



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ALINE FURTADO OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MICROFLUÍDICOS PARA PRODUÇÃO
DE LIPASE POR *BACILLUS SUBTILIS* IMOBILIZADO EM MICROPARTÍCULAS
DE ALGINATO**

*DEVELOPMENT OF MICROFLUIDIC SYSTEMS FOR LIPASE PRODUCTION
FROM BACILLUS SUBTILIS IMMOBILIZED IN ALGINATE MICROPARTICLES*

CAMPINAS
2018

ALINE FURTADO OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MICROFLUÍDICOS PARA PRODUÇÃO
DE LIPASE POR *BACILLUS SUBTILIS* IMOBILIZADO EM MICROPARTÍCULAS
DE ALGINATO**

*DEVELOPMENT OF MICROFLUIDIC SYSTEMS FOR LIPASE PRODUCTION
FROM BACILLUS SUBTILIS IMMOBILIZED IN ALGINATE MICROPARTICLES*

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química
como parte dos requisitos exigidos para
a obtenção do título de Doutora em
Engenharia Química.

Orientadora: Profa Dra Lucimara Gaziola de la Torre

Co-orientador: Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DE DOUTORADO DEFENDIDA
POR ALINE FURTADO OLIVEIRA E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. LUCIMARA GAZIOLA DE LA
TORRE.

CAMPINAS

2018

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

OL4d Oliveira, Aline Furtado, 1989-
Desenvolvimento de sistemas microfluídicos para imobilização de *Bacillus subtilis* em micropartículas de alginato visando a produção de lipase / Aline Furtado Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Lucimara Gaziola de la Torre.
Coorientador: Reinaldo Gaspar Bastos.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Microfluídica. 2. Alginatos. 3. *Bacillus subtilis*. 4. Lipase. I. Torre, Lucimara Gaziola de la, 1971-. II. Bastos, Reinaldo Gaspar. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of microfluidic systems for *Bacillus subtilis* immobilization in alginate microparticles for lipase production

Palavras-chave em inglês:

Microfluidics

Alginate

Bacillus subtilis

Lipase

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Lucimara Gaziola de la Torre [Orientador]

Sang Won Han

Rosiane Lopes da Cunha

Mariana Althenhofen da Silva

Juliana de Novais Schianti

Data de defesa: 03-05-2018

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese de Doutorado defendida por Aline Furtado Oliveira e aprovada no dia 03 de maio de 2018 pela comissão examinadora constituída pelos seguintes Professores Doutores:

Profa. Dra. Lucimara Gaziola de la Torre
Presidente da Banca
Orientadora

Prof. Dr. Sang Won Han (Titular)

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha (Titular)

Profa. Dra. Mariana Altenhofen da Silva (Titular)

Profa. Dra. Juliana de Novais Schianti (Titular)

* A Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e ao meu noivo que foram o meu alicerce para eu construir a minha trajetória e que me incentivaram a enfrentar os meus medos e a conquistar os meus ideais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pelas oportunidades e pelas pessoas que colocou em minha vida, pelas dificuldades que me fizeram crescer e aprender. Foram tantas as pessoas que fizeram parte desta história que não caberiam palavras para descrever o quanto cada um deles foi importante na minha jornada.

Agradeço imensamente aos meus pais, Dalmo e Gilda Helena, e minha irmã Janaina por todo apoio e incentivo. E agradeço também o Pedro, meu noivo, pelo carinho e ter sido meu companheiro em mais essa etapa da minha vida. Obrigada por todo o amor e cuidado que sempre tiveram comigo.

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Profa. Dra. Lucimara, e meu co-orientador, Prof. Dr. Reinaldo, pelas orientações e o incentivo para o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço também ao Prof. David Weitz por ter me recebido em seu laboratório na Universidade de Harvard e pela Dra. Julie Bouchon por ter me orientado nas atividades de pesquisa durante todo o período de estágio. Obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos e discussões que me fizeram crescer como profissional. Obrigada por terem contribuído tão positivamente não apenas para o desenvolvimento desta pesquisa de doutorado, mas também para o avanço científico que pude trazer para o Brasil.

Agradeço o apoio financeiro da FAPESP/CAPES e CNPQ, sendo concedida a bolsa de pesquisa do doutorado (Processo N° 2014/26814-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp) e também pela bolsa BEPE/FAPESP (Processo N° 2016/13167-9), onde pude aprender mais sobre técnicas de microfluídica e além disso, a conhecer a forma que a pesquisa é feita no exterior. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade da autora e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e da CAPES.

Além disso, quero agradecer aos meus colegas de laboratório: Caroline, Tiago Balbino, Micaela, Amanda, Franciele, Thays, Ismail, Bruna e Thiago Taketa. E também os meus amigos de faculdade, UFSCar-Araras, que estiveram comigo nesta fase, onde pudemos compartilhar nossos anseios, experiências e fazendo dos nossos momentos muito especiais. Agradeço a todos vocês, por estarem presentes de alguma forma e por contribuírem para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada!

RESUMO

A imobilização de biocatalisadores é uma estratégia importante para aumentar a produtividade em bioprocessos. Entretanto, a dificuldade na obtenção de partículas homogêneas pelos métodos convencionais assim como as limitações difusionais impostas pelas matrizes poliméricas são questões que precisam ser contornadas nestes sistemas. A microfluídica é uma tecnologia que pode contribuir nesta área diante da produção de micropartículas monodispersas e a possibilidade de investigação de respostas celulares em microambientes. Assim, este projeto teve como objetivo empregar a microfluídica para encapsular e investigar o comportamento de *Bacillus subtilis* em micropartículas de alginato. E, como desafio, investigar a produção de lipase, uma enzima de interesse biotecnológico relevante, usando cultivo em batelada. Diante disso, estratégias envolvendo geometrias de microcanais, soluções para fase contínua e dispersa na geração de gotas bem como métodos de gelificação de alginato foram estudados para a imobilização celular. Nestes estudos, um processo eficiente de imobilização foi obtido com microfluídica em geometria de fluxo cruzado, utilizando óleo fluorocarbonado para gerar as gotas de alginato. A reticulação do alginato, para a formação das micropartículas, foi realizada pelo método de gelificação interna. Em etapa subsequente, um microbiorreator de perfusão foi desenvolvido, permitindo identificar que o ambiente das micropartículas foi favorável para o crescimento celular, sendo que a alta concentração celular pode ter sido resultado da proteção celular. E, com o intuito de comparar estas micropartículas com outras estratégias em escala laboratorial, um sistema microfluídico de gotas operando em modo duplo foi desenvolvido. Assim, foi avaliada a produtividade em lipase para as formas de cultivo por células livres, imobilizadas por método convencional e por microfluídica. O cultivo das bactérias com micropartículas apresentou maior concentração celular e por isso a produtividade de lipase por esse sistema foi de até 3 vezes maior do que nas condições de células livres e imobilizadas por método convencional de gotejamento. Portanto, a tecnologia microfluídica mostra-se eficiente para encapsular e investigar comportamento celular e ainda, as micropartículas produzidas por este sistema podem ser aplicadas a cultivos submersos, o que poderá contribuir para o aumento de produtividade em bioprocessos.

Palavras-chave: Microfluídica, microbiorreator, micropartículas de alginato, *Bacillus subtilis*, lipase

ABSTRACT

Immobilization methods of biocatalyst are important strategies for improving the bioprocess productivity. However, heterogeneous particles productions from conventional methods and the diffusional limitations from polymeric matrix are some points could be optimized in these systems. Microfluidics is a technology that can contribute on this area due to the monodisperse microparticles productions and the possibility to investigate the cellular responses into the microparticles. Therefore, the purpose of this project was to use the microfluidics for encapsulating and investigating the cell behavior of *Bacillus subtilis* inside of alginate microparticles. As challenge, to investigate the potential of these cells on lipase production, an enzyme of relevant biotechnological interest was selected. Thus, strategies for microchannels geometries, composition of continuous and dispersed phase for droplet generation and alginate gelation methods were studied for *Bacillus subtilis* encapsulation on microparticles. On these studies, an efficient encapsulation process was obtained using a cross-flow microfluidic system, with fluorocarbon oil to generate the droplets and alginate cross-linking via internal gelation. The bacteria growth in perfusion microbioreactor shows that microparticles alginate conditions were favorable, resulting in a high cell density that can be stimulated by the cell protection. In order to apply these microparticles on a laboratory scale, a double droplet microfluidic system allowed us to investigate lipase productivity between the cultivate manners with free cell, encapsulated by the conventional and microfluidics methods. Thus, the cultivation with immobilized bacteria in alginate microparticle showed a high cell density, the lipase productivity by this system was almost 3 times higher than the conditions of free and encapsulated cells by conventional method. Therefore, the microfluidic technology was efficient to encapsulate and investigate of cell behavior on alginate microparticles and apply them on submerged cultivate, which may contribute to the increase of productivity in bioprocesses.

Key-words: Microfluidics, microbioreactor, alginate microparticles, *Bacillus subtilis*, lipase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 2

- Figura 2.1:** Técnicas de imobilização de células microbianas: por fixação a) floculação, b) adsorção em suporte sólido, c) *cross-linking* de células e, imobilização: d) em matriz porosa, e) em membrana. Adaptado de Westman *et al.* (2012).....23
- Figura 2.2:** Processos de formação de partículas de alginato: A) estrutura química e uma ligação de cátion divalente ao ácido glurônico – bloco G; B) método de gelificação externa por gotejamento e reticulação instantânea do alginato pelos íons de cálcio na forma livre; C) método de gelificação interna por emulsificação e o processo de acidificação para liberação dos íons na forma inativa para reticular o alginato.....25
- Figura 2.3:** Principais geometrias de microcanais para geração de gotas: A) focalização de fluxo; B) fluxo cruzado com junção em T. Estratégias por gelificação externa: C) gelificação externa misturando as soluções de alginato e CaCl_2 diretamente numa mesma gota; D) adição de uma segunda corrente contínua contendo solução de CaCl_2 para gelificação após a formação das gotas de alginato; E) formação de gotas de alginato em microcanais e posterior gotejamento em solução contendo CaCl_2 . Estratégias por gelificação interna: F) liberação de íons de cálcio por redução de pH para reticulação do alginato; G) gelificação lenta por troca iônica de cátions quelados com EDTA e EDDA. Imagens adaptadas dos respectivos autores destes trabalhos.....29
- Figura 2.4:** Sistema microfluídico de gotas amplificados por: A) paralelização usando sistema de canais de focalização de fluxo; B) paralelização usando geometria de focalização com canais em Y e, C) empilhamento de módulos contendo canais de focalização de fluxo. Adaptadas dos respectivos autores destes trabalhos.....30
- Figura 2.5:** Microbiorreatores para cultivo de células imobilizadas: A) sistema de perfusão; B) sistema integrado com processo de imobilização (a-c); incubação (d-f) e análises (g-i). Adaptados de Abeille *et al.* (2014) e Korster *et al.* (2008), respectivamente.....32

Capítulo 3

- Figura 3.1:** Configuração dos sistemas microfluídicos para formação de gotas: A) sistema por focalização de fluxo com canais simples, B) geometria de fluxo cruzado em junção em T de canais simples tendo uma serpentina como misturador e, C) sistema de fluxo cruzado em junção T com canais estruturados com filtros nas entradas e resistores de fluidos antes da quebra das gotas nos canais para estabilização do fluxo de soluções.....38
- Figura 3.2:** Geração de micropartículas de alginato por gelificação externa: A) sistema de focalização de fluxo para formação de gotas de alginato com gelificação em reservatório de CaCl_2 , B) geometria de fluxo cruzado com junção em T de canais simples tendo a gelificação feita pela mistura de alginato e solução de CaCl_2 dentro da gota.....41
- Figura 3.3:** Produção de micropartículas de alginato usando gelificação interna pelo método CLEX usando solução de alginato com Ca-EDTA-MOPS e outra composta por alginato e Zn-EDDA-MOPS. Para formar as gotas foi usado óleo HFE 7500 com fluorosurfactante.....42
- Figura 3.4:** Características dos óleos de milho e HFE 7500: A) estrutura química dos óleos de milho e HFE 7500, B) densidade; C) viscosidade; D) tensão interfacial do óleo com a água ultra-pura. As propriedades físico-químicas foram analisadas numa temperatura de 25°C, realizadas em triplicatas.....44
- Figura 3.5:** Forma de quebra das gotas usando microfluídica em microcanais em junção T com serpentina: A) formato de gotas não uniformes geradas com óleo de milho com PGPR 4% (m/m) como fase contínua e, B) formato das gotas uniformes produzidas com óleo HFE 7500 com fluorosurfactante 1% (v/v) como fase contínua. Nas correntes das fases dispersas foram utilizadas apenas água ultra-pura.....45
- Figura 3.6:** Regimes de formação de gotas: A) ausência de formação de gotas; B) *squeezing*; C) *dripping*; D) jateamento.....47
- Figura 3.7:** Formação de gotas em função da razão de taxas de fluxo ($R = \sum Q_D/Q_C$) e do número de Capilar (Ca) em: a) focalização de fluxo com canais simples em formato de cruz; b) sistema fluxo cruzado com junção em T, formado por canais simples; c) sistema com geometria em junção T com canais

estruturados. Na fase contínua foi usado óleo de milho contendo PGPR a 4% (m/m) ($\mu = 69,73$ mPa.s) e na dispersa, água ultra-pura ($\mu = 0,891$ mPa.s).....	48
Figura 3.8: Regime de formação de gotas em sistema microfluídico do tipo junção T com canais estruturas usando óleo HFE 7500 com fluorosurfactante 1% (v/v) na fase contínua: A) regime de formação de gotas; B) processo de quebra de gotas nos microcanais e gotas na emulsão numa vazão de $Q_c = 2,5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e $Q_d = 0,4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. As barras de escala são de $100 \mu\text{m}$	50
Figura 3.9: Gotas formadas em regime de <i>dripping</i> , as quais foram produzidas pelo sistema de fluxo cruzado com junção em T em canais estruturados usando vazões de $Q_c = 2,5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e $Q_d = 0,4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$: A) amostra das gotas distribuídas na fase oleosa; B) distribuição de tamanhos das gotas produzidas nestas condições de vazões. A barra de escala é equivalente a $100 \mu\text{m}$	50
Figura 3.10: Micropartículas de alginato em solução aquosa após a separação da emulsão por adição de PFO. Estas micropartículas foram produzidas por gelificação externa em canais de junção T estruturados tendo óleo HFE como fase contínua.....	51
Figura 3.11: Comparação de formas de obtenção de micropartículas de alginato, considerando a geração de gotas e formação de micropartículas de alginato. <i>Gelificação externa</i> – A) sistema de focalização de fluxo com gelificação em reservatório de solução gelificante; B) por fluxo cruzado em junção T com canais simples e gelificação dentro da própria gota. <i>Gelificação interna</i> - C) usando sistema de fluxo cruzado em junção T com canais estruturados.....	53
Figura 3.12: Micropartículas de alginato produzidas pelo método CLEX usando nova geometria de junção T: A) nova geometria de junção-T e geração de gotas, que foram compostas com alginato/ Ca-EDTA e alginato/Zn-EDDA, sendo quebradas por óleo HFE 7500 com fluorosurfactante 1% (v/v); B) micropartículas de alginato produzidas em nova geometria de junção T; C) perfil da distribuição de tamanho de micropartículas usando $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para fase contínua e $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para a fase dispersa.....	55

Capítulo 4

Figura 4.1: Plataforma microfluídica de microbiorretor construída com microestruturas para ancorar as micropartículas de alginato, que foi usado para acompanhar o crescimento de células imobilizadas (barra de escala = $100 \mu\text{m}$).....	62
Figura 4.2: Estabilidade das micropartículas de alginato após as etapas de lavagens e adição de CaCl_2 1 mM. Análise de diâmetro das micropartículas de alginato antes e depois do período de 24 h de incubação a 37°C com agitação orbital (150 rpm) ($N = 100$).....	67
Figura 4.3: Imobilização de <i>Bacillus subtilis</i> em micropartículas de alginato: A) sistema de fluxo cruzado em junção T, sendo as gotas compostas por alginato/Ca-EDTA e alginato/ Zn-EDDA com suspensão celular na fase dispersa e óleo HFE 7500 com fluorosurfactante 1 % (v/v) na fase contínua; B) presença de células na fase oleosa da emulsão num processo de formação de gotas em vazões $Q_C = 10$ e $Q_D = 1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; C) ausência de células na fase oleosa da emulsão, tendo em vazões $Q_C = 4$ e $Q_D = 0,4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para formação de gotas.....	68
Figura 4.4: Imobilização de células em micropartículas de alginato em vazões de $Q_c = 4$ e $Q_d = 0,4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$: A) presença de células no interior das micropartículas de alginato, após separação da emulsão, B) células marcadas com fluorescência (verde) que indica a viabilidade das células dentro de micropartículas de alginato. As células foram marcadas com fluorescência pelo kit de viabilidade bacteriana LIVE / DEAD® BacLight™ (Invitrogen, USA).....	68
Figura 4.5: Viabilidade de células imobilizadas em micropartículas de alginato: antes do processo de imobilização (suspensão celular, células em soluções de alginato contendo Ca-EDTA e Zn-EDDA); Após o processo de imobilização e também a viabilidade das células imobilizadas após 24 h de cultivo em plataforma microfluídica. Para o processo de imobilização foi usado uma vazão de $0,4$ para fase dispersa e $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, para a fase contínua.....	69
Figura 4.6: Sistema microbiorreator com microestruturas para ancoragem de micropartículas: A) modo de operação em batelada, sendo que cada unidade de microbiorreator foi fechada com mangueira em forma de lupe, B) presença de micropartículas no microbiorreator no tempo 0 h.....	71
Figura 4.7: Microbiorreator operando em modo batelada com alta concentração celular após 24 h de cultivo de células imobilizadas em micropartículas de alginato. Presença de micropartículas encontradas dentro do microbiorreator. A barra de escala é de $50 \mu\text{m}$	72

- Figura 4.8:** Análise de viabilidade celular de *Bacillus subtilis* NCBI 3610 imobilizado em micropartículas de alginato, sendo o corante de viabilidade celular inserido no sistema ao final de 6 h de cultivo em microbiorreator, o qual foi operado em modo contínuo. As células foram marcadas com fluorescência pelo kit de viabilidade bacteriana LIVE / DEAD® BacLight™ (Invitrogen, USA), sendo que a fluorescência verde indica a presença de células viáveis, enquanto que a fluorescência vermelha aponta as células não viáveis. 73
- Figura 4.9:** Células de *Bacillus subtilis* NCBI 3610 imobilizadas em micropartículas de alginato em cultivo usando o microbiorreator em modo contínuo com sistema para ancorar as partículas e observar o crescimento celular ao longo de 24 h em temperatura ambiente, sendo operado em modo contínuo com uma vazão de $0,1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ de meio de cultura com óleo de milho como fonte de carbono. 74
- Figura 4.10:** Perfis de crescimento entre *Bacillus subtilis* NRRL B 14819 na forma livre e imobilizada em micropartículas de alginato, sendo a concentração celular determinada por densidade óptica (600 nm) e cultivo em meio de cultura contendo óleo de milho como substrato para induzir a produção de lipase. 76
- Figura 4.11:** Cultivo submerso de *Bacillus subtilis* nas formas livres e imobilizadas em micropartículas de alginato: A) comparação da atividade enzimática entre as duas formas de cultivo; B) perfil de atividade específica ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$); C) avaliação de atividade enzimática por concentração de células ($\text{U}\cdot\text{cél}^{-1}$); D) perfil de variação de pH ao longo do tempo em cada condição de cultivo. 78

Capítulo 5

- Figura 5.1:** Sistema microfluídico de gotas em modo simples e plataforma em sistema gerador de gotas em módulo duplo. 84
- Figura 5.2:** Plataforma microfluídica de gotas com sistema duplo de geração de gota para imobilização de células microbianas em micropartículas de alginato. 85
- Figura 5.3:** Processo de produção de macropartículas de alginato pelo método de gotejamento usando uma vazão de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para gotejar solução de alginato de sódio num reservatório contendo solução de CaCl_2 a 30mM. 86
- Figura 5.4:** Perfil de geração de gotas em cada módulo da plataforma de microfluídica em função da vazão total de escoamento: A) diâmetro médio de gotas dos módulos 1 e 2, B) coeficiente de variação em diferentes vazões. 88
- Figura 5.5:** Formação de gotas pelo sistema simples gerador de gotas e a plataforma de sistemas duplos de microfluídica em função de diferentes vazões: A) perfil de diâmetro médio de gotas; B) perfil de variação de tamanhos, dado pelo coeficiente de variação (CV). 89
- Figura 5.6:** Frequência de gotas geradas por segundos (Hz) em diferentes vazões totais entre os sistemas simples e a plataforma de sistema duplo. 90
- Figura 5.7:** Processo de geração de gotas e micropartículas de alginato produzidas em plataforma dupla de microfluídica de gotas numa vazão total de $Q_T = 14 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, tendo uma frequência de 100 Hz. ... 91
- Figura 5.8:** Perfis de crescimento de células livres e imobilizadas em macro e micropartículas, que o número de células (N) foi normalizado em função do número inicial de células (N/N_0). A concentração inicial de células para as três formas de cultivo foi de $10^7 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ e as barras de erro representam o erro padrão de triplicatas independentes. 92
- Figura 5.9:** Cultivo submerso de *Bacillus subtilis* para produção de lipase nas condições de células livres, imobilizadas em macropartículas (técnica de gotejamento) e imobilizadas em micropartículas (técnica microfluídica): A) comparação da atividade enzimática entre as três formas de cultivo; B) atividade específica relativa à produção de lipase. Os ensaios foram realizados em triplicata, numa condição de agitação a 37°C , sendo avaliada a produção de lipase ao longo de 24 h. As barras indicam o desvio padrão da média entre as amostras. 94
- Figura 5.10:** Efeito da concentração celular nas respostas de produção enzimática nos cultivos com células livres, imobilizadas (em macropartículas) e microimobilizadas (em micropartículas de alginato): A) análise de atividade enzimática ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) por concentração de células ($\text{U}\cdot\text{cél}^{-1}$); B) variação de pH ao longo do tempo. 96

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3

- Tabela 3.1:** Propriedades do óleo de milho e HFE como fase contínua no processo de geração de gotas em microcanais..... 45
- Tabela 3.2:** Características das geometrias dos sistemas de focalização de fluxo e fluxo cruzado em junção T com canais simples e estruturados..... 46

Capítulo 4

- Tabela 4.1:** Estabilidade física das micropartículas de alginato em diferentes condições..... 65
- Tabela 4.2:** Comparação entre as velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) do *Bacillus subtilis* NRRL B 14819 nas condições de cultivo com células livres e imobilizadas em micropartículas de alginato por períodos de cultivo antes e após 12 h..... 76

Capítulo 5

- Tabela 5.1:** Comparação entre as velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) do *B. subtilis* NRRL B 14819 nas condições de cultivo com células livres, imobilizadas em macro e micropartículas de alginato. 92
- Tabela 5.2:** Comparação entre a produção de lipase nos tempos de 18 e 24 h, dado em atividade enzimática ($U.mL^{-1}$), por *Bacillus subtilis* NRRL B 14819 nas condições de células livres, imobilizadas em macro e micropartículas de alginato. 95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca	Número de Capilar
CLEX	<i>Complex ligand exchange crosslinking ion</i>
CV	Coeficiente de variação
EDDA	Ácido etilenodiamina-N, N-diacético
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
MOPS	Tampão de ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NRRL B	<i>Northern Regional Research Laboratory (National Center For Agricultural Utilization Research)</i>
PDMS	Poli dimetil siloxano
PFO	Perfluorooctanol
PGPR	Poliglicerol polirrinoleato
Q_D	Vazão da fase dispersa
Q_C	Vazão da fase contínua
R	Razão entre vazões
U	Velocidades
v_D	Velocidade da fase dispersa
v_C	Velocidade da fase contínua
w_D	Largura dos canais da fase dispersa
w_C	Largura dos canais da fase contínua
μ	Viscosidade
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular

SUMÁRIO

<i>Capítulo 1 - Introdução Geral</i>	16
1 Introdução	13
2 Objetivos	14
3 Organização da tese em capítulos	15
Referências	16
<i>Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica</i>	18
1 Lipases microbianas	18
2 Tecnologias de imobilização celular	19
3 Alginato como matriz de imobilização	21
4 Microfluídica como estratégia de imobilização e cultivo de células	23
4.1 Microfluídica de gotas	23
4.2 Microbiorreatores	28
Referências	29
<i>Capítulo 3 – Produção de micropartículas por microfluídica</i>	33
1 Introdução	33
2 Metodologia	34
2.1 Microfabricação de sistemas microfluídicos	34
2.2 Configuração de sistemas microfluídicos de gotas	35
2.3 Processo de formação de gotas em microcanais microfluídicos	36
2.3.1 Efeito da fase contínua na geração de gotas	36
2.4 Processo de gelificação de micropartículas de alginato em microcanais	37
2.4.1 Método de gelificação externa do alginato	37
2.4.2 Gelificação interna	38
2.4.3 Processo de separação das micropartículas de alginato	39
2.5 Análise de diâmetro de gotas e micropartículas de alginato	40
3 Resultados e Discussão	40
3.1 Avaliação da formação de gotas em microcanais microfluídicos	40
3.1.1 Efeito da fase contínua na formação de gotas	40
3.1.2 Influência das geometrias e vazões para o regime de formação de gotas	43
3.2 Avaliação da emulsão e separação de fases	48
3.3 Avaliação do método de gelificação das micropartículas de alginato	49
3.3.1 Comparação de micropartículas por gelificação externa e interna usando microfluídica ..	50
4 Conclusão	52
Referências	53
<i>Capítulo 4 – Imobilização celular em micropartículas de alginato por microfluídica</i>	55
1 Introdução	55
2 Metodologia	56
2.1 Estabilidade física e eficiência de imobilização celular em micropartículas de alginato	56
2.1.1 Estabilidade de micropartículas de alginato em sistema “bulk”	56
2.1.2 Imobilização de <i>Bacillus subtilis</i> em micropartículas de alginato por microfluídica	57
2.1.3 Viabilidade celular após o processo de imobilização por microfluídica	58
2.2 Microbiorreator para investigação de células microimobilizadas	58
2.2.1 Microfabricação de sistema de microbiorreator	58
2.2.2 Operação do sistema de microbiorreator	59
2.2.3 Monitoramento do crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> imobilizado em micropartículas de alginato	59

2.3	Cultivo de <i>B. subtilis</i> imobilizado em micropartículas de alginato	60
2.3.1	Cultivo de células livres e imobilizadas em micropartículas de alginato	60
2.4	Cinética de crescimento microbiano.....	60
2.5	Determinação da atividade da enzima lipase	61
2.6	Avaliação estatística	61
3	Resultados e Discussão	61
3.1	Investigação da estabilidade física das micropartículas de alginato	61
3.2	Avaliação do método de imobilização celular via processo microfluídico	64
3.2.1	Eficiência de imobilização em micropartículas de alginato.....	64
3.2.2	Efeito do processo de imobilização e gelificação sob a viabilidade celular	66
3.3	Investigação do comportamento celular usando microbioreator.....	67
3.3.1	Operação do sistema microbioreator para cultivo de células em batelada e contínuo	67
3.4	Análise de viabilidade e comportamento celular no interior de micropartículas de alginato	70
3.5	Cultivo em batelada de células imobilizadas em micropartículas de alginato	72
3.5.1	Produção de lipase por células livres e imobilizadas	74
4	Conclusão	76
	Referências	78
	<i>Capítulo 5 – Produção de lipase por Bacillus subtilis livre e imobilizado em alginato pelas técnicas de gotejamento e microfluídica de gotas.....</i>	<i>79</i>
1	Introdução.....	79
2	Metodologia	80
2.1	Configuração e microfabricação de sistema duplo de microfluídica de gotas.....	80
2.2	Geração de gotas em sistema duplicado	81
2.3	Técnicas de imobilização de <i>B.subtilis</i> em partículas de alginato.....	82
2.3.1	Imobilização de células microbianas em micropartículas de alginato em plataforma microfluídica dupla.....	82
2.3.2	Técnica convencional de imobilização por gotejamento.....	82
2.4	Cultivo em batelada de células imobilizadas	83
2.4.1	Análise da cinética de crescimento microbiano e produção de lipase	84
2.4.2	Avaliação estatística	84
3	Resultados e Discussão	84
3.1	Sistema duplo de microfluídica para geração de gotas	84
3.1.1	Análise comparativa de formação de gotas por sistema simples e duplicado	85
3.2	Produção de micropartículas de alginato para imobilização de células microbianas	87
3.3	Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> nas formas livre e imobilizada	89
3.4	Produção de lipase por células livres e imobilizadas.....	90
4	Conclusão	94
	Referências	95
	Conclusões Gerais	97
	Sugestões para trabalhos futuros.....	99
	Produções Científicas.....	100
	Referências Gerais	104
	Anexos	1068

Capítulo 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

As inovações tecnológicas que visam empregar métodos para tornar os processos mais produtivos poderão contribuir em diversas aplicações biotecnológicas e industriais. Na biotecnologia industrial, as técnicas de imobilização de biocatalisadores são estratégias que podem levar ao aumento de produção de metabólitos e enzimas, tais como as lipases microbianas, que tem um alto interesse comercial (PARK; CHANG, 2000; ZHU, 2007). O aperfeiçoamento destas tecnologias, bem como o uso de ferramentas que permitam investigar o comportamento de células imobilizadas, pode elevar a eficiência de processos biotecnológicos. Neste contexto, a tecnologia microfluídica surge como uma alternativa que pode aprimorar tais processos aplicados à biotecnologia.

A microfluídica é uma ciência que se originou da necessidade de otimizar os métodos analíticos. Os sistemas em microcanais foram criados por Manz et al. (1990), sendo empregados volumes na ordem de microlitros (10^{-6} a 10^{-18} L) que levam ao escoamento de fluidos em regime laminar e processos de transferência de massa e calor mais eficientes quando comparados às escalas macrométricas (WHITESIDES, 2006). A miniaturização de sistemas analíticos deu espaço a outras formas de investigações em microambientes, que resultaram em diferentes configurações de microcanais capazes de gerar gradientes de concentração (KIM et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016a), formar gotas (NAJAH et al., 2014) e até oferecer condições favoráveis para o crescimento celular em microbiorreatores (BRÁS et al., 2017; SCHÄPPER et al., 2010).

A versatilidade destes sistemas e a possibilidade de otimização de métodos aliados às investigações em escala micrométrica, tem apontado a microfluídica como uma tecnologia para potencializar as pesquisas em bioprocessos (OLIVEIRA et al., 2016b). Nesta área, a microfluídica pode ser usada como uma alternativa aos métodos convencionais de imobilização de biocatalisadores e ainda, dar suporte aos estudos de comportamento celular em condições similares ao microambiente celular.

A tecnologia microfluídica que se aplica à imobilização de agentes biológicos é a microfluídica de gotas, por meio de processos de emulsificação. Este sistema permite produzir micropartículas monodispersas, inclusive em escala amplificada, e com a possibilidade de controlar o tamanho da partícula, que nem sempre são obtidos facilmente pelos métodos convencionais (HOLTZE, 2013; KINTSES et al., 2010). O comportamento biológico nestas condições pode ser feito em microbiorreatores, usando sistemas microfluídicos que oferecem as mesmas condições de um biorreator convencional (SCHÄPPER et al., 2009). As análises em tempo real e a simulação de operações de macroescala dão respaldo a otimização de bioprocessos com maior eficácia *in vitro* do que as técnicas tradicionais (BALAGADDÉ et al., 2005; ZHANG et al., 2006).

Estas tecnologias microfluídicas são aplicadas em diversas áreas de pesquisas, apesar disso o uso destas ferramentas em bioprocessos ainda é pouco reportado na literatura. A imobilização de células e a investigação de comportamento celular por microfluídica de gotas e microbiorreatores são desafios que poderiam resultar em aumento de produtividade de bioprodutos de alto interesse industrial. Diante disso, tais tecnologias microfluídicas podem trazer grandes avanços para a biotecnologia, em especial às pesquisas envolvendo a produção de enzimas, como as lipases bacterianas, que possuem ampla aplicação industrial.

2 OBJETIVOS

Este projeto de pesquisa teve como objetivo empregar a microfluídica como ferramenta para imobilizar células bacterianas e investigar as respostas celulares em microbiorreator. A tecnologia microfluídica foi utilizada para imobilização de *Bacillus subtilis* em micropartículas de alginato, sendo as células submetidas em cultivo em batelada para produção de lipase. A produtividade neste sistema foi comparada com cultivo por células livres e imobilizadas por método convencional.

Para atingir tal objetivo, as seguintes etapas foram realizadas:

- Desenvolver sistema microfluídico de gotas para formação de micropartículas de alginato: avaliar os processos de geração de gotas, os métodos de gelificação do alginato e o efeito da geometria dos microcanais na formação das micropartículas de alginato.

- Imobilizar células bacterianas em micropartículas de alginato: investigar a eficiência e viabilidade do efeito de imobilização celular usando o sistema microfluídico de gotas e a estabilidade destas micropartículas em condições de temperatura e agitação.
- Investigar o comportamento celular no interior das micropartículas de alginato em sistema de microbiorreator: projetar um sistema de microbiorreator que permita monitorar, ao longo do tempo, o comportamento das células de *B. subtilis* imobilizadas em micropartículas de alginato.
- Avaliar a potencialidade do cultivo submerso de células imobilizadas em micropartículas de alginato: monitorar o crescimento celular em sistema agitado e a produção de lipase por *B. subtilis* nas formas livres e imobilizadas, usando um sistema com pequeno volume.
- Estabelecer estratégias microfluídicas de gotas para aumentar a produção de micropartículas de alginato: com base no sistema microfluídico de gotas desenvolvido, explorar estratégias de geometrias de microcanais para aumentar a produção de micropartículas de alginato.
- Cultivar *B. subtilis* nas formas livre e imobilizada para produção de lipase: avaliar os parâmetros cinéticos das células imobilizadas em micropartículas de alginato, bem como as atividades enzimática e específica, e comparar a produtividade com as formas de cultivo de células livres e imobilizadas por método convencional.

3 ORGANIZAÇÃO DA TESE EM CAPÍTULOS

Os resultados das etapas de pesquisa desta tese de doutorado estão organizados em capítulos, a fim de apresentar didaticamente a constituição deste trabalho.

O capítulo 2 apresentará os fundamentos teóricos e revisão da literatura envolvendo os temas, os quais foram base para esta pesquisa, tal como a importância da imobilização de células microbianas como um modo alternativo para aumento de produtividade, tendo como inovação o emprego das ferramentas de microfluídica de gotas e microbiorreatores.

O capítulo 3 mostrará os processos de produção de micropartículas de alginato usando três geometrias de microfluídica de gotas, bem como o uso de diferentes soluções para fases contínuas e dispersas na gelificação de alginato em microcanais.

O capítulo 4 apresentará a estabilidade física e a eficiência de imobilização celular nas micropartículas de alginato, por microfluídica de gotas, permitindo a aplicação destas em cultivo em batelada. O comportamento celular foi primeiramente observado ao longo do tempo usando um microbiorreator e então, avaliadas as respostas de crescimento celular e produção de lipase pelas células de *Bacillus subtilis* em sistema agitado num volume de microlitros.

Diante da potencialidade de aplicação em maior escala, no capítulo 5 será apresentada uma estratégia de configuração de microcanais para aumentar a produção de micropartículas de alginato por microfluídica de gotas visando empregar o cultivo em maior volume. Assim, permitindo a comparação de produtividade de lipase por *Bacillus subtilis* entre as formas de cultivo livre, imobilizada por método convencional e por microfluídica, as quais foram cultivadas em batelada.

Por fim, serão relatadas as conclusões gerais desta pesquisa bem como as sugestões para trabalhos futuros usando a imobilização de células por microfluídica de gotas, o microbiorreator para investigação de respostas celulares e aplicação de lipase por cultivo de células imobilizadas.

REFERÊNCIAS

- BALAGADDÉ, F. K. et al. Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 137–40, 1 jul. 2005.
- BRÁS, E. J. S. et al. A microfluidic platform for physical entrapment of yeast cells with continuous production of invertase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 334–341, 2017.
- HOLTZE, C. Large-scale droplet production in microfluidic devices—an industrial perspective. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 46, n. 11, p. 114008, 20 mar. 2013.

- KIM, M. et al. Rapid and accurate generation of various concentration gradients using polydimethylsiloxane-sealed hydrogel device. **Microfluid**, v. 16, n. 4, p. 645–654, 2014.
- KINTSES, B. et al. Microfluidic droplets: new integrated workflows for biological experiments. **Current opinion in chemical biology**, v. 14, n. 5, p. 548–55, out. 2010.
- MANZ, A. et al. Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology. **Sensor and Actuators**, v. 1, n. 1, p. 249–255, 1990.
- NAJAH, M. et al. Droplet-Based Microfluidics Platform for Ultra-High-Throughput Bioprospecting of Cellulolytic Microorganisms. **Chemistry & Biology resource**, v. 21, p. 1722–1732, 2014.
- OLIVEIRA, A. F. et al. Cultivation of yeast in diffusion-based microfluidic device. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, n. 2016, p. 288–295, 2016a.
- OLIVEIRA, A. F. et al. Microfluidic tools toward industrial biotechnology. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 6, p. 1372–1389, 2016b.
- PARK, J. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 4, p. 303–19, jul. 2000.
- SCHÄPPER, D. et al. Application of microbioreactors in fermentation process development: a review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 395, n. 3, p. 679–95, out. 2009.
- SCHÄPPER, D. et al. Development of a single-use microbioreactor for cultivation of microorganisms. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, n. 3, p. 891–898, jun. 2010.
- WHITESIDES, G. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. July, 2006.
- ZHANG, Z. et al. Microchemostat-microbial continuous culture in a polymer-based, instrumented microbioreactor. **Lab on a chip**, v. 6, n. 7, p. 906–13, jul. 2006.
- ZHU, Y. Chapter 14 . Immobilized Cell Fermentation for Production of Chemicals and Fuels. In: YANG, S.-T. (Ed.). . **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2007. p. 373–396.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 LIPASES MICROBIANAS

A biotecnologia industrial aliada às inovações tecnológicas resulta em estratégias que levam a obtenção de biomoléculas com elevado rendimento e alta produtividade. Produtos de interesse comercial vêm sendo obtidos a partir bioprocessos com células microbianas, tais como as enzimas, que, devido à sua eficiência como catalisadores, apresentam aplicações em indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos (CHOI; HAN; KIM, 2015; ZHU, 2007). Diante disso, diferentes abordagens científicas têm sido exploradas para estimular a produção de enzimas por vias biotecnológicas a fim de tornar o processo economicamente viável.

A eficiência de um processo industrial usando enzimas depende de fatores como estabilidade térmica, eficiência catalítica e especificidade. No entanto, a obtenção de enzimas com estas propriedades tem dificultado a aplicação em atividades industriais (CHOI; HAN; KIM, 2015; ELLEUCHE et al., 2014). Dentre as enzimas produzidas por rota biotecnológica, as lipases em geral apresentam tais características, sendo assim compatíveis com os processos industriais de tecnologias de alimentos, de indústria química e farmacêutica (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; JAEGER; EGGERT, 2002).

As lipases (triacilglicerol acilhidrolase, EC 3.1.1.3) são hidrolases que atuam em condições aquosas para gerar a conversão catalítica de triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). O potencial biotecnológico das lipases microbianas se deve ao fato de serem estáveis em solventes orgânicos, não necessitarem de co-fatores e possuírem uma ampla especificidade do substrato (JAEGER; REETZ, 1998). Estas enzimas são produzidas por fungos e principalmente por bactérias, em que são geradas lipases extracelulares, o que facilita no processo de recuperação. Os principais gêneros de bactérias produtoras de lipases são *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Bacillus*, sendo que este último se destaca pela produção de lipases com alta estabilidade térmica, uma característica importante para as aplicações industriais já que a maioria das reações ocorre acima de 45 °C (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; JAEGER; EGGERT, 2002).

Além da estabilidade térmica, as lipases produzidas por *Bacillus sp* apresentam como vantagem uma rápida resposta de produção, sendo obtidas durante todo o crescimento bacteriano com maior produtividade no final da fase exponencial (GUPTA *et al.*, 2004; SHARMA, CHISTI, BANERJEE, 2001). O método de produção destas lipases é preferencialmente por fermentação submersa. No trabalho de Sharma *et al.* (2002) a produção em fermentação submersa e a estabilidade de lipase alcalina por *Bacillus subtilis* foi avaliada em temperaturas de 50 a 85 °C. Já no trabalho de Ahmed *et al.* (2010), este tipo de lipase também obtida por *Bacillus subtilis* foi produzida a 37 °C em frascos agitados, tendo uma estabilidade de até 50 °C.

Diante do interesse industrial em lipases termicamente estáveis, estudos têm sido dirigidos para aumentar a produtividade desta enzima por via biotecnológica. Para os processos conduzidos com *Bacillus subtilis*, as investigações são principalmente por meio da determinação de condições ótimas de cultivo, tais como variação de pH, temperatura (LINDSAY *et al.*, 2000) e demanda de oxigênio (SONG *et al.*, 2013). A otimização da produção de enzimas de lipases poderia também ser avaliada usando técnicas de imobilização de *Bacillus subtilis*, uma vez que já foram realizados estudos nesta área para a produção de protease (ADINARAYANA; JYOTHI; ELLAIAH, 2005; ANWAR *et al.*, 2009) e α -amilase (KONSOULA; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2006) com alta produtividade enzimática. Tal estratégia de imobilização poderia levar ao aumento de produtividade de lipases por *Bacillus subtilis* em cultivo submerso.

2 TECNOLOGIAS DE IMOBILIZAÇÃO CELULAR

As tecnologias de imobilização de células microbianas e/ou enzimas têm contribuído para o aumento de produtividade em processos biotecnológicos. Os métodos de imobilização consistem na retenção de agentes biológicos de forma química ou física a um suporte sólido, ficando protegidos do meio reacional (CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996; PARK; CHANG, 2000). Desta forma, a produtividade está relacionada à proteção celular contra efeitos de cisalhamento e preservação das atividades catalíticas, gerando assim uma maior concentração celular no biorreator (ZHU, 2007).

O emprego de células imobilizadas em processos biotecnológicos tem se mostrado vantajoso frente ao uso de células livres. Tal fato se deve à facilidade de separação dos produtos e/ou células e pela possibilidade de conduzir os processos em regime contínuos, sem que ocorra o arraste de células (WESTMAN *et al.*, 2012). Para empregar as técnicas de imobilização, as características dos biocatalisadores devem ser consideradas afim de garantir a eficiência do processo de imobilização. As células que tem a capacidade de aderir em superfícies sólidas ou de se auto agregarem são imobilizadas por fixação, enquanto que as células que não possuem a mesma propriedade de aderência são imobilizadas em matrizes poliméricas ou membranas na forma de cápsulas ou partículas porosas (Figura 2.1) (CASSIDY *et al.*, 1996; WOODWARD, 1988).

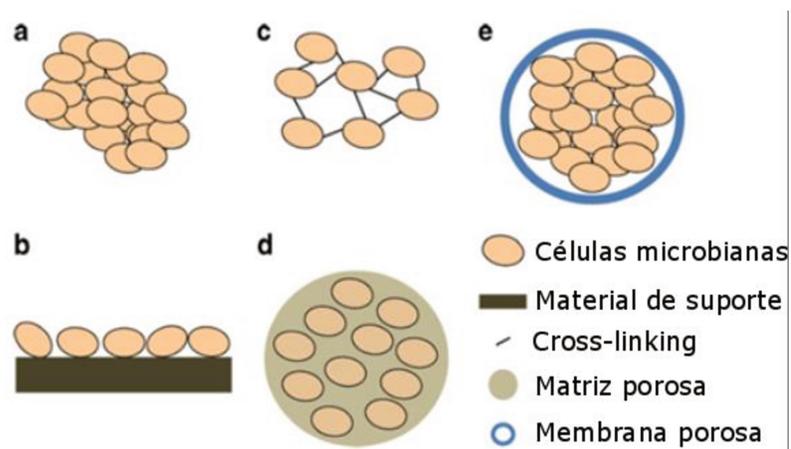


Figura 2.1: Técnicas de imobilização de células microbianas: por fixação a) floculação, b) adsorção em suporte sólido, c) *cross-linking* de células e, imobilização: d) em matriz porosa, e) em membrana. Adaptado de Westman *et al.* (2012).

Entre estas tecnologias apresentadas, a imobilização em matrizes poliméricas apresenta como vantagem uma maior estabilidade mecânica e de carregamento de células no interior das partículas (PARK; CHANG, 2000). Além disso, há uma diversidade em materiais poliméricos biocompatíveis que permite tanto a proteção quanto o crescimento de células animais e microbianas devido à porosidade das partículas. Para os processos conduzidos com micro-organismos imobilizados, os polímeros mais usados são carragena, alumina, quitosana, poliacrilamida, agarose e o alginato. O alginato é amplamente utilizado devido ao processo de imobilização que pode ser realizado a pH neutro e em temperatura ambiente (PARK e CHANG, 2000).

3 ALGINATO COMO MATRIZ DE IMOBILIZAÇÃO

O alginato é um polissacarídeo aniônico naturalmente encontrado em algas marrons (*Phaeophyceae*) e pode ser produzido também por bactérias do gênero *Azotobacter* e *Pseudomonas* (REHM, 2009). Estruturalmente, trata-se de um copolímero linear composto pelos monômeros de ácido β -D-manurônico (bloco - M) e ácido α -L-gulurônico (bloco - G), os quais são unidos por ligações glicosídicas entre os carbonos 1,4 (Figura 2.2A). As proporções de blocos MM, GG ou MG interferem nas propriedades físicas do polímero por ter uma relação direta com o processo de reticulação do alginato (SMIDSROD, 1974; YOUTSUYANAGI *et al.*, 1991).

A reticulação do alginato, que leva à formação de um hidrogel, depende da quantidade de blocos G onde ocorre a ligação de um cátion divalente, como Ca^{+2} , ao grupo carboxílico presente na estrutura química do alginato (DONATI; PAOLETTI, 2009; MØRCH *et al.*, 2006) (Figura 2.2A). Neste tipo de interação é formado um gel termoestável com propriedades mecânicas que irão depender também das concentrações de alginato e agente reticulante, bem como do processo e o tempo reticulação. A gelificação pode ser realizada pelo método externo, em que é usado um íon ativo para fazer a reticulação de alginato (Figura 2.2B), ou por gelificação interna, que um íon na sua forma inativa é liberado por meio de redução de pH ou por troca iônica (Figura 2.2C). Embora possam apresentar propriedades mecânicas diferentes, ambos são amplamente empregados para imobilização de células microbianas.

Pelo processo de gelificação externa, o hidrogel de alginato é formado quase que instantaneamente devido à presença de cátions livres, os quais se difundem imediatamente na camada externa até atingir o interior da gota, resultando em partículas de alginato (DONATI e PAOLETTI, 2009). Neste método, as partículas são produzidas principalmente pela técnica convencional de gotejamento, em que uma solução contendo o polímero juntamente com as células a serem imobilizadas é gotejada num reservatório contendo a solução reticulante, como por exemplo, o CaCl_2 (Figura 2.2B). As partículas produzidas por este método tendem a apresentar esfericidade e tamanhos variáveis com diâmetro na ordem de milímetros a micrômetros. Estas variações se devem a diferentes fatores envolvidos no gotejamento, tais como o diâmetro do bico ejetor, altura entre o bico e a solução de cloreto de cálcio, concentração de íons de cálcio e viscosidade do alginato.

Já na formação de partículas de alginato por gelificação interna, a solução de alginato é misturada com a solução contendo os cátions divalentes na sua forma inativa (CaCO_3 , Ca-EDTA, citrato de cálcio). Assim, a reticulação é proveniente da dissociação destes sais que são liberados de forma controlada através da redução de pH ou por troca iônica, resultando em um gel de reticulação mais homogêneo (PONCELET et al., 1995). Para a formação de partículas de alginato por gelificação interna, um dos métodos empregados é a emulsificação em que são obtidas partículas mais esféricas, porém com uma alta polidispersidade (Figura 2.2C) (PONCELET et al., 1995; REIS et al., 2006).

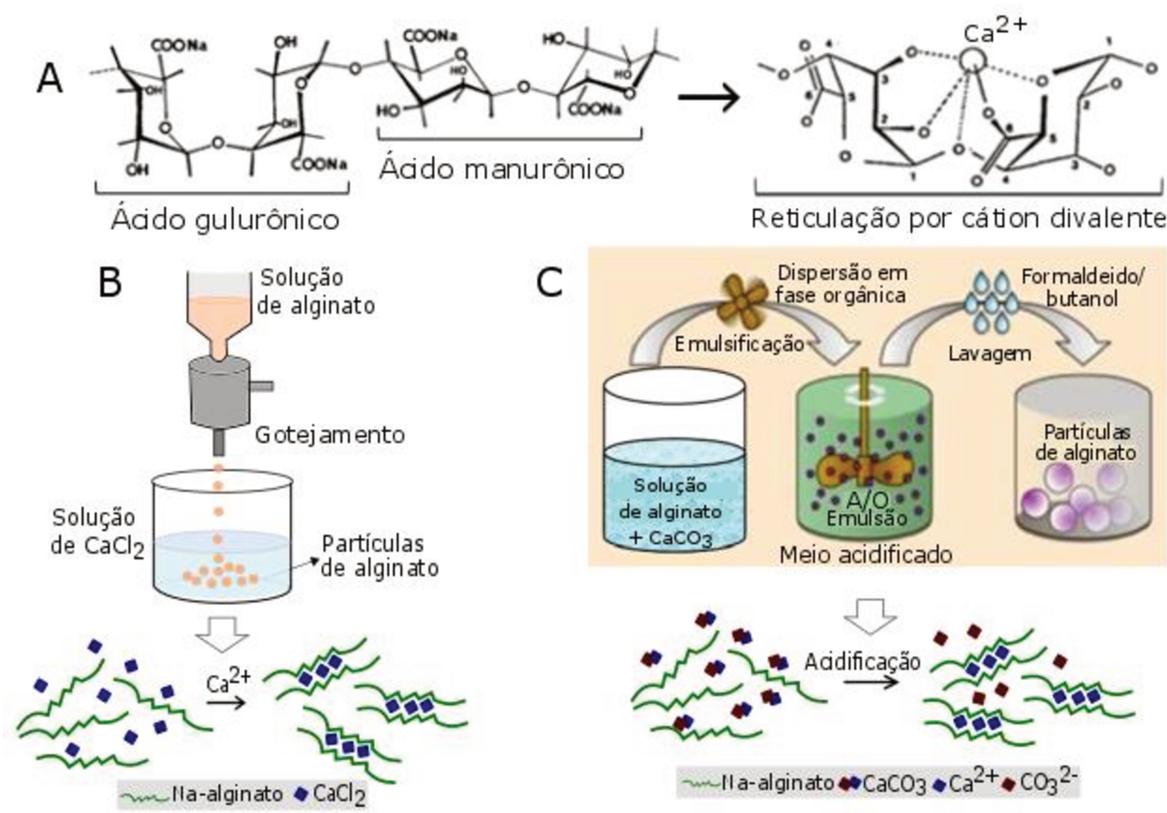


Figura 2.2: Processos de formação de partículas de alginato: A) estrutura química e uma ligação de cátion divalente ao ácido gulurônico – bloco G; B) método de gelificação externa por gotejamento e reticulação instantânea do alginato pelos íons de cálcio na forma livre; C) método de gelificação interna por emulsificação e o processo de acidificação para liberação dos íons na forma inativa para reticular o alginato – imagem adaptada de Manjanna *et al.* (2010).

Diante da formação de partículas polidispersas pelos métodos convencionais, o desenvolvimento de técnicas que inovem o processo de produção de partículas que garantam propriedades tais como tamanho e esfericidade uniformes se faz necessário para área de imobilização de biocatalisadores (RATHORE *et al.*, 2013).

Assim, a microfluídica pode ser empregada como tecnologia alternativa e promissora, uma vez que permite a imobilização de células microbianas em partículas micrométricas e monodispersas, bem como a avaliação do desempenho celular em sistema microfluídico do tipo microbiorreator.

4 MICROFLUÍDICA COMO ESTRATÉGIA DE IMOBILIZAÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS

A tecnologia de microfluídica é composta por estruturas micrométricas por onde escoam pequenos volumes (10^{-6} a 10^{-18} L) de amostras e reagentes que estão em regime laminar. Desta forma, os sistemas preveem uma redução de custo com reagentes e garante um ambiente com maior controle de processos (MARRE & JENSEN, 2010; WEIBEL & WHITESIDE, 2006).

A microfluídica é uma ferramenta altamente versátil e aplicável em diferentes áreas, tornando esta tecnologia atraente para o campo científico e industrial. A possibilidade de avaliar uma reação em escala micrométrica, simular microambiente celular e até mesmo permitir a transposição de dados para escala laboratorial, tem ampliado as perspectivas de estudos biológicos nestes sistemas, inclusive para estudos em bioprocessos. Sendo assim, a microfluídica tem contribuído para pesquisas biológicas que envolvam comportamento celular, reações bioquímicas e produtividade que podem ser investigadas por diferentes técnicas de sistemas microfluídicos, como a microfluídica de gotas e microbiorreatores.

4.1 Microfluídica de gotas

Dentre os tipos de sistemas microfluídicos, a microfluídica de gotas tem se mostrado como uma importante estratégia no desenvolvimento de pesquisas científicas, inclusive com apelo industrial. Este tipo de sistema microfluídico promove a compartimentalização de reagentes usando a fase contínua, como a oleosa, para encapsular pequenos volumes de reagentes aquosos em gotículas micrométricas e monodispersas (GUO *et al.*, 2012). Desta forma, são considerados sistemas altamente promissores para o campo analítico, de processos químicos, biológicos e biotecnológicos (KINTSES *et al.*, 2010).

Por estas razões, a microfluídica de gotas tem sido amplamente empregada como tecnologia de imobilização de diversos agentes biológicos. Diversos estudos têm direcionado esta técnica para imobilização de proteínas (HUEBNER *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2005), enzimas (KRENKOVÁ; FORET, 2004), células animais (CLAUSELL-TORMOS *et al.*, 2008) e micro-organismos (MAZZITELLI *et al.*, 2011). Além disso, a microfluídica permite encapsular uma única célula por gota e ampliar as formas de investigações, bem como os metabólitos que são produzidos pelas células (EUN *et al.*, 2011; KÖSTER *et al.*, 2008) e a viabilidade celular (TAN; TAKEUCHI, 2007).

Esta diversidade de materiais biológicos que podem ser imobilizados usando a microfluídica de gotas resultou na criação de diferentes geometrias de microcanais para geração de gotas. Tal fato se deve às propriedades destes agentes biológicos, em que a sua viabilidade celular pode ser afetada conforme o tipo de geração de gotas nos microcanais. As gotas podem ser formadas por estiramento (*jetting*), capilar ou corte transversal nos microcanais (TEH *et al.*, 2008). As características da matriz de imobilização também influenciam no processo de imobilização nos microcanais e, posteriormente, na manutenção do material biológico. Por isso, diversas configurações de microfluídica de gotas têm sido investigadas com o intuito de se aperfeiçoar o processo.

Na aplicação desta tecnologia de imobilização para células animais e microbianas, as principais geometrias de microcanais são por focalização de fluxo, com corte por estiramento (*jetting*), e por fluxo cruzado em T, em que a gota é quebrada num corte na transversal (Figura 2.3 A;B). Em termos de matrizes, podem ser empregados os biopolímeros, como o alginato que tem se mostrado uma excelente opção devido à sua biocompatibilidade e também pelas diferentes formas de gelificação que podem ser empregadas nos microcanais. Diante disso, estratégias de configuração e técnicas de gelificação de alginato em microcanais tem sido explorada a fim de gerar micropartículas uniformes e eficientes para imobilização celular.

As técnicas de gelificação de alginato em microfluídica de gotas, tanto no método externo quanto interno, são baseados no processo de emulsificação. Nos estudos em microcanais, a gelificação externa usando o reticulante juntamente com o alginato numa mesma gota é o processo menos favorável, uma vez que a rápida reticulação do gel pode obstruir os canais e impedir a formação de micropartículas durante o processamento. Apesar disso, alguns trabalhos mostraram que é possível

utilizar este método de gelificação usando estratégias que limitam a difusão do reticulante. Para isso adotaram configurações de sistemas com uma corrente central aquosa ou posterior gelificação, conforme apresentado nos estudos de CHOI *et al.* (2007) e por MADRIGAL *et al.* (2016) (Figura 2.3 C;D). Outra forma de induzir a gelificação externa em microfluídica é a formação de gotas contendo apenas a solução de alginato e a reticulação ser feita posteriormente, após o processamento microfluídico, com a coleta das gotas em um reservatório que já contenha a solução do agente gelificante, assim como apresentado no trabalho de CHEN *et al.* (2013) (Figura 2.3 E).

Com relação à produção de micropartículas de alginato usando a gelificação interna, a liberação dos íons complexados gera um processo de reticulação mais lento, sem afetar a geração de gotas nos microcanais. No trabalho de Tan & Takeuchi (2007) foi estudada a formação de micropartículas de alginato por gelificação interna numa configuração de junção T. Neste estudo, foram usadas nanopartículas de carbonato de cálcio (CaCO_3), sendo a liberação dos íons de Ca^{2+} feita por redução de pH. A gelificação interna também pode ser feita sem mudanças de pH, a qual pode afetar a viabilidade celular (Figura 2.3 F). Nos trabalhos de Hâti *et al.* (2016) e Bassett *et al.* (2016) foi utilizado um sistema de focalização de fluxo para produção de gotas e a gelificação interna ocorreu devido à troca iônica entre cátions complexados com quelantes, tais como EDTA e EDDA. Desta forma, a reticulação é feita de uma forma lenta e gradual conforme ocorre a troca iônica e conseqüentemente são formadas micropartículas monodispersas (Figura 2.3 G).

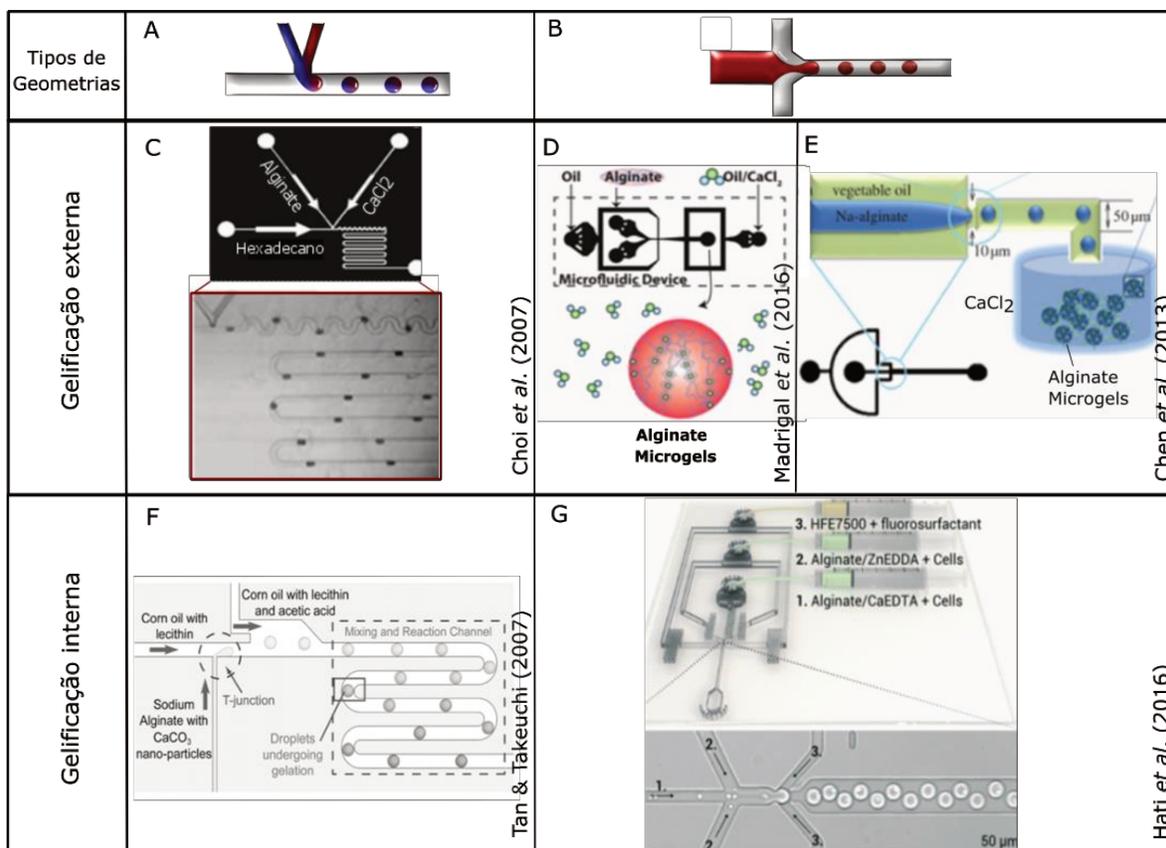


Figura 2.3: *Principais geometrias de microcanais para geração de gotas:* A) focalização de fluxo; B) fluxo cruzado com junção em T. *Estratégias por gelificação externa:* C) gelificação externa misturando as soluções de alginato e CaCl_2 diretamente numa mesma gota; D) adição de uma segunda corrente contínua contendo solução de CaCl_2 para gelificação após a formação das gotas de alginato; E) formação de gotas de alginato em microcanais e posterior gotejamento em solução contendo CaCl_2 . *Estratégias por gelificação interna:* F) liberação de íons de cálcio por redução de pH para reticulação do alginato; G) gelificação lenta por troca iônica de cátions quelados com EDTA e EDDA. Imagens adaptadas dos respectivos autores destes trabalhos.

As diferentes possibilidades de estratégias para gelificação de alginato para imobilização de células em micropartículas de alginato faz da microfluídica de gotas uma tecnologia potencial que pode contribuir para os estudos de processos biotecnológicos. A razão disso se deve também à produção de micropartículas monodispersas, de formato esférico e com a possibilidade de controlar o tamanho da partícula, que nem sempre são facilmente obtidos pelos métodos convencionais (GUO et al., 2012; KINTSES et al., 2010). E, por se tratarem de partículas micrométricas, apresentam uma elevada área superficial por volume que facilita os processos de transferência de massa e calor devido ao menor caminho difusional, se comparada às partículas macrométricas (GUO et al., 2012; KINTSES et al., 2010; TEH et al., 2008). As características destas micropartículas poderiam ser empregadas em cultivos de

células microbianas, numa nova estratégia para elevar a produtividade de bioprocessos. No entanto, a baixa produtividade na produção das micropartículas nos sistemas microfluídicos ainda é limitante para uma aplicação industrial.

Diante desta problemática, diversas pesquisas exploram por formas de aumentar a produtividade em sistemas microfluídicos por meio da construção de plataforma com múltiplos módulos geradores de gotas em configuração paralelizada ou por empilhamento de canais (HOLTZE, 2013; SUN *et al.*, 2010). Estas plataformas são capazes de gerar um processo contínuo de produção de gotas e/ou micropartículas, porém trata-se de um desafio tecnológico, uma vez a distribuição dos canais tem fundamental importância na criação destas plataformas microfluídicas (Figura 2.4) (ROMANOWSKY; ABATE; WEITZ, 2013).

No trabalho de Tendulkar *et al.* (2006) a produção de micropartículas de alginato para imobilização de células e proteínas foi obtida por um sistema microfluídico em 3D com aumento de escala de produção. Enquanto um sistema de geometrias em paralelo foi demonstrado por Nisisako; Torii (2008) e também por Romanowsky *et al.* (2013), mostrando que é possível empregar a microfluídica de gotas para produção em massa de partículas monodispersas (Figura 2.4 A). Estas plataformas podem ser empregadas numa estratégia de empilhamento levando a uma alta produtividade de partículas, como estudado por Han *et al.* (2017), viabilizando essa tecnologia em aplicações industriais (Figura 2.4 B).

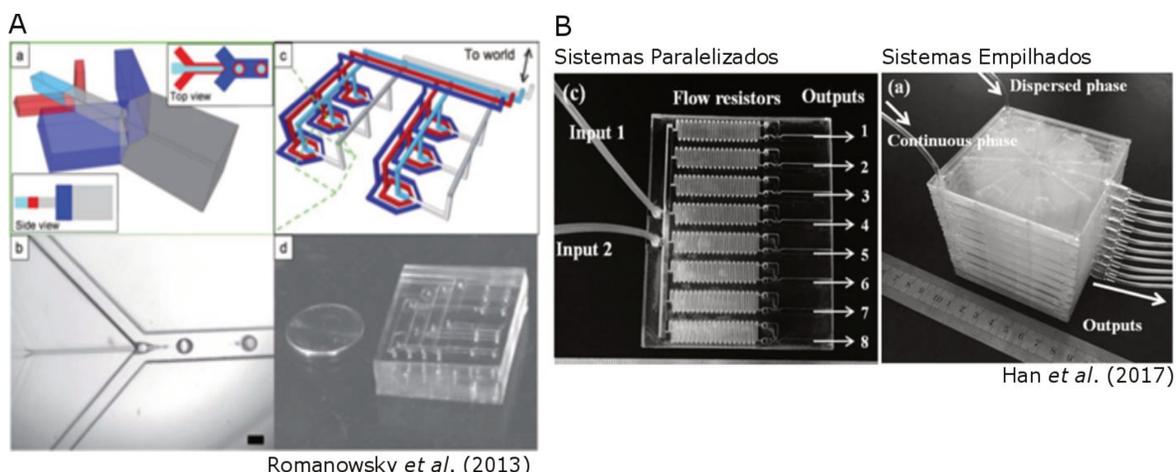


Figura 2.4: Sistema microfluídico de gotas amplificados por: A) paralelização usando geometria de focalização com canais em Y e, B) paralelização de sistemas e empilhamento de módulos contendo canais de focalização de fluxo. Adaptadas dos respectivos autores destes trabalhos.

Desta forma, embora haja poucos trabalhos direcionando a aplicação destas micropartículas em bioprocessos, a microfluídica de gotas pode ser uma tecnologia alternativa para imobilização de biocatalisadores. Desta forma, estudos visando avaliar o efeito da imobilização de biocatalisadores e seu impacto na produtividade de bioprodutos, torna-se uma oportunidade de avaliação de condições que permitam a elevação da produtividade nos bioprocessos.

4.2 *Microbiorreatores*

Os sistemas microfluídicos podem ainda ser combinados com outras tecnologias microfluídicas, permitindo além da imobilização, a incubação e investigação de respostas de células em microambientes. Os sistemas microfluídicos responsáveis por oferecer condições favoráveis para o crescimento celular são microbiorreatores, que podem ter as mesmas características de um biorreator convencional (EDLICH *et al.*, 2010). E, devido ao seu tamanho micrométrico, é possível realizar análises em tempo real e avaliar o comportamento biológico e a cinética das reações a partir de sensores integrados (ZHANG *et al.*, 2006), possibilitando a otimização de processos com maior eficácia *in vitro* comparada às técnicas tradicionais (TIAN; FINEHOUT, 2008).

A versatilidade dos sistemas microbiorreatores permite avaliar tanto o cultivo de células livres quanto imobilizadas. Assim, a configuração e a complexidade destes sistemas irão depender do foco de cada pesquisa e das condições em que as células se encontram, se livres ou imobilizadas. O estudo feito por Balagaddé *et al.* (2005) mostra que é possível monitorar o crescimento e comportamento de células livres, como de *Escherichia coli*, por longo período de tempo. Da mesma forma, Schäpper *et al.* (2010) apresentou um microbiorreator circular composto por sensores de pH, temperatura e oxigênio que permitiu determinar as condições ótimas de cultivo de leveduras na sua forma livre. Enquanto que para o cultivo com células imobilizadas, Abeille *et al.* (2014) projetou um sistema de perfusão, mostrando que a estratégia de imobilização facilita o processo de manipulação de recuperação do material imobilizado (Figura 2.5).

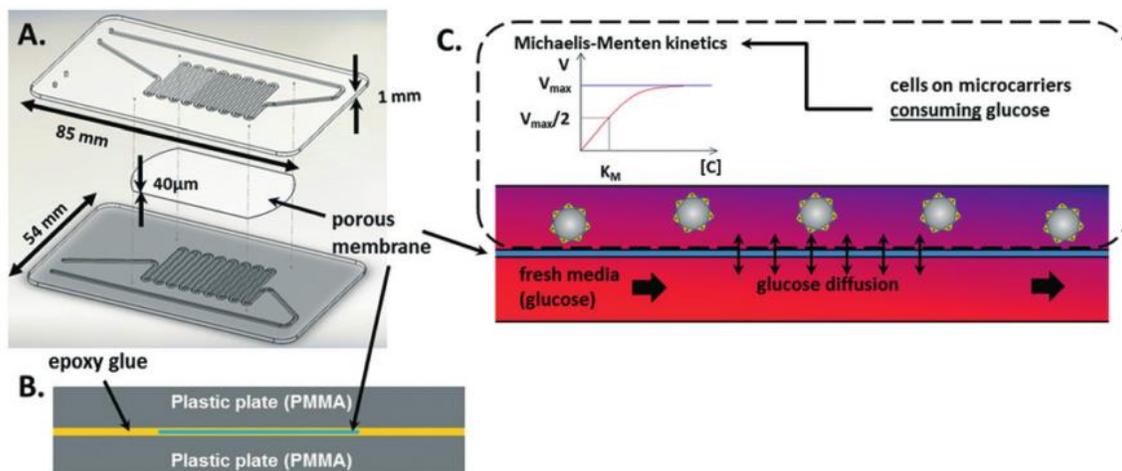


Figura 2.5: Microbiorreator para cultivo de células imobilizadas em modo de perfusão que permite determinar a cinética enzimática: a) construção do microbiorreator contendo duas bases e uma membrana porosa entre os canais; b) forma em que a membrana é colada entre as bases; c) princípio de operação do microbiorreator, mantendo as células imobilizadas separadas da corrente do meio de cultura. Adaptado de Abeille *et al.* (2014).

Os sistemas de microbiorreatores podem ser configurados também para cultivar células imobilizadas usando a microfluídica de gotas, que gera gotas ou partículas micrométricas. Tais microbiorreatores podem ser construídos com sistemas de aprisionamento, em que gotas e micropartículas ficam fixadas numa determinada região do microbiorreator, tornando possível acessar as células no interior das gotas. Através deste tipo de microbiorreator as condições de crescimento e produção de metabólitos podem ser monitoradas ao longo do tempo, tal como observado por Huebner *et al.* (2009) em cultivo com células de *E. coli* em gotículas aquosas. Enquanto que o trabalho de Köster *et al.* (2008) mostra que é possível investigar também os mecanismos de respostas à viabilidade de células animais na sua forma imobilizada.

Diante disso, os sistemas de microbiorreatores para cultivo com células imobilizadas podem auxiliar no entendimento de mecanismos celulares no interior de ambientes de confinamento, tal como em micropartículas. Além disso, podem indicar a viabilidade de empregar o cultivo de células imobilizadas em sistemas de maior escala.

REFERÊNCIAS

- ABEILLE, F. et al. Continuous microcarrier-based cell culture in a benchtop microfluidic bioreactor. *Lab on a Chip*, v. 14, n. 18, p. 3510, 2014.
- ADINARAYANA, K.; JYOTHI, B.; ELLAIAH, P. Production of alkaline protease with immobilized

- cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 3, p. E391–E397, jan. 2005.
- AHMED, E. H.; RAGHAVENDRA, T.; MADAMWAR, D. A thermostable alkaline lipase from a local isolate *Bacillus subtilis* EH 37: characterization, partial purification, and application in organic synthesis. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, n. 7, p. 2102–13, abr. 2010.
- ANWAR, A. et al. Calcium Alginate : A Support Material for Immobilization of Proteases from Newly Isolated Strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. **World Applied Sciences Journal**, v. 7, n. 10, p. 1281–1286, 2009.
- BALAGADDÉ, F. K. et al. Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 137–40, 1 jul. 2005.
- BASSETT, D. C. et al. Competitive ligand exchange of crosslinking ions for ionotropic hydrogel formation. **J. Mater. Chem. B**, v. 4, n. 37, p. 6175–6182, 2016.
- CASSIDY, M. B.; LEE, H.; TREVORS, J. . Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. **Journal of Industrial Microbiology**, n. 16, p. 79–101, 1996.
- CHEN, W. et al. Microfluidic one-step synthesis of alginate microspheres immobilized with antibodies. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 10, n. 88, p. 20130566, 2013.
- CHOI, C.-H. et al. Generation of monodisperse alginate microbeads and in situ encapsulation of cell in microfluidic device. **Biomedical microdevices**, v. 9, n. 6, p. 855–62, dez. 2007.
- CHOI, J.; HAN, S.; KIM, H. Industrial applications of enzyme biocatalysis : Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, 2015.
- CLAUSELL-TORMOS, J. et al. Droplet-Based Microfluidic Platforms for the Encapsulation and Screening of Mammalian Cells and Multicellular Organisms. **Chemistry and Biology**, v. 15, n. 5, p. 427–437, 2008.
- DONATI, I.; PAOLETTI, S. Material properties of alginate. In: REHM, B. H. A. (Ed.). . **Alginates : Biology and Applications**. Munster, Germany: Springer US, 2009. p. 1–54.
- EDLICH, A. et al. Microfluidic reactor for continuous cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology progress**, v. 26, n. 5, p. 1259–70, 2010.
- ELLEUCHE, S. et al. Extremozymes — biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. **Current opinion in biotechnology**, v. 29, p. 116–123, 2014.
- EUN, Y. et al. Encapsulating Bacteria in Agarose Microparticles Using. **ACS Chemical Biology**, v. 6, n. 3, p. 260–266, 2011.
- GUO, M. T. et al. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. **Lab on a chip**, v. 12, n. 12, p. 2146–55, 21 jun. 2012.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763–81, jun. 2004.
- HAN, T. et al. Factory-on-chip : Modularised microfluidic reactors for continuous mass production of functional materials. **Chemical Engineering Journal**, v. 326, p. 765–773, 2017.
- HÂTI, A. G. et al. Versatile, cell and chip friendly method to gel alginate in microfluidic devices. **Lab on a chip**, v. 16, n. 19, p. 3718–3727, 2016.
- HOLTZE, C. Large-scale droplet production in microfluidic devices—an industrial perspective. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 46, n. 11, p. 114008, 20 mar. 2013.

- HUEBNER, A. et al. Quantitative detection of protein expression in single cells using droplet microfluidics. **Chemical communications**, v. 2, n. 12, p. 1218–20, 28 mar. 2007.
- HUEBNER, A. et al. Static microdroplet arrays: a microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays. **Lab Chip**, v. 9, n. 5, p. 692–698, 2009.
- JAEGER, K.-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390–397, ago. 2002.
- JAEGER, K.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, 1998.
- JIANG, X. et al. A general method for patterning gradients of biomolecules on surfaces using microfluidic networks. **Analytical chemistry**, v. 77, n. 8, p. 2338–47, 15 abr. 2005.
- KINTSES, B. et al. Microfluidic droplets: new integrated workflows for biological experiments. **Current opinion in chemical biology**, v. 14, n. 5, p. 548–55, out. 2010.
- KONSOULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules α -amylase from *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 343–349, fev. 2006.
- KÖSTER, S. et al. Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells. **Lab on a chip**, v. 8, n. 7, p. 1110–5, jul. 2008.
- KRENKOVÁ, J.; FORET, F. Immobilized microfluidic enzymatic reactors. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21–22, p. 3550–63, nov. 2004.
- LINDSAY, D. et al. Physiology of dairy-associated *Bacillus* spp. over a wide pH range. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, n. 1–2, p. 49–62, mar. 2000.
- MADRIGAL, J. L. et al. Microfluidic generation of alginate microgels for the controlled delivery of lentivectors. **J. Mater. Chem. B**, v. 4, n. 43, p. 6989–6999, 2016.
- MANJANNA, K. M.; SHIVAKUMAR, B.; KUMAR, T. M. Microencapsulation: An Acclaimed Novel Drug-Delivery System for NSAIDs in Arthritis. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 27, n. 6, p. 509–545, 2010.
- MARRE, S.; JENSEN, K. F. Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 3, p. 1183, 2010.
- MAZZITELLI, S. et al. Encapsulation of eukaryotic cells in alginate microparticles: cell signaling by TNF- α through capsular structure of cystic fibrosis cells. **Journal of cell communication and signaling**, v. 5, n. 2, p. 157–65, jun. 2011.
- MØRCH, Y. A. et al. Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on alginate microbeads. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 5, p. 1471–1480, 2006.
- NISISAKO, T.; TORII, T. Microfluidic large-scale integration on a chip for mass production of monodisperse droplets and particles. **Lab on a chip**, v. 8, n. 2, p. 287–93, fev. 2008.
- PARK, J. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 4, p. 303–19, jul. 2000.
- PONCELET, D. et al. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. II. Physicochemistry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 644–650, 1995.
- RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 369–381, 2013.
- REIS, C. P. et al. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n.

- 3, p. 245–257, 2006.
- ROMANOWSKY, M.; ABATE, A. R.; WEITZ, D. A. **Scale-up of flow-focusing microfluidic devices**, 2013.
- SCHÄPPER, D. et al. Development of a single-use microbioreactor for cultivation of microorganisms. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, n. 3, p. 891–898, jun. 2010.
- SHARMA, R. et al. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 1075–1084, maio 2002.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, C. U. and applications of lipases. **Biotechnology advances**, v. 19, n. 1, p. 627–662, 2001.
- SMIDSRÖD, O. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. **Faraday Discussions of the Chemical Society**, v. 57, p. 263, 1974.
- SOMMER, G. J. et al. Introduction to Microfluidics. In: TIAN, W.-C.; FINEHOUT, E. (Eds.). . **Microfluidics for Biological Applications**. New York: Springer Science & Business Media, 2009. p. 1–29.
- SONG, P. et al. Two-stage oxygen supply strategy for enhanced lipase production by *Bacillus subtilis* based on metabolic flux analysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 71, p. 1–10, fev. 2013.
- SUN, B. J. et al. Microfluidic melt emulsification for encapsulation and release of actives. **ACS applied materials & interfaces**, v. 2, n. 12, p. 3411–6, dez. 2010.
- TAN, W.-H.; TAKEUCHI, S. Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation. **Advanced Materials**, v. 19, n. 18, p. 2696–2701, 17 set. 2007.
- TEH, S.-Y. et al. Droplet microfluidics. **Lab on a chip**, v. 8, n. 2, p. 198–220, fev. 2008.
- TENDULKAR, S. et al. A three-dimensional microfluidic approach to scaling up microencapsulation of cells. **Biomedical microdevices**, v. 14, p. 461–469, 2012.
- WEIBEL, D. B.; WHITESIDES, G. M. Applications of microfluidics in chemical biology. **Current opinion in chemical biology**, v. 10, n. 6, p. 584–591, 2006.
- WESTMAN, J. O. et al. Effects of encapsulation of microorganisms on product formation during microbial fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1441–1454, 2012.
- WOODWARD, J. Methods of immobilization of microbial cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 8, p. 91–102, 1988.
- YOUTSUYANAGI, T. et al. Acid-induced and calcium-induced gelation of alginate bead for swelling. **chemical pharmaceutical**, v. 4, n. 39, p. 1072–1074, 1991.
- ZHANG, Z. et al. Microchemostat-microbial continuous culture in a polymer-based, instrumented microbioreactor. **Lab on a chip**, v. 6, n. 7, p. 906–13, jul. 2006.
- ZHU, Y. Chapter 14 . Immobilized Cell Fermentation for Production of Chemicals and Fuels. In: YANG, S.-T. (Ed.). . **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2007. p. 373–396.

Capítulo 3

PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POR MICROFLUÍDICA DE GOTAS

1 INTRODUÇÃO

A microfluídica é uma ferramenta versátil e uma de suas características é a capacidade de gerar gotas em microcanais, tendo como base o processo de emulsão (GUO et al., 2012). A geração de gotas em tamanhos micrométricos e monodispersas tem tornado tal processo interessante para aplicações de síntese de micropartículas e imobilização de diversos agentes biológicos (GUO *et al.*, 2012; TEH *et al.*, 2008). A produção de micropartículas por microfluídica pode contribuir para áreas de aplicações biomédicas, farmacêuticas e biotecnológicas.

Apesar de se tratar de um processo aplicável em diversas áreas, compreender as forças envolvidas, as vazões e a configuração dos microcanais que induzem a quebra das gotas são importantes para se obter um sistema estável. A relação de forças viscosas e tensão interfacial com as geometrias dos microcanais e as vazões dos fluidos, podem levar a diferentes condições de formação de gotas na microfluídica (BAROUD; GALLAIRE; DANGLA, 2010; WEHKING et al., 2014). Ainda, as propriedades físico-químicas das soluções também influenciam na geração de gotas.

Além dos mecanismos de geração de gotas, para estudos de imobilização celular em matrizes de alginato usando microfluídica deve-se considerar também o processo de reticulação (UTECH et al., 2015). A geração de micropartículas de alginato homogêneas em microfluídica pode ser influenciada pela cinética de gelificação (BASSETT et al., 2016; HATI et al., 2016), a qual pode se dar de forma instantânea ou lenta, dependendo se o cátion está na forma ativa ou inativa (DONATI; PAOLETTI, 2009). Este processo leva ao aumento de viscosidade das soluções, que pode afetar a formação de gotas nos microcanais. Por isso, a importância de se investigar a geração de micropartículas quando é utilizada uma tecnologia de microfluídica (BASSETT et al., 2016).

Assim, o objetivo desta etapa do trabalho foi investigar a geração de gotas por microfluídica visando à produção de micropartículas de alginato. Para isso, exploramos (i) a geração de gotas em microcanais em função de diferentes geometrias

de microcanais e composição de fase contínua, bem como (ii) a influência do método de gelificação de alginato na geração de micropartículas. O emprego da técnica de microfluídica pode levar a uma aplicação potencial para imobilização em micropartículas de alginato trazendo avanços para investigações em biotecnologia.

2 METODOLOGIA

2.1 Microfabricação de sistemas microfluídicos

Os sistemas microfluídicos foram construídos em vidro e poli dimetilsiloxano (PDMS) usando a técnica de litografia macia (DUFFY; MCDONALD, 1998). Para a fabricação dos sistemas microfluídicos, primeiramente foi construído um molde negativo contendo as estruturas dos microcanais em alto relevo. Para o molde negativo foi usado um fotorresiste SU-8 3050 (MicroChem Corp, EUA), o qual foi espalhado sobre uma lâmina de silício (University Wafers, EUA) usando um *spinner*. O fotorresiste na lâmina de silício foi curado e sobre ele, foi colocada uma máscara de fotolito contendo os desenhos dos microcanais, sendo expostos em luz UV (250 mJ cm^{-2} , 365 nm) para marcação dos canais no fotorresiste. Após uma nova cura, os microcanais foram revelados no molde negativo usando um revelador Baker BTS 220 (JT Baker, EUA).

Tendo obtido o molde negativo, a transferência da estrutura dos microcanais em baixo relevo no PDMS foi formada usando o kit de elastômero de silicone Sylgard® 184 (Dow Corning, EUA). A mistura de PDMS foi vertida sobre o molde negativo, degaseificado e então submetido a um processo de cura (6h a 65°C). Depois disso, o PDMS curado foi removido do molde negativo e as entradas foram feitas usando um *punch* (instrumento manual de biópsia) com 1,2 mm de diâmetro (UniCore, EUA).

Após a higienização, as bases de vidro e PDMS foram tratados com plasma de oxigênio (10 s a 25 W) (PlasmaPrep 2; GaLa Instrumente GmbH) e os microcanais foram selados de forma irreversível entre o vidro e o PDMS.

Após a selagem dos dispositivos, os microcanais microfluídicos foram previamente tratados com Aquapel (Pittsburgh Glass Works, EUA) para tornar a superfície mais hidrofóbica e aumentar a molhabilidade da fase oleosa.

2.2 Configuração de sistemas microfluídicos de gotas

Os sistemas microfluídicos para geração de gotas foram projetados em dois tipos de geometrias: em focalização de fluxo e por fluxo cruzado numa configuração de junção em T (Figura 3.1). A estrutura do sistema de focalização de fluxo foi composta por canais simples (Figura 3.1 A), enquanto que a geometria com junção em T foi estudada numa versão de canais simples com serpentina (Figura 3.1 B) e com canais estruturados com filtros e resistores de fluidos (Figura 3.1 C).

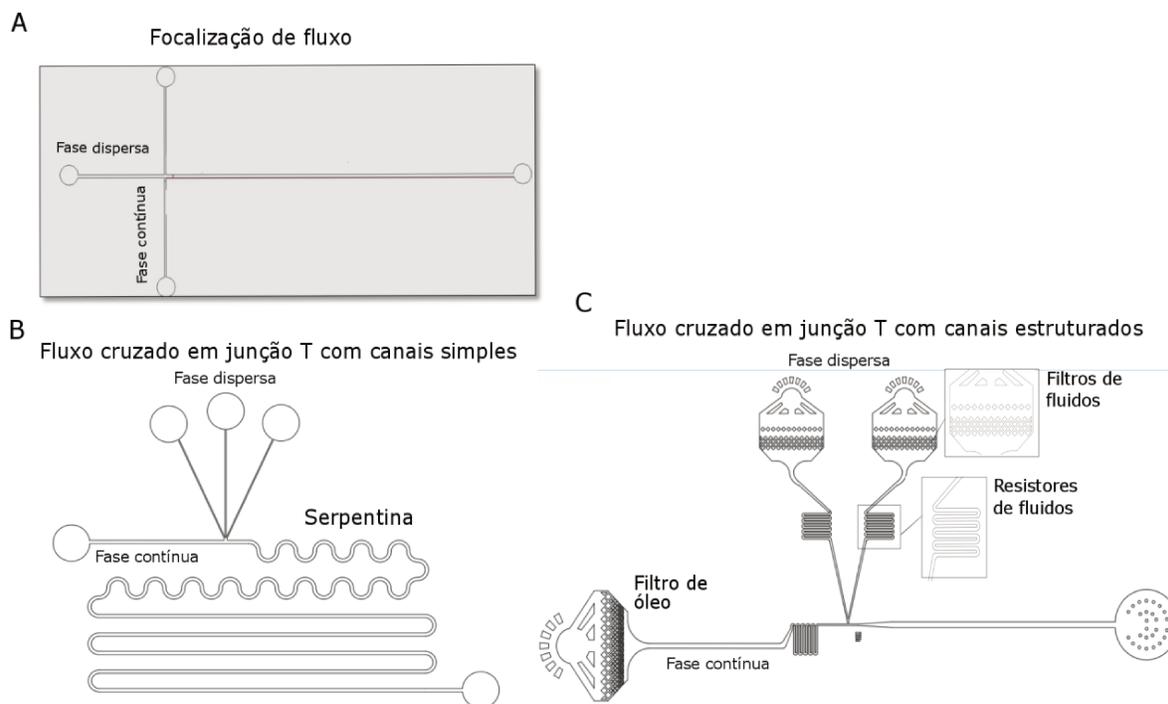


Figura 3.1: Configuração dos sistemas microfluídicos para formação de gotas: A) sistema por focalização de fluxo com canais simples, B) geometria de fluxo cruzado em junção em T de canais simples tendo uma serpentina como misturador e, C) sistema de fluxo cruzado em junção T com canais estruturados com filtros nas entradas e resistores de fluidos antes da quebra das gotas nos canais para estabilização do fluxo de soluções.

Os dispositivos microfluídicos apresentados foram construídos em base de vidro e os microcanais em PDMS usando a técnica de litografia macia. Tanto para as configurações com canais simples como estruturados, os microcanais foram produzidos com uma profundidade de 50 μm . Porém, por apresentarem formas de quebras de gotas diferentes em função da própria configuração, os microcanais foram projetados com larguras diferentes entre eles a fim de facilitar a formação das gotas.

O sistema microfluídico com geometria de focalização de fluxo foi formado com uma entrada central para a fase dispersa (com largura de 150 μm) e duas entradas

laterais para a fase contínua (75 μm), tendo assim um formato de cruz (Figura 3.1 A). Já a primeira configuração do sistema em junção T composta por três entradas para a fase dispersa (50 μm) e uma entrada na perpendicular para fase contínua, promovendo o corte da gota na transversal (largura de 150 μm ao longo de toda a estrutura). Esta geometria foi ainda composta por um sistema de microcanais em serpentina com objetivo de misturar as soluções presentes dentro da gota (Figura 3.1 B). Para o modelo de sistema junção T com canais estruturados foi projetado um modelo com uma entrada para a fase contínua e apenas duas para fase dispersa (Figura 3.1 C). Tal geometria foi composta por microestruturas desenhadas para filtrar as soluções e por canais em forma de resistores fluídicos para estabilizar o fluxo dentro dos microcanais. Nesta configuração, os canais de fase contínua tiveram uma largura de 30 μm até a quebra de gotas e depois um aumento gradual da largura para 120 μm a fim de gerar gotas arredondadas dentro dos microcanais. Os canais utilizados para alimentar a fase dispersa foram construídos com uma largura de 30 μm até a junção T e, então estreitado para 20 μm para facilitar a formação das gotas.

2.3 Processo de formação de gotas em microcanais microfluídicos

2.3.1 Efeito da fase contínua na geração de gotas

O efeito da quebra e o formato das gotas em microcanais foram avaliados em função do tipo de óleo empregado na fase contínua usando os sistemas em junção T com canais simples e estruturados (Figura 3.1 B;C). Neste estudo, foi investigado o uso de óleo de milho com poliglicerol polirricinoleato, PGPR (GRINDSTED®, Danisco, Brasil) a 4% (m/m) e óleo fluorocarbonado, HFE 7500 (3M, EUA) com 1% (v/v) de 008-fluorosurfactante (Ran Biotechnologies, EUA) como fase contínua. O emprego do óleo fluorocarbonado para formação de gotas em microcanais foi baseado nos estudos do grupo *Experimental Soft Condensed Matter Group, Harvard, EUA* (HOLTZE et al., 2008; MAZUTIS et al., 2013).

Para investigar o processo de formação de gotas usando estes dois tipos de óleos, foi usado como fase dispersa apenas água ultra-pura. A capacidade da fase contínua em romper a fase dispersa em gotas foi avaliada em função do tipo de geometria e da razão (R) entre as taxas de fluxo das fases dispersa (Q_D) e contínua (Q_C). Para isso foram exploradas faixas de vazões entre 0,4 e 1,5 $\mu\text{L min}^{-1}$ para Q_D e

entre 1 e 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ para Q_c . A formação das gotas foi observada usando um microscópio invertido (Nikon TU9, EUA) associado a uma câmera rápida HiSpec 5 (Fastec, EUA).

O regime de formação de gotas nestas condições foi explorado também quanto ao número de Capilar (Ca), que indica competição entre as forças viscosas (dado pelas propriedades de velocidade U e viscosidade μ da fase contínua) e tensão interfacial entre as fases contínua e dispersa (γ), onde:

$$Ca = \frac{U \mu}{\gamma}. \quad \text{Equação 3.1}$$

As propriedades reológicas das soluções das fases dispersa e contínua foram determinadas no Laboratório de Engenharia de Processos (FEA-Unicamp). A viscosidade (μ) foi determinada a 25 °C usando reômetro modular compacto Physica MCR301 (Anton Paar, Áustria) e a medida de tensão interfacial (γ) foi realizada em um tensiômetro de gota pendente Traker-S (Teclis, França). A densidade foi medida usando um picnômetro, a uma temperatura de 25 °C, tendo a água como referencial.

2.4 Processo de gelificação de micropartículas de alginato em microcanais

A formação de micropartículas de alginato por microfluídica foi investigada pelos métodos de gelificação externa e interna, uma vez que a cinética de gelificação pode influenciar na formação de gotas em sistemas microfluídicos e, conseqüentemente, na estrutura de micropartículas de alginato (UTECH et al., 2015).

2.4.1 Método de gelificação externa do alginato

O processo de gelificação de alginato através do método de gelificação externa foi estudado nos sistemas com geometrias de focalização de fluxo e em junção T (canais simples), sendo usado como fase dispersa soluções de alginato de sódio a 2% (m/v) (Sigma-Aldrich, EUA) (tendo uma viscosidade de $9,90 \pm 0,09$ mPa s e densidade de $1,02$ g cm^{-3}) e solução de cloreto de cálcio a 30 mM, ambos com pH 6,0 (Sigma-Aldrich, EUA).

No dispositivo de focalização de fluxo, as gotas formadas apenas com solução alginato e a emulsão foi gotejada em reservatório contendo solução de cloreto de cálcio 30 mM com e sem agitação feita por Ultra-Turrax® Tube Drive (IKA, Germany), numa rotação de 100 rpm (Figura 3.2 A). Já no sistema em junção T, as

gotas foram formadas por soluções de alginato, água ultra-pura e solução de cloreto de cálcio 30 mM. Neste dispositivo, a emulsão foi formada usando óleo de milho com PGPR 4% (m/m) e com óleo HFE 7500 com fluorosurfactante 1% (v/v) (Figura 3.2 B).

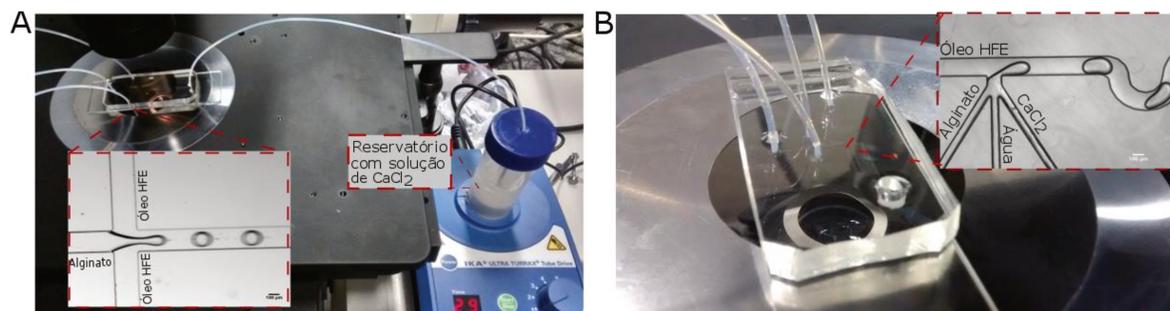


Figura 3.2: Geração de micropartículas de alginato por gelificação externa: A) sistema de focalização de fluxo para formação de gotas de alginato com gelificação em reservatório de CaCl₂, B) geometria de fluxo cruzado com junção em T de canais simples tendo a gelificação feita pela mistura de alginato e solução de CaCl₂ dentro da gota.

2.4.2 Gelificação interna

Os estudos de produção de micropartículas de alginato via gelificação interna foram baseados no método de CLEX do inglês *complex ligand exchange crosslinking ion* (tradução livre: reticulação por troca iônica de complexos ligantes), o qual foi descrito recentemente por Bassett *et al.* (2016) e Hâti *et al.* (2016). Neste método, o processo de gelificação do alginato ocorre pela reação entre soluções de alginato contendo cátions divalentes complexados com os quelantes: ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e ácido etilenodiamina-N, N-diacético (EDDA).

Neste estudo, para a formação de micropartículas de alginato foi usada uma concentração inicial de alginato de sódio a 2% (m/v), sendo dissolvida em tampão de ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico (MOPS) em 40 mM. Para compor a solução que promove a gelificação foram usadas concentrações iniciais de 84 mM de CaCl₂, 84mM de EDTA e 40mM de MOPS (solução 1: Ca-EDTA-MOPS a 84-84-40mM). Enquanto que a solução que induz a troca iônica foi preparada com ZnC₄H₆O₄ (acetato de zinco), EDDA e MOPS (solução 2: Zn-EDDA-MOPS a 84-84-40mM), sendo todas as soluções com o pH ajustado para 6,7 usando KOH 1M. A mistura destas soluções resultou numa concentração final de alginato de 1,2% (m/v) e 30 mM de Ca²⁺.

Para a formação das gotas de alginato nos microcanais foi usado como fase contínua, óleo HFE 7500 com fluorosurfactante a 1% (v/v) (Figura 3.3).

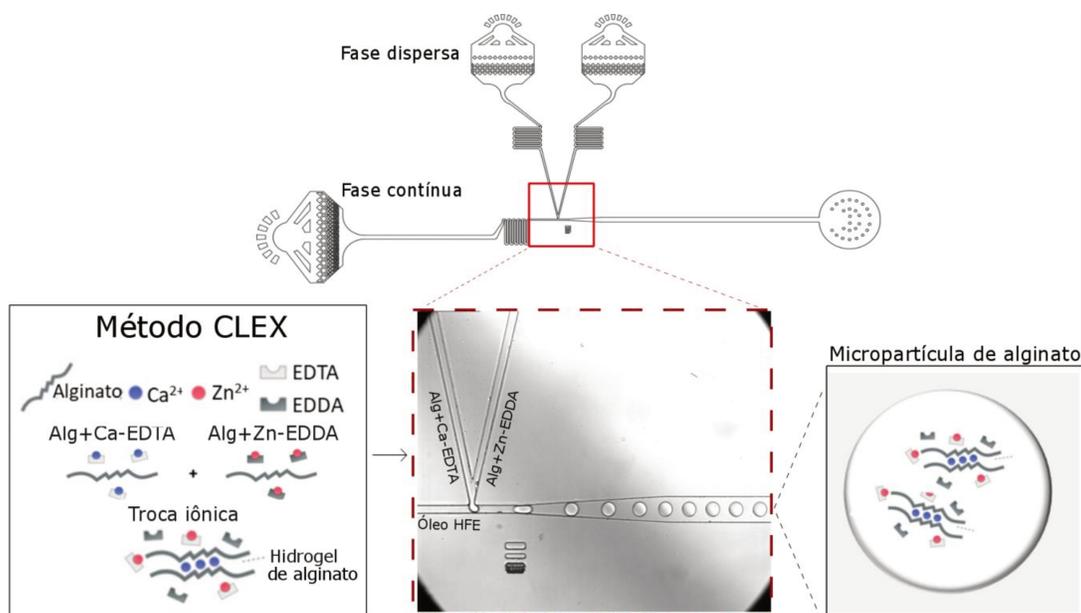


Figura 3.3: Produção de micropartículas de alginato usando gelificação interna pelo método CLEX usando solução de alginato com Ca-EDTA-MOPS e outra composta por alginato e Zn-EDDA-MOPS. Para formar as gotas foi usado óleo HFE 7500 com fluorosurfactante.

2.4.3 Processo de separação das micropartículas de alginato

As micropartículas de alginato produzidas usando óleo HFE 7500 tanto pelo método de gelificação externo quanto interno foram separadas da emulsão usando um demulsificante, perfluorooctanol (PFO) (Alfa Aesar, EUA).

A emulsão formada por óleo HFE e as micropartículas de alginato foram coletadas em tubo *ependorf* e para cada 100 μL de emulsão, 200 μL de água ultra-pura a fim de evitar a agregação das micropartículas entre si. O demulsificante PFO a 20% (v/v) foi adicionado e homogeneizado vagarosamente e, após 10 min em repouso, houve a separação completa da emulsão.

Para recuperar as micropartículas de alginato, esta solução contendo óleo HFE e micropartículas de alginato foi centrifugada a 3000 rpm por 1 min e o *pellet* foi ressuspenso usando solução tampão MOPS (40 mM, pH 6,7). Tal procedimento foi realizado três vezes para remoção do óleo bem como os resíduos gerados na reação de troca iônica pelo método CLEX. Para identificar se houve a gelificação do alginato e o formato das micropartículas, foi utilizado um microscópio confocal usando luz transmitida (Leica TCS SP5, EUA).

2.5 *Análise de diâmetro de gotas e micropartículas de alginato*

O diâmetro das gotas e micropartículas de alginato produzidas pela microfluídica de gotas foi analisado usando o *software* ImageJ (NHI, EUA), com a função *Analyze Particles*. O diâmetro médio das partículas foi analisado usando $N = 250$ e o coeficiente de variação (CV), em porcentagem, foi dado pela razão entre o desvio padrão médio pela média das amostras.

A distribuição de tamanhos das gotas ou micropartículas foi avaliada por meio do coeficiente de variação (CV), em que num valor menor do que 5% são consideradas monodispersas (XU et al., 2005).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 *Avaliação da formação de gotas em microcanais microfluídicos*

3.1.1 Efeito da fase contínua na formação de gotas

Na geração de gotas em microfluídica, o óleo de milho apresenta como vantagens uma compatibilidade com diferentes tensoativos e custo acessível (NISISAKO; OKUSHIMA; TORII, 2005; TAN; TAKEUCHI, 2007). Embora tenha um custo mais elevado do que o óleo de milho, o óleo fluorocarbonado HFE 7500 tem sido amplamente utilizado como fase contínua devido à suas propriedades que são compatíveis com aplicações biológicas, como possibilidade de ocorrer troca gasosa e facilidade de separação da emulsão (AKARTUNA et al., 2015; HOLTZE et al., 2008; ROMANOWSKY; ABATE; WEITZ, 2013).

Na microfluídica, as características do óleo que compõe a fase contínua são relevantes na formação de emulsão, uma vez que podem influenciar na forma e estabilidade das gotas (CHRISTOPHER; ANNA, 2007; TEH et al., 2008). Assim, a geração de gotas em microcanais foi avaliada usando óleo de milho com o tensoativo poliglicerol polirricinoleato (PGPR) a 4% (m/m) e óleo fluorocarbonado (HFE 7500) com fluorosurfactante a 1% (v/v). Estes óleos foram caracterizados quanto às propriedades de densidade, viscosidade e tensão interfacial, considerando a água como fase dispersa de uma emulsão (Figura 3.4).

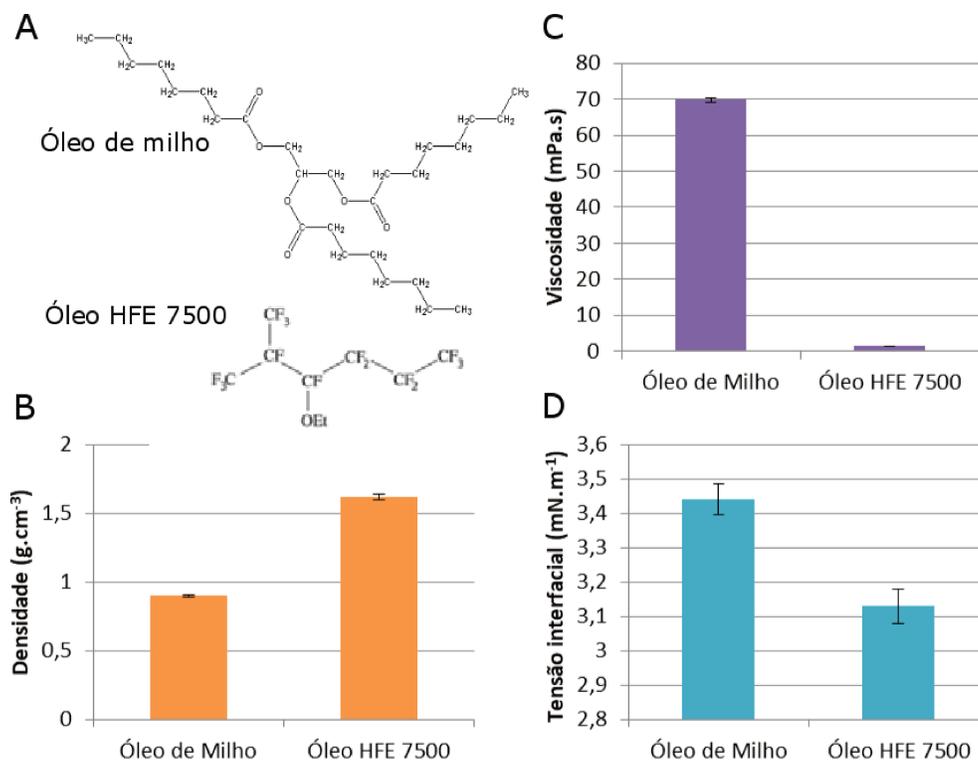


Figura 3.4: Características dos óleos de milho e HFE 7500: A) estrutura química dos óleos de milho e HFE 7500, B) densidade; C) viscosidade; D) tensão interfacial do óleo com a água ultra-pura. As propriedades físico-químicas foram analisadas numa temperatura de 25°C, realizadas em triplicatas.

A Figura 3.4 mostra a diferença entre as propriedades físico-químicas do óleo de milho e HFE (Figura 3.4 A-C) e a relação deles com a fase dispersa (Figura 3.4 D). Neste estudo, notamos que o óleo de milho é menos denso, porém é mais viscoso do que o óleo HFE 7500 (Figura 3.4 B;C). Além disso, o óleo HFE 7500 apresentou ainda uma tensão interfacial inicial foi menor do que o óleo de milho o que pode facilitar no processo de quebra de gotas (Figura 3.4 D).

Entre estas propriedades, a viscosidade e a tensão interfacial possuem um papel importante na quebra de gotas nos microcanais. A viscosidade da fase contínua está relacionada à tensão de cisalhamento que o fluido exerce sobre a fase dispersa. Enquanto que a tensão interfacial atua sob o processo de quebra de gotas nos microcanais, sendo que valores menores tende a facilitar a quebra de gotas. Assim, o efeito da tensão interfacial (γ) e a razão entre as viscosidades da fase dispersa e contínua ($\lambda = \sum \mu_d / \mu_c$) foram avaliadas no processo de geração de gotas, como mostra a Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Propriedades do óleo de milho e HFE como fase contínua no processo de geração de *gotas em microcanais.

Propriedades físico-químicas	Óleo de milho com PGPR	Óleo HFE com fluorosurfactante
Razão entre viscosidades (λ)	0,014	0,66
Tensão interfacial (mN m^{-1})	$3,44 \pm 0,04$	$3,13 \pm 0,05$

*Para a fase dispersa (gotas) foi usado água ultra-pura, tendo uma viscosidade de $\mu_d = 0,819 \text{ mPa s}$.

Como pode ser observado na tabela, o óleo HFE apresentou uma maior razão de viscosidades e uma menor tensão interfacial quando comparado ao óleo de milho. O efeito destas propriedades foi observado no processo de geração de gotas usando a geometria de fluxo cruzado com junção em T de canais simples, empregando o óleo de milho e óleo HFE na fase contínua, conforme apresentado na Figura 3.5.

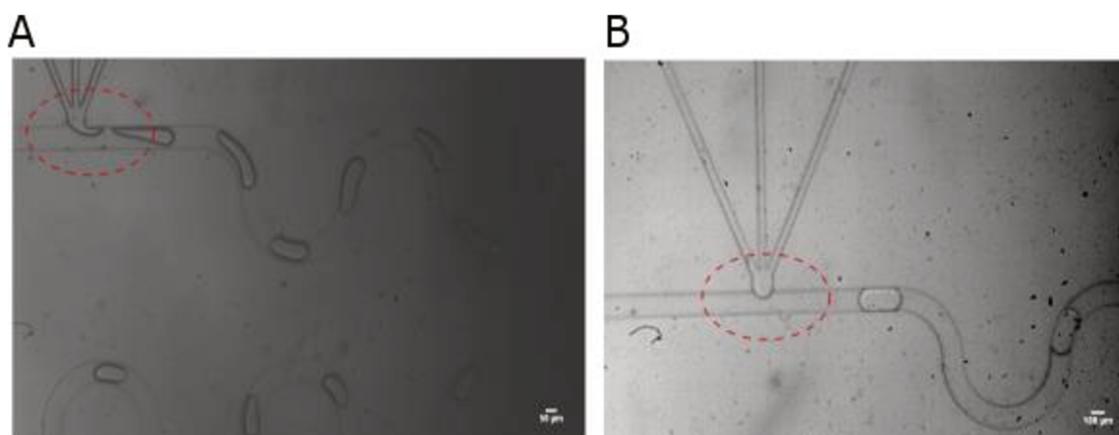


Figura 3.5: Forma de quebra das gotas usando microfluídica em microcanais em junção T com serpentina: A) formato de gotas não uniformes geradas com óleo de milho com PGPR 4% (m/m) como fase contínua e, B) formato das gotas uniformes produzidas com óleo HFE 7500 com fluorosurfactante 1% (v/v) como fase contínua. Nas correntes das fases dispersas foram utilizadas apenas água ultra-pura.

Este estudo mostra a influência que as propriedades físico-químicas dos óleos de milho e HFE exercem sobre a formação de gotas nos microcanais. As gotas no sistema usando óleo de milho com PGPR 4% (m/m) tiveram um formato não uniforme e nota-se que as gotas aderiram a um lado da parede do microcanal (Figura 3.5 A). Por outro lado, as gotas produzidas com o óleo HFE 7500 tem um perfil arredondado e uniforme (Figura 3.5 B).

Na formação de gotas nos microcanais, a viscosidade e a tensão interfacial das soluções da fase dispersa e contínua têm um efeito direto na forma em que estas gotas são geradas. Num sistema em que a viscosidade da fase contínua é muito maior que da fase dispersa, a pressão interna do sistema aumenta e interfere no tamanho das

gotas (NIE et al., 2008; WEHKING et al., 2014). Tal fato pode ser observado no sistema com óleo de milho, em que a alta viscosidade deste óleo ($69,73 \pm 0,70$ mPa s) comparada ao óleo HFE 7500 ($1,35 \pm 0,06$ mPa s), pode ter afetado a pressão interna das gotas, as quais foram compostas por apenas água (0,891 mPa s), sendo necessária uma alta tensão para romper as gotas e assim, formando gotas deformadas.

A tensão interfacial é outro fator relevante no processo de geração de gotas, sendo que a redução da tensão interfacial entre a fase contínua e dispersa pela adição de tensoativos facilita o processo de quebra de gotas nos microcanais e impede a coalescência entre as gotas, garantindo também a estabilidade da emulsão (BARET, 2012; MCCLEMENTS, 2007). Assim, as propriedades de menor viscosidade e tensão interfacial do óleo HFE em relação ao óleo de milho o tornou mais eficiente no processo de geração de gotas em microcanais, uma vez que gerou gotas mais uniformes e num processo estável.

3.1.2 Influência das geometrias e condições de escoamento para o regime de formação de gotas

Na microfluídica, as características da geometria e as vazões usadas nos sistemas microfluídicos também influenciam no processo de geração de gotas. Assim, deve ser considerada a razão entre as larguras de microcanais ($x = \sum w_d/w_c$), sendo w_d a largura do canal da fase dispersa e w_c da fase contínua; a relação de vazões da fase dispersa (Q_d) e contínua (Q_c) ($R = \sum Q_d/Q_c$) e a velocidades dos fluidos ($v = Q/Area$) em que a vazão da fase correspondente (Q) está relacionado à área dos microcanais. Estas propriedades nas geometrias estudadas foram determinadas em função da fase dispersa e contínua, como mostra a Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Características das geometrias dos sistemas de focalização de fluxo e fluxo cruzado em junção T com canais simples e estruturados.

Características das geometrias	Focalização de fluxo	Fluxo cruzado em junção T	
		Canais Simples	Canais Estruturados
Razão de largura dos canais (x)	2	1	0,66
*Razão entre vazões (R)	0,10	0,30	0,20
<u>*Velocidades dos fluidos (m/s)</u>			
Fase dispersa (v_d)	0,0004	0,0004	0,020
Fase contínua (v_c)	0,0151	0,0040	0,094

*Considerando vazões de $Q_c = 4$ e $Q_d = 0,4 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ para todas as geometrias estudadas.

Analisando as relações destas propriedades, nota-se que o tipo de geometria e a largura dos microcanais resultaram em diferentes razões de vazões e velocidades de fluidos para cada sistema. Como as velocidades levam em consideração à largura dos microcanais, esta propriedade pode ter um efeito ainda mais relevante do que a razão entre vazões. Entre as geometrias, a configuração de fluxo cruzado em junção T com canais estruturados apresentou uma menor razão de largura dos canais e por isso teve uma maior velocidade dos fluidos. Esta diferença de velocidades, juntamente com as propriedades dos fluidos como viscosidade e tensão interfacial, pode facilitar a formação de gotas nos microcanais.

As variáveis associadas às propriedades dos fluidos e da geometria dos microcanais apontam como as forças viscosas e interfaciais atuam no corte das gotas. A competição destas forças é determinada pelo número de Capilar (Ca), que indica as condições em que gotas são geradas nos microcanais (BAROUD; GALLAIRE; DANGLA, 2010). A relação entre estas forças indica quatro regimes de formação de gotas: (A) um perfil em que não se observa a formação de gotas; (B) regime de *squeezing*, que são gotas alongadas que ocupam toda a largura do canal; (C) de *dripping* que formam gotas pequenas e esféricas e; (D) jateamento (*jetting*), em que há a formação de um fio alongado que produz gotas maiores e irregulares (BAROUD; GALLAIRE; DANGLA, 2010; DE MENECH et al., 2008). Os perfis dos regimes de formação de gotas, usando diferentes velocidades da fase contínua, estão apresentados na Figura 3.6.

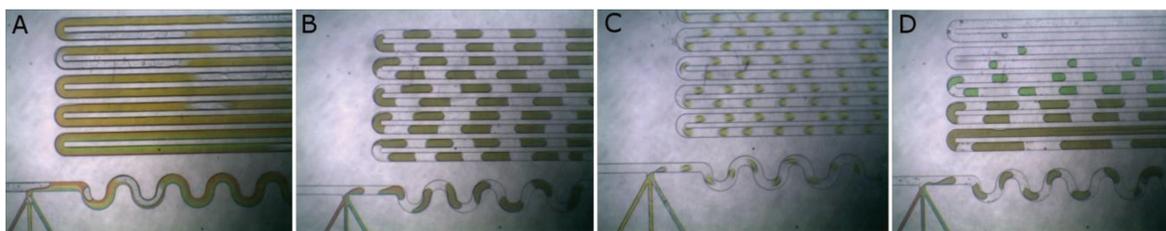


Figura 3.6: Regimes de formação de gotas: A) ausência de formação de gotas; B) *squeezing*; C) *dripping*; D) jateamento (*jetting*).

Com base nestas condições, a dinâmica de geração de gotas foi estudada nas geometrias de focalização de fluxo e por fluxo cruzados com junção T em canais simples e estruturados. Para isso foi usada na fase dispersa, água ultra-pura e como fase contínua, o óleo de milho. O regime de formação de gotas nos três sistemas foi

investigado em função da razão entre vazões e o número de Capilar, como mostrado na Figura 3.7.

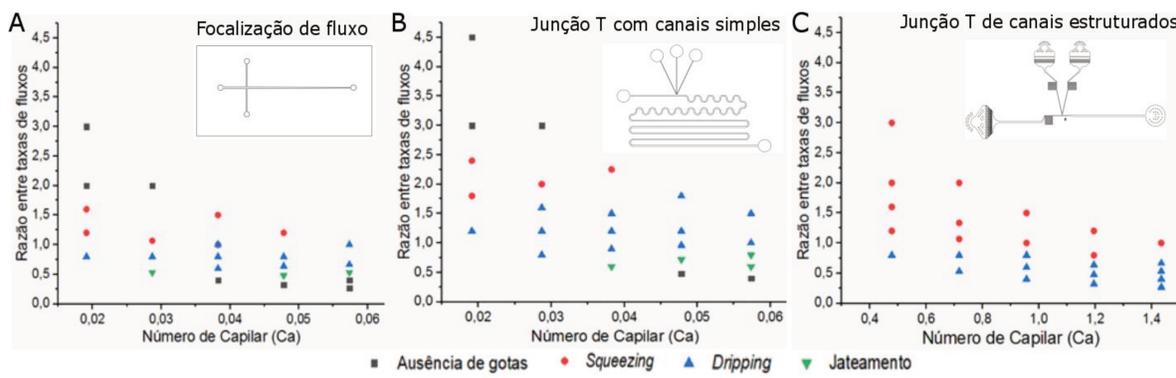


Figura 3.7: Formação de gotas em função da razão de taxas de fluxo ($R = \sum Q_D/Q_C$) e do número de Capilar (Ca) em: a) focalização de fluxo com canais simples em formato de cruz; b) sistema fluxo cruzado com junção em T, formado por canais simples; c) sistema com geometria em junção T com canais estruturados. Na fase contínua foi usado óleo de milho contendo PGPR a 4% (m/m) ($\mu = 69,73$ mPa.s) e na dispersa, água ultra-pura ($\mu = 0,891$ mPa.s).

Na Figura 3.7, nota-se que a formação de gotas se iniciou quando a vazão da fase contínua superou a dispersa $Q_C > Q_D$, sendo geradas gotas de tamanhos maiores e instáveis (*squeezing*). À medida que houve o aumento da vazão da fase contínua, o sistema gerou gotas estáveis (*dripping*) até que se desestabilizou e as gotas foram formadas por jateamento. Além disso, numa condição de $Q_C \gg Q_D$ ou $Q_D \gg Q_C$ não ocorre o processo de quebra de gotas.

As geometrias de focalização de fluxo e de fluxo cruzado em junção T com canais simples apresentaram a mesma região de formação de gotas, tendo um número de Capilar (Ca) entre 0,019 e 0,057. Ao comparar a relação de vazões necessárias para gerar gotas estáveis (*dripping*), nota-se que na geometria de focalização de fluxo as gotas foram formadas numa razão entre 0,6 e 1; enquanto que no sistema de fluxo cruzado esta relação foi de 0,9 a 1,8. Isso mostra que para gerar gotas estáveis no sistema de fluxo cruzado foi necessária uma vazão 1,5 vezes maior do que no sistema de focalização de fluxo.

Este comportamento pode estar relacionado às formas em que a tensão de cisalhamento é aplicada sobre fase dispersa para quebrar as gotas, que é dado pelo tipo de geometria. Na focalização de fluxo, os microcanais são configurados em formato de cruz e as gotas são rompidas por estiramento provocado pela compressão hidrodinâmica das correntes da fase contínua (CHRISTOPHER; ANNA, 2007).

Enquanto que na geometria de fluxo cruzado em junção T, as gotas são geradas por uma tensão de cisalhamento que é aplicada na perpendicular à fase dispersa gerando a quebra das gotas (CHRISTOPHER; ANNA, 2007). Diante disso, pode-se considerar que é necessária uma menor tensão de cisalhamento no sistema de focalização e, neste estudo, pode ser atribuído também à menor largura dos canais da fase contínua que resultou numa maior velocidade dos fluidos.

Por outro lado, ao comparar a formação de gotas entre as duas geometrias de fluxo cruzado em junção T (com canais simples e estruturados), nota-se que a região de formação de gotas é diferente, sendo que para o sistema de canais simples o número de Capilar foi de $0,019 < Ca < 0,057$ e no de canais estruturados foi de $0,5 < Ca < 1,43$. Neste caso, a velocidade da fase contínua foi que influenciou no aumento do número de Capilar para o sistema de junção T com canais estruturados. Além disso, para gerar gotas estáveis (*dripping*) foi necessária uma razão de vazões menor para este sistema, sendo de $0,3 < R < 0,8$, enquanto na geometria de canais simples foi observado este regime em $0,9 < R < 1,8$.

Desta forma, a vazão aplicada para a formação de gotas na geometria de fluxo cruzado com canais estruturados é menor do que no sistema com canais simples. Isso se deve principalmente pela razão de largura dos canais que levam a velocidades diferentes nos sistemas. Além disso, o sistema de fluxo cruzado com canais estruturados apresentou uma maior região em que há quebra de gotas, mostrando ser mais eficiente para geração de gotas do que a geometria de canais simples.

Além da geometria, as propriedades dos fluidos das fases dispersa e contínua também influenciam na velocidade das soluções e na quebra de gotas. A tensão interfacial e a viscosidade da fase contínua são os principais fatores físico-químicos envolvidos na dinâmica de formação de gotas (BAROUD; GALLAIRE; DANGLA, 2010; CHRISTOPHER; ANNA, 2007). Diante disso, a formação de gotas usando a geometria de fluxo cruzado em junção T com canais estruturados foi avaliada usando o óleo HFE 7500 com fluorosurfactante 1% (v/v), o qual apresenta menores valores de viscosidade e tensão interfacial do que o óleo de milho. Assim, o regime de formação de gotas foi avaliado também nesta condição, como mostra a Figura 3.8.

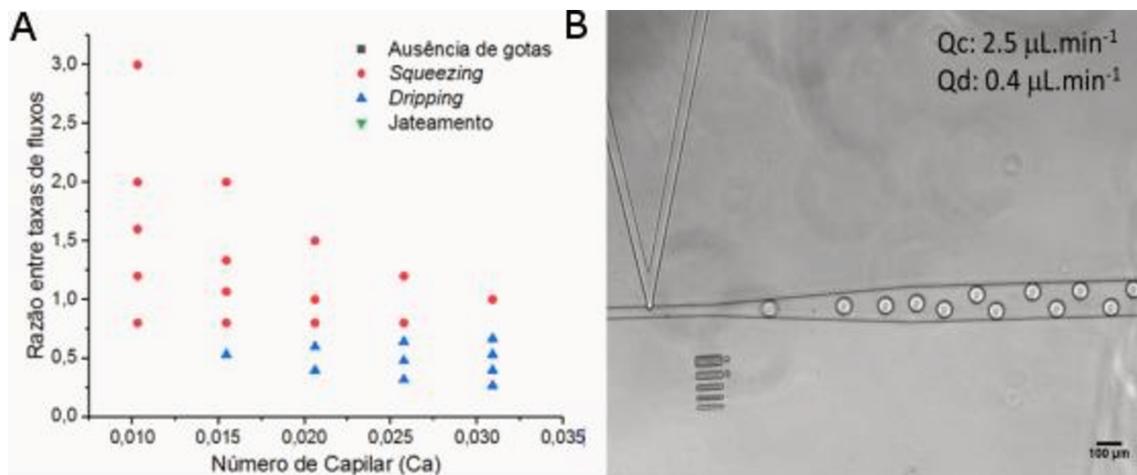


Figura 3.8: Regime de formação de gotas em sistema microfluídico do tipo junção T com canais estruturados usando óleo HFE 7500 com fluorosurfactante 1% (v/v) na fase contínua: A) regime de formação de gotas; B) processo de quebra de gotas nos microcanais e gotas na emulsão numa vazão de $Q_c = 2,5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e $Q_d = 0,4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. As barras de escala são de 100 μm .

Desta forma, a geometria de fluxo cruzado em junção em T com canais estruturados que possui uma menor razão entre os canais e microestruturas que estabilizam o fluxo, apresentou um perfil de geração de gotas mais estável. No estudo usando óleo HFE 7500, a região de formação de gotas estáveis compreende um Ca entre 0,01 e 0,03, sendo geradas gotas com diâmetro médio de $42 \pm 1,01 \mu\text{m}$ com baixa polidispersidade, indicado por um $\text{CV} = 2,41\%$, como mostra a Figura 3.9.

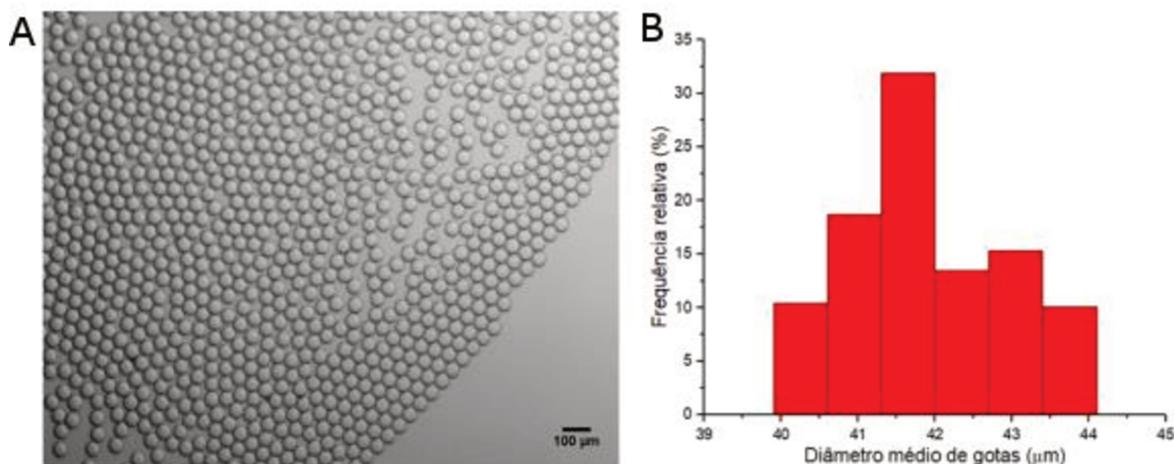


Figura 3.9: Gotas formadas em regime de *dripping*, as quais foram produzidas pelo sistema de fluxo cruzado com junção em T em canais estruturados usando vazões de $Q_c = 2,5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e $Q_d = 0,4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$: A) amostra das gotas distribuídas na fase oleosa; B) distribuição de tamanhos das gotas produzidas nestas condições de vazões. A barra de escala é equivalente a 100 μm .

3.2 Avaliação da emulsão e separação de fases

O processo de separação destas partículas da fase oleosa também é uma etapa importante do processo, já que o objetivo deste trabalho consiste em produzir micropartículas de alginato para imobilizar células microbianas. Diante disso, o método de separação de emulsão não pode ser agressivo às partículas e nem ao material biológico.

Para a emulsão formada por óleo de milho e o tensoativo PGPR, foram testadas etapas de filtração e centrifugação, porém não foi possível identificar claramente o alginato gelificado na forma de micropartículas após a quebra da emulsão. Neste caso, foi observada a formação de um agregado de alginato gelificado que foi causado provavelmente pela coalescência de gotas.

Por outro lado, a emulsão formada por óleo HFE com fluorosurfactante foi facilmente quebrada pela adição de um demulsificante, perfluorooctanol (PFO) 20% (v/v), que de acordo com Mazutis *et al.* (2013), não afeta o material imobilizado. Desta forma, as micropartículas de alginato foram separadas da emulsão de óleo HFE e, para preservar a integridade destas micropartículas, estas foram mantidas em água estéril, como mostra a Figura 3.10.

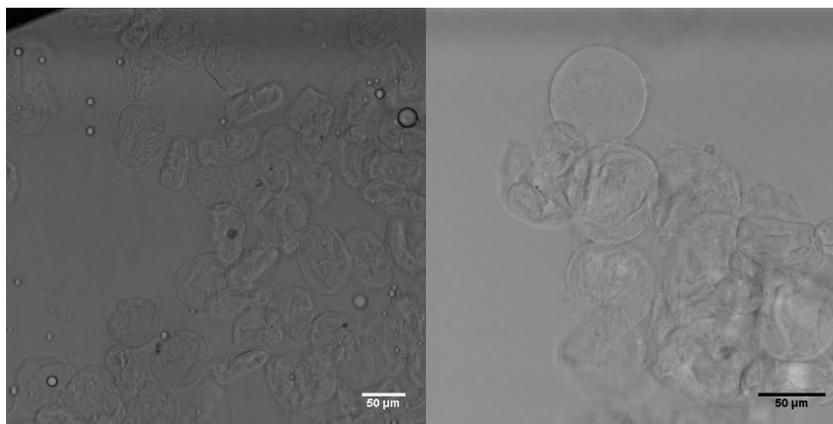


Figura 3.10: Micropartículas de alginato em solução aquosa após a separação da emulsão por adição de PFO. Estas micropartículas foram produzidas por gelificação externa em canais de junção T estruturados tendo óleo HFE como fase contínua.

Portanto, a partir destes estudos das propriedades dos óleos na formação de emulsões, com o respectivo processo de separação de fase apresentada na Figura 3.10, a utilização do óleo HFE com fluorosurfactante 1% (v/v) como fase contínua mostrou-se adequada para produção de micropartículas de alginato. Sendo assim, este

óleo foi empregado para as investigações subsequentes deste projeto de pesquisa que visa encapsular células microbianas em micropartículas de alginato.

3.3 Avaliação do método de gelificação das micropartículas de alginato

Em microcanais microfluídicos, o método de gelificação de alginato tem um papel importante para produção de micropartículas em microfluídica, uma vez que pode afetar a formação destas micropartículas em microcanais (HÅTI et al., 2016; HIRAMA et al., 2013). Diante disso, a geração de micropartículas de gotas foi investigada usando métodos de gelificação externa e interna. O método de gelificação externa ocorre quando um íon ativo, tal como uma solução de CaCl_2 , se liga de forma instantânea ao grupo carboxílico do alginato. Neste caso, os íons de cálcio difundem-se para o interior da matriz polimérica até atingir a completa gelificação do alginato (CHAN; LEE; HENG, 2006; DONATI; PAOLETTI, 2009). Desta forma, a gelificação é direta e rápida, gerando partículas com uma reticulação menos uniforme. A forma de produção de partículas de alginato por este método, em geral, é feito por gotejamento de uma solução de alginato em um reservatório com solução de CaCl_2 . Em microfluídica, o processo de formação das gotas de alginato ocorre por emulsificação. Para a formação de micropartículas de alginato por gelificação externa, a reticulação pode ocorrer após a formação das gotas sendo despejadas num reservatório contendo solução gelificante (MAZZITELLI et al., 2011) ou as soluções de alginato e reticulante podem ser misturadas numa mesma gota, sendo assim a gelificação ocorre dentro da própria gota (CHOI et al., 2007; MAZUTIS; VASILIAUSKAS; WEITZ, 2015).

Por outro lado, a reticulação do alginato pelo método interno é causada pela liberação de um íon inativo, por exemplo CaCO_3 ou Ca-EDTA, que se associa de forma mais lenta à estrutura do alginato. O alginato e uma solução iônica inativa (Ca-EDTA) são misturados e o cátion divalente pode ser liberado por redução de pH (MADRIGAL et al., 2016; UTECH et al., 2015) ou por troca iônica de um complexo ligante (CLEX). Esta última é uma estratégia recente empregada para controlar a reação de gelificação de alginato em microfluídica de gotas (BASSETT et al., 2016; HÅTI et al., 2016). Desta forma, a cinética de gelificação pelo método interno é mais lenta do que o método externo e depende da forma com que o cálcio é liberado para a matriz polimérica (DONATI; PAOLETTI, 2009).

3.3.1 Comparação de geração de micropartículas pelos métodos de gelificação externa e interna usando microfluídica

Nos estudos com gelificação externa, que é usado íons de cálcio na forma livre, foram avaliados os sistemas microfluídicos de focalização de fluxo com posterior gelificação em reservatório (Figura 3.11 A) e junção em T com canais simples, sendo a gelificação feita na própria gota gerada pela microfluídica (Figura 3.11 B). Já nas investigações usando gelificação interna, foi utilizada a geometria de microcanais em junção T com canais estruturados para formação de micropartículas de alginato pelo método CLEX, usando soluções de alginato com Ca-EDTA e Zn-EDDA para compor as gotas (Figura 3.11 C). Assim, a geração de micropartículas de alginato foi avaliada em função dos métodos de gelificação externo e interno, sendo comparados quanto à geração de gotas de alginato em microcanais e o formato das micropartículas de alginato após a gelificação (Figura 3.11).

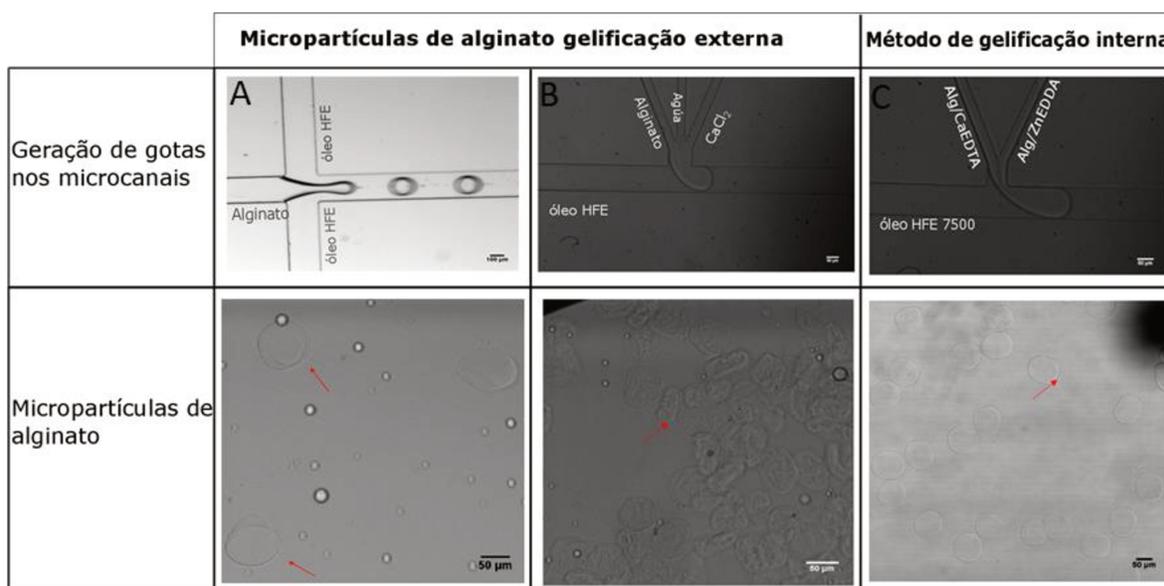


Figura 3.11: Comparação de formas de obtenção de micropartículas de alginato, considerando a geração de gotas e formação de micropartículas de alginato. *Gelificação externa* – A) sistema de focalização de fluxo com gelificação em reservatório de solução gelificante; B) por fluxo cruzado em junção T com canais simples e gelificação dentro da própria gota. *Gelificação interna* - C) usando sistema de fluxo cruzado em junção T com canais estruturados.

Conforme observado na Figura 3.11, as micropartículas de alginato produzidas por gelificação externa em microfluídica, tanto em gotejamento quanto na forma de gotas, mostraram um formato irregular. No sistema de focalização, as gotas apresentaram um formato oval com uma superfície não uniforme, que pode ter sido

causado pelo efeito do gotejamento (Figura 3.11A). Já as micropartículas produzidas em sistema em junção T apresentaram uma forma alongada e semelhante à geometria do canal, com tamanhos não uniformes (Figura 3.11B). No método interno foram produzidas micropartículas de alginato mais homogêneas e arredondadas (Figura 3.11C). Em ambos os casos, a uniformidade e a forma das micropartículas de alginato podem estar associadas à cinética de gelificação de cada método.

Como a gelificação externa apresenta uma reticulação direta por íon Ca^{2+} ativo que se difunde gradualmente para o interior da matriz polimérica, isso resulta na formação instantânea do hidrogel de alginato e uma gelificação não uniforme (DONATI; PAOLETTI, 2009). No caso em que a gelificação ocorreu dentro da gota (Figura 3.11 B), mesmo com uma corrente central aquosa para minimizar a difusão, não houve a formação de micropartículas uniformes. O contato entre soluções de alginato e CaCl_2 na junção dos microcanais, levou à formação de gel antes da quebra de gotas e isso provocou obstrução de microcanais, causando instabilidade no sistema.

Ao contrário dos resultados obtidos neste estudo com gelificação externa, alguns estudos mostraram ser possível formar micropartículas de alginato por este método de gelificação. Para isso foram usadas estratégias diferentes das empregadas neste estudo, uma delas foi de inserir a solução de reticulante separadamente da gota de alginato, como mostrado por Madrigal *et al.* (2016). Em outro estudo, foi usada uma concentração inicial de alginato de apenas 1% (m/v), sendo apresentada a formação de alginato em geometrias com e sem corrente central aquosa (CHOI *et al.*, 2007). Apesar de ter sido avaliada a estratégia de geometria com uma corrente central aquosa e terem sido testadas diferentes concentrações de CaCl_2 e taxas de fluxo, não foram obtidas micropartículas de alginato adequadas pelo método de gelificação externa.

Por outro lado, a maior uniformidade das micropartículas de alginato produzidas pela gelificação interna se deve aos íons inativos (Ca-EDTA) que são liberados de forma controlada no alginato por reticulação de troca iônica (BRASCHLER *et al.*, 2005). Conforme observado na Figura 3.11C, devido à cinética de gelificação mais lenta, a estrutura dos géis de alginato é mais homogênea comparada ao método de gelificação externa (DONATI; PAOLETTI, 2009). Os resultados mostraram uma produção eficiente de micropartículas de alginato por microfluídica de gotículas.

Portanto, para a produção e imobilização de células em micropartículas de alginato usando o dispositivo de microfluídica de junção T, para a gelificação foi usado

o método interno CLEX com modificações feitas de acordo com nossa aplicação. Neste caso, utilizamos soluções contendo alginato com Ca-EDTA-MOPS e alginato com Zn-EDDA-MOPS, ambos com pH em 6,7, para produzir micropartículas de alginato, tal como apresentado na Figura 3.12.

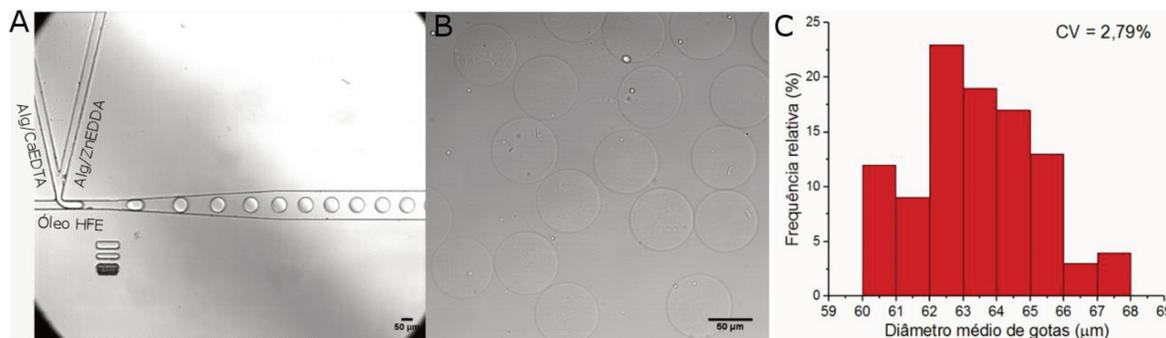


Figura 3.12: Micropartículas de alginato produzidas pelo método CLEX usando nova geometria de junção T: A) geometria de junção-T e geração de gotas, que foram compostas com alginato/Ca-EDTA e alginato/Zn-EDDA, sendo quebradas por óleo HFE 7500 com fluorosurfactante 1% (v/v); B) micropartículas de alginato produzidas em nova geometria de junção T; C) perfil da distribuição de tamanho de micropartículas usando $10 \mu\text{L min}^{-1}$ para fase contínua e $1 \mu\text{L min}^{-1}$ para a fase dispersa.

Nestas condições, usando vazões de $Q_C = 10 \mu\text{L min}^{-1}$ e $Q_D = 1 \mu\text{L min}^{-1}$ as micropartículas de alginato apresentaram um diâmetro médio de $63,53 \pm 1,77 \mu\text{m}$ com coeficiente de variação de 2,79%, indicando uma baixa polidispersidade (Figura 3.12 C). Assim, o uso da geometria de fluxo cruzado em junção T com canais estruturados, tendo o óleo HFE como fase contínua e o processo de gelificação pelo método CLEX mostrou-se eficiente para a geração de gotas e conseqüentemente, para produção de micropartículas de alginato para imobilização de agente biológico.

4 CONCLUSÃO

Diante dos estudos realizados com os sistemas microfluídicos para formação de gotas, notamos que os sistemas operados com óleo HFE 7500 com fluorosurfactante 1% (v/v) apresentou um perfil de geração de gotas mais estável e com gotas mais uniformes.

No processo de formação de micropartículas de alginato em sistemas microfluídicos, observamos que o método de gelificação interna, o qual apresenta uma cinética de reticulação mais lenta, gerou micropartículas mais homogêneas e sem causar entupimentos dos microcanais.

Além disso, as configurações dos microcanais também tiveram influência na geração de micropartículas uniformes. Embora as três geometrias tenham sido capazes de gerar gotas, o sistema microfluídico em junção T construído com canais estruturados apresentou maior estabilidade no processo de geração de gotas e gotas com formatos mais arredondados.

Sendo assim, para a formação de micropartículas de alginato em microfluídica foi empregado o sistema de gotas em junção T com canais estruturados, o óleo HFE 7500 na fase contínua e a gelificação interna pelo método CLEX.

REFERÊNCIAS

- AKARTUNA, I. et al. Chemically induced coalescence in droplet-based microfluidics. **Lab Chip**, v. 15, n. 4, p. 1140–1144, 2015.
- BARET, J.-C. Surfactants in droplet-based microfluidics. **Lab Chip**, v. 12, n. 3, p. 422, 2012.
- BAROUD, C. N.; GALLAIRE, F.; DANGLA, R. Dynamics of microfluidic droplets. **Lab on a chip**, v. 10, p. 2032–2045, 2010.
- BASSETT, D. C. et al. Competitive ligand exchange of crosslinking ions for ionotropic hydrogel formation. **J. Mater. Chem. B**, v. 4, n. 37, p. 6175–6182, 2016.
- BRASCHLER, T. et al. Gentle cell trapping and release on a microfluidic chip by in situ alginate hydrogel formation. **Lab on a chip**, v. 5, n. 5, p. 553–9, 2005.
- CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 2, p. 176–187, 2006.
- CHOI, C.-H. et al. Generation of monodisperse alginate microbeads and in situ encapsulation of cell in microfluidic device. **Biomedical microdevices**, v. 9, n. 6, p. 855–62, dez. 2007.
- CHRISTOPHER, G. F.; ANNA, S. L. Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 40, n. 19, p. R319–R336, 7 out. 2007.
- DE MENECH, M. et al. Transition from squeezing to dripping in a microfluidic T-shaped junction. **Journal of Fluid Mechanics**, v. 595, n. 2008, p. 141–161, 2008.
- DONATI, I.; PAOLETTI, S. Material properties of alginate. In: REHM, B. H. A. (Ed.). . **Alginates : Biology and Applications**. Munster, Germany: Springer US, 2009. p. 1–54.
- DUFFY, D.; MCDONALD, J. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). **Analytical Chemical**, v. 70, n. 23, p. 4974–4984, 1998.
- GARSTECKI, P. et al. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction-scaling and mechanism of break-up. **Lab on a chip**, v. 6, n. 3, p. 437–446, 2006.
- GUO, M. T. et al. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. **Lab on a chip**, v. 12, n. 12, p. 2146–55, 21 jun. 2012.

- HATI, A. G. et al. Microarrays for the study of compartmentalized microorganisms in alginate microbeads and. **Lab on a chip**, v. 6, p. 114830–114842, 2016.
- HATI, A. G. et al. Versatile, cell and chip friendly method to gel alginate in microfluidic devices. **Lab on a chip**, v. 16, n. 19, p. 3718–3727, 2016.
- HIRAMA, H. et al. Hyper alginate gel microbead formation by molecular diffusion at the hydrogel/droplet interface. **Langmuir**, v. 29, n. 2, p. 519–524, 2013.
- HOLTZE, C. et al. Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. **Lab on a Chip**, v. 8, n. 10, p. 1632, 2008.
- MADRIGAL, J. L. et al. Microfluidic generation of alginate microgels for the controlled delivery of lentivectors. **J. Mater. Chem. B**, v. 4, n. 43, p. 6989–6999, 2016.
- MAZUTIS, L. et al. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. **Nat. Protocols**, v. 8, n. 5, p. 870–891, 2013.
- MAZUTIS, L.; VASILIAUSKAS, R.; WEITZ, D. A. Microfluidic Production of Alginate Hydrogel Particles for Antibody Encapsulation and Release. **Macromolecular Bioscience**, v. 15, n. 12, p. 1641–1646, 2015.
- MAZZITELLI, S. et al. Encapsulation of eukaryotic cells in alginate microparticles: cell signaling by TNF-alpha through capsular structure of cystic fibrosis cells. **Journal of cell communication and signaling**, v. 5, n. 2, p. 157–65, jun. 2011.
- MCCLEMENTS, D. J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 47, n. 7, p. 611–649, 2007.
- NIE, Z. et al. Emulsification in a microfluidic flow-focusing device: Effect of the viscosities of the liquids. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 5, n. 5, p. 585–594, 2008.
- NISISAKO, T.; OKUSHIMA, S.; TORII, T. Controlled formulation of monodisperse double emulsions in a multiple-phase microfluidic system. **Soft Matter**, v. 1, n. 1, p. 23, 2005.
- ROMANOWSKY, M.; ABATE, A. R.; WEITZ, D. A. **Scale-up of flow-focusing microfluidic devices**, 2013.
- TAN, W.-H.; TAKEUCHI, S. Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation. **Advanced Materials**, v. 19, n. 18, p. 2696–2701, 17 set. 2007.
- TEH, S.-Y. et al. Droplet microfluidics. **Lab on a chip**, v. 8, n. 2, p. 198–220, fev. 2008.
- UTECH, S. et al. Microfluidic Generation of Monodisperse, Structurally Homogeneous Alginate Microgels for Cell Encapsulation and 3D Cell Culture. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, n. 11, p. 1628–1633, 2015.
- WEHKING, J. D. et al. Effects of viscosity , interfacial tension , and flow geometry on droplet formation in a microfluidic T-junction. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 16, n. 2014, p. 441–453, 2014.
- XU, S. et al. Generation of monodisperse particles by using microfluidics: Control over size, shape, and composition. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 5, p. 724–728, 2005.

Capítulo 4

IMOBILIZAÇÃO DE *BACILLUS SUBTILIS* EM MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO POR MICROFLUÍDICA: APLICAÇÃO EM CULTIVO SUBMERSO

1 INTRODUÇÃO

Micropartículas de alginato como matriz para imobilização celular têm sido usadas para explorar mecanismos de desenvolvimento celular e induzir o aumento de produção de metabólitos de interesse industrial (PARK; CHANG, 2000; RATHORE et al., 2013). Assim, os estudos com células imobilizadas são aplicados em diversos processos biotecnológicos, tal como em processos fermentativos para produção de antibióticos, ácidos orgânicos e enzimas (WESTMAN et al., 2012). Em cultivo submerso, estas micropartículas estarão expostas às tensões causadas pelo crescimento celular e também às ações mecânicas de meio circundante. Desta forma, a estabilidade e as condições que levam ao crescimento celular no interior de micropartículas devem ser considerados a fim de garantir a eficiência do processo.

Em bioprocessos, células microbianas imobilizadas em micropartículas de alginato são conduzidas em sistemas de fermentadores com diferentes condições de agitação e temperatura. Assim, a estabilidade física e o processo de imobilização celular em micropartículas têm um papel fundamental para o cultivo destas células. Tais fatores estão relacionados à estrutura química do alginato, assim como a concentração e o método de gelificação do alginato (MØRCH et al., 2006). As condições ideais de produção de micropartículas de alginato permitem a sua aplicação em diferentes condições de cultivo.

Além da estabilidade das micropartículas, o método de imobilização também tem influência nas respostas de crescimento celular. A microfluídica como tecnologia de imobilização tem se mostrado eficiente por ser menos agressiva às células. Além disso, o tamanho de micropartículas produzidas por microfluídica permite que o comportamento celular seja monitorado usando microbiorreatores. Estes sistemas têm como base a tecnologia microfluídica e apresentam condições para o cultivo e investigação do crescimento celular (BALAGADDÉ et al., 2005). Desta forma,

contribuem para estudos que visam compreender a dinâmica de um sistema ou investigar as condições ideais de um processo.

As micropartículas de alginato para imobilização celular, produzidas por microfluídica, têm sido aplicadas principalmente para investigar mecanismos de divisão celular, respostas celulares a diferentes estímulos e também para isolamento celular (GUO et al., 2012; MAZUTIS et al., 2013). Embora tenha uma vasta gama de aplicações, tais micropartículas têm sido pouco aplicadas em estudos de bioprocessos.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade física e a eficiência de imobilização por microfluídica de gotas em micropartículas de alginato, bem como o comportamento celular em microbiorreator e a possibilidade de empregá-las em cultivo submerso. Como prova de conceito, foi investigar o crescimento de *Bacillus subtilis* em micropartículas de alginato e a capacidade destas células em produzir lipase, visando o aumento de produtividade enzimática, uma vez que esta é uma enzima de alto interesse industrial.

2 METODOLOGIA

2.1 Estabilidade física e eficiência de imobilização celular em micropartículas de alginato

2.1.1 Estabilidade de micropartículas de alginato em sistema “bulk”

As micropartículas de alginato produzidas por sistema microfluídico de gotas do tipo fluxo cruzado em junção T com canais estruturados (Figura 3.3) foram submetidas a teste de estabilidade em função da temperatura e agitação orbital.

As micropartículas foram colocadas em meio de cultura (composto com extrato de levedura, peptona e óleo de milho com Tween 80) e tampão MOPS (40 mM, pH 6,7) como controle. As micropartículas foram incubadas em temperatura ambiente e a 37 °C durante 24 h, com e sem agitação orbital a 150 rpm. Para verificar o efeito de resíduos de cloreto de sódio nas soluções, que poderiam afetar a estabilidade física das partículas, foi realizada etapas de lavagens com a solução tampão MOPS. As partículas foram centrifugadas a 3000 rpm durante 1 min e ressuspendidas com soluções tampão MOPS. Este processo foi repetido por três vezes e ao final foi adicionada uma solução CaCl₂ 1 mM para garantir a estabilidade das micropartículas.

A estabilidade foi avaliada pela medição do tamanho médio e coeficiente de variação (CV) das micropartículas, tal como descrito no Capítulo 3, seção 2.5.

2.1.2 Imobilização de *Bacillus subtilis* em micropartículas de alginato por microfluídica

Para imobilização de *Bacillus subtilis* NRRL B 14819 e NCBI 3610 em micropartículas de alginato, as cepas foram previamente cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) a 30 °C por 12 h.

As células foram imobilizadas em micropartículas de alginato usando microfluídica de gotas na geometria de junção em T (Figura 3.3) como descrito no Capítulo 3, seção 2.4.2, sendo adicionada uma suspensão celular em cada solução de alginato. Após a imobilização celular, as micropartículas foram recuperadas na emulsão pela adição de demulsificante perfluorooctanol (PFO) 20% (v/v) (Alfa Aesar, EUA), como descrito no Capítulo 3, seção 2.4.3. Para garantir as condições assépticas do sistema, a solução de alginato de sódio foi filtrada em filtro de seringa 0,22 µm (Millipore, EUA) e todos os acessórios microfluídicos foram esterilizados com álcool 70% e luz UV.

Para determinar a concentração inicial da suspensão celular a ser imobilizada, foi usada a distribuição de Poisson (MAZUTIS et al., 2013), a qual indica a probabilidade (P) para encontrar X número de células por gota (λ), com a base do número de eventos esperados (x):

$$P(X = x) = \frac{(e^{-\lambda} \times \lambda^x)}{x!} \quad \text{Equação 4.1}$$

Sendo assim, foi adicionada 10^6 cel mL⁻¹ nas soluções de alginato para que em 5,38% de micropartículas tivessem pelo menos uma célula por micropartículas de alginato.

A eficiência de imobilização foi investigada em função das vazões das soluções na faixa de 0,4 e 1 µL.min⁻¹ para fase dispersa e 4 e 10 µL.min⁻¹, para a fase contínua. Para isso foi considerada a diferença de concentração celular antes e depois do processo de imobilização, sendo as micropartículas rompidas com adição de EDTA 1M para a determinação da densidade óptica (600 nm) das células que foram imobilizadas.

2.1.3 Viabilidade celular após o processo de imobilização por microfluídica

A imobilização de células bacterianas em micropartículas de alginato, pela técnica de gelificação interna foi avaliada quanto à composição das soluções e também quanto ao processo de geração de gotas em microcanais.

Primeiramente, foi investigado se o processo de gelificação interna pelo método CLEX poderia afetar a atividade celular devido à composição das soluções de alginato, sendo estas formadas por sais de cloreto de cálcio, acetato de zinco com os respectivos quelantes de EDTA e EDDA, todas em uma concentração de 84 mM e pH 6,7. Para isso, as células de *B. subtilis* foram adicionadas a estas soluções e após 30 min foi avaliada a viabilidade celular.

Além disso, foi avaliado se o corte da gota na vazão estudada para imobilização, sendo de $0,4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para a fase dispersa e $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para a fase contínua, exerceu algum efeito na viabilidade celular do *Bacillus subtilis* durante a geração de gotas nos microcanais. Para isso foram feitas análises de viabilidade celular logo após as células terem sido imobilizadas em sistema microfluídico de gotas.

Para as análises de viabilidade celular das bactérias foi usado o kit de fluorescência Live/Dead® BacLight™ (Invitrogen, EUA), sendo feitos testes de viabilidade da suspensão celular, como controle.

2.2 Microbiorreator para investigação de células microimobilizadas

2.2.1 Microfabricação de sistema de microbiorreator

O sistema microfluídico do tipo microbiorreator foi construído em vidro e PDMS usando a técnica de fotolitografia, conforme detalhado no Capítulo 3, item 2.1.

A configuração do sistema foi composta por microestruturas em formato de U tendo uma abertura de $100 \mu\text{m}$ e profundidade de $50 \mu\text{m}$ (Figura 4.1), sendo baseado no trabalho de Huebner *et al.* (2009). As microestruturas foram desenhadas para ancorar as micropartículas de alginato no microbiorreator permitindo monitorar o crescimento de células imobilizadas ao longo do tempo.

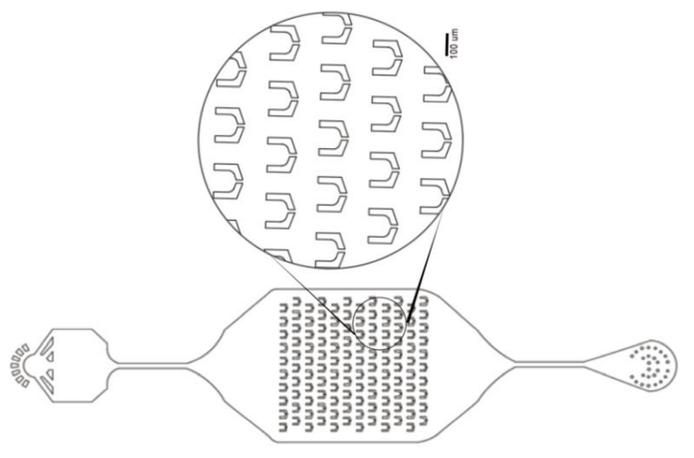


Figura 4.1: Plataforma microfluídica de microbiorreator construída com microestruturas para ancorar as micropartículas de alginato, que foi usado para acompanhar o crescimento de células imobilizadas (barra de escala = 100 μm).

2.2.2 Operação do sistema de microbiorreator

Para inserir as micropartículas de alginato contendo as células de *Bacillus subtilis* foi usada uma bomba seringa (Harvard, EUA) numa vazão de $0,1 \mu\text{L min}^{-1}$. Para induzir o crescimento celular, foi usado um meio de cultura composto com extrato de levedura, peptona e óleo de milho com Tween 80, sendo inserido juntamente com as micropartículas no microbiorreator.

O sistema de microbiorreator foi operado em modo contínuo, usando uma vazão de $0,1 \mu\text{L min}^{-1}$ de meio de cultura, e em modo batelada, em que o canal de saída foi totalmente preenchido com meio de cultura e conectado no canal de entrada para fechar o sistema.

2.2.3 Monitoramento do crescimento de *Bacillus subtilis* imobilizado em micropartículas de alginato

Após as células *Bacillus subtilis* NCBI 3610 terem sido imobilizadas nas micropartículas de alginato, o crescimento celular e as modificações das micropartículas de alginato foram monitorados ao longo de tempo usando o microbiorreator. Tais observações foram feitas usando um microscópio confocal (Leica TCS SP5, EUA) associado à técnica de *time-lapse*. As células foram cultivadas por 24 h no sistema de microbiorreator à temperatura ambiente, sendo capturadas imagens a cada 1 h.

Ao final do cultivo, foi avaliada a viabilidade celular usando fluorescência, como descrito no item 2.1.3, em que a solução de reagentes fluorescentes foi inserida no sistema de microbiorreator para marcação das células.

2.3 *Cultivo de B. subtilis imobilizado em micropartículas de alginato por microfluídica de gotas*

2.3.1 Cultivo de células livres e imobilizadas em micropartículas de alginato

Para o cultivo em batelada com células imobilizadas foram usadas as cepas de *B. subtilis* NRRL B 14819 e NCBI 3610 nas condições livres e imobilizadas em micropartículas de alginato, sendo que a cepa NRRL B 14819 apresentou melhores taxas de crescimento e produção enzimática. Para estes estudos partiu-se de um inóculo da ordem de 10^6 cel mL⁻¹, em frascos Erlenmeyer de 10 mL contendo 2,5 mL de meio de cultivo para produção de lipase.

Para o cultivo com células imobilizadas, 100 µL de micropartículas de alginato contendo células de *B. subtilis* foram adicionadas ao meio de cultura composto com óleo de milho para estimular a produção de lipase, sendo cultivado durante 24 h a 37 °C em agitação orbital a 150 rpm.

2.4 *Cinética de crescimento microbiano*

Os perfis de crescimento e produção de lipase nos cultivos com células livres e imobilizadas em micropartículas de alginato foram analisados em intervalos de 3 h.

Para determinar a concentração de células no cultivo com células imobilizadas foi adicionado 1 mL de solução EDTA a 1M para romper as partículas de alginato. Sendo assim, foi considerado o número total de células presentes no sistema.

O monitoramento do crescimento microbiano dos cultivos de células livres e imobilizadas foram acompanhados por densidade óptica (600 nm), sendo construídas as curvas de crescimento semi-logarítmicas. Desta forma, obteve-se o a velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$), onde para qualquer intervalo de tempo, temos que

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad \text{Equação 4.2}$$

2.5 Determinação da atividade da enzima lipase

A atividade enzimática (U mL⁻¹) da lipase foi quantificada por espectrofotometria usando método colorimétrico dado pelo Kit Lipase – k025 (Bioclin®, Brasil). De acordo com o fabricante, a presença da lipase é indicada pela sua reação com o ácido ditionitrobenzóico (DTNB) que forma um cromógeno de cor amarela, o qual é proporcional à atividade enzimática da lipase. A presença de lipase foi detectada por espectrofotômetro a 410 nm, sendo foi determinada conforme descrito pelo Kit Lipase – k-025:

$$\text{Atividade enzimática} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\text{ABS da amostra} - 0,048}{7} \quad \text{Equação 4.3}$$

A fim de determinar a pureza da enzima, foi estimada a atividade específica da enzima, a qual consiste na atividade enzimática contida em 1 mg de proteína, dada por:

$$\text{Atividade específica} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\text{Atividade Enzimática (U/mL)}}{\text{Concentração de proteína (mg/mL)}} \quad \text{Equação 4.4}$$

A determinação dos teores de proteínas totais (mg mL⁻¹) da solução enzimática bruta foi realizada através do método de Bradford (1976), usando soro albumina bovina como padrão.

Além dos perfis de atividade de produção de lipase, foram avaliados a atividade enzimática por número de células e a variação de pH do meio reacional ao longo do tempo.

2.6 Avaliação estatística

Os dados de crescimento microbiano e perfis de produção enzimática foram avaliados estatisticamente quanto à análise de variância (ANOVA) a um nível de confiança α de 0,05, sendo realizada no *software* OriginLab 2017.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Investigação da estabilidade física das micropartículas de alginato

Uma vez que o objetivo principal deste projeto de pesquisa foi investigar a imobilização de células microbianas em micropartículas de alginato, foi considerada a

estabilidade das micropartículas de alginato em condições de temperatura e agitação orbital para o crescimento celular. De fato, as propriedades mecânicas da matriz polimérica, como a força do gel que é afetada pela estrutura química do alginato, a concentração do alginato e agente de reticulação e o tempo de gelificação, controlam expressivamente a estabilidade do alginato e a dinâmica das células imobilizadas nestas micropartículas (LEE; MOONEY, 2012).

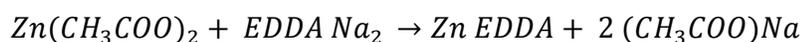
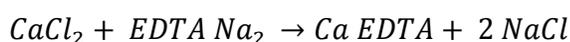
Desta forma, as micropartículas de alginato, sem a presença das bactérias, foram mantidas em condições similares em que as células imobilizadas serão posteriormente cultivadas, sendo avaliadas quanto à integridade física após 24 h. As micropartículas foram avaliadas em diferentes condições de processamento para determinar as condições para mantê-las estáveis durante o período de incubação (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Estabilidade física das micropartículas de alginato em diferentes condições

Solução	Temperatura	Agitação	Processamento	Estabilidade
Controle em tampão MOPS	Temperatura Ambiente	Sem agitação	Demulsificação convencional	Estáveis
		Com agitação		
*Meio de cultura	Temperatura Ambiente	Sem agitação	Demulsificação convencional	Estáveis
		Com agitação		
Meio de cultura	37°C	Sem agitação	Demulsificação convencional	Não estáveis
		Com agitação		
Meio de cultura	37 °C	Sem agitação	Demulsificação com Etapas de lavagens e Adição de CaCl ₂ 1 mM na solução	Estáveis
		Com agitado		

*Meio de cultura composto por óleo de milho, peptona, extrato de levedura, pH 7,0.

Como pode ser observado na Tabela 4.1, nas primeiras investigações em que foram usadas as micropartículas logo após o processo demulsificação em temperatura ambiente, nota-se que a composição do meio de cultura e agitação orbital não afetou a estabilidade física das micropartículas. Enquanto que, após 24 h de incubação a 37 °C, as micropartículas foram desintegradas. Tal fato pode ter se dado pela presença de resíduos de sais resultante do processo de gelificação por troca iônica. Desta forma, foi avaliada a composição das soluções do processo de gelificação interna, sendo que para as soluções de cátions com os quelantes, tem-se que:



Logo, as soluções de alginato contendo os cátions quelados formas compostas por:

Solução 1: *Na-alginato e CaEDTA + 2 NaCl*

Solução 2: *Na-alginato e ZnEDDA + 2 (CH₃COO)Na*

No processo de troca iônica, os íons de zinco se ligam ao EDTA, por ter uma força de interação maior com o EDTA (dado pela constante de formação $\log k = 16$) do que com o EDDA ($\log k = 11,1$), ficando os íons de cálcio livres para ligarem aos grupos carboxílicos do alginato (BASSET *et al.*, 2016). No entanto, como pode ser observado nas soluções 1 e 2, após as trocas iônicas ficam resíduos de sais de sódio (NaCl e CH₃COONa) na solução. A estabilidade do gel de alginato pode ser reduzida devido à substituição dos íons Ca²⁺ por outros cátions com maior afinidade pelo alginato, tal como os íons de Na⁺ (SMIDSROD; SKJAK-BRAEK, 1990). Sendo assim, a presença destes sais, juntamente com o efeito da temperatura, poderia estar acelerando a desintegração das micropartículas de alginato. Desta forma, foram propostas etapas adicionais de lavagens das micropartículas de alginato com tampão MOPS, após o processo de demulsificação, e adição de CaCl₂ numa concentração de 1 mM na solução aquosa para garantir a estabilidade das micropartículas de alginato. E, como pode ser observado na Tabela 4.1, após este processamento, as micropartículas de alginato se mantiveram estáveis após 24 h de incubação a uma temperatura de 37 °C.

A fim de avaliar de forma mais detalhada a estabilidade destas micropartículas nestas condições, estas foram mantidas em solução tampão MOPS e em meio de cultura num período de 24 h de incubação, a 37 °C com agitação orbital a 150 rpm. A estabilidade física foi determinada quanto ao diâmetro médio das micropartículas antes e depois do período de incubação, como mostra a Figura 4.2.

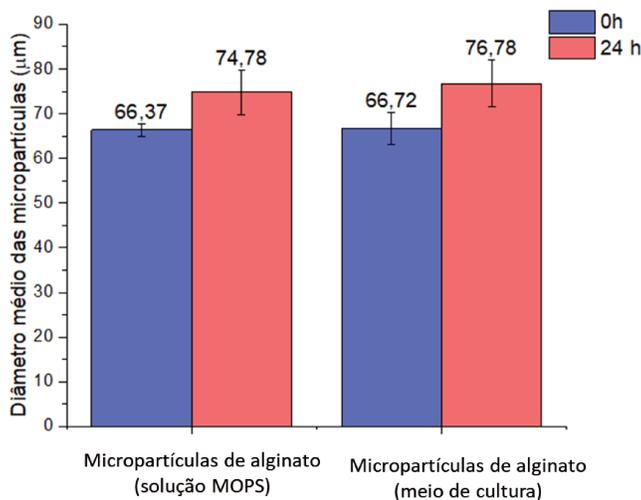


Figura 4.2: Estabilidade das micropartículas de alginato após as etapas de lavagens e adição de CaCl_2 1 mM. Análise de diâmetro das micropartículas de alginato antes e depois do período de 24 h de incubação a 37 °C com agitação orbital (150 rpm) (N = 250).

Assim, após o processamento de lavagens e adição de CaCl_2 e incubação, nota-se que as micropartículas se mantiveram íntegras após o período de incubação, em ambas as soluções de tampão e meio de cultura. Isso mostra que os íons de sódio poderiam de fato estar afetando a integridade das micropartículas e a adição de CaCl_2 pode ter contribuído para manter a estrutura de alginato. Portanto, o procedimento de efetuar etapas de lavagens com adição de CaCl_2 após a demulsificação foi adotado para os ensaios subsequentes, a fim de remover qualquer resíduo de sais proveniente do processo de gelificação. Tornando possíveis os estudos posteriores com cultivo de células nestas micropartículas em condição de sistema agitado e com temperatura num intervalo de 24 h.

3.2 Avaliação do método de imobilização celular via processo microfluídico

3.2.1 Eficiência de imobilização em micropartículas de alginato

Em microfluídica, as células são adicionadas às soluções da fase dispersa e imobilizadas durante a geração de gotas em microcanais. Como a formação de gotas depende do balanço entre as forças viscosas e interfaciais, as vazões impostas para as fases dispersas e contínuas e o cisalhamento da gota podem afetar a viabilidade celular e a eficiência de imobilização (ABATE et al., 2009; KÖSTER et al., 2008). Diante

disso, foram estudadas vazões entre 0,4 e 1 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para fase dispersa e 4 e 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, para a fase contínua e avaliado o efeito de imobilização destas vazões (Figura 4.3).

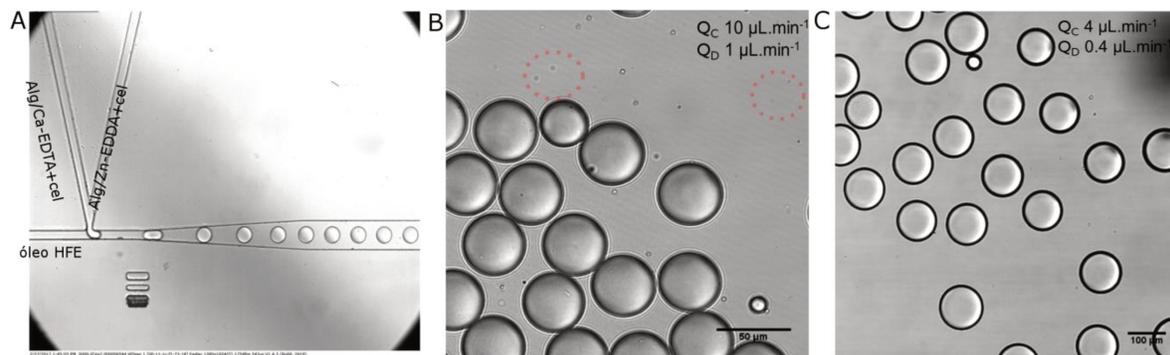


Figura 4.3: Imobilização de *B. subtilis* em micropartículas de alginato: A) formação de gotas em junção T composto por soluções de alginato com Ca-EDTA, Zn-EDDA e suspensão celular, tendo óleo HFE na fase contínua; B) presença de células na fase oleosa da emulsão em vazões $Q_C = 10$ e $Q_D = 1$ $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; C) ausência de células na fase oleosa da emulsão, tendo em vazões $Q_C = 4$ e $Q_D = 0,4$ $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para formação de gotas.

Nestes estudos, nas vazões de $Q_C = 10$ e $Q_D = 1$ $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figura 4.3 B) foi observada uma maior presença de células na fase oleosa da emulsão, indicando uma perda de células no processo de geração de gotas. Nesta condição foi obtida uma eficiência de imobilização de 73%. Enquanto que em vazões mais baixas ($Q_C = 4$ e $Q_D = 0,4$ $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), houve uma menor perda de células durante a formação das gotas. Nesta condição a eficiência foi de 88,92% de células imobilizadas em alginato (Figura 4.3). A presença de células imobilizadas foi observada em microscópio confocal e com marcação com fluorescência de viabilidade celular para identificar as células dentro das micropartículas de alginato (Figura 4.4 A;B).

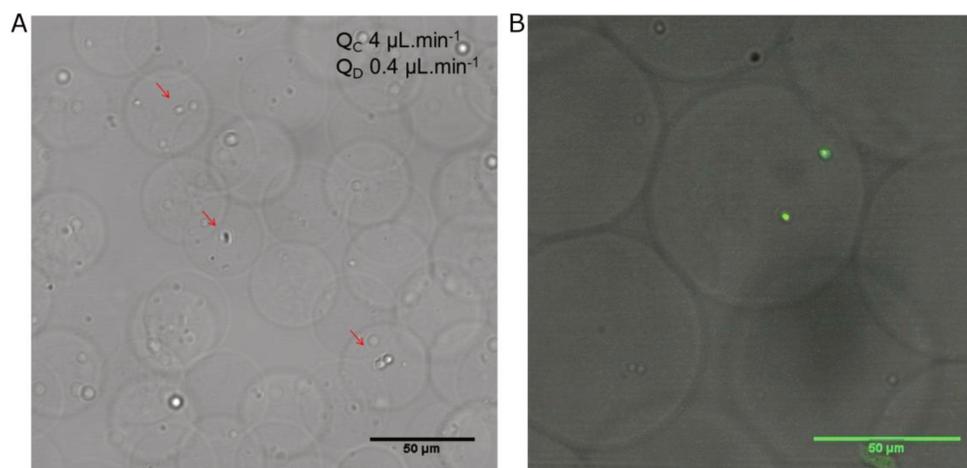


Figura 4.4: Células imobilizadas em micropartículas de alginato (vazões $Q_C = 4$ e $Q_D = 0,4$ $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$): A) células presentes no interior das micropartículas, B) células marcadas com

fluorescência (verde) que indica a viabilidade das células dentro de micropartículas de alginato. As células foram marcadas com fluorescência pelo kit de viabilidade bacteriana LIVE / DEAD® BacLight™ (Invitrogen, USA).

Portanto, para os processos de imobilização de células em micropartículas de alginato usando a microfluídica de gotas numa geometria em junção T, foi usada uma vazão de 0,4 para fase dispersa e 4 $\mu\text{L min}^{-1}$, para a fase contínua.

3.2.2 Efeito do processo de imobilização e gelificação sob a viabilidade celular

Além do efeito de imobilização, foi investigado se o método de gelificação CLEX poderia afetar o metabolismo celular, uma vez que o processo é composto por íons metálicos e quelantes. Para células bacterianas, o íon de zinco (Zn^{2+}) é tóxico quando usado em altas concentrações, enquanto a presença de quelante EDTA livre pode afetar a estrutura da parede celular bacteriana gram-negativa (SILVER, 1996; WOOLEY e JONES, 1983). Sendo assim, a viabilidade celular na suspensão (antes do processo de imobilização em microfluídica), no alginato Ca-EDTA e alginato Zn-EDDA e também a capacidade de crescimento celular após 24 horas de cultivo (Figura 4.5).

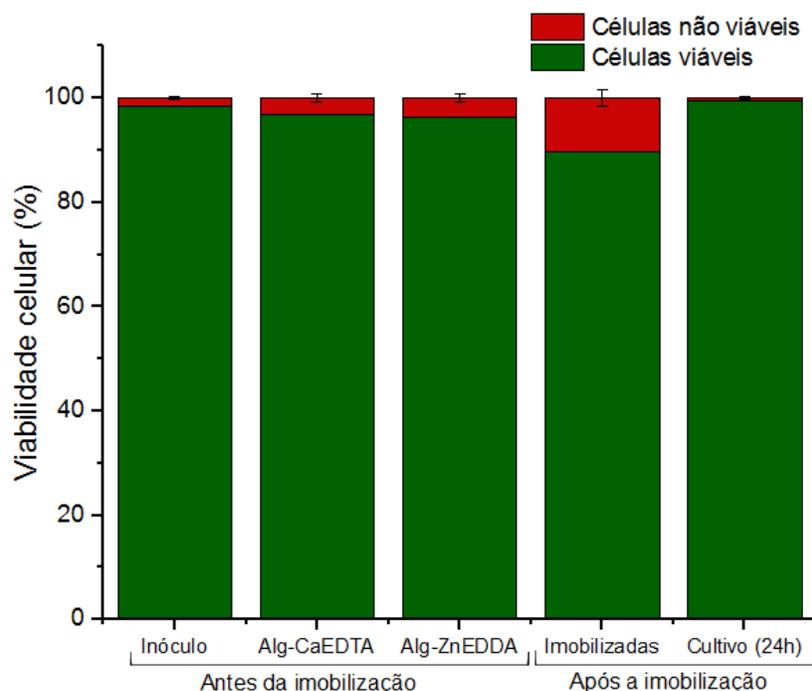


Figura 4.5: Viabilidade de células imobilizadas em micropartículas de alginato: antes do processo de imobilização (suspensão celular, células em soluções de alginato contendo Ca-EDTA e Zn-EDDA); Depois do processo de imobilização e também a viabilidade das células imobilizadas após 24 h de cultivo em cultivo submerso. Para o processo de imobilização foi usada uma vazão de 0,4 para fase dispersa e 4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, para a fase contínua.

Como mostra a Figura 4.5, as soluções de alginato contendo Ca-EDTA e Zn-EDDA não foram tóxicas para as células bacterianas, indicando que as concentrações de Ca^{2+} e Zn^{2+} queladas não afetaram a viabilidade microbiana. Estas mesmas soluções de alginato em concentrações mais elevadas foram testadas com células vivas por Bassett *et al.* (2016), as quais não tiveram sua atividade celular afetada. Assim, indicando que as ações dos quelantes evitaram a exposição de metais livres às células.

Em nosso experimento, notou-se que as células bacterianas nestas soluções de alginato apresentaram uma redução de apenas 2% das células viáveis da suspensão celular. No entanto, após o processo de imobilização, a viabilidade celular foi de quase 90%. Esta redução de células viáveis provavelmente foi causada por fatores do processo de imobilização em microfluídica, como o maior tempo de exposição celular em soluções de alginato (2 horas), devido à baixa produtividade microfluídica, e a tensão de cisalhamento causada por gerações de gotículas. Apesar disso, tal redução não afetou o crescimento de células imobilizadas, como observado após 24 h de cultivo, tendo uma viabilidade celular de 99%. Sendo assim, o método de imobilização celular usando microfluídica de gotas e gelificação interna de alginato podem oferecer condições para o cultivo celular imobilizado em micropartículas de alginato.

3.3 Investigação do comportamento celular usando microbiorreator

3.3.1 Operação do sistema microbiorreator para cultivo de células em modo batelada e contínuo

Os microbiorreatores são sistemas microfluídicos que tem a capacidade de mimetizar condições favoráveis para o crescimento celular, assim como um sistema de biorreatores. Tal como uma escala macrométrica, os microbiorreatores podem operar simulando sistemas do tipo batelada ou em modo contínuo (BALAGADDÉ *et al.*, 2005; SCHÄPPER *et al.*, 2010). Desta forma, o sistema de microbiorreator proposto foi avaliado em modo de cultivo batelada e por operação contínua.

3.3.1.1 Microbiorreator em modo batelada

Num processo de cultivo em batelada em macroescala, a agitação mecânica tende a maximizar a homogeneidade do meio. Já em um microbiorreator, pelo fato do

ambiente estar em uma escala micrométrica, o próprio movimento microbiano e o consumo de substrato podem gerar um sistema homogêneo. Assim, para conduzir o microbiorreator numa operação em modo batelada, a estratégia usada foi de fechar o sistema usando a própria mangueira de saída. Desta forma, o microbiorreator foi totalmente vedado e a condição de operação do sistema em batelada foi avaliada ao longo do tempo, como mostra a Figura 4.6.

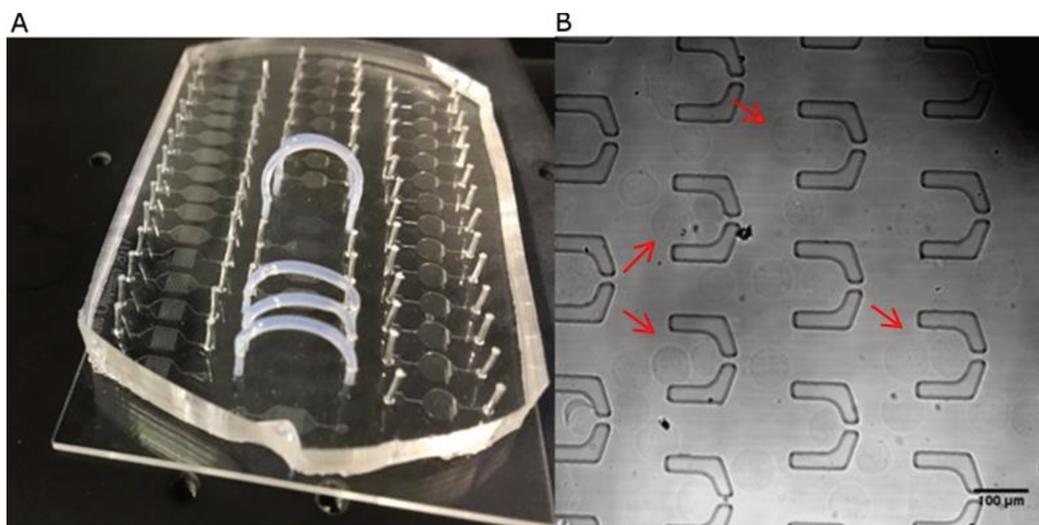


Figura 4.6: Sistema microbiorreator com microestruturas para ancoragem de micropartículas: A) modo de operação em batelada, sendo que cada unidade de microbiorreator foi fechada com mangueira em forma de lupe, B) presença de micropartículas no microbiorreator no tempo 0 h.

Como pode ser observada na Figura 4.6 A;B, a estratégia usada permitiu a operação em batelada sem a entrada de bolhas de ar ao longo do tempo. Assim, o microbiorreator teve condições para cultivar células em modo batelada, sendo avaliado o crescimento de *B. subtilis* imobilizado em micropartículas de alginato em 24 h de cultivo em temperatura ambiente. No entanto, ao final do cultivo a alta concentração celular impediu a identificação das micropartículas no meio, como pode ser notado na Figura 4.7.

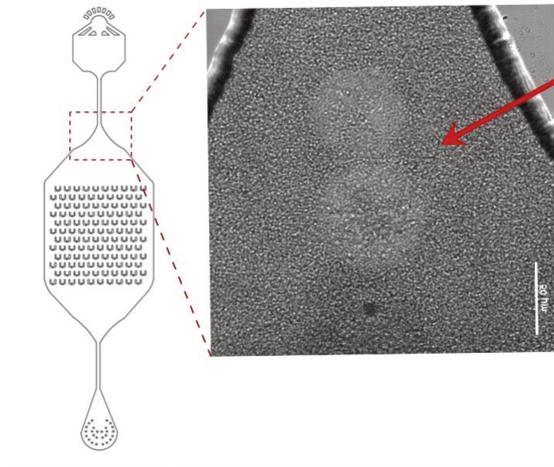


Figura 4.7: Microbiorreator operando em modo batelada com alta concentração celular após 24 h de cultivo de células imobilizadas em micropartículas de alginato. Presença de micropartículas encontradas dentro do microbiorreator (indicado pela seta vermelha). A barra de escala é de 50 μm .

Sendo assim, embora o microbiorreator seja aplicável para cultivo em batelada, não foi possível investigar o comportamento celular dentro das micropartículas ao longo de um intervalo de tempo maior.

3.3.1.2 *Microbiorreator em modo contínuo*

Este modelo de microbiorreator apresenta como vantagem a presença de microestruturas que permitem ancorar as micropartículas de alginato, permitindo assim que elas sejam mantidas dentro do sistema. Por isso, o sistema pôde ser operado em modo contínuo, sendo usada uma bomba do tipo seringa para injetar a solução de meio de cultura ao longo do tempo.

Por se tratar de um sistema micrométrico, a vazão aplicada no sistema pode afetar a estabilidade das micropartículas, arrastando-as para fora do microbiorreator. Desta forma foi observado que em altas vazões, as micropartículas eram retiradas da âncora e removidas do sistema. Enquanto que numa vazão baixa ($0,1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) as micropartículas mantiveram-se estáveis dentro do sistema, embora as micropartículas não tenham ficado presas nas âncoras durante todo o experimento. As condições de cultivo no microbiorreator operando em modo contínuo permitiu o crescimento celular neste microambiente. Assim, tal sistema de microbiorreator operando em modo contínuo poderá contribuir em estudos de dinâmica celular em microambientes.

3.4 Análise de viabilidade e comportamento celular no interior de micropartículas de alginato

No cultivo no microbiorreator em batelada, a alta concentração celular impediu a observação das micropartículas devido à turbidez do meio. Por outro lado, no modo contínuo, o fluxo contínuo de meio de cultura durante o cultivo no microbiorreator ofereceu condições para observar o crescimento celular e também as micropartículas num maior intervalo de tempo. Sendo assim, a condição de crescimento de *Bacillus subtilis* imobilizado em micropartículas foi observada, primeiramente, quanto à viabilidade celular, como mostra a Figura 4.8.

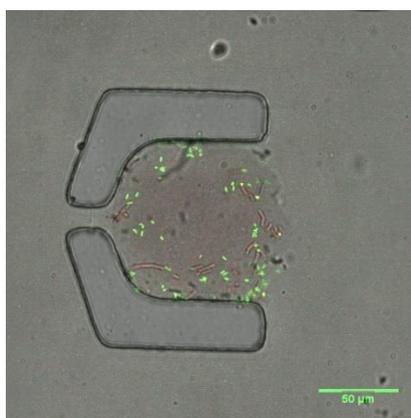


Figura 4.8: Análise de viabilidade celular de *Bacillus subtilis* NCBI 3610 imobilizado em micropartículas de alginato, sendo o corante de viabilidade celular inserido no sistema ao final de 6 h de cultivo em microbiorreator, o qual foi operado em modo contínuo. As células foram marcadas com fluorescência pelo kit de viabilidade bacteriana LIVE / DEAD® BacLight™ (Invitrogen, USA), sendo que a fluorescência verde indica a presença de células viáveis, enquanto que a fluorescência vermelha aponta as células não viáveis.

A Figura 4.8 mostra que a configuração do microbiorreator e o pequeno tamanho das micropartículas de alginato, que foram produzidas por microfluídica de gotas, permitiu acessar as células imobilizadas sem romper as partículas. Além disso, a presença de células viáveis (marcadas com fluorescência verde), ao final de 6 h de cultivo no microbiorreator, mostra que o sistema ofereceu condições favoráveis para o crescimento celular. Assim, este microbiorreator mostrou-se eficiente para investigar o crescimento de células microbianas ao longo do tempo em micropartículas de alginato e não apenas em gotas, tal como apresentado por Huebner *et al.* (2009).

E, observando o comportamento das células, nota-se que estas tendem a se concentrar próximas à superfície das micropartículas, favorecendo o consumo de substrato. Esse comportamento também facilita o escape de células das partículas para

a meio circundante, gerando um sistema com células livres e imobilizadas (RATHORE et al., 2013). O crescimento microbiano em micropartículas de alginato foi então observado ao longo do tempo, como apresenta a Figura 4.9.

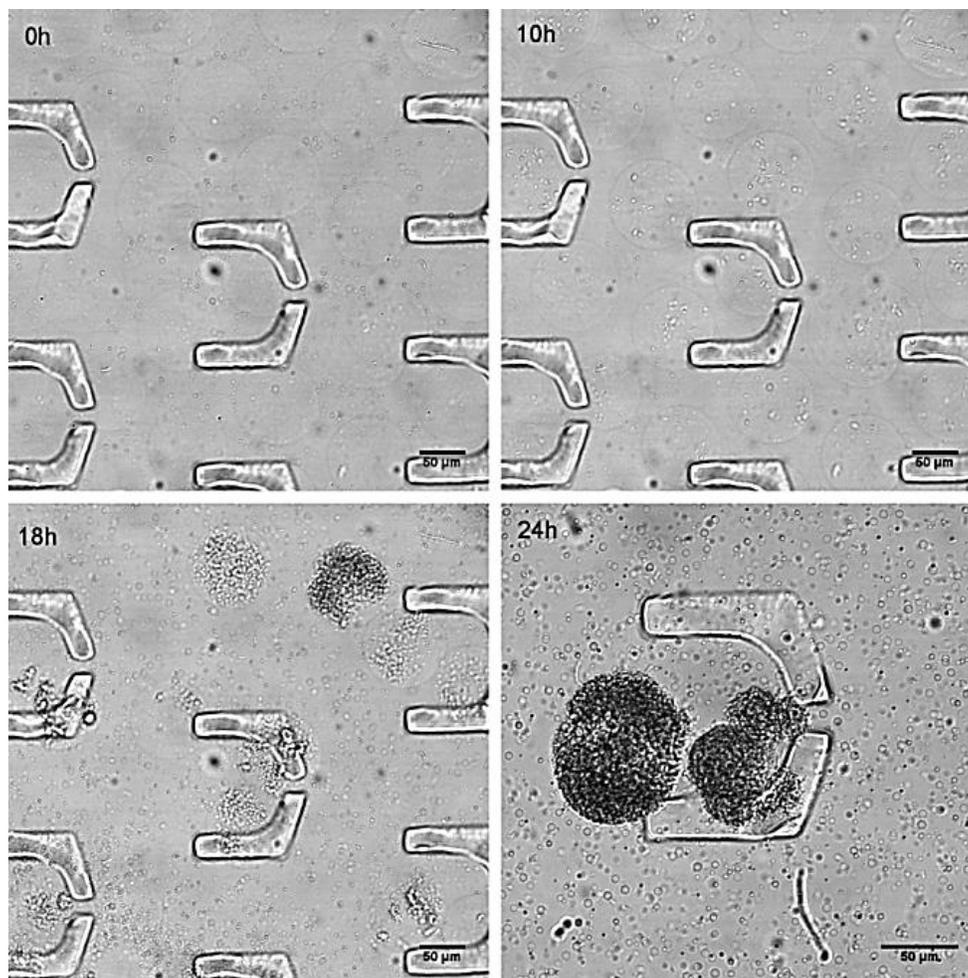


Figura 4.9: Células de *Bacillus subtilis* NCBI 3610 imobilizadas em micropartículas de alginato em cultivo usando o microbiorreator em modo contínuo com sistema para ancorar as partículas e observar o crescimento celular ao longo de 24 h em temperatura ambiente, sendo operado em modo contínuo com uma vazão de $0,1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ de meio de cultura com óleo de milho como fonte de carbono.

Ao monitorar o crescimento celular nas micropartículas de alginato, nota-se que houve um crescimento gradual do número de células no interior das micropartículas ao longo do tempo (Figura 4.9; 0 – 24h). Nas primeiras 10 h de cultivo, o crescimento ainda foi moderado e, em 18 h a concentração de células no interior das partículas foi mais expressiva, tendo as células ocupadas todo o espaço da partícula em 24 h, como pode ser observado na Figura 4.9. Isso significa que as propriedades físico-químicas do alginato permitiram a difusão de nutrientes pela matriz polimérica e a alta

concentração celular pode estar relacionada à proteção celular contra condições de estresse causado pela imobilização (LEE; MOONEY, 2012; ZHU, 2007).

Além do crescimento no interior das partículas, as células se multiplicaram também no meio externo, sendo notado esse comportamento logo após 6 h de cultivo e que pode visto com mais clareza nos tempos de 18 e 24 h da Figura 4.9. Essa dinâmica de crescimento microbiano em micropartículas já foi discutida em trabalhos realizados em *bulk*, em que apontando que a eficiência de transporte de nutrientes, oxigênio e metabólitos, permite alta concentração celular por esta forma de cultivo (PARK; CHANG, 2000; RATHORE et al., 2013). No entanto, as avaliações feitas com métodos convencionais não oferecem condições para avaliar as respostas ao longo do tempo, tal como feito em sistemas microfluídicos de microbiorreatores.

Apesar da contribuição que os microbiorreatores poderiam trazer aos estudos de bioprocessos, diante das observações ao longo do tempo, estes sistemas têm sido empregados para investigar respostas celulares, principalmente em desenvolvimento celular a partir de uma única célula (HÅTI et al., 2016; HUEBNER et al., 2009). Assim, o cultivo com células em micropartículas de alginato, produzidas por sistema microfluídico de gotas, leva a uma condição de cultivo com células livres e imobilizadas, gerando um ambiente com alta concentração celular. Para um sistema de bioprocessos que se deseja obter um produto associado ao crescimento, a imobilização em microfluídica de gota, com uma posterior avaliação em microbiorreator, pode ser uma alternativa para aumentar a produtividade de produtos de interesse.

3.5 Cultivo em batelada de células imobilizadas em micropartículas de alginato

Diante dos estudos do comportamento celular de *Bacillus subtilis* imobilizado em micropartículas de alginato, foi possível observar a capacidade de multiplicação celular usando um microbiorreator. Assim, foi avaliado o crescimento das células imobilizadas por cultivo em batelada usando um baixo volume (2,5 mL de meio de cultura) devido à baixa produção de micropartículas pelo sistema microfluídico de gotas projetado. O crescimento de células imobilizadas em micropartículas foi avaliado em comparação ao cultivo das células livres (Figura 4.10).

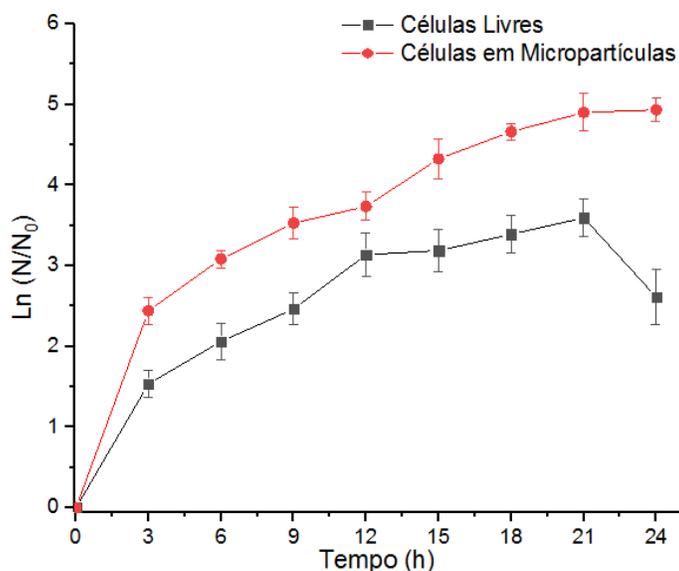


Figura 4.10: Perfis de crescimento entre *Bacillus subtilis* NRRL B 14819 na forma livre e imobilizada em micropartículas de alginato, sendo a concentração celular determinada por densidade óptica (600 nm) e cultivo em meio de cultura contendo óleo de milho como substrato para induzir a produção de lipase.

Ao analisar os cultivos com células livres e imobilizadas em micropartículas (Figura 4.10), nota-se que as micropartículas de alginato produzidas por microfluídica ofereceram condições para o crescimento celular em cultivo batelada, tal como observado nas células livres. Apesar disso, a avaliação do perfil de crescimento microbiano nas condições de cultivos estudadas mostra que houve um maior crescimento celular no cultivo com as células imobilizadas, com uma fase exponencial maior do que observado nas células livres. Enquanto no cultivo com células livres nota-se que houve um perfil de o crescimento em dois períodos, sendo assim a velocidade específica máxima de crescimento foi avaliada por períodos de cultivo, tal como mostra a Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Comparação entre as velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) do *Bacillus subtilis* NRRL B 14819 nas condições de cultivo com células livres e imobilizadas em micropartículas de alginato por períodos de cultivo antes e após 12 h.

Condição de Cultivo	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}) até 12 h de cultivo	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}) após 12 h de cultivo
Células Livres	$0,17 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$
Imobilizadas em Macropartículas	$0,14 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$

$\alpha = 0,05$: houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das velocidades específicas máximas de crescimento nos cultivos com células livres e imobilizadas obtidas antes e depois de 12 h de crescimento. O erro indica o desvio padrão entre as médias ($n = 3$).

Como pode ser observado na Tabela 4.2, as velocidades específicas máximas de crescimento entre os cultivos com células livres e imobilizadas tiveram diferença estatisticamente significativas nos períodos de cultivo analisados. Na condição com as células em micropartículas de alginato, o perfil crescimento se manteve entre os dois períodos analisados ($0,14 \pm 0,01$ nas primeiras 12 h e $0,13 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ após este período). Já no cultivo com células livres, nas primeiras 12 h a velocidade específica máxima de crescimento foi de $0,17 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, indicando estar numa fase exponencial. E, a partir deste momento, embora as células ainda estivessem numa fase exponencial, houve uma desaceleração no crescimento ($0,05 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$). Neste caso, pode-se sugerir que a redução na concentração de algum substrato foi maior no cultivo com células livres, uma vez que a concentração de células inicial foi maior nesta condição do que nas células livres.

Por outro lado, o estímulo deste crescimento celular nas micropartículas pode ter se dado pela proteção celular e também em razão de uma maior interação entre célula-célula, causada pelo microambiente de imobilização, tal como observado por Pajic-lijakovic *et al.* (2015). E, como observado no estudo em microbiorreator, as células imobilizadas tendem a crescer na superfície da partícula, facilitando o consumo de substrato e o escape das células para o meio circundante, resultando num cultivo tendo células na forma imobilizada e também livres. Embora a liberação das células para fora das micropartículas possam dificultar a separação e o uso em sistemas contínuos, nesta condição a concentração celular foi maior do que no sistema apenas com células livres

Embora este experimento tenha sido avaliado numa escala milimétrica, a comparação entre os cultivos com células livres e imobilizadas mostra que o método de imobilização por microfluídica apresentou resultados promissores em termos de crescimento celular e comparáveis aos sistemas convencionais de cultivo submerso em batelada.

3.5.1 Produção de lipase por células livres e imobilizadas

Como as células imobilizadas em micropartículas de alginato apresentaram crescimento compatível com as células livres, foram conduzidos ensaios visando a avaliação da produção de lipase extracelular por *Bacillus subtilis* nessas condições (Figura 4.11).

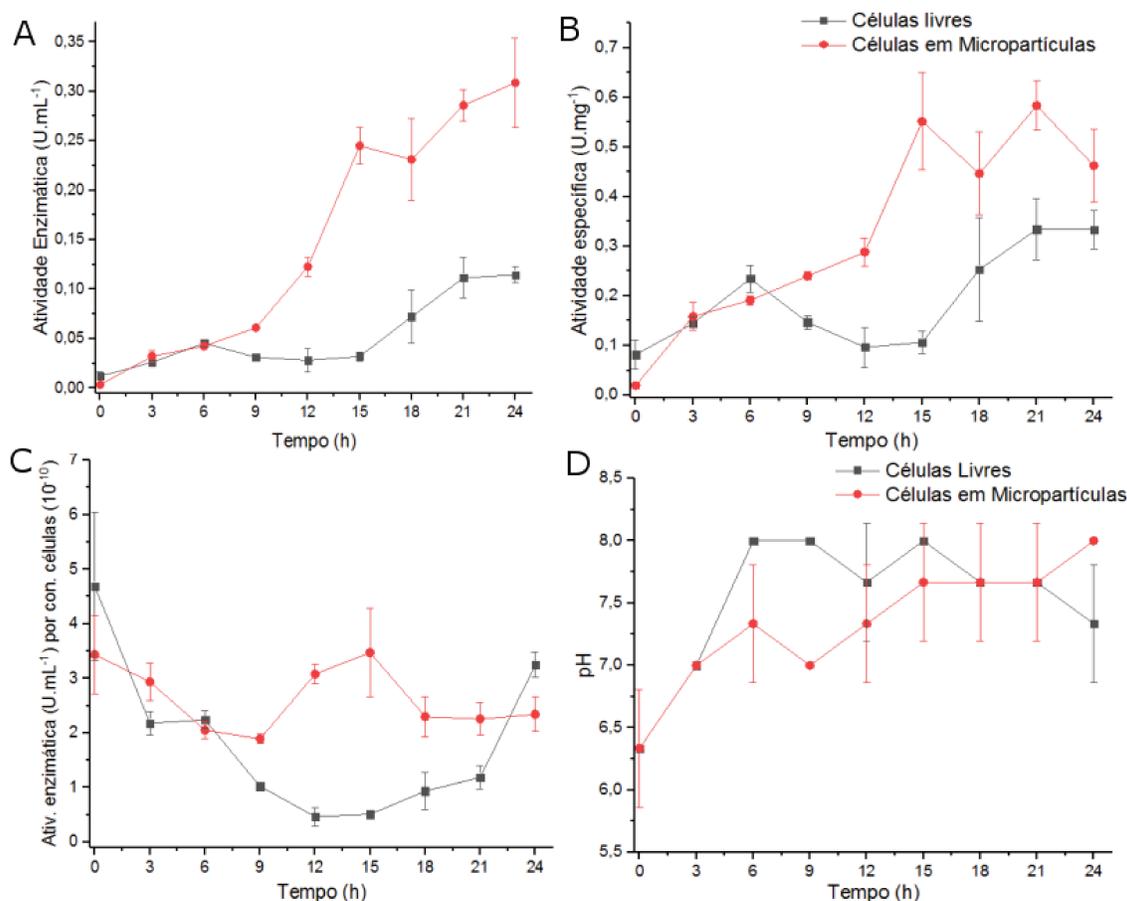


Figura 4.11: Cultivo submerso de *Bacillus subtilis* nas formas livres e imobilizadas em micropartículas de alginato: A) comparação da atividade enzimática entre as duas formas de cultivo; B) perfil de atividade específica (U.mg⁻¹); C) avaliação de atividade enzimática por concentração de células; D) perfil de variação de pH ao longo do tempo em cada condição de cultivo.

Como pode ser observado na Figura 4.11 A o perfil de atividade enzimática entre células livres e imobilizadas em micropartículas teve uma mesma tendência nas primeiras 9 h de cultivo. A partir disso, a produtividade enzimática por células em micropartículas foi maior do que no cultivo células livres, tendo o mesmo perfil na análise de atividade específica (Figura 4.11 B). A máxima produção de lipase por células livres foi em 24 h, tendo uma atividade enzimática de $0,11 \pm 0,01$ U mL⁻¹ e específica de $0,33 \pm 0,04$ U mg⁻¹. Enquanto que no cultivo com células em micropartículas, a produtividade foi de $0,31 \pm 0,04$ U mL⁻¹ com atividade específica de $0,46 \pm 0,07$ U mg⁻¹ resultando numa produtividade enzimática 2,8 vezes maior do que o observado nas células livres. Tal diferença pode ter sido em razão da alta concentração celular que foi observada ao final do cultivo com células imobilizadas em micropartículas de alginato.

Embora não tenha sido reportado na literatura o cultivo com células imobilizadas visando o aumento de produtividade de lipase por *Bacillus subtilis*, tão pouco na forma de cultivo em micropartículas, estudos mostram que a produção enzimática nestas condições tende a superar processos de cultivos com células livres. O trabalho de Adinarayana *et al.* (2005) mostra que a produtividade de protease alcalina por *Bacillus subtilis* imobilizado em partículas de alginato foi 1,2 vezes maior em comparação com células livres. Em condições ótimas de cultivo, a produção de α -amilase por *B. subtilis* imobilizados em partículas de alginato também teve uma produtividade maior do que na condição livre, sendo 2,5 vezes mais produtivo como apresentado por Konsoula *et al.* (2006).

De acordo com estes trabalhos, a alta produtividade enzimática foi principalmente devido ao aumento da concentração celular observado nos cultivos com células imobilizadas, sem afetar o metabolismo celular. Tal comportamento foi observado também neste estudo. Ao comparar a resposta de atividade enzimática por número de células e a variação de pH entre as duas formas de cultivo, ambas apresentam o mesmo perfil indicando que não houve diferença no metabolismo celular nas condições de cultivo (Figura 4.11 C;D).

Portanto, o emprego de micropartículas de alginato contendo células microbianas, proveniente de tecnologia microfluídica para imobilização, mostrou-se viável em cultivo submerso. As respostas de crescimento celular e o aumento considerável de produção de lipase por *Bacillus subtilis* em micropartículas de alginato confirmam a eficiência desta tecnologia de imobilização como estratégia para aumentar a produtividade enzimática e pode assim contribuir com diversas investigações de produtos obtidos por produção biotecnológica.

4 CONCLUSÃO

A formação de micropartículas de alginato em microfluídica usando o método de gelificação interna pelo processo CLEX, mostrou-se estável nas condições que serão utilizadas para o cultivo de células bacterianas (sistema agitado e com temperatura). Porém tal estabilidade foi possível apenas quando estas foram submetidas a etapas de lavagens para remoção de resíduos. O protocolo desenvolvido para imobilização de células bacterianas, concluímos que não afetou de forma

significativa a viabilidade celular e em menores vazões foi obtida uma maior eficiência de imobilização. Assim, ao garantir a estabilidade física das micropartículas num processo de imobilização eficiente, o cultivo de células bacterianas imobilizadas em alginato torna-se viável para um processo de fermentação.

Neste estudo, foi possível concluir que o microbiorreator desenvolvido foi capaz de operar tanto em modo batelada quanto em modo contínuo, sendo que imposição de um fluxo para cultivo em modo contínuo só foi possível devido às microestruturas que mantiveram as micropartículas dentro do microbiorreator. No entanto, no cultivo em modo batelada, as células tenderam a crescer no sistema que aumentou a turbidez do meio, inviabilizando a visualização das células dentro das micropartículas, o que limitou o tempo de observação do crescimento celular neste microambiente. Em contrapartida, a operação deste microbiorreator em modo contínuo permitiu a investigação do comportamento celular em um tempo de observação maior (24 h).

Ao analisar o comportamento celular, usando a operação em modo contínuo, foi possível identificar o modo em que as células tendem a crescer nas micropartículas, sendo preferencialmente nas superfícies e por isso tendem a escapar para o meio externo. Tal forma de investigação de comportamento e a resposta celular observada podem contribuir para estudos de bioprocessos que visam, por exemplo, o aumento de um determinado produto associado ao crescimento.

Diante destes estudos, notamos que as micropartículas produzidas por sistemas microfluídicos apresentam condições para serem usadas como matrizes poliméricas para imobilização de células microbianas em cultivo em batelada. Os resultados mostraram que o cultivo com células imobilizadas em micropartículas levou a uma concentração de células maior do que na condição de células livres e, conseqüentemente, houve um aumento na produtividade enzimática.

Devido à baixa produtividade do sistema microfluídico, o ensaio foi conduzido em bateladas de pequenos volumes (2,5 mL) com o intuito de investigar a viabilidade de empregar estas micropartículas em cultivo submerso. Os resultados satisfatórios mostram o potencial desta forma de cultivo em maior escala, para isso sendo necessário explorar estratégias que visam aumentar a produtividade do sistema microfluídico.

REFERÊNCIAS

- ABATE, A. R. et al. Impact of inlet channel geometry on microfluidic drop formation. **Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, v. 80, n. 2, p. 1–5, 2009.
- ADINARAYANA, K.; JYOTHI, B.; ELLAIAH, P. Production of alkaline protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 3, p. E391–E397, jan. 2005.
- BALAGADDÉ, F. K. et al. Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 137–40, 1 jul. 2005.
- BASSETT, D. C. et al. Competitive ligand exchange of crosslinking ions for ionotropic hydrogel formation. **J. Mater. Chem. B**, v. 4, n. 37, p. 6175–6182, 2016.
- GUO, M. T. et al. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. **Lab on a chip**, v. 12, n. 12, p. 2146–55, 21 jun. 2012.
- HÂTI, A. G. et al. Versatile, cell and chip friendly method to gel alginate in microfluidic devices. **Lab on a chip**, v. 16, n. 19, p. 3718–3727, 2016.
- HUEBNER, A. et al. Static microdroplet arrays: a microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays. **Lab Chip**, v. 9, n. 5, p. 692–698, 2009.
- KONSOULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Thermostable α -amylase production by *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 690–696, 2006.
- KÖSTER, S. et al. Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells. **Lab on a chip**, v. 8, n. 7, p. 1110–5, jul. 2008.
- LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106–126, jan. 2012.
- MAZUTIS, L. et al. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. **Nat. Protocols**, v. 8, n. 5, p. 870–891, 2013.
- MØRCH, Ý. A. et al. Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on alginate microbeads. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 5, p. 1471–1480, 2006.
- PAJIC-LIJAKOVIC, I. et al. Biointerface dynamics - Multi scale modeling considerations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 132, p. 236–245, 2015.
- PARK, J. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 4, p. 303–19, jul. 2000.
- RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 369–381, 2013.
- SCHÄPPER, D. et al. Development of a single-use microbioreactor for cultivation of microorganisms. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, n. 3, p. 891–898, jun. 2010.
- SMIDSROD, O.; SKJAK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends Biotech**, v. 8, n. March, p. 71–78, 1990.
- WESTMAN, J. O. et al. Effects of encapsulation of microorganisms on product formation during microbial fermentations. **Ap. Microb. and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1441–1454, 2012.
- ZHU, Y. Chapter 14 . Immobilized Cell Fermentation for Production of Chemicals and Fuels. In: YANG, S.-T. (Ed.). **Biop. for Value-Added Products from Renewable Res.** [s.l.] Elsevier Ltd, 2007. p. 373–396.

Capítulo 5

PRODUÇÃO DE LIPASE POR *BACILLUS SUBTILIS* IMOBILIZADO EM ALGINATO PELAS TÉCNICAS DE GOTEJAMENTO E MICROFLUÍDICA DE GOTAS

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia de imobilização de agentes biológicos usando sistemas microfluídicos de gotas tem uma vasta gama de aplicações, inclusive em biotecnologia industrial com investigações de respostas e produção de enzimas por micro-organismos imobilizados (NAJAH et al., 2014; SJOSTROM et al., 2014). Apesar de ser uma técnica cientificamente atrativa, a baixa eficiência de produção do sistema gerador de gotas e, conseqüentemente de micropartículas, pode limitar o uso desta técnica em aplicações com apelo industrial (HOLTZE, 2013). Diante disso, diferentes estratégias e geometrias têm sido estudadas a fim de contornar esta limitação e assim, permitir a aplicação desta tecnologia em aplicações biotecnológicas em maior escala.

As plataformas microfluídicas que visam o aumento da produtividade de geração de gotas são projetadas em múltiplos microcanais, que formam módulos de sistemas microfluídicos, os quais podem ser distribuídos em modo paralelo ou por empilhamento (CONCHOUSO et al., 2014; NISISAKO; TORII, 2008). Neste tipo de sistema, a relação de distância e largura entre os microcanais tem um papel fundamental na funcionalidade de cada módulo microfluídico (ROMANOWSKY; ABATE; WEITZ, 2013). Assim, o desafio na construção destes sistemas consiste na elaboração de geometrias em que todos os módulos operem de forma constante e sem diferença nas propriedades de tamanho e uniformidade das gotas.

Dentre as contribuições deste tipo de operação microfluídica, com maior produção, está a produção enzimática por processos biotecnológicos usando micro-organismos imobilizados em micropartículas. Ao contrário das tecnologias convencionais, pelo sistema microfluídico podem ser produzidas partículas de tamanhos menores e monodispersas, o que favorece no suprimento de nutrientes e conseqüentemente, o crescimento celular (PARK; CHANG, 2000; RADOVICH, 1985; RATHORE et al., 2013). Assim, esta tecnologia pode ser usada na imobilização de

células em matrizes poliméricas, como em alginato de cálcio, e estimular a produção de enzimas, como a lipase extracelular produzida por *Bacillus subtilis*.

Como uma inovação na tecnologia para imobilização de células em micropartículas de alginato, a microfluídica de gotas pode contribuir neste âmbito. Neste contexto, este trabalho teve como desafio construir uma plataforma de microcanais em paralelo na geometria em fluxo cruzado em junção T, inicialmente com o propósito de duplicar a produção de micropartículas. Diante disso, utilizar esta tecnologia para imobilizar células de *B. subtilis* em micropartículas de alginato e comparar sua capacidade de produção de lipase com métodos convencionais de imobilização, tendo como referencial o cultivo com células livres.

2 METODOLOGIA

2.1 Configuração e microfabricação de sistema duplo de microfluídica de gotas

O sistema duplo de microfluídica de gotas foi construído em base de vidro e polidimetil siloxano (PDMS) pela técnica de litografia macia, conforme detalhado no Capítulo 3, item 2.1.

O design do sistema duplo teve como base a geometria simples de fluxo cruzado em junção T. Este dispositivo foi composto por dois módulos geradores de gotas, tendo duas entradas principais para a fase dispersa e uma para a fase contínua, as quais são duplicadas em correntes secundárias que formam cada módulo de sistema de gotas, conforme apresentado na Figura 5.1.

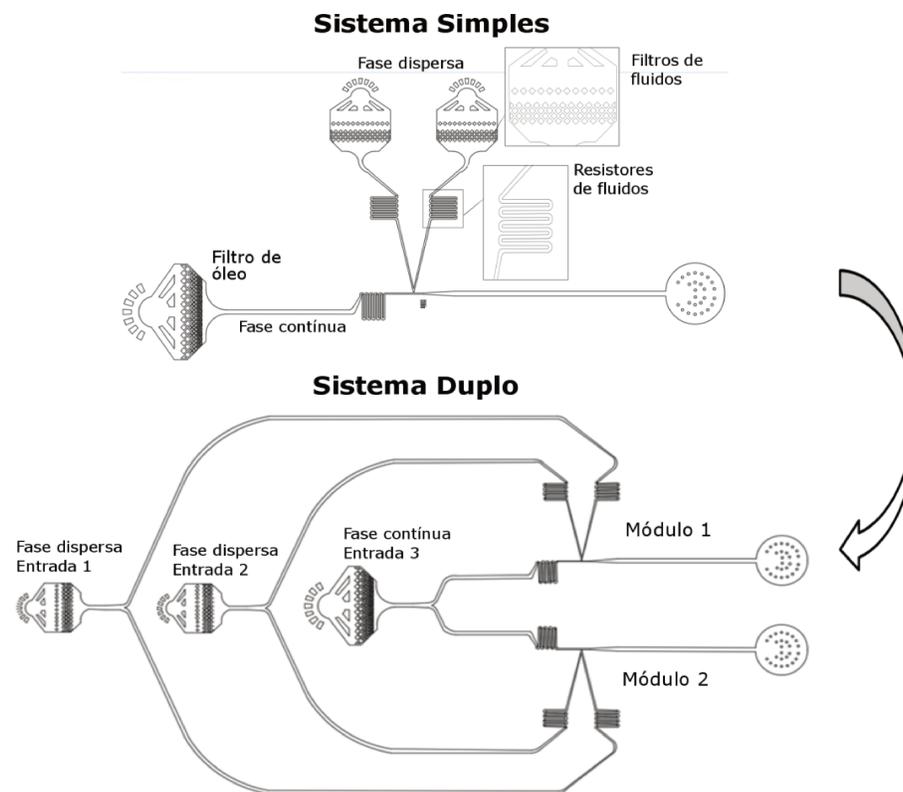


Figura 5.1: Sistema microfluídico de gotas em modo simples e plataforma em sistema gerador de gotas em módulo duplo.

2.2 Geração de gotas em sistema duplicado

A capacidade de formar gotas no sistema duplicado foi avaliada usando água ultra-pura nas correntes de fase dispersa e na fase contínua foi usado óleo fluorocarbonado, HFE 7500 (3M, EUA) contendo 1% (v/v) de 008-fluorosurfactante (Ran Biotechnologies, EUA).

A geração de gotas foi analisada usando vazões de 2 a 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ na fase contínua (Q_C), tendo fixado uma vazão de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ na fase dispersa (Q_D), resultando numa vazão máxima de 64 $\mu\text{L}/\text{min}$ no sistema.

O diâmetro médio das gotas foi analisado conforme descrito no Capítulo 3, na seção 2.5. E a frequência de gotas por segundos (Hz) geradas em cada sistema foi determinada pela razão da vazão total da fase dispersa pelo volume das gotas obtidas nesta mesma vazão.

2.3 Técnicas de imobilização de *B.subtilis* em partículas de alginato

2.3.1 Imobilização de células microbianas em micropartículas de alginato em plataforma microfluídica dupla

Para geração de micropartículas de alginato e imobilização de células foi utilizado o método de gelificação interna CLEX, como detalhado no Capítulo 4, na seção 2.1.2, usando a plataforma microfluídica de gotas dupla, como mostra a Figura 5.2.

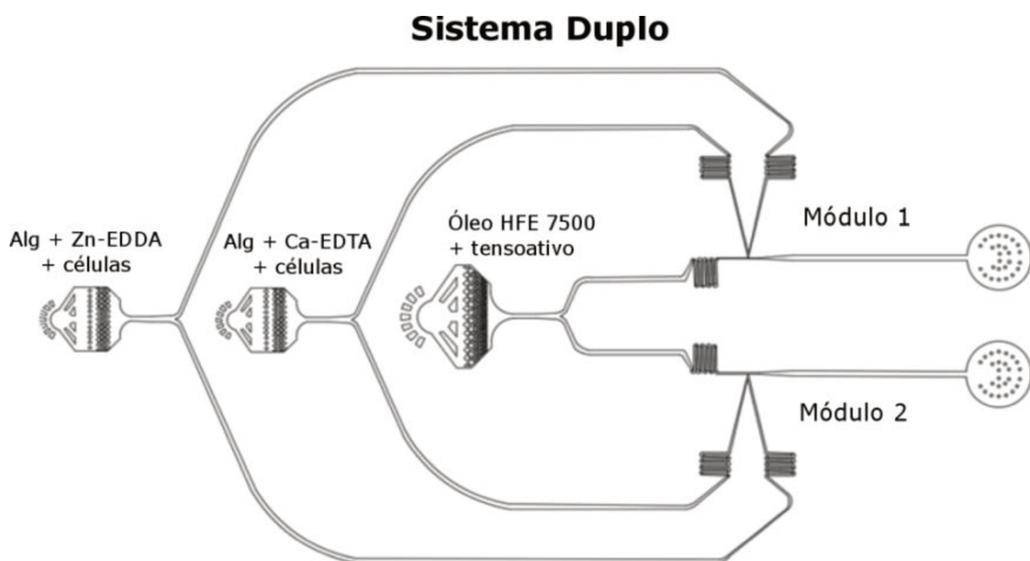


Figura 5.2: Plataforma microfluídica de gotas com sistema duplo de geração de gota para imobilização de células microbianas em micropartículas de alginato.

Para o processo imobilização de células em gotas de alginato foi usada uma vazão de $10 \mu\text{L min}^{-1}$ na corrente da fase contínua (Q_C) e $2 \mu\text{L min}^{-1}$ na fase dispersa (Q_D), uma vez que para a imobilização de células é necessário empregar vazões menores para não haver o arraste de células. Além disso, foi avaliado também a eficiência de imobilização celular, em porcentagem, considerando a concentração celular antes e depois do processo de imobilização.

2.3.2 Técnica convencional de imobilização por gotejamento

No processo de imobilização por gotejamento foram geradas partículas de tamanhos maiores, sendo denominadas de macropartículas. Neste caso, a suspensão celular foi misturada numa solução de alginato de sódio 2% (m/v), resultando numa concentração final de alginato 1,2 % (m/v), e gotejada num reservatório com 30 mL de solução de cloreto de cálcio a 30 mM, num pH 6,7, e mantidas na solução por 30 min

para completar a gelificação. Para o gotejamento foi usado como bico ejetor uma seringa de vidro de 1 mL (Hamilton, USA) e uma agulha de ~1 mm de diâmetro interno. A fim de obter partículas de alginato esféricas, a solução de alginato foi impulsionada por uma bomba do tipo seringa, numa vazão de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, e com uma distância de ~1cm de gotejamento (Figura 5.3).



Figura 5.3: Processo de produção de macropartículas de alginato pelo método de gotejamento usando uma vazão de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para gotejar solução de alginato de sódio num reservatório contendo solução de CaCl_2 a 30mM.

2.4 Cultivo em batelada de células imobilizadas

Para o cultivo submerso e produção de lipase usando *Bacillus subtilis* NRRL B 14819 nas condições livres e imobilizadas foram usadas as mesmas metodologias descritas no Capítulo 4, seção 2.3.1.

Para estes cultivos foram utilizadas concentração inicial de células de 10^7 cel mL^{-1} em 25 mL de meio de cultura, contendo óleo de milho como substrato, que foram conduzidos em Erlenmeyers de 250 mL em agitação orbital (150 rpm), por 24 h a 24°C .

Os cultivos em batelada usando células de *B. subtilis* imobilizadas em micropartículas (técnica microfluídica) e em partículas (técnica convencional de gotejamento) de alginato foram realizados com a mesma concentração inicial de células (10^7 cel mL^{-1}). Para isso, em cada triplicata, 1 mL de suspensão celular na sua forma imobilizada foi adicionado ao meio de cultura. Sendo assim, para encapsular 1 mL de células, pelo processo de microfluídica foi produzido um volume de 9 mL de emulsão, que contém as micropartículas de alginato (posteriormente separadas da emulsão), enquanto que pelo método de gotejamento o volume de partículas foi de 3 mL.

Para investigar os cultivos em bateladas, foram coletadas amostras a cada 3 h para determinação dos perfis de crescimento e produção enzimática.

2.4.1 Análise da cinética de crescimento microbiano e produção de lipase

A metodologia usada para investigação do crescimento microbiano e da produção de lipase das três condições de cultivo estudadas, livres e imobilizadas, foi detalhada no Capítulo 4, nas seções 2.4 e 2.5.

2.4.2 Avaliação estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *software* OriginLab 2017. Para os perfis de crescimento microbiano e produção enzimática entre as três formas de cultivo, as análises estatísticas foram avaliadas quanto à análise de variância (ANOVA), e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey, ambos num nível de confiança α de 0,05.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme os estudos apresentados, a imobilização em micropartículas de alginato usando sistema microfluídico pode ser atraente para aplicações biotecnológicas que busquem investigar as respostas celulares ao longo do tempo e também o aumento de produtos de interesse. Apesar disso, a microfluídica tem como limitação a baixa produtividade. Para amplificar a escala de produção em microfluídica, estão sendo projetadas plataformas com paralelização de geometrias num único sistema, gerando um processo contínuo de produção (HOLTZE, 2013; TENDULKAR et al., 2012). Diante disso, foram avaliadas novas configurações de sistema microfluídico a fim de buscar estratégias de amplificação para aumentar a produtividade na geração micropartículas de alginato.

3.1 Sistema duplo de microfluídica para geração de gotas

Neste trabalho, um sistema microfluídico duplo foi proposto e avaliado quanto à sua eficiência de geração de gotas e a reprodutibilidade de cada módulo. Nesta primeira etapa, a relação de vazões para formação de gotas foi mantida em $R = 0,2$, uma vez que esta razão foi dada como a melhor condição para imobilização de

células em microcanais (Capítulo 4, seção 2.1.2). Desta forma, foi explorada a capacidade máxima de vazão suportada pelos microcanais e o perfil de geração de gotas por cada módulo, analisados quanto ao diâmetro e o coeficiente de variação (CV) para as vazões impostas, como mostra a Figura 5.4.

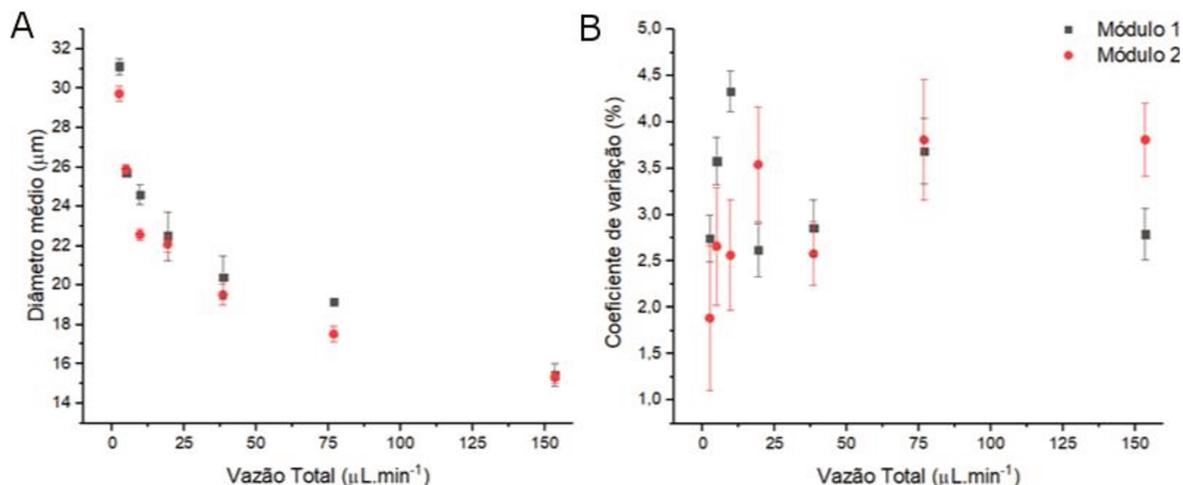


Figura 5.4: Perfil de geração de gotas em cada módulo da plataforma de microfluídica em função da vazão total de escoamento: A) diâmetro médio de gotas dos módulos 1 e 2, B) coeficiente de variação em diferentes vazões.

Como pode ser observado na Figura 5.4 A o sistema microfluídico proposto foi capaz de gerar gotas numa vazão máxima de 153,6 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, sendo usadas vazões de 128 e 12,8 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para as fases contínua e dispersa, respectivamente.

Neste estudo em que foi mantida a razão entre as vazões ($R = 0,2$ – somatória das vazões da fase dispersa pela vazão da fase contínua), nota-se que os módulos microfluídica (1 e 2) apresentaram o mesmo perfil de tamanho de gotas, sendo que os diâmetros das gotas tenderam a diminuir com o aumento da vazão da fase contínua. Além disso, a Figura 5.4 B, mostra a uniformidade das gotas geradas pelo sistema duplo de microfluídica, sendo que para ambos os módulos o coeficiente de variação (CV) ficou abaixo de 5%, indicando assim a monodispersidade das gotas geradas por este sistema microfluídico.

3.1.1 Análise comparativa de formação de gotas por sistema simples e duplicado

Após avaliar a capacidade de formação de gotas em cada módulo, este sistema microfluídico foi comparado à sua geometria em modo simples. Neste estudo,

os sistemas foram avaliados quanto às características de tamanho e polidispersidade das gotas, como mostra a Figura 5.5.

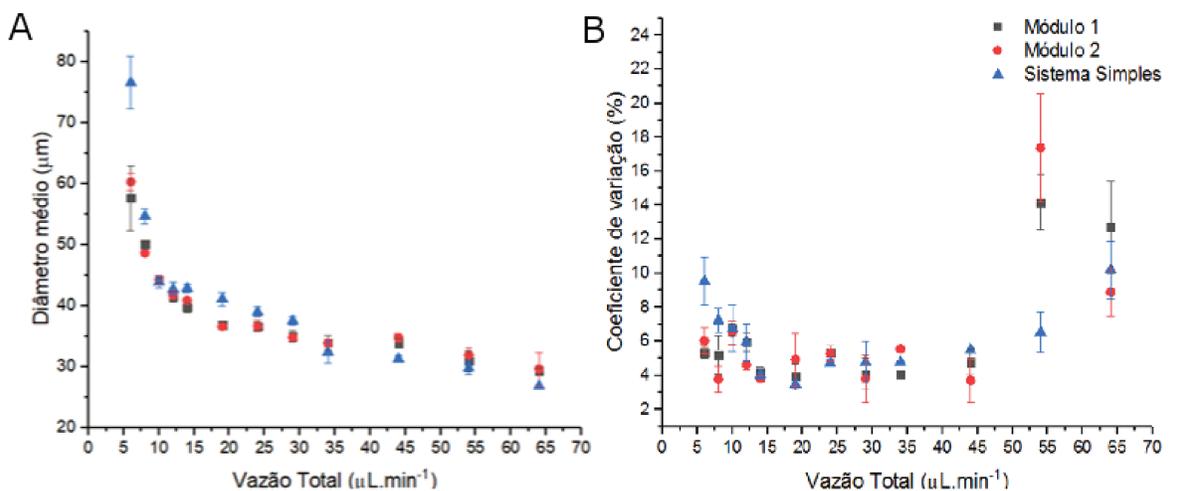


Figura 5.5: Formação de gotas pelo sistema simples gerador de gotas e a plataforma de sistemas duplos de microfluídica em função de diferentes vazões: A) perfil de diâmetro médio de gotas; B) perfil de variação de tamanhos, dado pelo coeficiente de variação (CV).

A Figura 5.5 A, mostra que o perfil de geração de gotas pelo sistema duplo apresenta a mesma tendência que a versão simples. No entanto, no sistema simples nota-se que há uma maior redução no tamanho das gotas conforme aumentam as vazões. Tal efeito pode ser atribuído à diferença de comprimento dos microcanais, que gera uma diferença na resistência dos fluidos (ROMANOWSKY; ABATE; WEITZ, 2013). No sistema duplo, tanto os canais da fase dispersa quanto contínua possuem comprimentos maiores do que no sistema simples e isso gera uma diferença na resistência dos fluídos, reduzindo a velocidade com que as soluções atingem o canal principal. Desta forma, no sistema duplo o efeito da vazão da fase contínua sob o corte das gotas é menor, já que a velocidade neste caso é menor, resultando em gotas de tamanhos maiores. Apesar disso, a variação em tamanho de gotas foi menor em vazões de até 55 µL.min⁻¹ e, acima disso, nota-se uma maior variabilidade nos tamanhos das gotas devido à alta vazão da fase contínua que gera uma instabilidade no processo de geração de gotas. Tal comportamento foi observado nos sistemas simples e duplo, o que confere na reprodutibilidade dos sistemas (Figura 5.5 B).

Como o objetivo desta configuração consiste em dobrar a produtividade da geração de gotas comparada ao modo simples, os sistemas foram avaliados quanto

à frequência de gotas geradas. Para isso, a geração de gotas foi avaliada em diferentes vazões de soluções e da frequência de gotas geradas, como mostra a Figura 5.6.

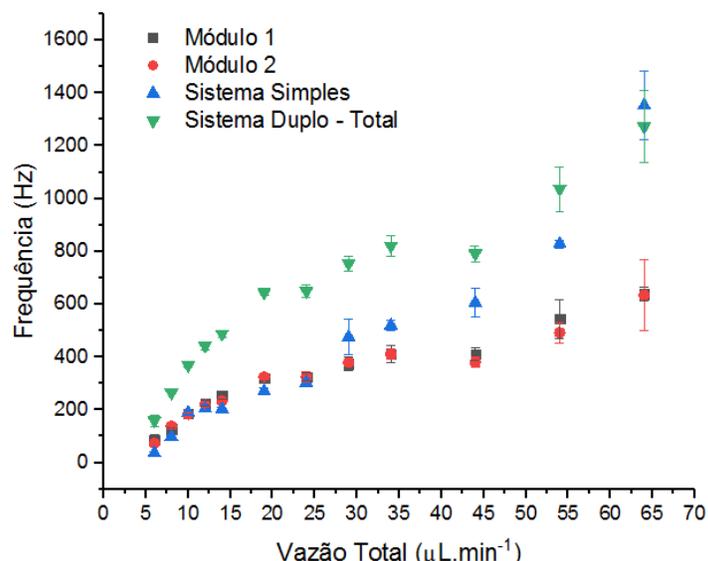


Figura 5.6: Frequência de gotas geradas por segundo (Hz) em diferentes vazões totais entre os sistemas simples e a plataforma de sistema duplo.

A análise da frequência de gotas geradas entre os sistemas mostra que a produtividade do sistema duplo é maior do que o sistema simples quando é considerado o conjunto completo (módulos 1 e 2). E, neste estudo, comparando a produtividade entre os sistemas nota-se que a eficiência do sistema duplo foi maior em vazões totais de até $54 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Na vazão máxima estudada, a qual foi definida pela capacidade do sistema simples, não houve diferença na produtividade em ambos os sistemas. Apesar disso, nesta vazão as gotas apresentaram uma maior polidispersidade, indicado pelo coeficiente de variação (CV) acima de 8%, como ilustrado na Figura 5.6.

Desta forma, analisando a produtividade e a distribuição do tamanho de gotas dos sistemas nota-se que a operação do sistema duplo teve uma produtividade de até 158% maior (4,4 vezes) do que o sistema simples, tendo um CV abaixo de 5%, indicando a homogeneidade das gotas.

3.2 Produção de microparículas de alginato para imobilização de células microbianas

No processo de geração de gotas de alginato na plataforma microfluídica de gotas, as soluções de alginato possuem uma viscosidade maior do que da água e isso

pode resultar num maior efeito de resistência. Além disso, para o processo de imobilização de células microbianas as vazões das correntes contínuas e dispersas devem ser amenas a fim de não gerar um possível arraste das células. Diante disso, a operação da plataforma de sistema de gotas duplo foi avaliada quanto à formação de micropartículas de alginato e o processo de imobilização de células microbianas. A capacidade do sistema em formar micropartículas de alginato pode ser observada na Figura 5.7.

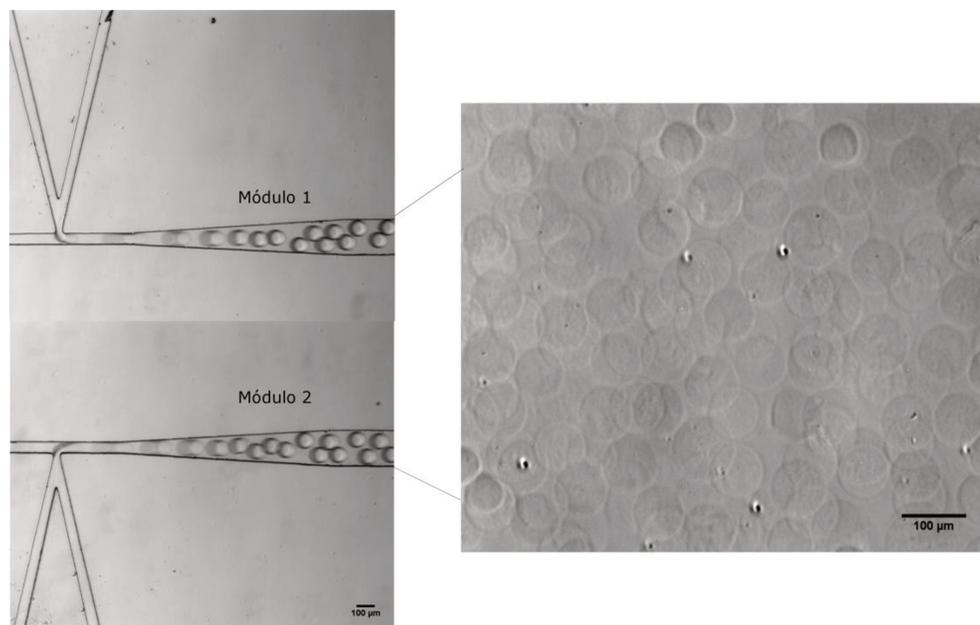


Figura 5.7: Processo de geração de gotas e micropartículas de alginato produzidas em plataforma dupla de microfluídica de gotas numa vazão total de $Q_T = 14 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, tendo uma frequência de 100 Hz.

Como pode ser observada na Figura 5.7, a produção de gotas de alginato teve a mesma característica em ambos os módulos da plataforma microfluídica, tendo uma frequência total de 100 Hz. E, na condição de operação, usando uma vazão de $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ na fase contínua e de $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ($Q_T = 14 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) para as soluções da fase dispersa, as partículas de alginato apresentam um diâmetro médio de $68,35 \pm 3,27 \mu\text{m}$ com uma polidispersidade de 4,78%. Além disso, foi obtido uma eficiência de 86% de células imobilizadas em micropartículas de alginato, mostrando que as condições do sistema não afetaram a processo de imobilização. Sendo assim, pode ser considerada a aplicação desta plataforma microfluídica de gotas para imobilização de células com aplicação em diversas investigações que seja necessária uma produtividade do que os sistemas simples.

3.3 Cultivo de *Bacillus subtilis* nas formas livre e imobilizada

Os cultivos *Bacillus subtilis* NRRL B 14819 nas condições livre e imobilizadas em macro e micropartículas de alginato foram conduzidos em sistema agitado e avaliados os perfis de crescimento microbiano ao longo de 24 h, como pode ser observado na Figura 5.8.

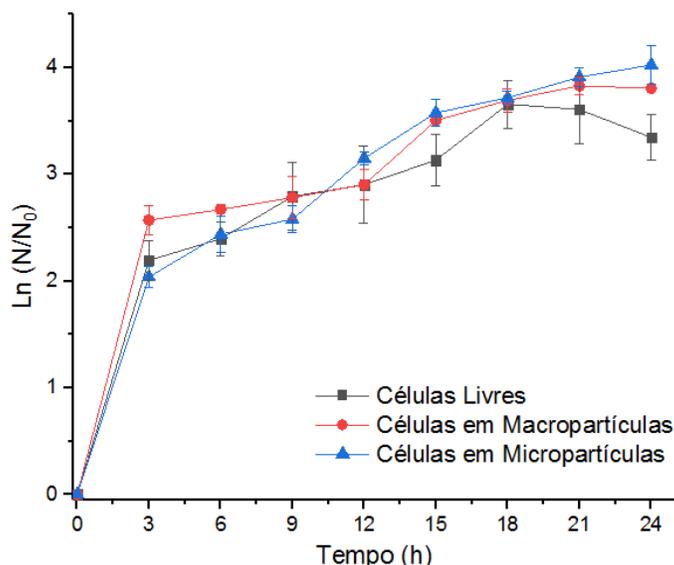


Figura 5.8: Perfis de crescimento de células livres e imobilizadas em macro e micropartículas, que o número de células (N) foi normalizado em função do número inicial de células (N/N_0). A concentração inicial de células para as três formas de cultivo foi de 10^7 cel mL⁻¹ e as barras de erro representam o erro padrão de triplicatas independentes.

A análise de crescimento microbiano apresentado na Figura 5.8, mostra que as células imobilizadas pela técnica microfluídica têm o mesmo perfil de crescimento que as outras formas de cultivo. Ainda assim, as velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para cada tipo de cultivo foram determinados e a diferença entre as médias foi avaliada por meio de teste estatístico, como mostra a Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Comparação entre as velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) do *B. subtilis* em cultivos com células livres, imobilizadas em macro e micropartículas de alginato.

Condição de Cultivo	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)
Células Livres	0,19 ± 0,01 b
Imobilizadas em Macropartículas	0,09 ± 0,02 a
Imobilizadas em Micropartículas	0,11 ± 0,01 a

*Comparação de médias entre cada linha, onde valores com a mesma letra indica que não são significativamente diferentes, ao nível α de 5%, pelo teste de Tukey

A partir da Tabela 5.1 observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das velocidades específicas máximas de crescimento entre os cultivos com células imobilizadas em macro e micropartículas de alginato, sendo de $0,09 \pm 0,02$ e $0,11 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Por outro lado, no cultivo com células livres os substratos estão mais acessíveis para consumo, se comparado com as células imobilizadas, o que pode ter resultado numa maior velocidade específica máxima de crescimento ($0,19 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$). Apesar disso, ao analisar o perfil de crescimento nesta forma de cultivo, nota-se que houve um declínio no número de células após 18 h que aponta para início da fase de morte celular (Figura 5.8). Tal fato pode estar relacionado à exposição ao cisalhamento do meio, podendo levar à morte celular (ZHU, 2007).

Por outro lado, nas condições de cultivo com células imobilizadas em micropartículas o crescimento celular se manteve até 24 h, enquanto que o perfil de crescimento em macropartículas foi até 18 h (Figura 5.8). Este comportamento pode ser atribuído à diferença em tamanhos entre as partículas de alginato, em que as micropartículas apresentaram um diâmetro médio de $68,35 \pm 3,27 \mu\text{m}$ e CV 4,78%, enquanto que as macropartículas tiveram um diâmetro de $3,17 \pm 0,46 \text{ mm}$ com um CV de 14,62%. A influência destes fatores ao desempenho celular se deve à relação direta com o transporte de nutrientes para o centro das partículas e, além disso, a limitação de transferência de matérias pode causar um acúmulo de metabólitos tóxicos no interior deste microambiente e afetar a viabilidade celular (RATHORE et al., 2013).

Desta forma, as células imobilizadas em partículas monodispersas e de tamanhos micrométricos (micropartículas) tiveram melhores respostas de crescimento. Sendo assim, o cultivo com células imobilizadas em micropartículas de alginato, usando microfluídica de gotas, pode levar a uma melhor atividade celular e conseqüentemente a uma maior obtenção de produtos associados ao crescimento do que na condição em células usando macropartículas.

3.4 Produção de lipase por células livres e imobilizadas

Considerando que as formas de cultivo com células livres e imobilizadas apresentam condições para o crescimento microbiano, estas foram avaliadas quanto ao potencial de obtenção de produto associado ao crescimento. Assim, os modos de

cultivos com células imobilizadas em macropartículas e micropartículas de alginato foram avaliados como estratégia para aumentar a produção de lipase, tendo o cultivo com células livres como referencial.

O interesse em investigar métodos de aumentar a produtividade de enzima lipase produzida por *Bacillus subtilis* se deve as suas propriedades de estabilidade térmica e ótima atividade enzimática em valores de pH alcalino (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). No processo de obtenção desta enzima é usado um substrato lipídico que induz a produção de lipase, a qual desempenha a função de quebrar o triglicerídeo em glicerol e ácidos graxos para dar condições para o crescimento celular (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004).

Neste estudo foi usado como fonte de carbono o óleo de milho que possui uma alta estabilidade físico-química, dada pelo baixo índice de acidez ($0,15 \pm 0,01$ NaOH mg g⁻¹). Sendo assim, as atividades enzimáticas e específicas nestas três condições cultivo foram analisadas ao longo do tempo, como apresenta a Figura 5.9.

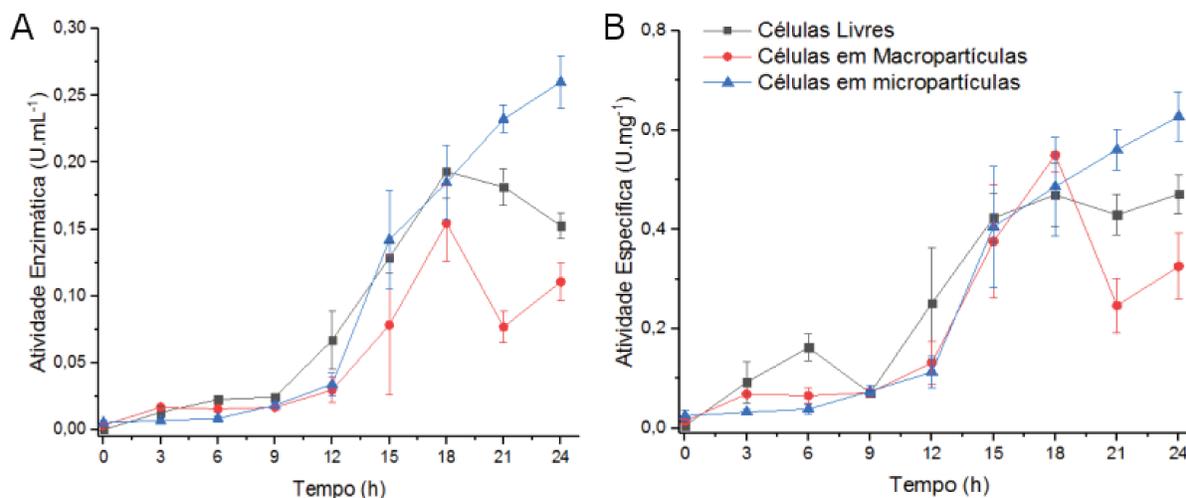


Figura 5.9: Cultivo submerso de *Bacillus subtilis* para produção de lipase nas condições de células livres, imobilizadas em macropartículas (técnica de gotejamento) e imobilizadas em micropartículas (técnica microfluídica): A) comparação da atividade enzimática entre as três formas de cultivo; B) atividade específica relativa à produção de lipase. Os ensaios foram realizados em triplicata, numa condição de agitação a 37°C, sendo avaliada a produção de lipase ao longo de 24 h. As barras indicam o desvio padrão da média entre as amostras.

Os resultados apresentados na Figura 5.9 A;B mostram que, ao comparar as três formas de cultivo é possível observar que, nos tempos finais de cultivo, a produção de lipase por células imobilizadas em micropartículas chega a superar o processo com células livres. Avaliando a produção máxima de lipase em cada condição

de cultivo, nota-se que no cultivo de células imobilizadas em micropartículas, a produção máxima foi em 24 h com uma atividade enzimática de $0,26 \pm 0,02 \text{ U mL}^{-1}$, tendo uma taxa de atividade específica, $0,63 \pm 0,05 \text{ U mg}^{-1}$. Enquanto que no cultivo com células livres e imobilizadas em macropartículas, a produção máxima de lipase em ambas foi em 18 h, com atividades enzimáticas de $0,19 \pm 0,02$ e $0,13 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$ e atividade específica de $0,47 \pm 0,06$ e $0,55 \pm 0,04 \text{ U.mg}^{-1}$, respectivamente (Figura 5.8 A;B). Desta forma, a atividade enzimática de lipase nas três formas de cultivo foi comparada nos tempos de 18 e 24 h, como mostra a Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Comparação entre a produção de lipase nos tempos de 18 e 24 h, dado em atividade enzimática (U mL^{-1}), por *Bacillus subtilis* NRRL B 14819 nas condições de células livres, imobilizadas em macro e micropartículas de alginato.

Condição de Cultivo	Atividade enzimática em 18 h (U.mL^{-1})	Atividade enzimática em 24 h (U.mL^{-1})
Células Livres	$0,19 \pm 0,02 \text{ b}^*$	$0,15 \pm 0,01 \text{ b}$
Imobilizadas em Macropartículas	$0,13 \pm 0,01 \text{ a}$	$0,11 \pm 0,01 \text{ a}$
Imobilizadas em Micropartículas	$0,18 \pm 0,03 \text{ a,b}$	$0,26 \pm 0,02 \text{ c}$

*Comparação de médias entre cada coluna, onde valores com a mesma letra indica que não são significativamente diferentes, ao nível α de 5%, pelo teste de Tukey.

Como pode ser observada na Tabela 5.2, a produção de lipase em 18 h não há uma diferença estatisticamente significativa comparando as condições de células livres e imobilizadas em micropartículas, e entre células imobilizadas entre micro e macropartículas de alginato, sendo diferente apenas quanto ao cultivo com células livres e em macropartículas. No entanto, em 24 h há uma diferença estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$) na produção de lipase entre todas as formas de cultivo, em que na condição de células imobilizadas em micropartículas de alginato esta produção chega a ser 1,7 vezes maior do que o cultivo com células livres. Tal diferença pode ser sugerida pelo melhor desempenho celular observado no cultivo com células imobilizadas em micropartículas, as quais se mantêm ativas até o tempo de 24 h, o que pode sugerir um consumo mais lento e constante dos substratos. Por outro lado, as células livres entram em fase de declínio em 18 h de cultivo devido a disponibilidade de substrato desde o início do cultivo (Figura 5.8).

A presença de células livres no cultivo com células imobilizadas em micropartículas, dado pelo escape de células observado no estudo com o

microbiorreator (Capítulo 4, seção 3.3), pode estar influenciando no consumo gradual de substrato. Estas células livres tem a produção de lipase estimulada mais facilmente do que as imobilizadas pela disponibilidade dos triglicerídeos (substrato que induz a produção enzimática). Assim, a lipase produzida pelas células livres leva à quebra deste composto em ácidos graxos e gliceróis que estimula o crescimento celular e conseqüentemente a produção de lipase.

Além de gerar uma diferença na produção enzimática, o metabolismo celular pode provocar mudanças físico-químicas no meio reacional, sendo que o fator pH pode ter um efeito direto na produção de lipase. Desta forma, a produção de lipase em função do número de células e as variações de pH resultantes de cada forma de cultivo foram analisadas ao longo do tempo (Figura 5.10).

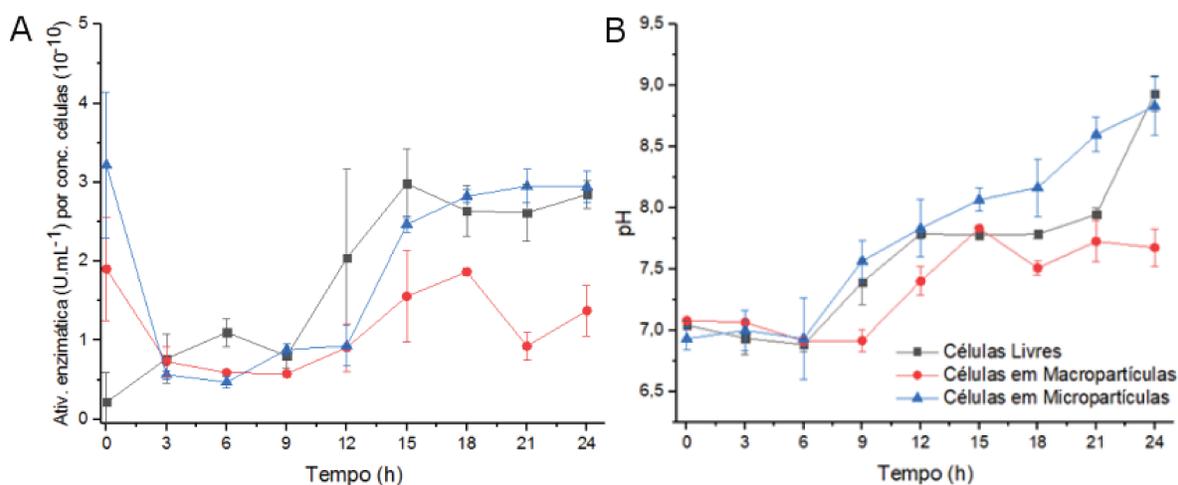


Figura 5.10: Efeito da concentração celular nas respostas de produção enzimática nos cultivos com células livres, imobilizadas em macropartículas e em micropartículas de alginato): A) análise de atividade enzimática (U.mL⁻¹) por concentração de células; B) variação de pH ao longo do tempo.

Ao avaliar a produção de lipase por número de células e a variação de pH ao longo do tempo (Figura 5.10 A;B), nota-se que as três formas de cultivo apresentam a mesma tendência, tendo uma menor diferença entre os cultivos com células livres e imobilizadas em micropartículas. Isso mostra que o processo de imobilização utilizando a técnica de microfluídica, não afetou o metabolismo celular e provavelmente não houve limitação de transferência de massa, haja vista que o desempenho celular e as alterações no meio reacional foram similares com o cultivo de células livres. Desta forma, o tamanho das micropartículas geradas pela tecnologia microfluídica, permitiu a geração de um microambiente, que permite o crescimento e produção de lipase por

períodos superiores, sem gerar limitações de transferência de massa. Sendo assim, a tecnologia de imobilização de células em micropartículas de alginato, por microfluídica de gotas, pode ser uma estratégia para, de fato, aumentar a produção de lipase.

Em trabalhos que buscam o aumento da produção de lipase por *Bacillus subtilis*, o foco de otimização é principalmente na determinação de condições ótimas para o cultivo, variando a temperatura, pH e composição de nutrientes, estando as células num estado livre. Nos estudos de Esmaeili *et al.* (2015) a produção máxima de lipase foi em 48 h a 43 °C (3,16 U.mL⁻¹), tendo óleo de milho como fonte de carbono. No entanto, a produção de lipase pode ser otimizada a depender da faixa de temperatura, pH e tipo de substrato no qual as células são cultivadas. Assim, a determinação das condições ótimas de cultivo pode resultar num processo mais produtivo.

Diante disso, a produtividade de lipase por *Bacillus subtilis* pode ser ainda maior se estas estratégias de otimização de condições de cultivo forem aplicadas ao modo de cultivo com células imobilizadas em micropartículas de alginato, produzidas em tecnologia microfluídica. Haja vista que a produtividade de lipase por células imobilizadas em micropartículas de alginato teve um desempenho superior ao cultivo com células livres. Portanto, a combinação desta tecnologia à estudos de otimização das condições de cultivo podem resultar num processo altamente promissor para aplicações industriais e em diversos segmentos biotecnológicos.

4 CONCLUSÃO

A construção de plataforma microfluídica de gotas usando a geometria em fluxo cruzado em junção T tem sido pouco reportada na literatura. Apesar de esta geometria ser mais limitada em termos de diversidade em configurações de paralelização ou empilhamento, a estratégia de microcanais em módulos paralelos apresentada neste trabalho permitiu a geração de gotas com as mesmas características de diâmetro e variação de tamanhos em ambos os módulos geradores de gotas.

Em comparação com o sistema simples de geração de gotas, a plataforma microfluídica em módulo duplo teve o mesmo perfil de formação de gotas, bem como a distribuição de tamanhos. Além disso, em termos de produtividade, dada pela

frequência de gotas geradas por segundos (Hz), a plataforma microfluídica teve um desempenho até 4 vezes maior do que o sistema simples.

Embora haja uma diferença de distância dos microcanais da fase dispersa, a resistência causada por este fator não afetou no processo de produção de micropartículas de alginato. Para contornar esta possível limitação, deve-se inserir as soluções mais viscosas nos canais mais curtos a fim de minimizar o efeito de resistência de fluidos.

Assim, esta plataforma mostrou-se eficaz para o processo de imobilização de células microbianas em micropartículas de alginato, sendo que a produtividade de micropartículas geradas neste sistema foi de 100 Hz, viabilizando assim o emprego destas micropartículas para imobilização de células e investigá-las em cultivo submerso.

Desta forma, células de *Bacillus subtilis* NRRL B 14819 imobilizadas em micropartículas de alginato foram cultivadas em batelada e comparadas as suas respostas de crescimento e produção de lipase com cultivos nas formas livres e imobilizadas por técnicas convencionais. Nestes ensaios, notou-se que as células imobilizadas em micropartículas tiveram um maior tempo de atividade celular do que as outras condições, possivelmente em razão da proteção celular. Em razão disso, a produção de lipase foi maior do que nas outras duas formas de cultivo.

Portanto, a produtividade de lipase usando células de *Bacillus subtilis* imobilizadas em micropartículas de alginato apresentou resultados superiores à condição de células livres. Embora o escape de células neste tipo de cultivo possa dificultar no processo de separação do produto, a estratégia pode ser empregada para manter um crescimento gradual e aumentar a produtividade de um produto de interesse. Desta forma, a tecnologia microfluídica de imobilização pode de fato contribuir para aplicações em bioprocessos visando o aumento de produtividade de enzimas ou outros metabólitos de interesse comercial.

REFERÊNCIAS

- CONCHOUSO, D. et al. Three-dimensional parallelization of microfluidic droplet generators for a litre per hour volume production of single emulsions. **Lab on a chip**, v. 14, n. 16, p. 3011–20, 2014.
- ESMAEILI, M. et al. A central composite design for the optimizing lipase and protease

- production from *Bacillus subtilis* PTCC 1720. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 349–354, 2015.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763–81, jun. 2004.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, jun. 2006.
- HOLTZE, C. Large-scale droplet production in microfluidic devices—an industrial perspective. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 46, n. 11, p. 114008, 20 mar. 2013.
- NAJAH, M. et al. Droplet-Based Microfluidics Platform for Ultra-High-Throughput Bioprospecting of Cellulolytic Microorganisms. **Chemistry & Biology resource**, v. 21, p. 1722–1732, 2014.
- NISISAKO, T.; TORII, T. Microfluidic large-scale integration on a chip for mass production of monodisperse droplets and particles. **Lab on a chip**, v. 8, n. 2, p. 287–93, fev. 2008.
- PARK, J. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 4, p. 303–19, jul. 2000.
- RADOVICH, J. M. Mass transfer effects in fermentations using immobilized whole cells. **Enzyme Microb. Technol**, p. 2–10, 1985.
- RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 369–381, 2013.
- ROMANOWSKY, M.; ABATE, A. R.; WEITZ, D. A. **Scale-up of flow-focusing microfluidic devices**, 2013.
- SJOSTROM, S. L. et al. High-throughput screening for industrial enzyme production hosts by droplet microfluidics †. **Lab on a chip**, v. 14, n. 14, p. 806–813, 2014.
- TENDULKAR, S. et al. A three-dimensional microfluidic approach to scaling up microencapsulation of cells. **Biomedical microdevices**, v. 14, p. 461–469, 2012.
- ZHU, Y. Chapter 14 . Immobilized Cell Fermentation for Production of Chemicals and Fuels. In: YANG, S.-T. (Ed.). . **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2007. p. 373–396.

CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos resultados obtidos, do presente trabalho que visou o emprego de tecnologia microfluídica para imobilização celular em micropartículas de alginato como uma estratégia para aumento de produtividade enzimática em bioprocessos, concluiu-se que:

- Em microfluídica de gotas, as estruturas dos microcanais e a composição da fase contínua são fatores que afetam diretamente na geração de gotas estáveis dentro dos microcanais.
- Para geração de micropartículas de alginato em microfluídica de gotas, o processo de gelificação interna pelo método CLEX favoreceu a formação de micropartículas homogêneas e esféricas, tendo a sua estabilidade física garantida após subseqüentes etapas de lavagens para remoção de resíduos de sais.
- O processo de gelificação interna de alginato e o efeito de quebra de gotas em microcanais não afetou a viabilidade celular. A imobilização de células bacterianas em micropartículas de alginato foi mais eficiente ao empregar vazões de valores mais baixos para fase contínua e dispersa ($Q_C = 4$ e $Q_D = 0,4 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$).
- A capacidade de crescimento e a dinâmica celular no interior de micropartículas de alginato, imobilizadas por via microfluídica, puderam ser monitoradas ao longo do tempo em microbiorreator com operação de modo contínuo. O crescimento de células no interior das micropartículas confirma a eficiência deste modo de imobilização para cultivo de células.
- A viabilidade de usar estas células imobilizadas em micropartículas de alginato foi confirmada em cultivo submerso de baixo volume diante da condição de crescimento celular. Além disso, o cultivo com células imobilizadas em

micropartículas indicou um aumento de produção enzimática em comparação com células livres, apontando para uma aplicação potencial desta estratégia de cultivo em escala de maior volume.

- Para aumentar a produtividade de micropartículas de alginato, diferentes estratégias de configuração de microcanais foram exploradas, resultando numa plataforma microfluídica em módulo duplo. Esta plataforma apresentou um desempenho de produtividade de até 4 vezes mais do que o sistema gerador de gotas simples, tornando viável o emprego destas micropartículas em cultivo submerso.
- O cultivo submerso de *Bacillus subtilis* imobilizado em micropartículas de alginato por plataforma microfluídica de gota apresentou condições para o crescimento microbiano, num tempo de 24 h de ensaio. No entanto, apresentou uma produtividade enzimática de lipase maior do que as condições de células livres e imobilizadas por técnica convencional.
- Diante disso, a tecnologia microfluídica como ferramenta para imobilização de células em micropartículas de alginato e também como microbiorreator para investigar o crescimento microbiano, pode contribuir para os processos biotecnológicos visando o aumento de produtividade de produtos de interesse.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade de pesquisas envolvendo a aplicação dos sistemas microfluídicos, das micropartículas de alginato, bem como a produtividade de lipase obtida neste estudo, sugere-se:

- Avaliar a possibilidade de emprego do sistema microfluídico de gotas em junção T com canais estruturados para produção de outras micropartículas poliméricas.
- Utilizar as micropartículas de alginato para encapsulação de outros micro-organismos visando a produtividade de diferentes metabólitos de interesse, inclusive com alto valor agregado.
- Empregar sistemas de sensores para medir densidade óptica no microbiorreator a fim de determinar a concentração celular e/ou produção de metabólitos.
- Aumentar o potencial da plataforma microfluídica geradora de gotas por meio da paralelização desta configuração de sistema.
- Buscar novas condições de cultivo, como meio de cultura, pH, temperatura que otimize ainda mais a produção de lipase usando *Bacillus subtilis* encapsulado em micropartículas de alginato.
- Com uma visão geral, estas tecnologias microfluídicas podem contribuir ainda para produção de biomoléculas de alto interesse industrial e aplicados em diversas áreas.

PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

Com o resultado dos estudos realizados durante esse projeto de pesquisa, a relevância científica de sistemas microfluídicos para a área de bioprocessos gerou a publicação de um artigo de revisão na revista *Biotechnology Progress*, intitulado de *Microfluidic Tools Toward Industrial Biotechnology* (Oliveira *et al.*, 2016) (ANEXO B). Além disso, os estudos de formação de gotas em sistemas microfluídicos utilizando óleo de milho resultaram numa extensão deste projeto de pesquisa em colaboração com o Laboratório de Microfabricação (LNNano, CNPEM). Desta colaboração foi publicado um artigo na revista *Analytica Chimica Acta*, com o título *High adhesion strength and hybrid irreversible/reversible full-PDMS microfluidic chips* sobre a construção de um sistema microfluídico híbrido com aplicação para produção de gotas (Shiroma *et al.*, 2017) (ANEXO C).

Além disso, os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste projeto de pesquisa foram apresentados em congressos nacional e internacional. Os resultados obtidos na primeira foram apresentados no *International Conference on Chemical and Biochemical Engineering*, em 2015, realizado em Paris – França (ANEXO D). Nesta mesma ocasião, foi realizado uma visita ao *Laboratoire d'Hydrodynamique* (LadHyX) da École Polytechnique, sob a direção do Professor Charles Baroud, onde foi possível conhecer as instalações e realizar discussões com o grupo de pesquisa que atua com microfluídica de gotas (ANEXO E). Além disso, foram apresentados trabalhos no Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2016 (ANEXO F); XV B-MRS Meeting - SBPMat 2016 (ANEXO G), VI e VII Workshop de Microfluídica (ANEXO H e I) e 3rd Latin-America Symposium on Microencapsulation (ANEXO J).

E ainda, como uma atividade em conjunto com o grupo de pesquisa LanBda, supervisionada pela Profa. Dra. Lucimara Gaziola de la Torre, a aluna participou da escrita de um capítulo do livro *Biopolymer-Based Composites: drug delivery and biomedical applications*, intitulado de *Biopolymers for gene delivery applications*, que foi publicado pela Elsevier em 2017 (ANEXO K).

REFERÊNCIAS GERAIS

- ABEILLE, F. et al. Continuous microcarrier-based cell culture in a benchtop microfluidic bioreactor. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 18, p. 3510, 2014.
- ADINARAYANA, K.; JYOTHI, B.; ELLAIAH, P. Production of alkaline protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 3, p. E391–E397, jan. 2005.
- AHMED, E. H.; RAGHAVENDRA, T.; MADAMWAR, D. A thermostable alkaline lipase from a local isolate *Bacillus subtilis* EH 37: characterization, partial purification, and application in organic synthesis. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, n. 7, p. 2102–13, abr. 2010.
- ANWAR, A. et al. Calcium Alginate : A Support Material for Immobilization of Proteases from Newly Isolated Strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. **World Applied Sciences Journal**, v. 7, n. 10, p. 1281–1286, 2009.
- BALAGADDÉ, F. K. et al. Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 137–40, 1 jul. 2005.
- BARET, J.-C. Surfactants in droplet-based microfluidics. **Lab Chip**, v. 12, n. 3, p. 422, 2012.
- BAROUD, C. N.; GALLAIRE, F.; DANGLA, R. Dynamics of microfluidic droplets. **Lab on a chip**, v. 10, p. 2032–2045, 2010.
- BASSETT, D. C. et al. Competitive ligand exchange of crosslinking ions for ionotropic hydrogel formation. **J. Mater. Chem. B**, v. 4, n. 37, p. 6175–6182, 2016.
- BRÁS, E. J. S. et al. A microfluidic platform for physical entrapment of yeast cells with continuous production of invertase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 334–341, 2017.
- BRASCHLER, T. et al. Gentle cell trapping and release on a microfluidic chip by in situ alginate hydrogel formation. **Lab on a chip**, v. 5, n. 5, p. 553–9, 2005.
- CASSIDY, M. B.; LEE, H.; TREVORS, J. . Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. **Journal of Industrial Microbiology**, n. 16, p. 79–101, 1996.
- CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 2, p. 176–187, 2006.
- CHEN, W. et al. Microfluidic one-step synthesis of alginate microspheres immobilized with antibodies. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 10, n. 88, p. 20130566, 2013.
- CHOI, C.-H. et al. Generation of monodisperse alginate microbeads and in situ encapsulation of cell in microfluidic device. **Biomedical microdevices**, v. 9, n. 6, p. 855–62, dez. 2007.
- CHOI, J.; HAN, S.; KIM, H. Industrial applications of enzyme biocatalysis : Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, 2015.
- CHRISTOPHER, G. F.; ANNA, S. L. Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 40, n. 19, p. R319–R336, 7 out. 2007.
- CLAUSELL-TORMOS, J. et al. Droplet-Based Microfluidic Platforms for the Encapsulation and

- Screening of Mammalian Cells and Multicellular Organisms. **Chemistry and Biology**, v. 15, n. 5, p. 427–437, 2008.
- CONCHOUSO, D. et al. Three-dimensional parallelization of microfluidic droplet generators for a litre per hour volume production of single emulsions. **Lab on a chip**, v. 14, n. 16, p. 3011–20, 2014.
- DE MENECH, M. et al. Transition from squeezing to dripping in a microfluidic T-shaped junction. **Journal of Fluid Mechanics**, v. 595, n. 2008, p. 141–161, 2008.
- DONATI, I.; PAOLETTI, S. Material properties of alginate. In: REHM, B. H. A. (Ed.). . **Alginates : Biology and Applications**. Munster, Germany: Springer US, 2009. p. 1–54.
- DUFFY, D.; MCDONALD, J. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). **Analytical Chemical**, v. 70, n. 23, p. 4974–4984, 1998.
- EDLICH, A. et al. Microfluidic reactor for continuous cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology progress**, v. 26, n. 5, p. 1259–70, 2010.
- ELLEUCHE, S. et al. Extremozymes — biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. **Current opinion in biotechnology**, v. 29, p. 116–123, 2014.
- ESMAEILI, M. et al. A central composite design for the optimizing lipase and protease production from *Bacillus subtilis* PTCC 1720. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 349–354, 2015.
- EUN, Y. et al. Encapsulating Bacteria in Agarose Microparticles Using. **ACS Chemical Biology**, v. 6, n. 3, p. 260–266, 2011.
- GARSTECKI, P. et al. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction-scaling and mechanism of break-up. **Lab on a chip**, v. 6, n. 3, p. 437–446, 2006.
- GUO, M. T. et al. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. **Lab on a chip**, v. 12, n. 12, p. 2146–55, 21 jun. 2012.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763–81, jun. 2004.
- HAN, T. et al. Factory-on-chip : Modularised microfluidic reactors for continuous mass production of functional materials. **Chemical Engineering Journal**, v. 326, p. 765–773, 2017.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, jun. 2006.
- HÂTI, A. G. et al. Microarrays for the study of compartmentalized microorganisms in alginate microbeads and. **Lab on a chip**, v. 6, p. 114830–114842, 2016.
- HÂTI, A. G. et al. Versatile, cell and chip friendly method to gel alginate in microfluidic devices. **Lab on a chip**, v. 16, n. 19, p. 3718–3727, 2016.
- HIRAMA, H. et al. Hyper alginate gel microbead formation by molecular diffusion at the hydrogel/droplet interface. **Langmuir**, v. 29, n. 2, p. 519–524, 2013.
- HOLTZE, C. et al. Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. **Lab on a Chip**, v. 8, n. 10, p. 1632, 2008.
- HOLTZE, C. Large-scale droplet production in microfluidic devices—an industrial perspective. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 46, n. 11, p. 114008, 20 mar. 2013.
- HUEBNER, A. et al. Quantitative detection of protein expression in single cells using droplet microfluidics. **Chemical communications**, v. 2, n. 12, p. 1218–20, 28 mar. 2007.

- HUEBNER, A. et al. Static microdroplet arrays: a microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays. **Lab Chip**, v. 9, n. 5, p. 692–698, 2009.
- JAEGER, K.-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390–397, ago. 2002.
- JAEGER, K.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, 1998.
- JIANG, X. et al. A general method for patterning gradients of biomolecules on surfaces using microfluidic networks. **Analytical chemistry**, v. 77, n. 8, p. 2338–47, 15 abr. 2005.
- KIM, M. et al. Rapid and accurate generation of various concentration gradients using polydimethylsiloxane-sealed hydrogel device. **Microfluid**, v. 16, n. 4, p. 645–654, 2014.
- KINTSES, B. et al. Microfluidic droplets: new integrated workflows for biological experiments. **Current opinion in chemical biology**, v. 14, n. 5, p. 548–55, out. 2010.
- KONSOULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules α -amylase from *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 343–349, fev. 2006.
- KÖSTER, S. et al. Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells. **Lab on a chip**, v. 8, n. 7, p. 1110–5, jul. 2008.
- KRENKOVÁ, J.; FORET, F. Immobilized microfluidic enzymatic reactors. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21–22, p. 3550–63, nov. 2004.
- LINDSAY, D. et al. Physiology of dairy-associated *Bacillus* spp. over a wide pH range. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, n. 1–2, p. 49–62, mar. 2000.
- MADRIGAL, J. L. et al. Microfluidic generation of alginate microgels for the controlled delivery of lentivectors. **J. Mater. Chem. B**, v. 4, n. 43, p. 6989–6999, 2016.
- MANJANNA, K. M.; SHIVAKUMAR, B.; KUMAR, T. M. Microencapsulation: An Acclaimed Novel Drug-Delivery System for NSAIDs in Arthritis. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 27, n. 6, p. 509–545, 2010.
- MANZ, A. et al. Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology. **Sensor and Actuators**, v. 1, n. 1, p. 249–255, 1990.
- MARRE, S.; JENSEN, K. F. Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 3, p. 1183, 2010.
- MAZUTIS, L. et al. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. **Nat. Protocols**, v. 8, n. 5, p. 870–891, 2013.
- MAZUTIS, L.; VASILIAUSKAS, R.; WEITZ, D. A. Microfluidic Production of Alginate Hydrogel Particles for Antibody Encapsulation and Release. **Macromolecular Bioscience**, v. 15, n. 12, p. 1641–1646, 2015.
- MAZZITELLI, S. et al. Encapsulation of eukaryotic cells in alginate microparticles: cell signaling by TNF- α through capsular structure of cystic fibrosis cells. **Journal of cell communication and signaling**, v. 5, n. 2, p. 157–65, jun. 2011.
- MCCLEMENTS, D. J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 47, n. 7, p. 611–649, 2007.
- MØRCH, Y. A. et al. Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on alginate microbeads. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 5, p. 1471–1480, 2006.

- NAJAH, M. et al. Droplet-Based Microfluidics Platform for Ultra-High-Throughput Bioprospecting of Cellulolytic Microorganisms. **Chemistry & Biology resource**, v. 21, p. 1722–1732, 2014.
- NIE, Z. et al. Emulsification in a microfluidic flow-focusing device: Effect of the viscosities of the liquids. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 5, n. 5, p. 585–594, 2008.
- NISISAKO, T.; OKUSHIMA, S.; TORII, T. Controlled formulation of monodisperse double emulsions in a multiple-phase microfluidic system. **Soft Matter**, v. 1, n. 1, p. 23, 2005.
- NISISAKO, T.; TORII, T. Microfluidic large-scale integration on a chip for mass production of monodisperse droplets and particles. **Lab on a chip**, v. 8, n. 2, p. 287–93, fev. 2008
- OLIVEIRA, A. F. et al. Cultivation of yeast in diffusion-based microfluidic device. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, n. 2016, p. 288–295, 2016a.
- OLIVEIRA, A. F. et al. Microfluidic tools toward industrial biotechnology. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 6, p. 1372–1389, 2016b.
- PARK, J. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 4, p. 303–19, jul. 2000.
- PONCELET, D. et al. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. II. Physicochemistry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 644–650, 1995.
- RADOVICH, J. M. Mass transfer effects in fermentations using immobilized whole cells. **Enzyme Microb. Technol**, p. 2–10, 1985.
- RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 369–381, 2013.
- REIS, C. P. et al. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 3, p. 245–257, 2006.
- ROMANOWSKY, M.; ABATE, A. R.; WEITZ, D. A. **Scale-up of flow-focusing microfluidic devices**, 2013.
- SCHÄPPER, D. et al. Application of microbioreactors in fermentation process development: a review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 395, n. 3, p. 679–95, out. 2009.
- SCHÄPPER, D. et al. Development of a single-use microbioreactor for cultivation of microorganisms. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, n. 3, p. 891–898, jun. 2010.
- SHARMA, R. et al. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 1075–1084, maio 2002.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, C. U. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology advances**, v. 19, n. 1, p. 627–662, 2001.
- SJOSTROM, S. L. et al. High-throughput screening for industrial enzyme production hosts by droplet microfluidics †. **Lab on a chip**, v. 14, n. 14, p. 806–813, 2014.
- SMIDSROD, O. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. **Faraday Discussions of the Chemical Society**, v. 57, p. 263, 1974.
- SOMMER, G. J. et al. Introduction to Microfluidics. In: TIAN, W.-C.; FINEHOUT, E. (Eds.). . **Microfluidics for Biological Applications**. New York: Springer Science & Business Media, 2009. p. 1–29.
- SONG, P. et al. Two-stage oxygen supply strategy for enhanced lipase production by *Bacillus subtilis* based on metabolic flux analysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 71, p. 1–10,

- fev. 2013.
- SUN, B. J. et al. Microfluidic melt emulsification for encapsulation and release of actives. **ACS applied materials & interfaces**, v. 2, n. 12, p. 3411–6, dez. 2010.
- TAN, W.-H.; TAKEUCHI, S. Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation. **Advanced Materials**, v. 19, n. 18, p. 2696–2701, 17 set. 2007.
- TEH, S.-Y. et al. Droplet microfluidics. **Lab on a chip**, v. 8, n. 2, p. 198–220, fev. 2008.
- TENDULKAR, S. et al. A three-dimensional microfluidic approach to scaling up microencapsulation of cells. **Biomedical microdevices**, v. 14, p. 461–469, 2012.
- UTECH, S. et al. Microfluidic Generation of Monodisperse, Structurally Homogeneous Alginate Microgels for Cell Encapsulation and 3D Cell Culture. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, n. 11, p. 1628–1633, 2015.
- WEHKING, J. D. et al. Effects of viscosity , interfacial tension , and flow geometry on droplet formation in a microfluidic T-junction. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 16, n. 2014, p. 441–453, 2014.
- WEIBEL, D. B.; WHITESIDES, G. M. Applications of microfluidics in chemical biology. **Current opinion in chemical biology**, v. 10, n. 6, p. 584–591, 2006.
- WESTMAN, J. O. et al. Effects of encapsulation of microorganisms on product formation during microbial fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1441–1454, 2012.
- WHITESIDES, G. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. July, 2006.
- WOODWARD, J. Methods of immobilization of microbial cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 8, p. 91–102, 1988.
- XU, S. et al. Generation of monodisperse particles by using microfluidics: Control over size, shape, and composition. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 5, p. 724–728, 2005.
- YOUTSUYANAGI, T. et al. Acid-induced and calcium-induced gelation of alginate bead for swelling. **chemical pharmaceutical**, v. 4, n. 39, p. 1072–1074, 1991.
- ZHANG, Z. et al. Microchemostat-microbial continuous culture in a polymer-based, instrumented microbioreactor. **Lab on a chip**, v. 6, n. 7, p. 906–13, jul. 2006.
- ZHU, Y. Chapter 14 . Immobilized Cell Fermentation for Production of Chemicals and Fuels. In: YANG, S.-T. (Ed.). . **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2007. p. 373–396.

ANEXOS

ANEXO A

Estratégias de geometrias para aumentar a produção de gotas em sistema microfluídico

A fim de aumentar a produção de gotas em sistema microfluídico foram projetadas diferentes geometrias de microcanais microfluídicos. Para isso foram propostas quatro estratégias, tendo como base os estudos realizados durante a primeira etapa deste projeto, ou seja, usando a configuração de junção T com serpentina, óleo de milho com tensoativo PGPR para gerar as gotas em microcanais. A partir disso foram projetadas as seguintes plataformas microfluídicas: (i) sistema triplo; (ii) bloco único em PDMS; (iii) sistema duplo e (iv) sistema quadruplicado nas geometrias de canais simples e estruturado, como mostra Figura 1- Anexo A.

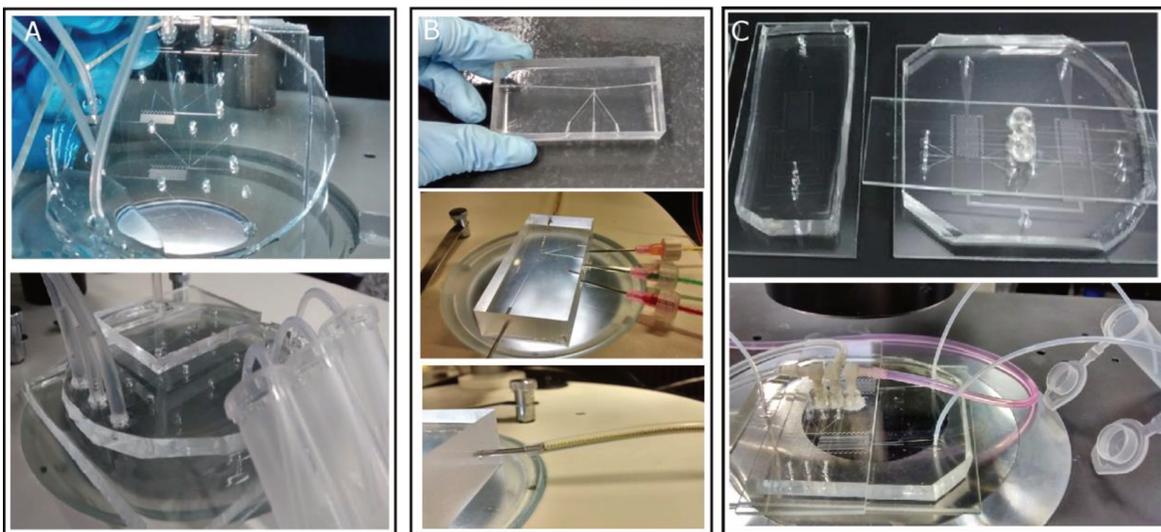


Figura 1 - Anexo A: Estratégias e geometrias de sistemas de amplificação para produção de gotas: A) plataforma microfluídica em três níveis e com três unidades, B) sistema em bloco único de PDMS para alta vazão, C) sistemas de sistema em módulos duplo e quádruplo.

No primeiro momento, foi estudado um sistema em três níveis. Neste modelo foram estruturadas três unidades de sistema microfluídico com alinhamento deslocado de modo a impedir que nenhum canal se sobrepusesse. Nesta plataforma foi observado que as gotas começavam a serem formadas em tempos diferentes e isso levou à geração de gotas em tamanhos diferentes entre os sistemas (Figura 1 A). Tal fato pode

ter sido observado devido às distâncias desiguais entre as correntes das soluções, o que gerou caminho preferencial para as soluções.

Outro modelo de aumento de produção de gotas foi estudado usando um sistema em bloco único de PDMS, que foi construído em parceria com o Laboratório de Microfabricação (LNNano, CNPEM). Nesta estratégia (Figura 1 B), a alta vazão de soluções suportada pelo sistema, sendo Q_C de $302,85 \mu\text{L min}^{-1}$ e Q_D de $10,6 \mu\text{L min}^{-1}$, gerou uma alta produção de gotas. No entanto, devido à largura dos microcanais, que foram feitos usando um molde com fio de nylon de $600 \mu\text{m}$ de espessura para o canal principal, as gotas tiveram tamanhos maiores que o desejado por este projeto. Nestas condições foram produzidas gotas com tamanho de $351,73 \pm 1,63 \mu\text{m}$ e CV de 4,65%. Além disso, a alta vazão da fase contínua poderia causar um dano às células que seriam imobilizadas.

Por fim, foram estudadas as geometrias em paralelo num único nível em módulos duplos e quádruplos (Figura 1 C). Em testes preliminares, a plataforma com quatro módulos apresentou vazamentos em função de uma segunda selagem do nível superior com o vidro, que distribuiria as soluções entre os módulos. Enquanto que a configuração em módulo duplo apresentou uma geração de gotas menores e uniformes entre as unidades de sistema microfluídicos, uma vez que foram configurados de um modo mais simples. Na plataforma de sistema duplo foram gotas com um diâmetro médio de $170,00 \pm 5,00 \mu\text{m}$ e CV de 5%.

Então, como o modelo de plataforma em módulo duplo teve um melhor desempenho, este foi reestruturado usando o protocolo de estudo estabelecido durante o estágio na Universidade de Harvard: usando o novo sistema em junção T (Figura 3.1C) óleo HFE com fluorosurfactante na fase contínua e método de gelificação interna usando CLEX para formação das micropartículas de alginato (conforme descrito no Capítulo 3 – item 2.4.2).

ANEXO B

OLIVEIRA, A. F.; PESSOA, A.C.S.N.; BASTOS, R.G.; DE LA TORRE, L. G.
 Microfluidic tools toward industrial biotechnology. *Biotechnology Progress*, v. 32, n. 6, p.
 1372–1389, 2016



Microfluidic Tools Toward Industrial Biotechnology
Aline F. Oliveira

Department of Bioprocesses and Materials Engineering, School of Chemical Engineering, University of Campinas, 500 Albert Einstein avenue, Campinas, P.O. Box 6066

Amanda C. S. N. Pessoa

Department of Bioprocesses and Materials Engineering, School of Chemical Engineering, University of Campinas, 500 Albert Einstein avenue, Campinas, P.O. Box 6066

Reinaldo G. Bastos

Department of Agroindustrial Technology and Rural Socioeconomy, Center of Agricultural Sciences, Federal University of São Carlos, Km 174 Anhanguera Highway, Araras, P.O. Box 153

Lucimara G. de la Torre

Department of Bioprocesses and Materials Engineering, School of Chemical Engineering, University of Campinas, 500 Albert Einstein avenue, Campinas, P.O. Box 6066

DOI 10.1002/tptr.2350

Published online September 21, 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

*Microfluidics is a technology that operates with small amounts of fluids and makes possible the investigation of cells, enzymes, and biomolecules and encapsulation of biocatalysts in a greater variety of conditions than permitted using conventional methods. This review discusses technological possibilities that can be applied in the field of industrial biotechnology, presenting the principal definitions and fundamental aspects of microfluidic parameters to better understand advanced approaches. Specifically, concentration gradient generators, droplet-based microfluidics, and microreactors are explored as useful tools that can contribute to industrial biotechnology. These tools present potential applications, inclusive as commercial platforms to optimizing in bioprocesses development as screening cells, encapsulating biocatalysts, and determining critical kinetic parameters. © 2016 American Institute of Chemical Engineers *Biotechnol. Prog.*, 32:1372–1389, 2016*

Keywords: microfluidics, concentration gradient generator, droplet-based, microreactor, industrial biotechnology

Introduction

Microfluidics is a versatile technological field that enables studies of dynamic conditions, and this has increased the interest in all biotechnology segments. In industrial biotechnology, which uses enzymes or microorganisms in industrial processes,¹ the possibility to employ microfluidic tools for monitoring biocatalysts in controlled microenvironments could expand the research prospects in this area. However, the research and interest for industrial applications using microfluidic systems have been extensively directed to medical biotechnology.

Unlike conventional techniques, microfluidics provides the opportunity for single or multicell analysis with high-resolution and localized experimental applications² in dynamic conditions. The proper microenvironment design in the microfluidic approach leads to understanding the fundamental biological mechanisms, such as motility, biochemical responses, interactions between cells, and biological behavior.^{3–5} Furthermore, there are several types of microfluidic

systems that allow simulating different biological and chemical environments that can idealize new analytical ways. As a result, the research in sciences as biomedical, pharmaceutical, and medical biotechnology has gone beyond the academic scope since microfluidics technology represent an advance in healthcare area through diagnostics and investigation of disease progression with fast and precise results and low cost.

In view of this, the implementation of microfluidic systems could also benefit the industrial biotechnology field. Microfluidic tools for the exploration of mammalian cell culture^{3,6} and microbial microenvironment^{7–11} have been recently reviewed. Nevertheless, to verify the impact of microfluidics on industrial biotechnology applications, we cross-compared the number of publications involving microfluidics studies of mammalian, microbial cells, and enzymes vs. microfluidics studies in general biotechnology (including all segments of this science) and industrial biotechnology (bioprocessing) fields over the last 20 years (Figure 1).

The results of our literature search reveal the increasingly important role of microfluidic technologies in biological research. Within this field, it is important to note the overwhelming focus of microfluidics research on enzymes and

Correspondence concerning this article should be addressed to Lucimara G. de la Torre at latorre@fq.unicamp.br

ANEXO C

SHIROMA, L. S.; OLIVEIRA, A.F.; LOBO-JÚNIOR, E.O.; COLTRO, W.K.T.; GOBBI, A.L.; DE LA TORRE, L. G.; LIMA, R. S. High adhesion strength and hybrid irreversible/reversible full-PDMS microfluidic chips. *Analytica Chimica Acta*, v. 951, p. 116–123, 2017.



High adhesion strength and hybrid irreversible/reversible full-PDMS microfluidic chips



Leticia S. Shiroma^{a, b}, Aline F. Oliveira^c, Eulicio O. Lobo-Júnior^d, Wendell K.T. Coltro^d, Angelo L. Gobbi^a, Lucimara G. de La Torre^c, Renato S. Lima^{a, b, *}

^a Laboratório de Microfabricação, Laboratório Nacional de Nanotecnologia, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo 13083-100, Brazil

^b Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil

^c Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil

^d Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás 74001-970, Brazil

HIGHLIGHTS

- SWB offers simple, fast, and low cost operation requiring only a laboratory oven.
- Microdevices herein described showed burst pressures of up to 4.5 MPa.
- Reversible behavior is crucial in stages of research and development.
- Chips obtained after successive detachment/bonding steps withstood high pressure.
- Emulsifications at high flow rates produced monodisperse dispersions.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 September 2016
Received in revised form
17 November 2016
Accepted 18 November 2016
Available online 25 November 2016

Keywords:
Lan-on-a-chip
Bonding
Flow rate
Droplets
Emulsion
Electrophoresis

ABSTRACT

To the best of our knowledge, this paper outlines for the first time high adhesion and hybrid irreversible/reversible microfluidic devices fully composed of polydimethylsiloxane (PDMS). These chips were fabricated by the sandwich bonding (SWB), a method that was recently deployed by our group. SWB offers simple, fast, and low cost operation requiring only a laboratory oven. The devices showed burst pressures of up to 4.5 MPa. This value is more than tenfold the pressures withstood by the full-PDMS chips described in literature. In terms of the reversible behavior, the ability for disassembling the chip slides is crucial in research and development stages, especially when the device integrates high-cost components or harsh cleaning steps are needed. Following successive steps of detachment and bonding, the channels still withstood high pressures of approximately 1.8 MPa. Finally, the emulsification of corn oil 4.0% w/w to polyglycerol polyricinoleate with 10.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ rhodamine B aqueous solution was realized to show the relevance in enhancing the flow rate in microfluidics. Such experiment was conducted at total flow rates of 0.8–160.0 $\mu\text{L min}^{-1}$. The decrease in size and polydispersity of the droplets was observed at increasing flow rates. Monodisperse emulsions were achieved only at 160.0 $\mu\text{L min}^{-1}$.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

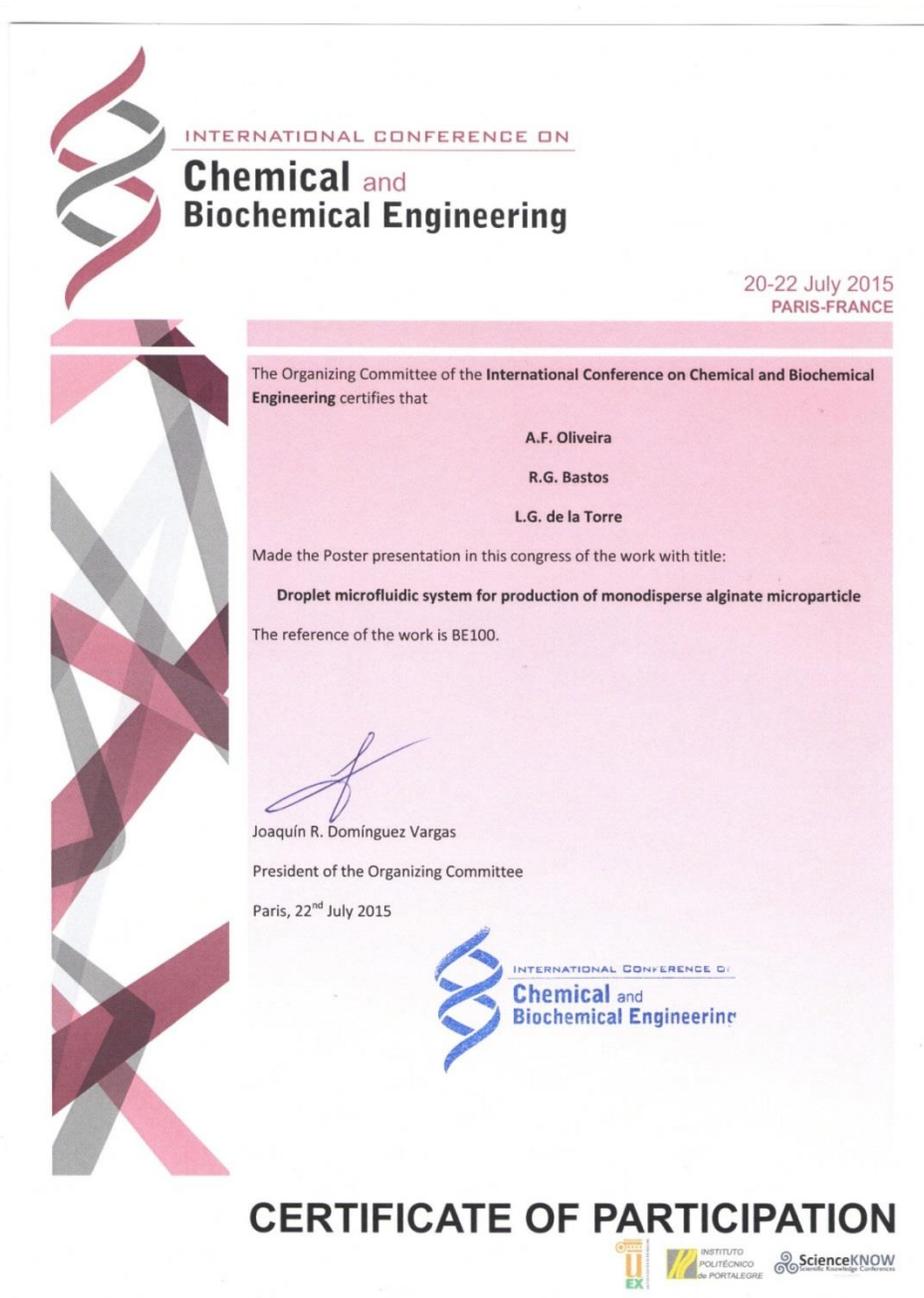
* Corresponding author. Laboratório de Microfabricação, Laboratório Nacional de Nanotecnologia, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo 13083-100, Brazil.

E-mail address: renato.lima@lnnano.cnpm.br (R.S. Lima).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.048>
0003-2670/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO D

Certificado de participação no congresso “Chemical and Biochemical Engineering”, com apresentação de trabalho em pôster com o título de “Droplet microfluidic system for production of monodisperse alginate microparticle”.



ANEXO E

Certificado de visita ao laboratório “Laboratoire d'Hydrodynamique (LadHyX)” da Ecole Polytechnique, Paris.

Charles Baroud
Laboratoire d'Hydrodynamique (LadHyX)
Ecole Polytechnique
91128 Palaiseau
France
+33.1.69.33.52.61

Paris, September 28, 2015

Ms. Aline Furtado Oliveira,
School of Chemical Engineering,
University of Campinas,
Brazil

Dear Ms. Furtado Oliveira,

This letter confirms that you visited my laboratory at Ecole Polytechnique, in the context of the collaboration with Professor Lucimara Gaziola de la Torre, whom you are working with at the University of Campinas.

Your visit was on the 17th of July and you visited the lab installations and discussed scientific subjects with the doctoral and post-doctoral researchers in my lab.

Sincerely yours,


Charles Baroud
Professeur Chargé de Cours
Ecole Polytechnique

ANEXO F

Certificado de participação no congresso COBEQ-2016 com apresentação de trabalho em pôster intitulado de “Microfluídica de gotas para imobilização de biocatalisadores para produção de lipase”.



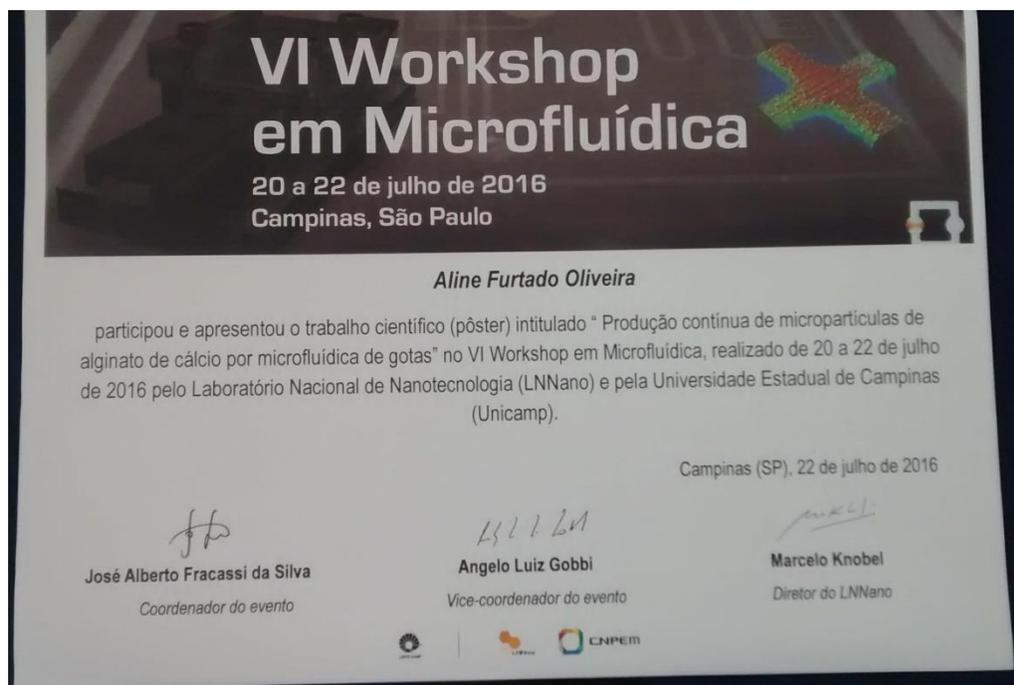
ANEXO G

Apresentação de trabalho na forma de pôster no congresso XV B-MRS Meeting - SBPMat 2016, intitulado de “Droplet microfluidics for biocatalyst immobilization in calcium alginate microparticles”



ANEXO H

Certificado de participação e apresentação de trabalho na forma de pôster no VI Workshop em Microfluídica, com o título “Produção contínua de micropartículas de alginato de cálcio por microfluídica de gotas”.



ANEXO I

Certificado de participação e apresentação de trabalho na forma de pôster no VII Workshop em Microfluídica, com o título “Effect of gelation method and microchannels structure for alginate microparticles production in microfluidics”.



**VII Workshop
em Microfluídica**
31 de Julho a 2 de Agosto de 2017
São Paulo - SP

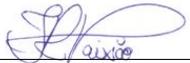
ALINE FURTADO OLIVEIRA

Apresentou Poster no VII Workshop em Microfluídica, realizado pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT) em São Paulo- SP, nos dias 31 de julho a 02 de agosto de 2017.

Titulo: EFFECT OF GELATION METHOD AND MICROCHANNELS STRUCTURE FOR ALGINATE MICROPARTICLES PRODUCTION IN MICROFLUIDICS

Autores: OLIVEIRA, ALINE FURTADO; BASTOS, REINALDO GASPAR; DE LA TORRE, LUCIMARA GAZIOLA

São Paulo, 11 de Agosto de 2017



Dr. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão
Instituto de Química-USP– São Paulo (SP)





Dr. Mário Ricardo Gongora Rubio
BioNanoManufatura – IPT – São Paulo (SP)



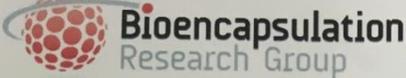


Dra. Cecília de Carvalho Castro e Silva
MackGraphe-UPM- São Paulo (SP)



ANEXO J

Certificado de participação e apresentação de trabalhos na forma de pôster no 3rd Latin-Amerin Symposium on Microencapsulation, com os títulos “Bioencapsulation process in alginate microparticles by microfluidics” e “Alginate microparticles production using microfluidics technology”.

 <p>Bioencapsulation Research Group 114 allée Paul Signac 44240 Sucé sur Erdre France Phone : +33 2 51 78 55 45 Fax : +33 2 51 78 54 67 BRG@bioencapsulation.net http://bioencapsulation.net N° Siret 410 792 154 00024</p> <p>BRG is a French non profit association. Bylaws are available on BRG web site.</p> <p>Object : 3rd Latin-America Symposium on Microencapsulation</p>	<p style="text-align: right;">MS ALINE OLIVEIRA UNIV. CAMPINAS SCHOOL OF CHEMICAL ENGINEERING ALBERT EINSTEIN ST, 500 13083-852 CAMPINAS SÃO PAULO BRAZIL</p> <p style="text-align: center;">CERTIFICATE OF ATTENDANCE</p> <p>I, undersigned, Denis Poncelet, President of Bioencapsulation Group, certify that Aline Oliveira from Univ. Campinas (Brazil) attended to the 3rd Latin-America Symposium on Microencapsulation hold in Pucon, Chile, November 27-29, 2017.</p> <p>The following contribution(s) has(ve) been selected by the scientific committee for presentation during the conference:</p> <p>P-03 Bioencapsulation process in alginate microparticles by microfluidics (Poster)</p> <p>P-12 Alginate microparticles production using microfluidics technology (Poster)</p> <p style="text-align: center;">Done in Pucon, Chile on November 27, 2017.</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: center;">Denis Poncelet President of Bioencapsulation Research Group</p>
---	---

ANEXO K

Participação na escrita de um capítulo sobre biopolímeros “Biopolymers for gene delivery applications”, no livro “Biopolymer-Based Composites: drug delivery and biomedical applications”.

de la TORRE, L. G. ; SIPOLI, C. C. ; OLIVEIRA, ALINE F. ; ES, I. ; PESSOA, AMANDA C. S. N. ; VITOR, M. T. ; VIT, F. F. ; NAVES, T. F. . Biopolymers for gene delivery applications. In: Sougata Jana, Sabyasachi Maiti, Subrata Jana. (Org.). Biopolymer-Based Composites: drug delivery and biomedical applications. 1ed. Reino Unido: Woodhead publishing, 2017, p. 289-324.

Biopolymers for gene delivery applications

10

Lucimara G. de La Torre¹, Caroline C. Sipoli^{1,2}, Aline F. Oliveira¹, Ismail Eç¹, Amanda C.S.N. Pessoa¹, Micaela T. Vitor¹, Franciele F. Vit¹, Thays F. Naves¹

¹State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; ²Federal University of Technology – Paraná (UTFPR), Apucarana, Brazil

10.1 Introduction

Over the last twenty years, advanced progresses have been made in order to understand molecular bases of genetic diseases [1]. As a result of intense studies, several techniques for gene therapy have been discovered to achieve efficient and safe delivery of genetic material into specific cells, which is considered primordial challenge in biotechnology.

The main concern in successful gene therapy as well as gene vaccine approach is the insertion of a desired copy of nucleic acid [i.e., plasmid DNA (pDNA), small interfering RNA (siRNA)] in a patient, aiming to correct or eliminate genetic defect and consequently treat the disorder [2]. However, several limiting factors are associated with gene delivery. First and foremost, the genetic material must overcome numerous extra- and intracellular barriers, reach the target cell, and trigger the desired gene expression [3] while the gene maintains its stability and efficiency. In case of using pDNA, the delivery becomes even more complicated because the genetic material must enter the cell nucleus. Therefore it is important to design vehicle systems for gene delivery that provide nucleic acids protection from enzyme digestion while accomplishing efficient transport to target sites.

The vehicle systems can be divided into two major categories: viral and nonviral vectors. Although viral vectors have been commonly applied in current gene therapy approaches because of their established mechanisms and high transfection efficiency, these systems have disadvantages involving the limited amount of genetic material they can carry, high cost of vector development, and safety concerns such as immunogenicity and potential infectivity [4–7]. Hence, nonviral gene delivery systems have provided novel possibilities of materials for designing carriers with low immunogenicity, low toxicity, and low cost of production and with the ability of transporting larger nucleic acid molecules. Nonviral vectors must be capable of interacting with nucleic acids and delivering it inside cells. In this sense, most of the nonviral vectors use cationic molecules for proper electrostatic interactions with nucleic acids. Different types of molecules and aggregates can be used as nonviral vectors. Some common examples are lipids, liposomes, and synthetic polymers and biopolymers [8–12]. The

Biopolymer-Based Composites, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-101914-4.00010-7>
Copyright © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.