIVERO, A.; VEZILIER, J.; WEILL, M.; READ, A. F. and GANDON, S. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? **PLOS pathogens**. 2010; 6(8):e1001000.

ROHRMAN, G. F. Baculovirus Molecular Biology. 4th edition. Bethesda (MD). National Center for Biotechnology Information (US). 2019.

RUSSELL, R. L. Q.; ROHRMANN, G. F. A 25-kDa protein is associated with the envelopes of occluded baculovirus virions. **Virology**, v.195, p.532-540, 1993.

SÁ, V. G. M.; FONSECA, B. V. C.; BOREGAS, K. G. B.; WAQUIL, J. M. Sobrevivência e desenvolvimento larval de Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, p. 108-115, 2009.

SANTOS, M. S. Curiosidades Baculovirus, 2020. Disponível em: < https://maissoja.com.br/curiosidades-baculovirus/>. Acesso em: 17 de setembro de 2020>.

SAXENA H. Microbial Managment of Crop-Pest. **Journal of Biopesticides**, 2008; 1:32–37.

SHAPIRO, M. 1986. *In vivo* production of baculoviruses. In: Granados, R. R. Federeci, B. A. (Eds.), The Biology of baculoviruses, vol. II. CRC Press, Boca Raton, p. 31-61.

SIQUEIRA, S. L.; KRUSE, M. H. L. Agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. **Revista Escola Enfermagem**, v. 42, n. 3, p. 584-590, 2008. [DOI: 10.1590/S0080-62342008000300024].

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORSO, I. C.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; HIROSE, E. Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 90p. (Embrapa Soja. Documentos, 269).

SOSA-GÓMEZ, D. R.; LASTRA, C. C. L.; HUMBER, R. A. An overview of arthropod-associated fungi from Argentina and Brazil. Mycopathologia. v. 170, n. 1, p. 61–76, Jul. 2010. [DOI: 10.1007/s11046-010-9288-3].

SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S. V.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Host plants of Chrysodeixis includens (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). **Revista Brasileira de Entomologia,** v. 59, n. 4, p. 343–345, Oct./Dec. 2015. [DOI: 10.1016/j.rbe.2015.09.002].

STANBRIDGE, L. J, DUSSUPT, V. and MAITLAND, N. J. Baculoviruses as vectors for gene therapy against human prostate cancer. **Biomed Biotechnol**, 2003; 2:79-91.

SZEWCYK, B. RABALSKI, L. KROL, E. SIHLER, W. SOUZA, M. L, et al 2009. Baculovirus biopesticides – safe alternative to chemical protection of plants. **Journal of Biopesticides**, v. 2, n. 2, p. 209-216.

THEILMANN, D.A.; BLISSARD, G.W.; BONNING, B.; JEHLE, J.; O´REILLY, D.R.; ROHRMANN, G.F.; THIEM, S.; VLAK, J.M. Baculoviridae. In: MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELLBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. (Eighth Report of The International Committee on Taxonomy of Viruses).

USDA (Departamento de Agricultura dos EUA). (2019). Recuperado de <https://www.ers.usda.gov/topics/crops/ soja-óleo-culturas>

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. S. Controle biológico da lagarta do cartucho, Spodoptera frugiperda, com Baculovírus. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 14 p. (Circular Técnica, 114).

VAGO, C.; AIZAWA, K.; IGNOFFO, C.; MARTIGNONI, M. E.; TARASEVITCH, L. and TINSLEY, T. W. Editorial: Present status of the nomenclature and classification of invertebrate viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, 1974; 23:133–134.

VAN DEN BOSCH, R.; MESSENGER, P. S.; GUTIERREZ, A. P. An introduction to Silva e Brito. 2015. **Revista AGROTEC** – v. 36, n. 1, p. 248-258, 2015. 258 biological control. New York, Plenum Press, 247p., 1982.

VAN OERS, M. M. and VLAK, J. M. Baculovirus genomics. **Current DrugTargets**, 2007; 8(10):1051-1068.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. Virus taxonomy classification and nomenclature of virus. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego, 2000.

VASANTHARAJ, D. B. Biotechnological approaches in IPM and their impact on environment. **Journal of Biopesticides**. 2008; 1:1–5.

VAUGHN, J. L.; GOODWIN, R. H.; TOMPKINS, G. J. et al. The establishment of two cell lines from the insectspodoptera frugiperda (lepidoptera; noctuidae). *In Vitro* 13, 213–217 (1977). [DOI.org/10.1007/BF02615077].

VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; PAULA, A. C. O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinada à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 7, p. 1273-1283, 1999, [DOI:10.1590/S0100- 204X1999000700021].

VOLKMAN, L. E. The 64-K envelope protein of the budded nuclear polyhedrosis virus. In: DOERFLER, W.; BOEHM, P. (Eds.). **Current topics in microbiology and immunology**. Berlin: Heidelberg/New York: Springer-Verlag, 1986. p.103-118.

VOLKMAN, L. E.; GOLDSMITH, P. A. Mechanism of neutralization of budded Autographa californica nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis. **Virology**, v.143, p.185-195, 1985.

VOLKMAN, L. E and SUMMERS, M. D. Autographa californica nuclear polyhedrosis virus: Comparitive infectivity of the occluded, alkali-liberated, and nonoccluded forms. **Journal of Invertebrate Pathology**, 1977; 30:102–103.

WANG, C-Y.; LI, F.; YANG, Y.; GUO, H-Y.; WU, C-X. and WANG, S. Recombinant baculovirus containing the Diphtheria toxin A gene for malignant glioma therapy. **Cancer Research**, 2006; 66:5798-5806.

WANG, P. and GRANADOS, R. R. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancing. **Proceedings of the National Academic Science of United States of America**, 1997; 94:6977–6982.

WANG, X.; WANG, C.; ZENG, J.; XU, X.; HWANG, P. Y. K.; YEE, W-C.; NG, Y. K. and WANG, S. Gene Transfer to Dorsal Root Ganglia by Intrathecal Injection: Effects on Regeneration of Peripheral Nerves. **Molecular Therapy**, 2005; 12:314-320.

WHALON, M. E.; MOTA-SANCHEZ, D. and HOLLINGWORTH, R. M. Global Pesticide Resistance in Arthropods. CAB International: Wallingford, UK, 2008.

WRIGHT, M. G. Biological Control of Invasive Insect Pests. In: ABROL, D. P. (ed.) Integrated Pest Management - **Current concepts and ecological perspective**, San Diego: Elsevier Academic Press, 2014. p. 267-281.

WHITFORD, M.; FAULKNER, P. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a gene encoding gp41, a structural glycoprotein of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, v.66, p.4763-4768, 1992b.

XEROS N. Cytoplasmic polyhedral virus diseases. **Nature**, 1952; 170 (4338):1073.

ZULIN, D.; ÁVILA, C. J.; SCHLICK-SOUZA, E. C. Population fluctuation and vertical distribution of the soybean looper (Chrysodeixis includens) in soybean culture. **American Journal of Plant Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1544–1556, Jan. 2018. [DOI: 10.4236/ajps.2018.97113].