MICROFLUÍDICA DE GOTAS PARA ENCAPSULAÇÃO DE BIOCATALISADORES PARA PRODUÇÃO DE LIPASE

A.F. OLIVEIRA[1], R.B.BARRETO[1], R.G. BASTOS[2], L.G. DE LA TORRE[1]

[1] Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos
[2] Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural
E-mail para contato: alinefurtado@feq.unicamp.br

RESUMO – *O objetivo deste trabalho foi empregar a microfluídica de gotas na microencapsulação de agentes biológicos. Esta técnica baseia-se no processo de emulsão, geralmente água em óleo (A/O), para obtenção de micropartículas monodispersas produzidas em microcanais, tornando-se assim atrativa para aplicações biotecnológicas. Nesse intuito, um sistema microfluídico de gotas foi construído para encapsulação de Bacillus subtilis produtor de lipase em micropartículas de alginato de cálcio. A configuração em "T" gerou a quebra das gotas de alginato (contendo em sua mistura a suspensão celular e solução de* $CaCl_2$*) por fluxo cruzado, tendo como fase contínua o óleo de milho com poliglicerol polirricinoleato (PGPR). Através do controle das vazões, foram obtidas micropartículas monodispersas (indicados pelo CV < 5%) com diâmetros na ordem de 115 µm. Portanto, esta técnica apresenta potencial para encapsulação de biocatalisadores, constituindo-se numa promessa inovadora para a biotecnologia industrial.*

1. INTRODUÇÃO

A microfluídica vem ganhando cada vez mais espaço nas investigações científicas envolvendo células microbianas com aplicações biotecnológicas. Por se tratar de um sistema que utiliza microlitros de soluções, as reações neste microambiente podem ser analisadas de forma mais precisa quando comparadas com os sistemas em macroescala (Teh *et al.*, 2008). Além disso, a versatilidade dos sistemas microfluídicos amplia ainda mais as perspectivas de estudos biológicos que vão desde análises de comportamento celular até as complexas investigações de reações bioquímicas e produtividade (Barry e Ivanov, 2004). Dentre as técnicas, a microfluídica de gotas destaca-se como uma nova tecnologia para microencapsulação microbiana.

O sistema microfluídico de gotas consiste na compartimentalização de reagentes usando um fluido contínuo, como uma fase oleosa, para encapsular pequenos volumes de uma fase aquosa em

gotículas (Basova e Foret, 2015; Guo *et al.*, 2012). Neste processo, são produzidos micropartículas de baixa polidispersidade, formato esférico e tamanho controlado em função das vazões das fases, que nem sempre são obtidos facilmente pelos métodos convencionais (Kintses *et al.*, 2010; Teh *et al.*, 2008). As gotículas geradas nos microcanais tem sido empregues para encapsular diversos agentes biológicos com aplicações biotecnológicas, incluindo avaliações de comportamento celular (Khorshidi *et al.*, 2014), investigação de crescimento e maior produtividade microbiana dentro de gotas (Nahja *et al.*, 2014) e seleção de micro-organismos e enzimas visando aplicações industriais (Sjostrom *et al.*, 2014).

Na biotecnologia, uma das áreas que pode ser beneficiada pelo uso da microfluídica de gotas é em bioprocessos. A microencapsulação de biocatalizadores em matrizes poliméricas usando sistemas microfluídicos de gotas pode ser vista como uma nova tecnologia aliada a busca de aumento de produtividade e menor custo com amostras e soluções. Além de conferir proteção ao micro-organismo, as micropartículas possuem tamanhos reduzidos que confere em maior área superficial e menor caminho difusional para os nutrientes, quando comparados com macropartículas (Guo *et al.*, 2012; Kintses *et al.*, 2010; Teh *et al.*, 2008).

Embora seja escassa a literatura a respeito do uso de micropartículas na encapsulação de micro-organismos em fermentações clássicas, a microfluídica de gotas mostra-se uma estratégia tecnológica inovadora para microencapsulação. Desta forma, o objetivo deste trabalho consistiu em empregar a microfluídica de gotas para produção de micropartículas de alginato de cálcio com potencial para encapsulação de *Bacillus subtilis*, visando a produção de lipase.

2. METODOLOGIA

2.1. Construção do sistema microfluídico de gotas

Os microcanais do sistema microfluídico de gotas foram fabricados em poli dimetilsiloxano (PDMS) e com a base em vidro. Este sistema foi construído usando a técnica de litografia macia, conforme a metodologia descrita por Duffy e McDonald (1998), a qual consiste basicamente de três etapas: (1) criação do molde negativo, tendo como referência a geometria desenhada em máscara de fotolito; (2) adição do PDMS sobre o molde negativo para criação dos microcanais e (3) selagem do PDMS curado em base de vidro usando plasma de oxigênio.

Para este método, a base da construção dos microcanais se dá pela geometria desenhadas em programa de Autocad® e, a partir disso é feita a impressão em fotolito, como mostra a Figura 1a. E então é construído o dispositivo na configuração desejada em PDMS e vidro, como indicado pela Figura 1b, sendo que o processo de formação de gotas por meio de microcanais configurados em fluxo cruzado está representado pela Figura 1c.

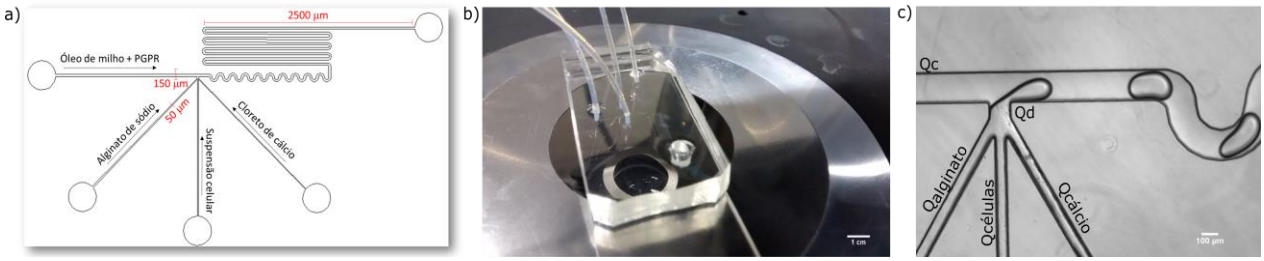

Figura 1 – Sistema microfluídico de gotas: a) geometria e dimensões dos microcanais desenhado em programa Autocad®, b) dispositivo microfluídico construído em base de vidro e PDMS pelo método de litográfica macia (a barra de escala representa 1 cm) e, c) processo de formação de gotas dentro dos microcanais microfluídicos (barra de escala de 100 µm).

Após ter o sistema microfluídico de gotas construído, as soluções foram injetas de forma controlada por bomba do tipo seringa (Harvard, EUA). Assim, o comportamento dos fluxos e a formação das gotas foram observadas usando um microscópio invertido (Nikon Instruments, moledo Eclipse Ti-U, EUA), como mostra a Figura 2.

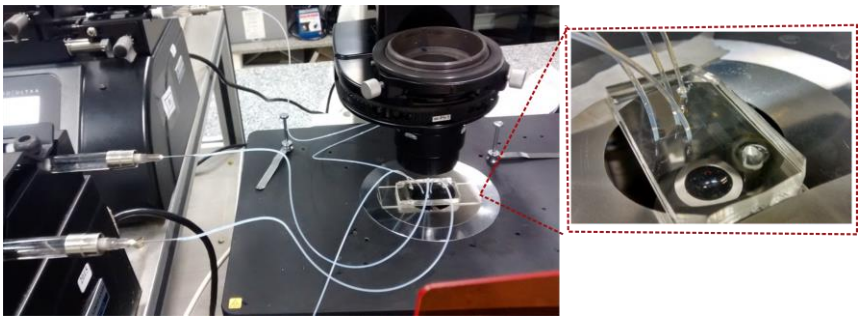

Figura 2 – Sistema microfluídico de gotas construído e sua operação usando bomba do tipo de seringa com observação do comportamento do fluxo por meio de microscópio invertido. A imagem ampliada mostra o sistema microfluídico de gotas construído em base de vidro-PDMS.

2.2. Geração de micropartículas de alginato de cálcio em sistema microfluídico de gotas

A formação de gotas neste sistema microfluídico é baseado num processo de emulsão do tipo A/O. No ponto de encontro entre os fluxos, ocorre a formação das gotas (fase dispersa) pelo fluxo da fase contínua que escoa na direção perpendicular. O tamanho e a formação das gotas são controlados pelas vazões de cada fase, sendo que a vazão da fase dispersa (Q_d) refere-se às vazões das soluções de alginato de sódio a 2% (m/v) ($Q_{alginato}$) (Sigma Aldrich Chemicals, EUA), e suspensão celular de *Bacillus subtilis* NRRL B 14819 numa ordem de 10^6 cél/mL ($Q_{células}$) e solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2.2H_2O$) (Synth, Brasil) a 30 mM ($Q_{cálcio}$). Enquanto que a vazão da fase contínua (Qc) foi composta por óleo de milho (Salada, Brasil) contendo 4% (m/m) do tensoativo poliglicerol

polirricinoleato (GRINDSTED® PGPR) (Danisco, Brasil). Após formadas, as gotas percorreram um microcanal em serpentina que promoveu a mistura entre as soluções que compõe a gota, como mostra a Figura 1c.

A produção e o tamanho das micropartículas de alginato de cálcio foram avaliados quanto à razão entre taxas de fluxos e a relação mássica entre alginato/Ca^{2+} para favorecer o processo de gelificação. As taxas de fluxos foram determinadas em função do número de Capilar, que leva em consideração a tensão interfacial entre as fases e a vazão da fase contínua. O número de Capilar é representado pela Equação (1), onde U indica a velocidade da fase contínua (Qc), μ é a viscosidade da fase contínua e γ, a tensão interfacial entre as fases contínua e dispersa.

$$Ca = U\mu/\gamma \quad (1)$$

As imagens das gotas foram adquiridas por meio de câmera digital acoplada ao microscópio invertido, em que o diâmetro das gotas foi medido no reservatório de saída dos microcanais e após a coleta das amostras. O diâmetro das micropartículas de alginato de cálcio foram medidos através do *software* ImageJ (National Institutes of Health, USA), utilizando a ferramenta *Measure*. Enquanto a polidispersidade foi descrita pelo coeficiente de variação (CV), consiste na razão do desvio padrão médio pela média do diâmetro das micropartículas. Sendo a distribuição de tamanhos considerada monodispersa para valores de CV menor que 5% (Xu *et al.*, 2005). Para as análises estatísticas foram medidas 100 micropartículas de experimentos em triplicata independente.

2.3. Cultivo de *Bacillus subtilis* NRRL B 14819

As células de *Bacillus subtilis* NRRL B 14819 foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio caldo nutriente (0,3 % de extrato de carne, 0,5 % de peptona, 0,1% de NaCl, pH 7,0) em agitador orbital a 200 rpm, por 12 h a 30°C. As células foram posteriormente diluídas em água estéril para a encapsulação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, a obtenção de micropartículas de alginato de cálcio produzidas pelo sistema microfluídico de gotas foi realizada devido as vazões das fases contínua (Q_c) e dispersa (Q_d), sendo avaliadas as propriedades de gelificação das micropartículas. Sendo assim, a capacidade de formar gotas foi investigada em função da razão entre taxas de fluxos ($R_{Qd/Qc}$) e o número de Capilar (Ca). Após isso, foram analisadas as melhores condições para o processo de gelificação do alginato de cálcio.

O processo de formação de gotas nos microcanais foi estudado em diferentes razões $R_{Qd/Qc}$, sendo empregadas vazões de 1 a 3 μL/min em Qc e entre 0,4 e 1,5 μL/min para Qd (utilizando as vazões Qalginato, Qcálcio e Qcélulas sempre iguais). Nas razões estudadas foi possível notar que o estiramento das gotas acontece a partir de $R_{Qd/Qc} > 0,3$. Assim, para valores de $0,6 > R_{Qc/Qd} > 0,8$ foram observados formação de gotas alongadas e pouco estáveis (característico do regime de *squeezing*). Já para $R_{Qc/Qd}$ num intervalo de 0,3 a 0,6 ocorre a geração estável de gotas arredondas e

pequenas, definido pelo comportamento de gotejamento. Enquanto que em baixos valores de R associado a uma maior tensão de cisalhamento (0,2 < R < 0,3) há o predomínio do jateamento, um comportamento que leva ao rompimento de gotas de modo instável após a formação de um arraste da fase contínua. Para os valores maiores que estes limites não há formação de gotas, como pode ser observado na Figura 3. Além disso, a formação de gotas estáveis prevaleceu numa faixa de Ca acima de 0,015.

Como pode ser observado na Figura 3, a geração de gotas neste sistema microfluídico se deve ao cisalhamento imposto pela diferença de taxas de fluxos das fases contínua e dispersa, intensificado pela diferença de viscosidade dos fluidos. Além disso, a competição entre as forças viscosas e tensão interfacial também influenciaram nesse processo. De acordo com Christopher e Anna (2007) a formação de gotas estáveis numa faixa de Ca entre 0,01 e 1 indica que há uma combinação entre cisalhamento e pressão para gerar o corte das gotas. Tal comportamento torna-se atrativo para o processo de microencapsulação de biocatalisadores, garantindo a viabilidade celular, uma vez que há uma menor força de cisalhamento envolvido na formação das gotas, quando comparado com outros sistemas em que Ca é maior do que 1, em que predomina o cisalhamento.

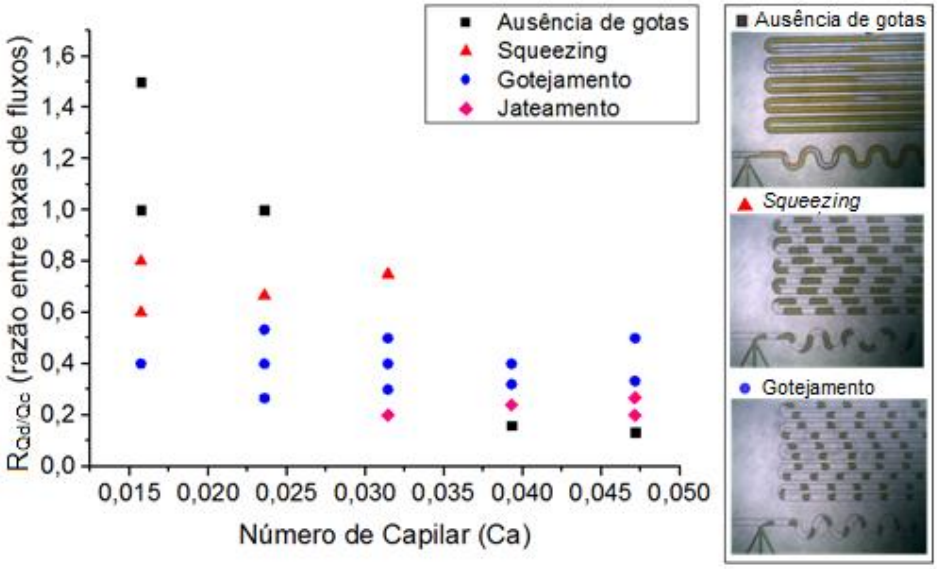

Figura 3 - Regime de formação de gotas em função da relação das razões em taxas de fluxos das fases contínua (Qc) e dispersa (Qd) e influência da viscosidade, descrita pelo número de Capilar (Ca). A fase contínua foi formada por óleo de milho contendo tensoativo (PGPR a 4%) e fase dispersa, por alginato (2% m/v), água ultrapura (em substituição à suspensão celular apenas neste ensaio) e $CaCl_2$ a 30 mM e pH 5,75. O comportamento dos fluxos quanto ao número de capilar foi avaliado em ensaio usando valores de μ = 8,2 mPa.s e pH 5,5 para o alginato e μ = 5,85 mPa.s e pH 5,75 para a solução oleosa contendo o tensoativo. As figuras da legenda ilustram os principais comportamentos de formação de gotas dentro dos microcanais.

Assim, após conhecer o mecanismo de formação das gostas e selecionar as faixas de $R_{Qd/Qc}$

onde ocorre a formação estável, foram avaliadas características de gelificação das micropartículas de alginato de cálcio. De acordo com Fundueanu *et al.* (1999), a gelificação do alginato por íons Ca^{2+} ativos consiste num processo de difusão destes íons para o interior das partículas, que se completa em torno de 1 h (considerando as macropartículas obtidas por métodos convencionais), dependendo da relação alginato/Ca^{2+} e fatores como temperatura, agitação e pH. Tais propriedades foram consideradas no sistema microfluídico de gotas a fim de otimizar o processo de gelificação das micropartículas de alginato no interior dos microcanais.

Desta forma, as vazões da fase dispersa foram ajustadas para disponibilizar uma maior quantidade de íons de Ca^{2+} para o processo de gelificação. Sendo assim, foram usadas vazões de 0,8 µL/min para cada uma das soluções da fase dispersa: solução de alginato de sódio (2% m/v; 8,2 mPa.s), suspensão celular numa ordem de 10^6 cél/mL e para a solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2.2H_2O$) tendo uma concentração de 30 mM, pH 5,75. A fase contínua foi composta por óleo de milho contendo tensoativo PGPR a 4 % (m/m), sendo imposta uma vazão de 2 µL/min.

Embora o tempo de residência da micropartícula dentro do microcanal seja baixo (por volta de 4 s), o microcanal configurado em serpentina proporciona a mistura das soluções (alginato, suspensão celular e $CaCl_2$) favorecendo o processo difusional (Guo *et al.*, 2012; Teh *et al.*, 2008). No entanto, a gelificação se completará após o processamento no microcanal e por isso a importância da estabilidade da emulsão. Para isso, foi adicionado à fase contínua o tensoativo PGPR que possui alta estabilidade de emulsão, conforme apresentado por Ushikubo e Cunha (2014). Para o presente estudo, gelificação das micropartículas de alginato de cálcio foi confirmada, como ilustra a Figura 4.

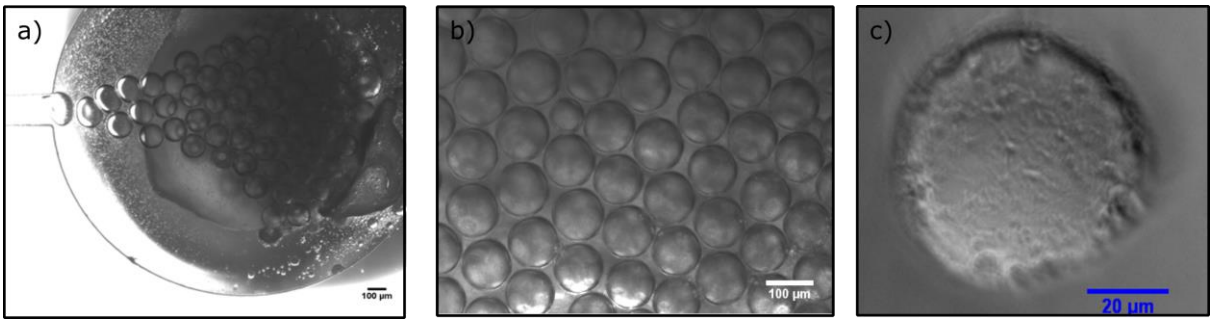

Figura 4 – Produção de micropartículas de alginato de cálcio em sistema microfluídico de gotas: a) micropartículas no reservatório de saída do microcanal (estabilidade da emulsão), b) micropartículas de alginato de cálcio observadas após 2h e, c) micropartículas de alginato de cálcio contendo células de *Bacillus subtilis* que se movimentam dentro da partícula. As imagens foram obtidas em microscópio invertido com objetivas de 10, 40 e 60x de aumento, respectivamente.

Nestas condições, a produção de micropartículas de alginato de cálcio para encapsulação de *Bacillus subtilis* NRLL B 14819 pelo sistema microfluídico de gotas apresentou alta estabilidade da emulsão e foram obtidas micropartículas monodispersas, uma vez que foi obtida um CV = 3,28% com diâmetros de 115,09 ± 0,38 µm micropartículas, conforme apresenta a Figura 5.

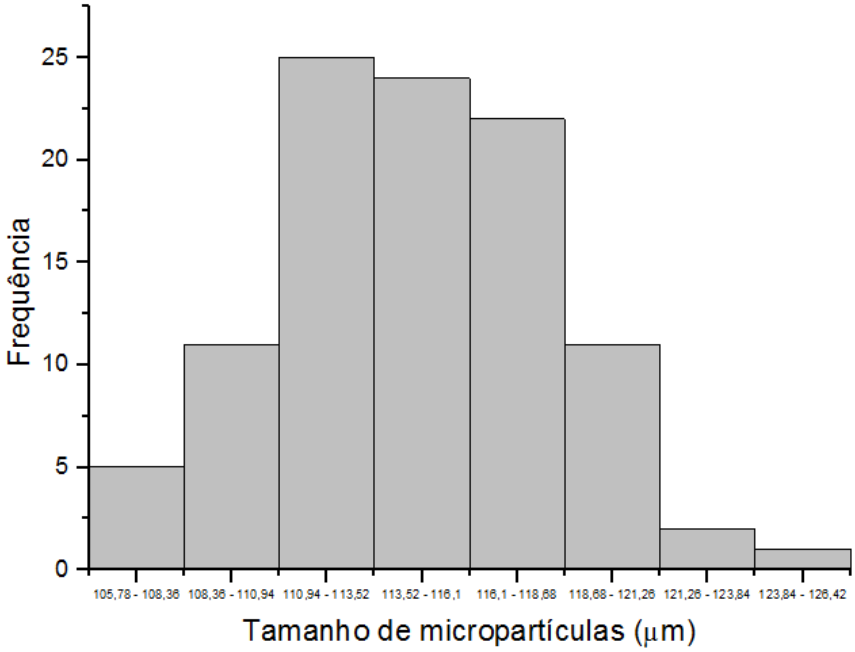

Figura 5 – Histograma de distribuição de tamanho de micropartículas de alginato de cálcio produzidas por sistema microfluídico de gotas (amostragem de 100 micropartículas)

Como pode ser observado nos dados acima, 71% da população das micropartículas de alginato de cálcio apresentaram um diâmetro entre 110 e 118 μm, havendo uma distribuição normal. Desta forma, pode-se concluir que as condições de formação de gotas e os ajustes de vazões e estabilidade da emulsão foram imprescindíveis para produção de micropartículas de alginato de cálcio estáveis, monodispersas e com tamanhos e formas que podem ser controlados de forma precisa por esta técnica.

As características obtidas pela técnica de microfluídica de gotas nem sempre são obtidas de forma fácil pelas técnicas convencionais de microencapsulação. Técnicas convencionais, como gotejamento e emulsificação, as partículas de alginato de cálcio apresentam tamanhos na ordem de 300 – 1000 μm (Lee, Ravindra e Chan, 2013; Puguan, Yu e Kim, 2014; Rathore *et al.*, 2013). Ainda, são técnicas que expõe as células à um cisalhamento maior do que pode ser observado pelo microfluídica. Além disso, a redução de tamanho para a ordem de 100 μm possibilitada pelo sistema microfluídico de gotas proporciona uma área superficial maior e consequentemente irá contribuir no processo de transferência de massa. Desta forma, a microfluídica de gotas apresenta-se como uma ferramenta para microencapsulação de biocatalisadores com alto controle de tamanho e estabilidade.

4. CONCLUSÕES

O sistema microfluídico de gotas configurado em fluxo cruzado foi capaz de produzir micropartículas de alginato de cálcio de monodispersas e com diâmetro na ordem de 115 μm. Este tipo de sistema microfluídico pode ser considerado uma ferramenta com potencial para processos de microencapsulação de biocatalisadores, contribuindo para a produtividade em bioprocessos.

5. REFERÊNCIAS

BARRY, R.; IVANOV, D. Microfluidics in biotechnology. *Journal of nanobiotechnology*, v. 2, p. 1–5, 2004.

BASOVA, E. Y.; FORET, F. Droplet microfluidics in (bio)chemical analysis. *Analyst*, v. 140, p. 22–38, 2015.

CHRISTOPHER, G. F.; ANNA, S. L. Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 40, p. R319–R336, 2007.

DUFFY, D.; MCDONALD, J. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *Analytical Chemical*, v. 70, p. 4974–4984, 1998.

FUNDUEANU, G.; NASTRUZZI, C.; CARPOV, A.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. *Biomaterials*, v. 20, p. 1427–1435, 1999.

GUO, M. T.; ROTEM, A.; HEYMAN, J.; WEITZ, D. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. *Lab on a chip*, v. 12, p. 2146–55, 2012.

KHORSHIDI, M. A.; RAJESWAR, P. K. P.; WAHLBY, C.; JOENSSON, H. N.; SVAHN, H. A. Automated analysis of dynamic behavior of single cells in picoliter droplets. *Lab on a chip*, v. 14, p. 931–937, 2014.

KINTSES, B.; VAN VLIET, L. D.; DEVENISH, S. R.; HOLLFELDER, F. Microfluidic droplets: new integrated workflows for biological experiments. *Current opinion in chemical biology*, v. 14, p. 548–55, out. 2010.

LEE, B.; RAVINDRA, P.; CHAN, E.-S. Size and Shape of Calcium Alginate Beads Produced by Extrusion Dripping. *Chemical and Engineering Technology*, v. 36, p. 1627–1642, 2013.

NAJAH, M.; CALBRIX, R.; MAHENDRA-WIJAYA, I. P.; BENEYTON, T.; GRIFFITHS, A. D.; DREVELLE, A. Droplet-Based Microfluidics Platform for Ultra-High-Throughput Bioprospecting of Cellulolytic Microorganisms. *Chemistry & Biology resource*, v. 21, p. 1722–1732, 2014.

PUGUAN, J. M. C.; YU, X.; KIM, H. Characterization of structure , physico-chemical properties and diffusion behavior of Ca-Alginate gel beads prepared by different gelation methods. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 432, p. 109–116, 2014.

RATHORE, S.; DESAI, P. M.; LIEW, C.V.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, v. 116, p. 369–381, 2013.

SJOSTROM, S. L.; BAI, Y.; HUANG, M.; LIU, Z.; NIELSEN, J.; JOENSSON, H. N.; SVAHN, H. A. High-throughput screening for industrial enzyme production hosts by droplet microfluidics †. *Lab on a chip*, v. 14, p. 806–813, 2014.

TEH, S.-Y.; LIN, R.; HUNG, L-H.; LEE, A. P. Droplet microfluidics. *Lab on a chip*, v. 8, p. 198–220, 2008.

USHIKUBO, F. Y.; CUNHA, R. L. Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. *Food hydrocolloids*, v. 34, p. 145–153, 2014.

YE, N.; QIN, J.; SHI, W; LIU, X.; LIN, B. Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device. *Lab on a chip*, v. 7, p. 1696–704, 2007.