

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE PELO MÉTODO DE ENCAPSULAMENTO VIA FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO

Aline Luiza Machado Carlos.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais - PEMM/COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadores: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Marcos Lopes Dias

Rio de Janeiro

Junho de 2023

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE PELO MÉTODO DE ENCAPSULAMENTO VIA FIAÇÃO
POR SOPRO EM SOLUÇÃO

Aline Luiza Machado Carlos

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA
METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Orientadores: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Marcos Lopes Dias

Aprovada por: Prof.^a Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Prof. Marcos Lopes Dias

Prof.^a Renata Antoun Simão

Dr.^a Bruna Nunes Teixeira

Prof.^a Maria Alice Zarur Coelho

Prof. Otávio Bianchi

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JUNHO DE 2023.

Carlos, Aline Luiza Machado

Imobilização de lipase pelo método de encapsulamento via Fiação Por Sopro Em Solução / Aline Luiza Machado Carlos. - Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2023

XIII, 118 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, Marcos Lopes Dias

Tese (doutorado) - UFRJ/COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2023

Referências Bibliográficas: p. 96-107.

1. Imobilização de enzima. 2. Fiação por sopro em solução. 3. Estrutura core-shell. I. Thiré, Rossana Mara da Silva Moreira, *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título.

*Dedico este trabalho à minha mãe
Zilda Machado Carlos, de quem
veio todo empenho, suporte e
inspiração para que eu fosse em
busca da realização dos meus
sonhos... mãe, essa vitória é sua!*

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Rossana Thiré e Marcos Dias pela orientação, credibilidade e pelo incentivo.

Às instituições de fomento CAPES, CNPq e Faperj pelo apoio à pesquisa desenvolvida.

Aos técnicos dos laboratórios de Microscopia e Multiusuário e demais serviços do programa de engenharia metalúrgica e de materiais, em especial Manoel e Taissa.

Aos integrantes do Laboratório de Engenharia de Sistemas Biológicos, em especial à professora Maria Alice e à aluna Selsiane pelo apoio na avaliação enzimática e por compartilharem seu conhecimento.

Ao senhor Carlos Henrique Thiré pela contribuição para o desenvolvimento do projeto.

Aos amigos feitos no PEMM: Anderson, Antônio, Beatriz, Carolina, Felipe e todos os demais que deixaram um pouquinho de si em suas experiências compartilhadas e apoio em momentos difíceis.

Aos amigos dos laboratórios de Biopolímeros e Bioengenharia por compartilhar de todos os momentos, em especial aos amigos Bruna, Javier e Marianna, dos quais recebi aprendizado e suporte essenciais à conclusão dessa etapa.

À amiga de longa data, Ariadne, que esteve junto compartilhando de todos os momentos e sendo ombro amigo.

Aos amigos externos ao meio acadêmico que sempre apoiaram meus sonhos.

Ao meu padrinho André Carlos, por desde o início me ajudar a tornar tudo isso possível.

À minha mãe Zilda, pelo esforço além do possível para prover meu sustento e crescimento, que me possibilitaram ir além.

À minha irmã Amanda, por ser minha conselheira nos momentos difíceis e, juntamente com a minha mãe, ser minha melhor amiga.

A todos vocês, o meu mais sincero agradecimento.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutora em Ciências (D.Sc.)

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE PELO MÉTODO DE ENCAPSULAMENTO VIA FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO

Aline Luiza Machado Carlos

Junho/2023

Orientadores: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Marcos Lopes Dias

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

A Fiação por Sopros em Solução (*Solution Blow Spinning* - SBS) é uma técnica utilizada na produção de fibras nano e micrométricas, que consiste na fiação de uma solução polimérica por meio do uso de forças aerodinâmicas. Em relação aos processos tradicionais, como, por exemplo a eletrofiação, apresenta inúmeras vantagens, incluindo menor custo e maior segurança. A imobilização de enzimas em materiais nanoestruturados aumenta significativamente sua eficiência biocatalítica, mesmo em baixas concentrações. É possível conseguir desempenho similar ao uso das enzimas livres, porém com uma maior estabilidade e possibilidade de reuso, além de evitar a contaminação do meio. Estruturas do tipo núcleo-casca (*core-shell*) são especialmente interessantes para imobilizar enzimas pelo método de encapsulamento e podem ser obtidas no processo de SBS. No presente trabalho, foi estudada a processabilidade do poli(3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato) - PHBV via SBS para produção de mantas de fibras *core-shell*, visando a imobilização de enzimas. Ajustes de parâmetros de processo e configuração do alvo resultaram em fibras altamente alinhadas com menores defeitos e de diâmetros reduzidos (de 3,07 para 1,42 μm) em comparação com as fibras obtidas em alvo estático. Os resultados comprovaram a imobilização da enzima lipase no interior da estrutura *core-shell* das fibras. A inserção de 1% de polietilenoglicol – PEG na solução de PHBV foi estudada como metodologias para facilitar o acesso do substrato à enzima e possibilitou um aumento na atividade da enzima imobilizada, quando comparado às enzimas livres e imobilizada sem a presença do PEG na casca.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

LIPASE IMMOBILIZATION BY ENCAPSULATION METHOD VIA SOLUTION BLOW SPINNING

Aline Luiza Machado Carlos

Junho/2023

Advisors: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Marcos Lopes Dias

Departament: Metallurgical and Materials Engineering

Solution Blow Spinning (SBS) is a technique to produce nano and micrometric fibers, which consists of spinning a polymeric solution through the use of aerodynamic forces. Compared to traditional processes, such as electrospinning, for example, it has numerous advantages, including lower cost and greater safety. The immobilization of enzymes in nanostructured materials significantly increases their biocatalytic efficiency, even in low concentrations. It is possible to obtain performance similar to the use of free enzymes, but with greater stability and rotation besides avoiding contamination of the medium. Core-shell structures are especially interesting for enzymes immobilization by the encapsulation method and can be used in the solution blow spinning process. In the present work, the processability of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) - PHBV via SBS for the production of core-shell fiber mats was evaluated. Adjustments of process parameters and target configuration resulted in highly defined fibers with smaller defects and reduced diameters (from 3.07 to 1.42 μm). The results verified the immobilization of the lipase enzyme into the core-shell structure of the fibers. The insertion of 1% polyethylene glycol – PEG in the PHBV solution was studied as a methodology to facilitate the access of substrates to the enzyme and enabled an increase in the activity of the immobilized enzyme, when compared to the free and immobilized enzyme on the fibers mats without PEG.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II – OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GERAL.....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
CAPÍTULO III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 ENZIMAS	6
3.1.1 Lipases	9
3.2 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	11
3.2.1 Métodos Químicos	12
MÉTODOS DE SUPORTE (<i>CARRIER</i>)	13
MÉTODOS DE RETICULAÇÃO (<i>CROSS-LINKING</i>)	14
3.2.2 Métodos de Contenção	16
MÉTODO DE APRISIONAMENTO EM GEL (<i>ENTRAPMENT</i>)	16
MÉTODO DE ENCAPSULAMENTO (<i>ENCAPSULATION</i>)	17
3.3 FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO (<i>Solution Blow Spinning</i>)	21
3.3.1 Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)	25
CAPÍTULO IV – METODOLOGIA	28
PARTE I	28
4.1 MATERIAIS	28
4.2 PRODUÇÃO DE MANTAS DE FIBRAS MONOLÍTICAS DE PHBV E PLA	29
PARTE II	31
4.3 PRODUÇÃO DE MANTAS DE FIBRAS <i>CORE-SHELL</i> COM LIPASE E MODIFICAÇÃO NO TIPO E VELOCIDADE DO COLETOR.....	31
PARTE III	34
4.4 PRODUÇÃO DAS MANTAS DE FIBRAS <i>CORE-SHELL</i> COM E SEM PEG	34
CARACTERIZAÇÕES	36
4.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	36
4.5.1 Cromatografia Líquida de Permeação em Gel (GPC)	36
4.5.2 Comportamento Reológico (Viscosimetria)	36
4.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	36
4.5.4 Microscopia de Fluorescência (MF)	37
4.5.5 Avaliação de ângulo de contato (Molhabilidade)	37
4.5.6 Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	38
4.6 TESTE DE INTUMESCIMENTO	40

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E REUSO	40
4.8 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA E DE pH	44
4.9 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE EM ESTOCAGEM	45
CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
PARTE I.....	46
5.1 PROPRIEDADES REOLÓGICA DAS SOLUÇÕES DE PLA E PHBV	46
5.2 MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS FIBRAS MONOLÍTICAS DE PLA E PHBV	49
Conclusões parciais.....	53
PARTE II.....	54
5.3 INFLUÊNCIA DO TIPO DE COLETOR NA MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS FIBRAS <i>CORE-SHELL</i>	54
5.4 CONFIRMAÇÃO DA ESTRUTURA <i>CORE-SHELL</i>	57
Conclusões parciais.....	59
PARTE III.....	60
5.5 INFLUÊNCIA DA MODIFICAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DA CASCA DAS MANTAS DE FIBRAS <i>CORE-SHELL</i> : INSERÇÃO DO PEG	60
5.6 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DAS MANTAS DE FIBRAS <i>CORE-SHELL</i> COM E SEM PEG	67
5.6.1 Atividades das mantas a 37°C e pH 7 (ciclo 1 e ciclo 2 – reuso)	68
5.6.2 Atividades das mantas a 37°C, pHs 5 e 9	72
5.6.3 Atividades das mantas a 50°C e pH 7	78
5.6.4 Atividades das mantas após estocagem (14 dias em temperatura ambiente)...	81
5.6.5 Atividades relativas entre as mantas com e sem PEG e enzima livre nas condições analisadas.	83
5.7 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE INTERAÇÃO DA ENZIMA IMBOLIZADA NAS MANTAS DE FIBRAS <i>CORE-SHELL</i> PVA/LIPASE – PHBV/PEG COM O MEIO DURANTE AS ANÁLISES DE ATIVIDADE	86
Conclusões parciais.....	91
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES.....	92
6.1 CONCLUSÕES GERAIS.....	92
6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	95
CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
APÊNDICE	108
I - AJUSTES LINEAR DAS CURVAS DE ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DO TEMPO	

II – PUBLICAÇÕES	115
III - LICENÇA TERMOS E CONDIÇÕES JOHN WILEY & SONS PARA USO DE CONTEÚDO DO ARTIGO	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação de ligação peptídica entre dois α -aminoácidos adjacentes (Adaptado de ILLANES, 2008).....	6
Figura 2. Modelo do encaixe induzido (induced fit) de processo de catálise enzimática.....	7
Figura 3. Comparação entre vantagens e desvantagens da imobilização biocatalítica.....	12
Figura 4. Configuração do sistema Solution Blow Spinning (ilustração criada no Biorender.com).....	22
Figura 5. Sistema de Fiação por Sopros em Solução desenvolvido para o processo de obtenção das mantas de fibras monolíticas.....	29
Figura 6. Dispositivo de agulhas concêntricas utilizado no sistema de fiação por sopros em solução.....	32
Figura 7. Sistemas de Fiação por Sopros em Solução desenvolvidos para o processo de obtenção das mantas de fibras coaxiais aleatórias (a) e alinhadas (c) e coletor rotatório (b).....	33
Figura 8. Esquema experimental da metodologia utilizada para os testes de atividade e reuso.....	41
Figura 9. Esquema experimental da metodologia utilizada para os testes de estabilidade em diferentes pHs (A) e em alta temperatura (B).....	45
Figura 10. Comportamento reológico das soluções poliméricas utilizadas em função da taxa de cisalhamento.....	46
Figura 11. Micrografias de MEV das amostras testadas em diferentes pressões do ar (PSI), com distâncias de trabalho de 20 e 40 cm, aumento de 4000x.....	49
Figura 12. Histogramas de distribuição do tamanho das fibras obtidas com diferentes pressões de ar e distância de trabalho.....	51
Figura 13. Análise qualitativa da orientação das fibras obtida via Orientation J, plug-in do software image J (mapa de cores de acordo com os ângulos adaptado de Rezakhaniha et al. 2012), com micrografias de MEV, aumento de 200x (a); Micrografias de MEV obtidas com aumentos de 1000 e 5000 x (b) e avaliação de distribuição de tamanho (c) de mantas de fibras core-shell produzidas com coletor estático e coletor rotativo (baixa e alta velocidade).....	55
Figura 14. Micrografia de MEV no modo STEM de fibras core-shell PVA/Lipase-PHBV produzidas.....	57
Figura 15. Micrografia de Microscopia Óptica de Fluorescência de fibras core-shell PVA/Lipase-PHBV.....	58
Figura 16. Medidas de ângulo de contato de (a) mantas de fibras monolíticas de PHBV, (b) mantas de fibras core-shell PVA/Lipase- PHBV; (c) mantas de fibras core-shell PVA/Lipase – PHBV/PEG e (d) filme de PVA/Lipase.....	60
Figura 17. Grau de intumescimento das fibras core-shell de PVA/Lipase – PHBV e das fibras core-shell de PVA/Lipase – PHBV/PEG.....	62
Figura 18. Espectros de FTIR das mantas de fibras monolíticas de PHBV, core-shell PVA/Lipase – PHBV e core-shell PVA/Lipase – PHBV/PEG do filme de PVA, dos grânulos de PEG.....	64
Figura 19. Micrografias de MEV das mantas de fibras monolíticas de PHBV (A), mantas de fibras core-shell PVA/Lipase - PHBV (B) e mantas de fibras core-shell PVA/Lipase - PHBV/PEG antes (C) e após liberação em tampão PBS pH 7, 37°C por aproximadamente 1h (D) (diâmetro médio das fibras core-shell PVA/Lipase - PHBV/PEG $1,04 \pm 0,81$).....	66
Figura 20. Curvas de absorvância da enzima livre e das mantas de fibras core-shell PVA/Lipase - PHBV e core-shell PVA/Lipase - PHBV/PEG (Sem PEG e Com PEG) incubadas à 37°C e pH 7 – ciclo 1.....	69
Figura 21. Curvas de absorvância das mantas de fibras core-shell PVA/Lipase - PHBV e core-shell PVA/Lipase - PHBV/PEG (Sem PEG e Com PEG) incubadas à 37°C e pH 7 – segundo ciclo (ciclo 2 - reuso).....	69

Figura 22. Curvas de absorvância dos sobrenadantes das mantas core-shell PVA/Lipase - PHBV/PEG (Com PEG) incubadas à 37°C e pH 7 nos tempos t0, t20 e t40.....	71
Figura 23. Curvas de absorvância da cinética de reação da Lipase livre incubada a 37°C e em pH 7 e pH 9.	75
Figura 24. Curvas de absorvância da enzima livre e das mantas de fibras core-shell PVA/Lipase - PHBV e core-shell PVA/Lipase - PHBV/PEG (Sem PEG e Com PEG) incubadas a 37°C e pH 9.....	76
Figura 25. Curvas de absorvância dos sobrenadantes das mantas core-shell PVA/Lipase - PHBV/PEG (Com PEG) incubadas à 37°C e pH 9 nos tempos t0, t20 e t40.....	77
Figura 26. Curvas de absorvância da enzima livre e das mantas de fibras core-shell PVA/Lipase - PHBV e core-shell PVA/Lipase - PHBV/PEG (Sem PEG e Com PEG) incubadas a 50°C e pH 7.....	79
Figura 27. Curvas de absorvância da cinética de reação da Lipase livre incubada a 37°C e 50°C em pH 7.....	80
Figura 28. Curvas de absorvância dos sobrenadantes das mantas core-shell PVA/Lipase - PHBV/PEG (Com PEG) incubadas à 50°C e pH 7 nos tempos t0, t20 e t40.....	80
Figura 29. Curvas de absorvância da enzima livre e das mantas de fibras core-shell PVA/Lipase - PHBV e core-shell PVA/Lipase - PHBV/PEG (Sem PEG e Com PEG) incubadas a 37°C e pH 7 pós estocagem por 14 dias em temperatura ambiente.....	82
Figura 30. Atividades relativas entre as mantas com e sem PEG e enzima livre.....	84
Figura 31. Micrografias de MEV das mantas de fibras core-shell PVA/Lipase - PHBV/PEG incubadas a 37°C e pH 7, durante ensaio de atividade.....	87
Figura 32. Micrografias de MEV das mantas de fibras core-shell PVA/Lipase - PHBV/PEG incubadas a 37°C e pH 9, durante ensaio de atividade.....	88
Figura 33. Micrografias de MEV das mantas de fibras core-shell PVA/Lipase - PHBV/PEG incubadas a 50°C e pH 7, durante ensaio de atividade.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aplicações industriais das lipases (Adaptado de SHARMA et al., 2001).	10
Tabela 2. Vantagens e desvantagens da utilização de enzimas processos catalíticos (Adaptado de ILLANES, 2008).	11
Tabela 3. Imobilização de enzimas em nanofibras produzidas por eletrofiação.....	20
Tabela 4. Materiais utilizados.	28
Tabela 5. Parâmetros de processo utilizados para produção de mantas de fibras monolíticas.	30
Tabela 6. Parâmetros de processo utilizados para produção das mantas de fibras core-shell..	32
Tabela 7. Parâmetros de processo utilizados para produção das mantas de fibras core-shell com e sem PEG.	35
Tabela 8. Equipamentos, especificações e laboratórios envolvidos nas técnicas de caracterizações.	38
Tabela 9. Massas e quantidades utilizadas nos cálculos comparativos.....	68
Tabela 10. Atividades operacional e em função da disponibilidade de proteína das enzimas imobilizadas nas mantas com e sem PEG e enzima livre em pH 7, a 37°C.....	70
Tabela 11. Atividades operacional e em função da disponibilidade de proteína das enzimas imobilizadas nas mantas com e sem PEG e enzima livre em diferentes pHs 5, 7 e 9, a 37°C.	74
Tabela 12. Atividades operacional e em função da disponibilidade de proteína das enzimas imobilizadas nas mantas com e sem PEG e enzima livre em pH 7 a 37 e 50°C.....	78
Tabela 13. Atividades operacional e em função da disponibilidade de proteína das enzimas imobilizadas nas mantas com e sem PEG antes e após estocagem por 14 dias em temperatura ambiente.	82
Tabela 14. Atividades relativas entre as enzimas imobilizadas nas mantas com e sem PEG e enzima livre em função da disponibilidade de proteína.	83
Tabela 15. Trabalhos atuais disponíveis em imobilização de lipase de <i>Candida rugosa</i>	94

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação (1)	40
Equação (2)	42
Equação (3)	42
Equação (4)	43
Equação (5)	44

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Fibras nanométricas e submicrométricas têm ganhado grande interesse devido às suas propriedades únicas em comparação com micro e macromateriais e até mesmo com outros nanomateriais materiais com geometrias diferentes, como nanopartículas e esferas mesoporosas (SUN *et al.*, 2020; LOMBARDO *et al.* 2020). Essas propriedades, que incluem a elevada relação entre área superficial e volume e interconectividade da estrutura fibrosa, tornam as fibras candidatas promissoras para uso em muitas aplicações médicas, por exemplo, o uso na liberação controlada de fármacos, como arcabouços para regeneração de tecidos, sistemas de entrega de compostos ativos e imobilização (YANG *et al.* 2011; GHOSAL *et al.*, 2019; DING *et al.*, 2019; TOLEDO *et al.* 2020).

Existem muitas tecnologias para a fabricação de fibras micro e nanométricas, tais como, fiação por sopro de material fundido, fiação por sopro em solução, fiação a seco, separação de fases e eletrofiação (ALMETWALLY *et al.*, 2017; BARHOUM *et al.*, 2019; DOS SANTOS *et al.*, 2020). A eletrofiação (ES) é uma técnica bem conhecida e tradicional que permite a produção de fibras utilizando forças eletrostáticas partir de soluções poliméricas (TOOSI *et al.*, 2020; KHALAJI *et al.*, 2021).

A fiação por sopro de solução (SBS – *Solution Blow Spinning*) é uma tecnologia que utiliza força aerodinâmica para induzir a formação de fibras a partir de soluções poliméricas em solventes voláteis. O uso de gás como força motriz ao invés de alta voltagem possibilita a deposição de fibras em qualquer superfície, incluindo organismos vivos. Além disso, a alta eficiência de fiação em comparação com o processo de eletrofiação torna o SBS um processo promissor para produzir fibras poliméricas (MEDEIROS *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 2020; SONG *et al.*, 2020; GAO *et al.*, 2020). Outra vantagem do processo SBS sobre ES é a variedade de

solventes, não se limitando ao uso de sistemas solventes com características dielétricas adequadas para ejeção da solução polimérica. Assim, pelo SBS, uma ampla gama de polímeros pode ser usada para produzir fibras fiadas (DARISTOTLE *et al.*, 2016).

Além disso, ao ajustar as variáveis de processamento e as propriedades da solução, o sistema SBS possibilita a produção de fibras com propriedades adequadas, como bioatividade, superfícies funcionalizadas, e estrutura biomimética (MAGAZ *et al.*, 2018).

A configuração do SBS inclui uma geometria de bico personalizada que permite a incorporação de vários canais, o que facilita o uso de fibras multicomponentes, incluindo a incorporação de compostos variados na produção da estrutura *core-shell*. Substâncias sensíveis ao pH ou solúveis em água, por exemplo, podem ser fiadas na geometria núcleo-casca, usando solventes não voláteis na solução do núcleo. Essa geometria é a mais indicada para encapsulamento de moléculas instáveis que podem ser facilmente degradadas pelo meio externo (temperatura, luz e/ou ar). Corantes, óleos essenciais e enzimas são exemplos desses agentes sensíveis. Desta forma, a solução da casca é facilmente fiada no processo, enquanto a solução interna é alimentada dentro das fibras da casca e é encapsulada pela estrutura da casca (PARK *et al.*, 2018; DI *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2020; GONÇALVES *et al.*, 2020).

Polímeros biodegradáveis têm sido amplamente escolhidos em processos de fiação. De acordo com relatório da European Bioplastic, em 2022, o poli(ácido láctico) (PLA) foi o polímero biodegradável que apresentou maior capacidade de produção global (aproximadamente 500.000 toneladas), sendo seguido pelas blendas de amido e pelo poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT). De acordo com este mesmo relatório, há expectativa para que, em 2027, a capacidade de produção global do PLA aumente para 2,4 milhões de toneladas e que os polihidroxialcanoatos (PHA) (poliésteres biodegradáveis produzidos naturalmente pela fermentação de microrganismos) passem a configurar no segundo lugar de produção global dos bioplásticos.

O poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуалерато) (PHBV) é um copolímero PHA produzido em larga escala com alta biocompatibilidade com diversas linhagens celulares e biodegradabilidade, toxicidade nula, estabilidade química, piezoelectricidade, termoplasticidade e propriedades de barreira (JIAO *et al.*, 2020; PERVEEN *et al.*, 2020; ABAZARI *et al.*, 2021; THIRÉ *et al.*, 2011; KANIUK *et al.*, 2020).

A imobilização de enzimas é um processo que garante seu uso industrial como biocatalisadores com maior estabilidade e possibilidade de recuperação do meio. A imobilização em materiais nanométricos aumenta significativamente sua eficiência biocatalítica, mesmo em baixas concentrações, pela alta área superficial destes materiais, podendo-se conseguir desempenho similar ao uso das enzimas livres, garantindo uma maior estabilidade e possibilidade de recuperação, evitando contaminação do meio. Técnicas tradicionais de imobilização de enzimas em suportes necessitam muitas vezes de mais de uma etapa e, na maioria dos casos, o processo de imobilização da enzima é um processo a parte do processo de produção.

As lipases desempenham um papel muito importante nos processos tecnológicos em diversos segmentos industriais catalisando reações como hidrólise, esterificação e aminólise. A imobilização destas enzimas em suporte de baixo custo que permita aumentar sua estabilidade operacional e reutilização surge como uma grande vantagem econômica.

A fiação por sopro de solução (SBS) é uma tecnologia inovadora e economicamente viável, que apresenta potencial na produção de fibras com enzimas imobilizadas em uma única etapa de forma mais simples, e, portanto, seu estudo e desenvolvimento de fibras a partir desta técnica se mostra altamente relevante. Estruturas do tipo núcleo-casca (*core-shell*) são especialmente interessantes para imobilizar enzimas pelo método de encapsulamento e podem ser obtidas de forma simples no processo de fiação por sopro em solução (BILAL *et al.*, 2019; JIANG *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2014; VASILE, 2018a; HAGHJU *et al.*, 2018; ZDARTA *et al.*, 2018; DIAS *et al.*, 2020; GONÇALVES *et al.*, 2020). A eletrofiação é bastante utilizada para produção de

fibras de PHBV, porém, apesar de vários biopolímeros serem explorados na produção de fibras biodegradáveis pela técnica SBS, esse polímero ainda é pouco utilizado nessa técnica (CARLOS *et al.*, 2021, GAO *et al.*, 2020, DADOL *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2014).

Assim, o presente trabalho propõe, pela primeira vez, a imobilização de enzima em mantas de fibras do tipo *core-shell* de PHBV em uma única etapa via SBS. Além disso, este trabalho traz uma discussão sobre a processabilidade do PHBV em comparação com o PLA, que é um polímero amplamente utilizado no processo SBS. A capacidade de fiação dos polímeros foi avaliada em termos de características morfológicas. O estudo também investigou como cada parâmetro pode afetar a morfologia das fibras, como diâmetro das fibras, alinhamento e presença de defeitos, e propõe como essa influência pode ser significativamente reduzida alterando a configuração do SBS.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho propõe a produção de um suporte de baixo custo e sustentável e imobilização de enzima em uma única etapa via Fiação por Sopros em Solução (SBS).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a processabilidade do polímero PHBV comparado ao polímero PLA via SBS;
- Imobilizar a enzima lipase por encapsulamento em estrutura *core-shell* de fibras de PHBV utilizando a técnica de SBS;
- Estabelecer metodologias para facilitar o acesso do substrato à enzima.

CAPÍTULO III

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ENZIMAS

Enzimas são proteínas (com exceção das enzimas ácidos ribonucleicas – RNA) compostas por um grande número de resíduos de aminoácidos que varia de cem a várias centenas. Estes aminoácidos são covalentemente ligados por meio de ligação peptídica formada entre o átomo de carbono de um grupo carboxila de um aminoácido e o átomo de nitrogênio de um grupo α -amino do aminoácido seguinte, como apresentado na Figura 1. De acordo com a natureza de seus grupos substituintes (R' e R''), os aminoácidos podem ser polares ou apolares e sua distribuição ao longo da molécula de proteína determina seu comportamento (LEHNINGER, NELSON e COX, 2013; ILLANES, 2008).

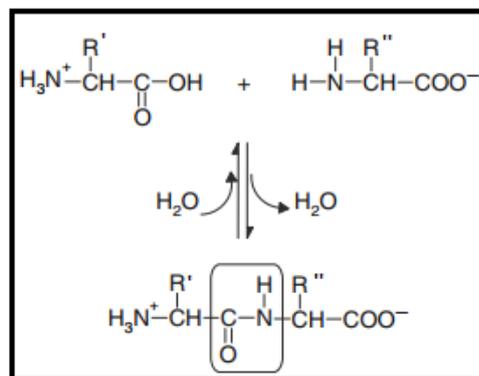


Figura 1. Formação de ligação peptídica entre dois α -aminoácidos adjacentes (Adaptado de ILLANES, 2008).

As enzimas são moléculas capazes de catalisar eficientemente uma infinidade de reações químicas, sem, contudo, sofrerem quaisquer alterações em sua composição. Elas são consideradas catalisadores verdes por serem biocompatíveis, biodegradáveis e de origem natural (WOLFENDEN & SNIDER, 2001).

A catálise enzimática (biocatálise) ocorre em uma pequena porção da enzima denominada sítio ativo (ou centro ativo). Os sítios ativos são pequenas regiões da sequência de aminoácidos, responsáveis pelas reações químicas, enquanto o resto da proteína atua como um suporte. O sítio ativo possui características moldáveis à ancoragem do substrato (*em bioquímica, é designado substrato um composto químico que sofre reação catalisada por uma ou mais enzimas, diferentemente da definição utilizada na engenharia, onde o substrato é o material que serve de suporte para deposição de outro material. Para maior clareza do texto, será denominado substrato o que atende à definição bioquímica e suporte o que atende ao conceito usado em engenharia*). Ao se ligar à enzima no sítio ativo, o substrato adequa a conformação do sítio à sua estrutura e sofre alterações na distribuição de elétrons de suas ligações químicas, o que leva à formação dos produtos. Após a formação dos produtos, estes são liberados da enzima que está pronta para o próximo ciclo catalítico (ILLANES, 2008; WOLFENDEN & SNIDER, 2001). A Figura 2 apresenta a teoria do encaixe induzido (*induced fit*), que descreve como funciona o processo de catálise das enzimas.

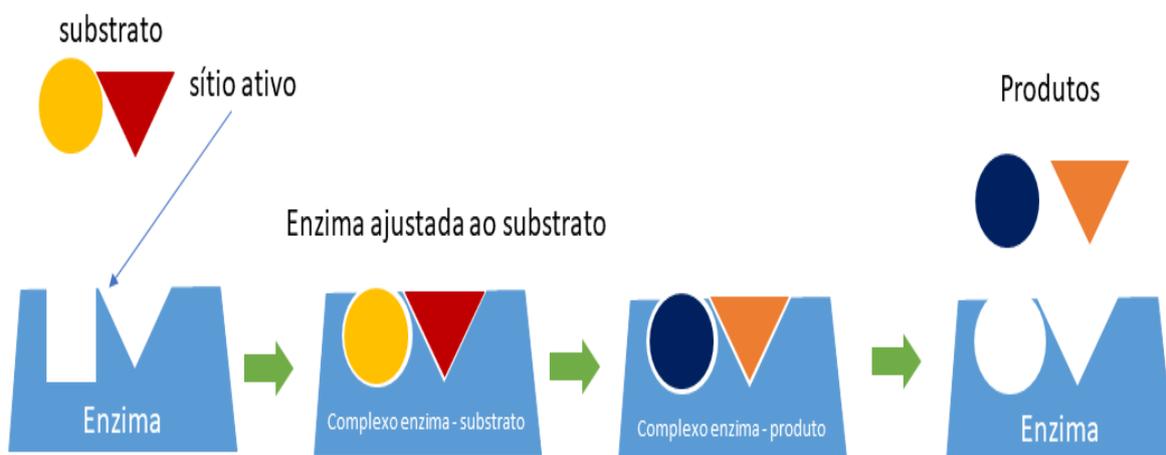


Figura 2. Modelo do encaixe induzido (*induced fit*) de processo de catálise enzimática.

(Fonte: www.thebiologynotes.com, Adaptado).

O comitê de nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), classifica as enzimas em seis famílias diferentes, de acordo com suas atividades biocatalíticas (ILLANES, 2008):

- *Oxirredutases*: são enzimas que catalisam reações de oxidação-redução por meio de transferência de elétrons, hidrogênio ou oxigênio;
- *Transferases*: são enzimas que catalisam a transferência de grupos funcionais entre doador e receptor;
- *Hidrolases*: são enzimas que catalisam reações de hidrólise, isto é, a cisão de uma ligação química pela ação da água;
- *Liases*: são enzimas que catalisam reações de cisão não hidrolíticas e não oxidativas das ligações químicas;
- *Isomerases*: são enzimas que catalisam reações de conversão de um substrato em um isômero, ou seja, em uma substância molecularmente igual, mas estruturalmente diferente;
- *Ligases*: são enzimas que catalisam reações de ligações covalentes entre duas moléculas.

Além de serem catalisadores muito eficientes (em função de sua alta seletividade), as enzimas são capazes de manter elevada atividade catalítica em condições brandas (temperatura ambiente, pH fisiológico, pressão atmosférica, etc.). Tais características tornam essas moléculas alternativas eficientes para substituição de catalisadores tradicionais, como, por exemplo, os metálicos, que têm sua atividade limitada às condições específicas de ativação (LEHNINGER, NELSON e COX, 2013; ILLANES, 2008).

A versatilidade enzimática como catalisador é de interesse para diversos setores da indústria. Elas podem ser aplicadas em processos variados, como na fermentação de laticínios e produtos de panificação, fabricação de cerveja, processamento de frutas e vegetais, produção de detergentes, cosméticos, medicamentos, na produção de biocombustíveis de primeira e

segunda geração, processamento têxtil, na indústria de química fina e ainda em processos de despolimerização (SALES *et al.*, 2020; GUERRAND 2017).

No setor de embalagens para alimentos, enzimas comerciais podem ser facilmente utilizadas como agentes biocatalisadores, com aplicações que variam de controlar o crescimento microbiano, inibir reações de degradação oxidativa à biocatálise direcionada (inibição de compostos ativos presentes na formulação do alimento ou naturalmente gerados por este em processos de maturação e/ou desnaturação), sem modificar características como textura, estabilidade de emulsões, odor, gosto e cor (XIE *et al.*, 2022; SHARMA *et al.*, 2022; KAUSHAL *et al.*, 2018).

3.1.1 Lipases

Dentre as enzimas que possuem maior versatilidade industrial, podemos destacar as lipases. Lipases (triacilglicerol acilidrolase, EC 3.1.1.3) catalisam a hidrólise das ligações éster carboxílico em triacilgliceróis (TAGs) para produzir monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol. Além disso, as lipases catalisam a hidrólise, acidólise, aminólise e transesterificação de outros ésteres, e ainda a síntese de ésteres. Lipases podem ser obtidas de diversas fontes, podendo ser de origem animal, como por exemplo, lipase pancreática de porco; de bactérias, como as lipases produzidas por *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp.; de fungos, como lipase *Aspergillus* sp. e *Candida* sp.; de planta, como lipases de mamona; de palmeira, entre outras. As lipases produzidas por bactérias, no entanto, vêm ganhando mais destaque no uso industrial devido a maior variedade de reações que podem catalisar, e maior simplicidade de isolamento e produção (MEHTA *et al.*, 2020). A Tabela 1 a seguir apresenta exemplos do uso de lipases em diferentes aplicações industriais.

Tabela 1. Aplicações industriais das lipases (Adaptado de SHARMA et al., 2001).

Indústria	Ação	Aplicação
Laticínios	Hidrólise de leite, gordura, maturação de queijo e modificação de gorduras	Desenvolvimento de agente aromatizante em leites, queijos e manteigas
Detergentes	Hidrólise de gorduras	Remoção de manchas de óleo em tecidos
Bebidas	Melhoramento de amora	Melhoria do aroma e sabor
Condimentos	Aumento da qualidade	Estabilidade de molhos para salada, cremes, maioneses, chantillys
Carnes e peixes	Melhoramento de sabor	Remoção de rancidez dos alimentos à base de carnes pela remoção de gordura
Farmacêutica	Hidrólise de álcoois e poliésteres	Produção de diversos produtos intermediários aplicáveis na fabricação de fármacos
Cosméticos	Síntese	Atuam com emulsificantes e hidratantes
Biorremediação	Transesterificação de óleos e graxas	Remoção e hidrólise de oleosas e graxas
Combustíveis	Transesterificação	Produção de biodiesel
Agroquímicos	Esterificação	Produção de herbicidas

As lipases de *Candida rugosa* (CRL) são vastamente utilizadas em diversos processos catalíticos, sendo uma das enzimas mais aplicadas em síntese de fitoesteróis (fitoesteróides, semelhantes ao colesterol, que ocorrem em plantas, sementes, óleos vegetais e frutas), correspondendo a cerca de 50% da aplicação (PEREIRA *et al.*, 2022). Também apresentam alta eficiência quando utilizadas na produção de biodiesel (KUMAR *et al.*, 2023). O sítio ativo das CRL é coberto por uma tampa (*lid*) composta de aminoácidos com propriedades anfifílicas em uma estrutura β -hélice, que é essencial para ativação interfacial e, conseqüentemente, para a atividade enzimática catalítica, outra vantagem para reações de esterificação (PEREIRA *et al.*, 2023; KUMAR *et al.*, 2023).

3.2 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Apesar de vantajosa, a aplicação industrial das enzimas é frequentemente dificultada pela instabilidade destas em condições de processamento e estocagem, como por exemplo, altas temperaturas, pHs extremos e longos prazos de prateleira (YUSHKOVA *et al.*, 2019; ILLANES, 2008). A Tabela 2 apresenta as vantagens e desvantagens da utilização das enzimas como catalisadoras em processos industriais.

Tabela 2. Vantagens e desvantagens da utilização de enzimas processos catalíticos (Adaptado de ILLANES, 2008).

Vantagens	Desvantagens
Alta especificidade	Alta complexidade molecular
Alta atividade em condições moderadas	Alto custo de produção quando comparada aos catalisadores comerciais mais tradicionais
Possibilidade de reuso	Fragilidade intrínseca
Altamente biodegradável	
Produto de origem natural	

Tais desvantagens geralmente podem ser superadas pela imobilização da enzima. Além disso, o processo de imobilização minimiza extensamente a contaminação da enzima por agentes externos e a contaminação do produto pela enzima, sendo mais fácil separá-la deste. A imobilização da enzima também é um processo que permite um maior custo-benefício, uma vez que a utilização de um suporte elimina o desperdício durante o processo (RIOS *et al.*, 2022; NGUYEN & KIM, 2017; EŞ *et al.*, 2015a; SHELDON e VAN PELT, 2013; HOMAIEI *et al.*, 2013; GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). A Figura 3 ilustra as vantagens e desvantagens da imobilização das enzimas em sua ação biocatalítica.

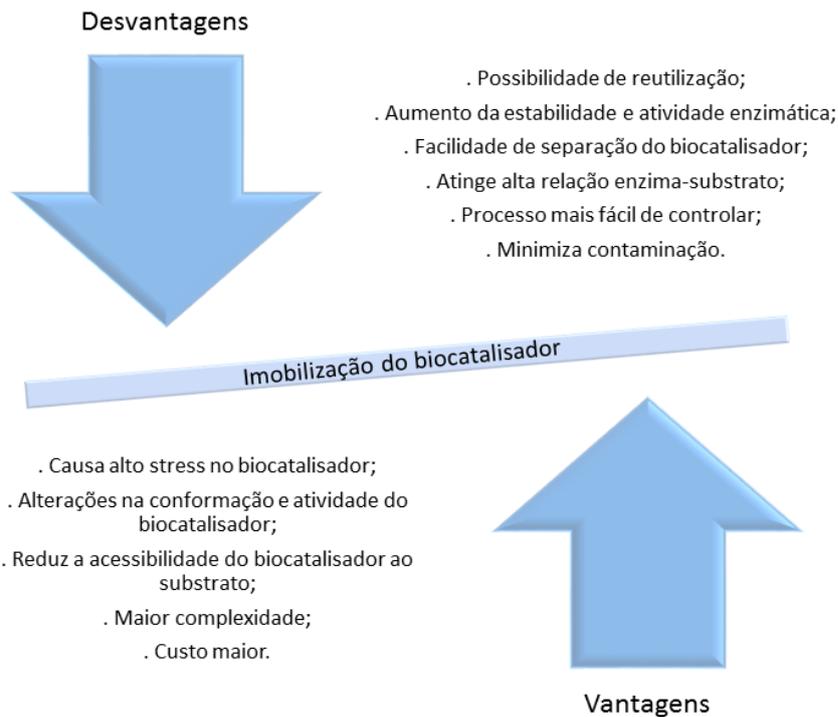


Figura 3. Comparação entre vantagens e desvantagens da imobilização biocatalítica

Existe uma grande quantidade de metodologias para imobilização de enzimas já descritas na literatura. Estes métodos podem ser divididos em duas categorias: (i) métodos que envolvem interação química da enzima com a matriz (ou apenas entre enzimas, no caso da reticulação), denominados métodos químicos e (ii) métodos onde a enzima está restrita a um espaço limitado e ligada à matriz por interação física, denominados métodos de contenção (ILLANES, 2008).

3.2.1 Métodos Químicos

Os métodos químicos podem ser subdivididos em métodos que incluem a ligação química das enzimas em um suporte inerte (denominado método de suporte), por meio de adsorção ou ligação covalente entre enzima e suporte, e métodos que não requerem suporte (denominado método de reticulação) que podem ocorrer pela formação de uma rede de ligação cruzada de enzimas agregadas (*cross-linked enzyme aggregate* - CLEA) ou de cristais (*cross-linked enzyme crystal* - CLEC) (ILLANES, 2008; SHELDON e VAN PELT, 2013).

MÉTODOS DE SUPORTE (*CARRIER*)

Diversos materiais vêm sendo aplicados como suportes para imobilização de enzimas, sejam compostos orgânicos ou inorgânicos. Os requisitos básicos para um material poder ser utilizado como suporte na imobilização de enzimas por meio do método químico de suporte são: alta capacidade de se ligar às proteínas, compatibilidade e insolubilidade no meio reacional, estabilidade química e mecânica, flexibilidade conformacional e alta área superficial. Os materiais mais comumente usados como suporte para imobilização de enzimas são resinas poliméricas sintéticas, polímeros naturais, como por exemplo, polissacarídeos, sílicas e zeólitas (ILLANES, 2008; SHELDON e VAN PELT, 2013; VASILE, 2018a).

Imobilização em suporte por adsorção

Nesta metodologia, a enzima está imobilizada no suporte por meio de interações que podem ser interações hidrofóbicas, interação de van der Waals ou por meio de ligação iônica. As principais vantagens deste método são a facilidade em recuperar o suporte após a exaustão da enzima, por meio da dessorção de proteínas, os rendimentos de imobilização geralmente elevados e a simplicidade do método. No entanto, sua principal desvantagem é que a enzima pode ser facilmente dessorvida do suporte por alterações no ambiente da reação. No caso da imobilização por ligação iônica, por exemplo, muitas proteínas podem perder força e sofrer dessorção com alterações no pH do meio reacional. É importante ressaltar que em meios não aquosos, como em solventes orgânicos, a tendência à dessorção das enzimas é significativamente reduzida, tornando essa metodologia uma opção adequada (ILLANES, 2008; SHELDON e VAN PELT, 2013).

Imobilização em suporte por ligação covalente

Nesta metodologia, ligações covalentes são estabelecidas entre os grupos funcionais disponíveis no suporte e os grupos funcionais disponíveis nos resíduos de aminoácidos das enzimas. É um método significativamente complexo, mas muito explorado na literatura, dispondo de diversos protocolos de desenvolvimento. Como principal vantagem, pode-se destacar a estabilidade operacional alta e flexibilidade, possibilitando que a imobilização seja realizada adequando às características de cada processo. No entanto, devido à alta energia de ligação enzima-suporte adquirida por essa técnica, a mobilidade da enzima é restringida, reduzindo seu acesso ao substrato e, conseqüentemente, reduzindo sua atividade catalítica. Além disso, podem ocorrer alterações nas propriedades cinéticas da enzima. Para a catálise industrial em biorreatores, a impossibilidade de reutilizar o suporte após a exaustão da enzima é uma desvantagem ainda mais significativa (EŞ *et al*, 2015b; ILLANES, 2008; SHELDON e VAN PELT, 2013).

MÉTODOS DE RETICULAÇÃO (*CROSS-LINKING*)

Enzimas são moléculas naturalmente solúveis em meio aquoso. No entanto, estas podem se tornar insolúveis por meio da formação de uma rede tridimensional de ligações cruzadas entre elas (reticulação). Essa reação é feita utilizando um reagente bifuncional que atuará como agente reticulante, ou seja, um reagente que fornece grupos diferentes dos grupos presentes nas enzimas, fazendo com que estes grupos se liguem covalentemente aos seus grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos, criando uma rede tridimensional de enzimas reticuladas (EŞ *et al*., 2015b; ILLANES, 2008; SHELDON e VAN PELT, 2013).

Imobilização por formação de rede de ligação cruzada de enzimas agregadas (CLEA)

A imobilização por reticulação de agregados de enzimas é feita reticulando-se os agregados de enzimas via técnica de precipitação de proteínas.

Primeiramente enzimas solúveis são agregadas pela adição de agentes externos, como por exemplo, sais, solventes orgânicos ou polímeros. Posteriormente, os agregados são agitados vigorosamente a fim de se reduzir o tamanho dos agregados de enzimas. Por fim, os agregados formados são reticulados e as enzimas se tornam estáveis por meio da imobilização.

Essa técnica de imobilização é bastante vantajosa por alcançar uma alta atividade enzimática, já que dispõe de uma alta concentração de enzimas expostas (praticamente todos os sítios ativos estão disponíveis e não há impedimento na mobilidade da enzima pela presença de um suporte), alta estabilidade e baixo custo de produção, dispensando investimento em suporte. No entanto, sistemas de CLEAs possuem desvantagens como baixas propriedades mecânicas (partículas altamente compressíveis e sensíveis ao cisalhamento) e dificuldade do controle do tamanho de partículas (partículas geralmente muito pequenas), dificultando a recuperação do catalisador (ILLANES, 2008; SHELDON e VAN PELT, 2013).

Imobilização por formação de rede de ligação cruzada de cristais de enzima (CLEC)

A imobilização por CLEC é feita pela reticulação de cristais de enzimas purificados. Essa reticulação dos cristais de enzimas estabiliza a rede cristalina, conferindo alta atividade catalítica resultante de uma alta concentração enzimática disposta em redes com alto grau de organização. A estabilidade deste sistema permite sua liofilização e armazenagem em temperatura ambiente. Os cristais reticulados também são altamente estáveis em condições extremas como, por exemplo, alta temperatura, pHs extremos e exposição à solventes orgânicos, mantendo sua atividade catalítica.

Embora possua as vantagens anteriormente mencionadas, esta metodologia possui a desvantagem de ter um custo significativamente alto, resultante do processo de purificação em

alto grau necessário para que as enzimas sofram cristalização. Tal custo torna este processo inviável para diversas aplicações (ILLANES, 2008; SHELDON e VAN PELT, 2013).

3.2.2 Métodos de Contenção

Os métodos de contenção são métodos de imobilização da enzima em um espaço restrito, por meio do aprisionamento das enzimas em sistemas de géis poliméricos, denominados métodos de aprisionamento em gel (*entrapment*) ou ainda no confinamento destas em microcápsulas ou cascas que permitam a interação enzima-substrato sem permitir a liberação da enzima para o meio, denominados métodos de encapsulamento (*encapsulation*).

Estes métodos possuem inúmeras vantagens em relação aos métodos já apresentados anteriormente, como por exemplo, ser mais eficiente em imobilizar a enzima que o método de adsorção, mas possibilitar uma maior interação desta com o substrato, em comparação ao método de ligação covalente. Além de não necessitar de enzimas com alto grau de pureza, como no caso dos métodos de reticulação. O inconveniente dos tamanhos das partículas no caso dos sistemas imobilizados de CLAEs também é sanado por meio dos métodos de confinamento (ILLANES, 2008; SHELDON e VAN PELT, 2013).

MÉTODO DE APRISIONAMENTO EM GEL (*ENTRAPMENT*)

O método de aprisionamento em gel é muito similar ao método de suporte, no entanto, este método se dá pelo aprisionamento das enzimas na matriz de um polímero durante a sua reação de polimerização e não em uma matriz pré-fabricada. A imobilização ocorre pela polimerização do monômero presente num solvente contendo a enzima. As enzimas ficam confinadas entre as cadeias de polímero formadas, numa conformação compacta o suficiente para imobilizá-las. A polimerização pode ocorrer por rotas químicas ou por fotopolimerização. Embora ocorra majoritariamente durante o processo de polimerização, a imobilização por aprisionamento em gel pode ser realizada ainda no processo de gelificação de polímeros como, por exemplo, o

poli(álcool vinílico) - PVA. Uma solução concentrada de PVA é misturada à enzima e conduzida ao resfriamento para que ocorra a formação de gel.

Esta metodologia de imobilização resulta em biocatalisadores com tamanhos apropriados para processos de catálise industriais e de fácil recuperação. No entanto, é limitada no que diz respeito à transferência de massa (baixa transferência de massa, resultante da alta viscosidade do gel necessária para evitar perda), dificultando o livre acesso do substrato à enzima, reduzindo sua atividade catalítica (ILLANES, 2008; SHELDON e VAN PELT, 2013).

MÉTODO DE ENCAPSULAMENTO (*ENCAPSULATION*)

A principal característica desta metodologia de imobilização é a possibilidade de um alto nível de liberdade do substrato e do produto sem a perda da enzima para o meio. Nesta técnica, mais de uma enzima pode ser imobilizada no mesmo suporte, podendo desempenhar mais de uma ação catalítica (ILLANES, 2008).

Encapsulamento em microcápsulas

A imobilização de enzimas em microcápsulas é dada por uma reação de polimerização que ocorre na superfície de gotas de uma solução aquosa de enzimas. A solução aquosa da enzima é gotejada em um solvente orgânico imiscível em água contendo o monômero. Um surfactante (espécie com grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos que reduz a tensão superficial entre dois líquidos imiscíveis, mantendo uma emulsão) é adicionado para manter a dispersão das gotas de enzima. Um material de parede de matriz polimérica é formado ao redor da solução aquosa da enzima, encapsulando-a (ILLANES, 2008).

Encapsulamento em fibras

A incorporação de enzimas em materiais nanoestruturados vem ganhando destaque na literatura, uma vez que a razão área/volume intrinsecamente alta destes materiais proporciona uma vasta disponibilidade de superfície para a ancoragem destas enzimas, aumentando significativamente sua eficiência catalítica em comparação com enzimas imobilizadas em suportes tradicionais (macro) (EL-AASSAR et al., 2019, BILAL et al., 2019).

Alguns dos materiais nanoestruturados, no entanto, apresentam desvantagens que são difíceis de contornar. Materiais mesoporosos (com tamanhos de poros entre 2-50 nm), por exemplo, geralmente confinam moléculas de enzima em sua área interna, o que limita a difusão do substrato para a enzima e resulta em menor atividade enzimática. Nanopartículas e os nanotubos, mostraram diminuir notavelmente a transferência de massa, tornando sua dispersão mais difícil (BILAL et al., 2019).

Nanofibras poliméricas obtidas por eletrofiação têm um grande potencial para superar tais limitações, podendo ser suportes promissores para a imobilização enzimática. Estas fibras são extremamente vantajosas, já que uma alta gama de polímeros pode ser utilizada nessa técnica, e são capazes de formar estruturas com poros interconectados (o que permite uma maior transferência de massa). Além disso, propriedades intrínsecas dos polímeros como facilidade de modificação superficial (que favorece a fixação de enzimas e aumenta sua atividade), baixo custo de produção, alta processabilidade e resistência mecânica adequada, são exploradas. Outras propriedades de materiais passíveis de serem eletrofiados desejadas para imobilização de enzimas são: biocompatibilidade e não toxicidade, hidrofiliabilidade e biodegradabilidade (BILAL et al., 2019; VASILE 2018a; ZDARTA *et al.*, 2018, MANCIPE et al., 2022).

A técnica de eletrofiação consiste na infusão de uma solução polimérica com solvente condutor por um capilar com o auxílio de uma seringa. Um campo eletrostático de alta voltagem é formado entre a ponta do capilar e um coletor aterrado, levando ao estiramento da solução

com evaporação do solvente e formação das fibras depositadas no coletor (MANCIPE *et al.*, 2022; SUN *et al.*, 2019; ZHUANG *et al.*, 2019).

A imobilização da enzima em fibras eletrofiadas pode ser realizada por meio de três metodologias diferentes.

A primeira metodologia consiste na imobilização da enzima na superfície das fibras em etapas pós-processamento, por meio da funcionalização da superfície das fibras (para expor os grupos ativos ligantes à enzima) e formação de ligações covalentes entre as enzimas e o suporte com a utilização de agente externo (agente químico de reticulação ou irradiação). No entanto, essa técnica traz a necessidade de várias etapas longas que encarecem o processo e o torna industrialmente complexo. Esta tecnologia pode ser considerada uma técnica de imobilização em suporte por ligação covalente (já apresentada anteriormente no texto), dadas suas características.

A segunda metodologia refere-se ao processo de eletrofiação direta monoaxial, que consiste na formação de fibras ativas a partir de uma solução de polímero e enzima. As enzimas são incorporadas à matriz de polímero, sendo aprisionadas entre as cadeias poliméricas por ancoragem. No entanto, essa tecnologia limita o uso de uma vasta gama de polímeros e enzimas, uma vez que a maioria das enzimas apresenta degradação frente à solventes orgânicos comumente empregados na solubilização de materiais poliméricos. Dessa forma, a imobilização fica restrita à utilização de polímeros solúveis em água ou ao emprego de enzimas resistentes à solventes orgânicos.

A terceira metodologia baseia-se no uso de um dispositivo de duas agulhas concêntricas (uma interna e outra externa) onde a solução de enzima é confinada no interior de fibras ocas. Essa metodologia é denominada eletrofiação coaxial e as fibras apresentam morfologia do tipo *core-shell* (núcleo-casca).

Esta técnica possui claras vantagens em relação às outras duas apresentadas, por ser uma técnica de imobilização simples em uma única etapa. Solventes distintos podem ser utilizados

para o material de casca e núcleo (sem a necessidade de utilizar polímeros solúveis em água na casca) sem que a enzima perca sua integridade, além de se mostrar mais eficiente no controle da estabilidade da enzima (BILAL *et al.*, 2019; JIANG *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2014; VASILE, 2018a; HAGHJU *et al.*, 2018; ZDARTA *et al.*, 2018).

A Tabela 3 a seguir apresenta alguns trabalhos disponíveis na literatura, onde enzimas foram imobilizadas em nanofibras produzidas por eletrofiação e avaliadas quanto sua atividade biocatalítica, estabilidade de estocagem e estabilidade em diferentes condições (diferentes temperaturas e pHs).

Tabela 3. Imobilização de enzimas em nanofibras produzidas por eletrofiação.

Enzima/ação	Metodologia	Resultados	Referência
Lacase (degradação por oxidação)	Imobilização por ligação covalente em fibras eletrofiadas de policaprolactona (PCL)/ polietilenodiamina (PEI), funcionalizadas com glutaraldeído.	A enzima imobilizada manteve 30% de sua estabilidade operacional mesmo após 10 ciclos de uso. A enzima imobilizada teve uma eficiência de degradação de 86% e 46% para os corantes Alaranjado II e Verde malaquita, respectivamente.	Kolak <i>et al.</i> , 2023.
Peroxidase de rábano (degradação por oxidação)	Imobilização pelo método de encapsulamento em cápsulas de alginato de sódio (AS), seguida de eletrofiação de solução de poli(cloreto de vinila) com as cápsulas de AS/Peroxidase dispersas.	Devido a dupla imobilização, foi possível obter 100% de eficiência de imobilização. A enzima manteve 80% de sua atividade catalítica. A ação biocatalítica da enzima se manteve superior à 80% para ambos os fármacos avaliados.	Zdarta <i>et al.</i> , 2022.
Tirosinase (degradação por oxidação)	Imobilização por adsorção pós-processo de eletrofiação de fibras de policaprolactona (PCL) com quitosana.	A imobilização da enzima nas fibras manteve 95% de atividade em comparação com a enzima livre. A imobilização aumentou a estabilidade da enzima e facilitou o reuso. O biocatalisador foi capaz de degradar todo o agente poluente (bisfenol A) após apenas 90 min.	Zdarta <i>et al.</i> , 2020.
Lacase (degradação por oxidação)	Imobilização por ligação covalente em fibras eletrofiadas de poli(acrilonitrila-	A eficiência do método de imobilização provou ser diretamente dependente da concentração de PEI incorporada. A imobilização manteve a estabilidade da	El-Aassar <i>et al.</i> , 2019

	estireno/pirrol) funcionalizadas com polietilenodiamina (PEI), utilizando glutaraldeído como agente reticulante.	enzima em diferentes pHs e temperatura. A condição ótima operacional da enzima imobilizada foi encontrada em 70°C e pH 6, enquanto a enzima livre teve uma perda de 65% de sua atividade após 2h submetida a temperatura de 50°C.	
β -D-Galactosidase (biocatálise direcionada)	Imobilização por eletrofiação direta monolítica de fibras de quitosana/poli(álcool vinílico)/ β -D-Galactosidase.	A atividade catalítica da enzima imobilizada não foi significativamente afetada pela imobilização, se mantendo similar à atividade da enzima livre. A imobilização aumentou significativamente a estabilidade da enzima em relação a temperatura, pH e estocagem.	Haghju <i>et al.</i> , 2018

3.3 FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO (*Solution Blow Spinning*)

A técnica *Solution Blow Spinning* (SBS) ou Fiação por Sopros em Solução foi desenvolvida em 2009 utilizando elementos de Eletrofiação e Fiação por Sopros de Material Fundido (*Eletrospinning* e *Melt Blowing*, respectivamente). Este método de produção de micro e nanofibras consiste na injeção de uma solução polimérica, a uma taxa constante, através de uma seringa que injeta a solução em um bico interno de um sistema concêntrico, ao mesmo tempo em que um fluxo de ar ou gás de alta pressão passa pelo bico externo do sistema, evaporando o solvente e formando fibras poliméricas em direção a um coletor (MEDEIROS *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 2020). A Figura 4 apresenta um esquema representativo da configuração de um sistema de *Solution Blow Spinning*.

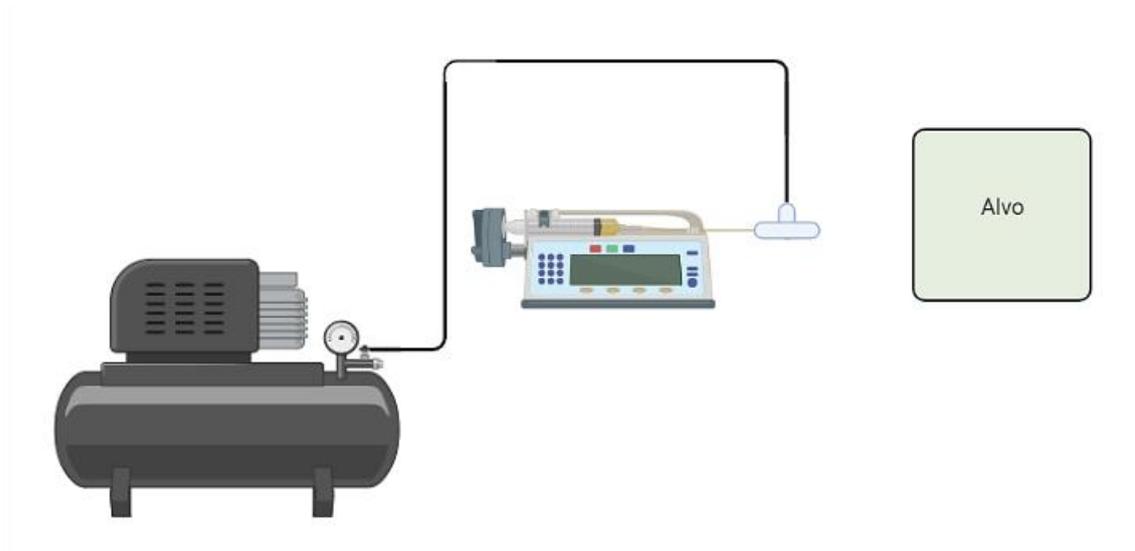


Figura 4. Configuração do sistema Solution Blow Spinning (ilustração criada no Biorender.com).

O desenvolvimento da técnica de SBS traz uma alternativa mais segura e sustentável ao processo de eletrospinning, uma vez que não requer o uso de alta voltagem para obtenção das fibras. É também industrialmente mais viável, sendo sua vazão significativamente maior. Além disso, a vasta possibilidade de solventes que podem ser utilizados no processo de spinning por sopro em solução aumenta significativamente a gama de polímeros que podem ser processados, não sendo limitada, por exemplo, a polímeros que possuam solubilidade em solventes condutores. No entanto, a vantagem da técnica de SBS em relação à eletrospinning que tem atraído o maior interesse é a possibilidade de deposição em qualquer tipo de suporte, incluindo organismos vivos, sendo especialmente interessante para aplicação em biomateriais como suportes ou arcabouços com imobilização de uma diversidade de moléculas e agentes ativos (da SILVA PARIZE *et al.*, 2016; GAO *et al.*, 2020; SONG *et al.*, 2020; dos SANTOS *et al.*, 2020).

Técnicas industriais de produção de fibras poliméricas, como por exemplo, spinning por sopro de material fundido e spinning a seco, utilizam gás para resfriar e evaporar o solvente das fibras, respectivamente, em uma etapa seguinte à spinning. A técnica de SBS é ainda mais viável em comparação a estas, uma vez que o gás pressurizado é utilizado para spinning e evaporação do

solvente, em uma única etapa. O que torna o processo mais simples, rápido e econômico (DARISTOTLE *et al.*, 2016; DADOL 2020).

No entanto, por se tratar de uma tecnologia mais recente, a fiação por sopro em solução possui naturalmente diversos desafios quando comparada a técnicas já bem estabelecidas e vastamente exploradas. O controle das variáveis do processo e sistema (pressão do ar, taxa de injeção, distância de trabalho, tamanho, velocidade e tipo de coletor, diâmetro do bico, ângulo de deposição), o seu efeito na morfologia final das fibras, os fatores externos que afetam o processo (taxa de evaporação do solvente, viscosidade da solução, tensão superficial, temperatura ambiente, pressão atmosférica, umidade relativa do ar), a porção de influência que cada fator tem, entre outras, são questões que ainda seguem sendo discutidas na literatura. Esforços vêm sendo aplicados a cada trabalho desenvolvido, a fim de se superar esses desafios. Apesar destes desafios de uma tecnologia ainda emergente, as vantagens do SBS estimulam pesquisadores a buscarem produzir fibras por essa tecnologia para os mais diversos campos de aplicação que vão desde o uso em biomateriais, sistemas de liberação de fármacos, à aplicação em sensores de monitoramento e controle de qualidade de produtos (DADOL *et al.*, 2020; GAO *et al.*, 2020; DIAS *et al.*, 2020).

MIRANDA *et al.* (2021) desenvolveram sachês de nanofibras de poli(ácido lático) - PLA contendo ativos absorvedores de umidade e oxidativos de etileno para uso em embalagens de frutos climatéricos (frutos que sofrem maturação mesmo após a colheita). Os resultados apresentados mostraram que além de adiar a maturação dos frutos de tomate avaliados, aumentando assim o tempo de prateleira, as nanofibras de PLA produzidas por SBS foram uma barreira eficiente ao agente absorvente permanganato de potássio (KMnO_4), evitando a contaminação por agente tóxico.

Em outro trabalho, em 2020, os autores exploraram ainda a produção de nanofibras de poliestireno (PS) como sensores indicadores de alteração de pH para vinhos, via SBS. Os autores incorporaram azul de bromotimol às fibras de PS e os resultados apontaram que o

material desenvolvido foi adequado ao uso em embalagens para bebidas e alimentos contendo um alto teor de álcool (acima de 20%), sendo indicado para a utilização proposta. Em relação às propriedades morfológicas das fibras obtidas, os resultados mostraram que a incorporação do indicador azul de Bromotimol não alterou significativamente os diâmetros das fibras, embora tenha gerado regiões com contas (*beads*). Este resultado indica que a incorporação de aditivos em fibras produzidas via SBS não interfere diretamente nas variáveis do processo, uma vez que o diâmetro das fibras se manteve diretamente relacionado aos parâmetros utilizados (MIRANDA *et al.*, 2020).

FERREIRA *et al.* (2019) produziram filmes de fibras nanoestruturadas de poli(dimetil siloxano) - PDMS via SBS dopados com nanopartículas de prata (AgNP), para revestimentos antimicrobianos. O material apresentou atividade antimicrobiana contra linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os autores ressaltaram que, embora o método de produção dos revestimentos ativos tenha se dado em duas etapas, sendo elas fiação e deposição das nanopartículas, ainda assim se mostrou um método simples, barato e eficiente.

A fiação por sopro em solução é especialmente adequada para incorporação de moléculas sensíveis a agentes do meio externo e/ou solventes da matriz (como corantes, óleos essenciais e enzimas), por utilizar condições brandas de processamento, mantendo a integridade do princípio ativo enquanto garante seu contato com o meio (ASADUZZAMAN e SALMON, 2022).

Uma alta estabilidade dessas moléculas imobilizadas pode ser encontrada ainda no pós-processamento quando encapsuladas em estrutura núcleo-casca (DIAS *et al.*, 2020; GONÇALVES *et al.*, 2020).

PARK *et al.* (2018) encapsularam o corante fotossensível hidrofílico sulforodamina B em estrutura *core-shell* via SBS. O polímero poli(3-caprolactona) - PCL foi utilizado na casca e o polímero polivinilpirrolidona – PVP como dispersante do corante no núcleo. O efeito da incorporação de uma porção de PVP na estrutura *shell* como agente porogênico foi avaliado.

Os autores destacaram que a presença do agente porogênico PVP facilitou a exposição do corante ao meio externo, aumentando a taxa de liberação deste para o meio. No entanto, foi possível observar a liberação do agente mesmo em estruturas com ausência do agente porogênico.

Polímeros biodegradáveis são materiais bastante explorados nos processos de fiação. Estes polímeros são facilmente processados por essas técnicas e amplamente utilizados como biomateriais, além de possuir apelo ambiental. O polímero biodegradável mais aplicados nos processos de fiação, incluindo o SBS, é o PLA. O PLA é bioabsorvível, biocompatível, possui propriedades mecânicas competitivas e tem um histórico de segurança quando utilizado como biomaterial (PARIZE *et al.* 2016; PARIZE *et al.*, 2016; MILLER, *et al.*, 2019).

No entanto, os polihidroxialcanoatos - PHAs (poliésteres biodegradáveis produzidos naturalmente em fermentação bacteriana) vêm ganhando espaço no setor de bioplásticos (ELMOWAFY *et al.*, 2019; KOLLER e MUKHERJEE *et al.*, 2020).

3.3.1 Poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуалерато)

O poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуалерато) (PHBV) é um copolímero da família dos PHAs, hidrofóbico (quando comparado a outros poliésteres) e termoplástico produzido em larga escala que possui alta biocompatibilidade com diversas linhagens celulares e alta biodegradabilidade, é atóxico, quimicamente estável e com propriedades de barreira e piezoelectricidade. O PHBV pode ser considerado um polímero amigável ao ambiente (*eco-friendly*), já que além de seu processo de produção por fermentação bacteriana ser um processo sustentável, é um polímero 100% biodegradável em diversos ambientes (solos, águas, etc.) (JIAO *et al.*, 2020; PERVEEN *et al.*, 2020; ABAZARI *et al.*, 2021; KANIUK *et al.*, 2020).

No processo de eletrofiação, o PHBV já é um polímero bastante utilizado para gerar estruturas de fibras. No entanto, embora diversos biopolímeros venham sendo processados via

SBS, o PHBV ainda não é muito explorado por essa técnica (GAO *et al.*, 2020; DADOL *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2014).

Em um estudo de Souza *et al.* (2014), os autores produziram nanofibras de PHBV por eletrofiação (ES) e fiação por sopro em solução (SBS) para uso como sistemas de liberação controlada de diclofenaco de sódio e avaliaram o efeito das técnicas utilizadas na eficiência do material produzido. Os resultados mostraram que o fármaco introduzido atuou como plastificante durante os processos de produção das membranas, aumentando sua flexibilidade. O efeito da adição do fármaco nestas propriedades foi similar em ambos os processos. As fibras de PHBV produzidas sem adição de fármacos apresentaram microestrutura e diâmetro análogos para ambas as técnicas. Apenas com a adição de grandes concentrações de fármaco (20% m/m) foi observada uma diferença nas fibras de PHBV produzidas via SBS e ES, onde a adição do fármaco aumentou significativamente os diâmetros das fibras produzidas por SBS (de $246 \pm 1,5$ nm das fibras de PHBV puro para $577,4 \pm 25,7$ nm das fibras de PHBV com 20% de diclofenaco de sódio). Os autores destacaram a competitividade da técnica de SBS para a produção de fibras de PHBV quando comparada ao processo de eletrofiação.

Embora polímeros em solução aquosa sejam mais difíceis de fiar via SBS, devido à baixa pressão de vapor da água em comparação a solventes mais voláteis (como por exemplo, os orgânicos), estes têm sua importância para a técnica, principalmente para formação de fibras núcleo e carregamento de moléculas hidrofílicas e/ou sensíveis à solventes orgânicos (DOS SANTOS *et al.*, 2020; KHARAGHANI *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2014).

3.3.2 Poli(álcool vinílico) – PVA

O poli(álcool vinílico) é um polímero solúvel em água, biodegradável e biocompatível, com alta capacidade de absorção de água e formação de gel. É o polímero hidrossolúvel mais produzido mundialmente, sendo produzidas cerca de 650.000 toneladas de PVA anualmente. Possui alta capacidade de formação de filme, o que atrelado ao fato de ser atóxico e

biocompatível, amplia significativamente seu uso em diversos campos de aplicação. Seu uso vai de embalagens de alimentos, recobrimentos hidrofílicos, excipientes e cápsulas de fármacos, lentes de contato, fios cirúrgicos, entre outros. (ALONSO-LÓPEZ, *et al.*, 2021; KHARAGHANI *et al.*, 2019). Hidrogéis de PVA são especialmente interessantes e bastante aplicado como sistema de carreamento e liberação controlada de moléculas hidrofílicas. Estudos têm explorando essas características do PVA em mantas produzidas pelas técnicas de Eletrofiação e Fiação por Sopros em Solução para aplicação como biomateriais (MICKOVA *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014; TONG *et al.*, 2015; KOLBASOV *et al.*, 2016; ALHARBI *et al.*, 2018; SEDGHI *et al.*, 2018; KHARAGHANI *et al.*, 2019).

3.3.3 Polietilenoglicol – PEG

Outro polímero hidrofílico, atóxico e biodegradável bastante empregado para carreamento de moléculas é o Polietilenoglicol – PEG. O PEG é um polímero sintético de baixa massa molar obtido a partir da polimerização do Óxido de Etileno. Seu uso é aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*). O alto grau de absorção de água, a capacidade de inchamento do PEG, e sua rápida solubilidade, são de alto interesse na aplicação para desenvolvimento de membranas para aplicação médica, curativos e sistemas de liberação controlada para facilitar a interação entre moléculas associadas a ele e meios aquosos (AHMED *et al.*, 2018, D'SOUZA *et al.*, 2016, MASOOD *et al.*, 2019). Hidrogéis de PEG são adequados para carreamento de proteínas. Bioconjugados estabelecidos entre polímeros à base de polietilenoglicol (PEG) aniônicos e proteínas catiônicas, por exemplo, provaram ser uma estratégia promissora para projetar biocatalisadores termoestáveis. (PÉREZ *et al.*, 2018).

CAPÍTULO IV

METODOLOGIA

PARTE I

Nesta etapa do trabalho, mantas de fibras monolíticas de PHBV e PLA foram produzidas via Fiação por Sopros em Solução em diferentes condições e parâmetros de processo, com a finalidade de estudar a processabilidade do PHBV por SBS. Os materiais utilizados bem como os parâmetros testados nesta etapa estão apresentados a seguir.

4.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados para a produção das fibras via fiação por sopros em solução, bem como suas características principais estão descritos na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4. Materiais utilizados.

Material	Características físico-químicas	Fornecedor
Clorofórmio PA estabilizado com amileno	Pureza: 99,5% Massa molar: 119,36 g/mol	Sigma-Aldrich
Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) – PHBV Biocycle 2000 (Lote 109)	Massa Molar ponderal média (Mw) obtida em análise de GPC: 170.930 g/mol Hidroxi-valerato (HV): 4,07%	PHB Industrial S.A
Poli(ácido láctico) – PLA Ingeo (Lote 2003D)	Massa molar ponderal média (Mw) obtida em análise de GPC: 168.164 g/mol Monômero D-ácido láctico: 4%	Natureworks
Polietilenoglicol – PEG	Massa molar: 4000 g/mol Lote: 0503226	Vetec Química Fina

4.2 PRODUÇÃO DE MANTAS DE FIBRAS MONOLÍTICAS DE PHBV E PLA

Uma configuração de um sistema de Fiação por Sopros em Solução foi obtida para a realização de testes de parâmetros de processo para obtenção das mantas de fibras monolíticas.

A Figura 5 apresenta o sistema preparado.

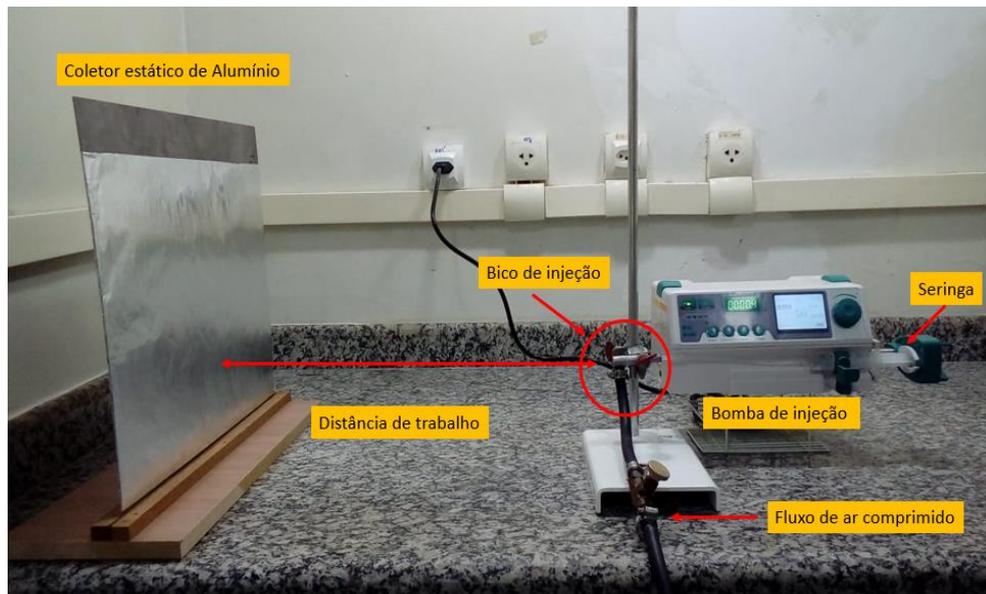


Figura 5. Sistema de Fiação por Sopros em Solução desenvolvido para o processo de obtenção das mantas de fibras monolíticas.

Para a montagem do equipamento, foi utilizado como fonte de ar um compressor modelo Motocompressor Pratic Air 8,5 Pés 2 HP 25L Monofásico, adquirido da SCHULZ. Para a injeção das soluções foi utilizado uma bomba de infusão, modelo BSV 700 FlexPump, adquirido da Biosensor Brasil.

Para a avaliação das condições de processo a serem empregadas na fabricação das fibras, alguns parâmetros foram ensaiados. Testes preliminares de fiação foram realizados para determinar uma concentração adequada para as soluções de polímeros empregadas. Diante dos resultados observados, a concentração de 10% (m/v) do polímero em clorofórmio foi selecionada para dar andamento ao trabalho. A Tabela 5 apresenta os parâmetros e materiais testados.

Tabela 5. Parâmetros de processo utilizados para produção de mantas de fibras monolíticas.

Material	PLA		PHBV
Vazão de injeção (mL/h)	7,5		
Concentração da solução (% massa/volume)	10		
Pressão do ar (PSI)	42	30	24
Distância de trabalho (cm)	20		40

PARTE II

A processabilidade do PHBV foi confirmada na etapa I do presente trabalho e este polímero foi utilizado como casca para a produção das mantas de fibras coaxiais (ou *core-shell*). Nesta etapa, foram produzidas fibras *core-shell* tomando como base os resultados obtidos na etapa anterior. Uma modificação no tipo de alvo de deposição das fibras foi realizada e a influência do tipo e velocidade do alvo na microestrutura e alinhamento destas fibras foi estudada.

4.3 PRODUÇÃO DE MANTAS DE FIBRAS *CORE-SHELL* COM LIPASE E MODIFICAÇÃO NO TIPO E VELOCIDADE DO COLETOR

Uma enzima Lipase (E.C. 3.1.1.3) pancreático tipo II (Sigma-Aldrich, São Paulo) foi utilizada para o estudo do processo de imobilização, devido sua maior disponibilidade em quantidade e menor custo. Uma *solução mãe* dessa enzima Lipase foi preparada utilizando solução salina de NaCl comercial, pH 6 na concentração de 1,82 mg/mL.

Para a solução *core*, foi preparada uma solução de poli(álcool vinílico) – PVA em água destilada na concentração de 10% (m/v). Foram utilizadas 9 partes da solução de PVA para 1 parte da *solução mãe* da enzima.

Embora os parâmetros de produção das mantas de fibras monolíticas tenham sido utilizados inicialmente nesta etapa, ajustes foram realizados com a finalidade de se obter melhores condições de processo como, por exemplo, a redução da pressão de ar para evitar o arraste de fibras do alvo. A Tabela 6 a seguir apresenta os parâmetros utilizados na produção das mantas de fibras *core-shell*.

Tabela 6. Parâmetros de processo utilizados para produção das mantas de fibras *core-shell*.

Solução	Core	Shell
	PVA em água (10% m/v)/ Lipase em solução salina de NaCl (1,82mg/ml) PVA/E 9:1	PHBV em clorofórmio (10% m/v)
Taxa de injeção (ml/h)	0.5	5
Pressão do ar (psi)	10	
Velocidade do alvo (rpm)	0*	
	300	
	600	
Distância de trabalho (cm)	30	

* coletor estático

O dispositivo utilizado para injeção das soluções foi um dispositivo triaxial que consiste em três capilares concêntricos, onde uma agulha de 0,5 mm de diâmetro (capilar da solução núcleo) é posicionada interna a um capilar de 1 mm de diâmetro (capilar da solução casca), que por sua vez está posicionado internamente a uma saída de 1,5 mm de diâmetro para saída do ar comprimido. A Figura 6 apresenta a imagem do dispositivo utilizado no processo.

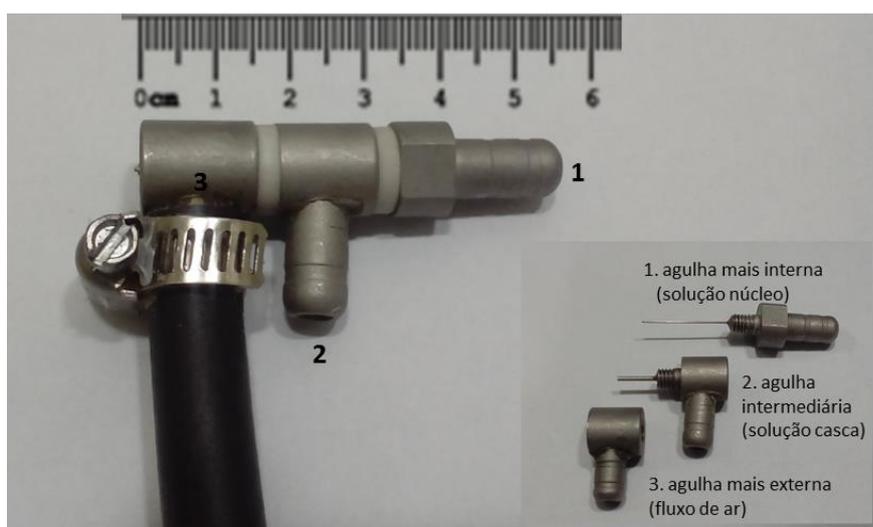


Figura 6. Dispositivo de agulhas concêntricas utilizado no sistema de fiação por sopro em solução

Uma nova configuração do sistema foi adotada para possibilitar a produção das mantas de fibras *core-shell*. Uma nova bomba de injeção foi adicionada ao sistema para possibilitar a fiação de duas soluções diferentes em composição e vazão de injeção. Um ambiente com vedação foi criado para manter umidade e temperatura controladas (aproximadamente $45\% \pm 5$ e $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, para umidade e temperatura, respectivamente) para maior controle das variáveis do processo. Um tambor de alumínio com haste (Figura 7b) foi confeccionado e acoplado a um agitador mecânico para ser utilizado como coletor rotatório. Esta configuração (Figura 7c) produziu fibras orientadas que foram comparadas às fibras aleatórias obtidas com um coletor de placa estático (Figura 7a), como apresentado a seguir.

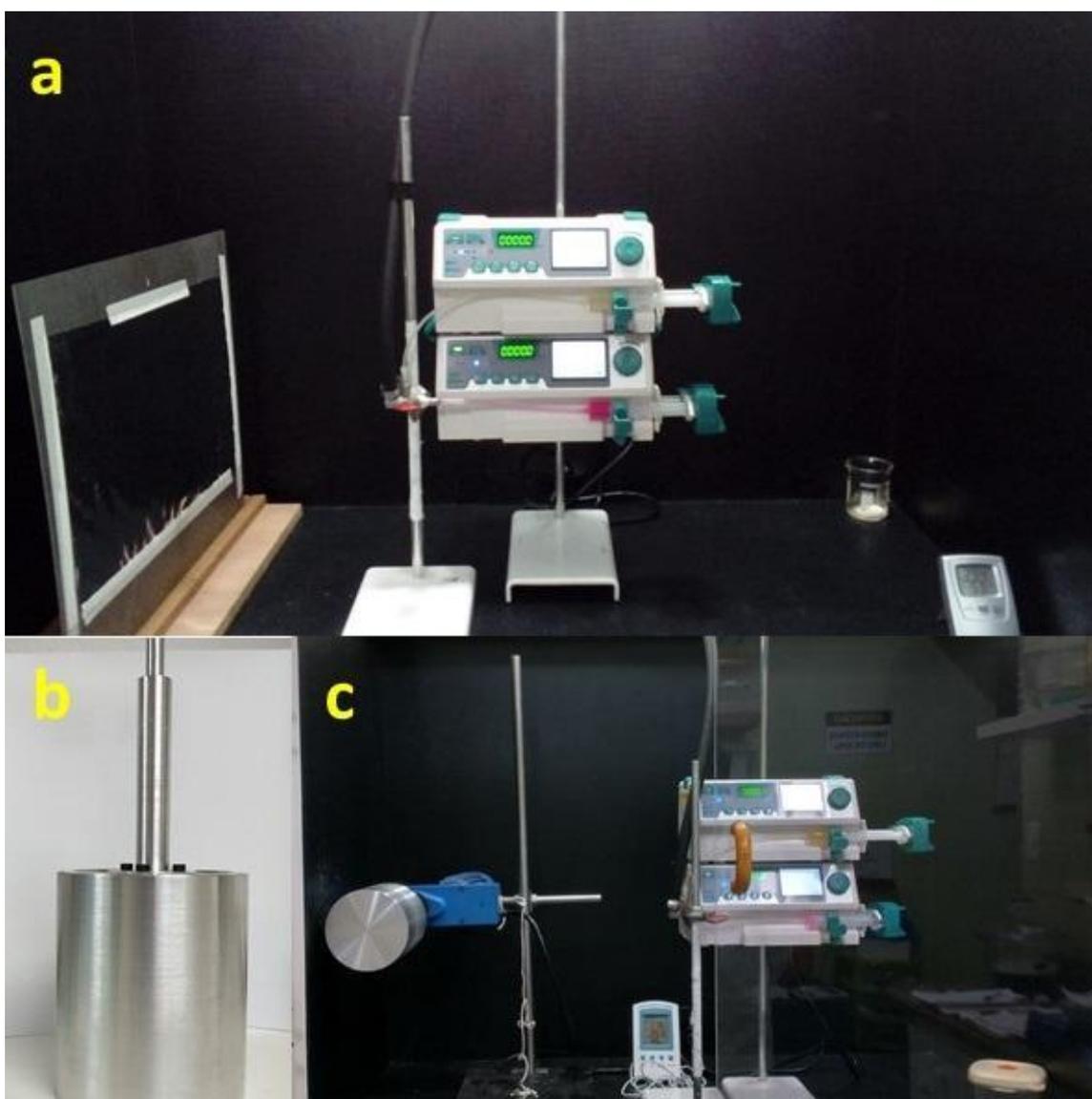


Figura 7. Sistemas de Fiação por Sopros em Solução desenvolvidos para o processo de obtenção das mantas de fibras coaxiais aleatórias (a) e alinhadas (c) e coletor rotatório (b).

PARTE III

A etapa III do presente trabalho constitui da produção de mantas de fibras *core-shell* de PVA/Lipase – PHBV com modificação na composição da casca para avaliar seu efeito no acesso do substrato à enzima e, conseqüentemente, na atividade do material produzido.

4.4 PRODUÇÃO DAS MANTAS DE FIBRAS *CORE-SHELL* COM E SEM PEG

Após as condições de processo bem estabelecidas para a imobilização da enzima Lipase, fibras *core-shell* foram produzidas utilizando uma enzima Lipase de *Candida rugosa*, tipo VII (CAS: 9001-62-1, Sigma-Aldrich, São Paulo), com atividade específica ≥ 700 U/mg de sólido. A *solução mãe* da enzima foi preparada em tampão fosfato (PBS) preparado com concentração molar e pH 100 mM e 7, respectivamente, na mesma concentração utilizada na etapa II (1,82 mg/mL).

Como estratégia para facilitar o acesso do substrato à enzima encapsulada, baseado no estudo de DROR *et al.* (2008), foram inseridas regiões de domínios hidrofílicos nas fibras casca de PHBV. Para tal, 1% em massa de polietilenoglicol (PEG) foi solubilizado juntamente com 10% em massa de PHBV em clorofórmio. A Tabela 7 traz as condições de produção das fibras nessa etapa de processo.

Tabela 7. Parâmetros de processo utilizados para produção das mantas de fibras core-shell com e sem PEG.

Solução	Core	Shell	
	PVA em água (10% m/v)/ Lipase em soro (1,82mg/ml) PVA/E 9:1	Manta sem PEG	Manta com PEG
Taxa de injeção (ml/h)		0.5	PHBV em clorofórmio (10% m/v)
Pressão do ar (psi)	10		
Velocidade do alvo (rpm)	600		
Distância de trabalho (cm)	30		

Nesta fase do presente trabalho, chegou-se às condições finais do material a ser estudado. As etapas anteriores constituíram de passos que convergiram para as duas condições finais, denominadas mantas com e sem PEG (mantas de fibras *core-shell* PVA/Lipase – PHBV e mantas de fibras *core-shell* PVA/Lipase – PHBV/PEG).

CARACTERIZAÇÕES

4.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

4.5.1 Cromatografia Líquida de Permeação em Gel (GPC)

A viscosidade de uma solução polimérica está diretamente relacionada não apenas com a concentração de polímero em uma solução, mas também com o tamanho e massa molar de suas cadeias. Tal relação ajuda a melhor compreender o comportamento da solução no processo de obtenção das fibras. Para tal, a massa molar média, a massa ponderal média (M_w) e a polidispersão (D) do PLA e do PHBV foram avaliadas pela técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC). As análises foram realizadas utilizando-se clorofórmio como solvente, vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 mL. Curva de calibração foi construída com padrões monodispersos de poliestireno e as determinações de massa molar realizadas com o software LC Solution GPC da Shimadzu.

4.5.2 Comportamento Reológico (Viscosimetria)

O comportamento reológico das soluções utilizadas para a produção das fibras monolíticas foi avaliado utilizando um viscosímetro rotacional, com taxas de cisalhamento de 1, 2,5, 5, 10 e 20 rpm. As amostras foram ensaiadas até uma taxa de deformação dos fluidos de 80%. O ensaio ocorreu em temperatura ambiente, de acordo com a CNTP (25°C).

4.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As morfologias das fibras monolíticas de PHBV e PLA, das fibras *core-shell* PVA/Lipase – PHBV e das fibras *core-shell* PVA/Lipase – PHBV/PEG foram avaliadas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aspectos como integridade, presença de defeitos e diâmetro das fibras foram observados. As amostras foram recobertas com ouro para promover a condutividade. Os diâmetros das fibras foram medidos com o auxílio do *software Size Meter*

1.1. As imagens de micrografia obtidas também foram utilizadas no estudo de orientação das fibras produzidas nos diferentes tipos de alvo (estático e rotatório) e nas diferentes velocidades de rotação (0, 300 e 600 rpm). Para esta análise, foi utilizada a ferramenta *Orientation J* do software Image J.

A formação da geometria *core-shell* foi avaliada por meio de microscopia eletrônica de varredura, utilizando detector de elétron de transmissão de varredura (STEM). Para esta análise, foi utilizada uma aceleração de feixe de 30 kV. Um fino pedaço de manta de fibras *core-shell* foi depositado em grades porta amostra de Microscópio Eletrônico de Transmissão recobertas com filme de carbono Formvar.

4.5.4 Microscopia de Fluorescência (MF)

A técnica de microscopia óptica com aparato de luz de fluorescência permite avaliar uma amostra que emita fluorescência (ou marcada com fluoróforos) e identificá-la ao longo de uma amostra que não possua fluorescência. Esta técnica foi utilizada para avaliar as diferentes fases (polimérica e enzimática) presentes ao longo de toda a extensão das fibras *core-shell* das mantas obtidas. Para tal, a solução core foi previamente corada com o corante fluorescente Rodamina adquirida de Proquimios (Rio de Janeiro, Brasil) na concentração de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

4.5.5 Avaliação de ângulo de contato (Molhabilidade)

A análise superficial das mantas de fibras monolíticas de PHBV, das mantas de fibras *core-shell* PVA/Lipase – PHBV e das mantas *core-shell* PVA/Lipase – PHBV/PEG (mantas com e sem PEG) foi realizada por meio da medida de ângulo de contato. foi buscado avaliar a presença ou não de material núcleo na casca, indicando uma falha no processo de produção das mantas de fibras *core-shell* ou seu sucesso. Também foi estudado o efeito da inserção de PEG nas fibras casca. Um filme de PVA/Lipase foi utilizado como controle hidrofílico. Uma gota d'água (2

μL) foi depositada em amostras com 2 x 2 cm em três áreas de amostra diferentes com 100 tempos de medição em cada área. A molhabilidade da superfície foi estudada.

4.5.6 Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A avaliação da composição química da manta de fibras monolíticas de PHBV, da manta de fibras *core-shell* PVA/Lipase – PHBV e da manta *core-shell* PVA/Lipase – PHBV/PEG (mantas com e sem PEG), bem como de um filme de PVA e dos grânulos de PEG foram realizadas via análise de FTIR. As análises foram realizadas no modo transmitância, na faixa de varredura de 4000 a 650 cm^{-1} , com 256 scans e resolução de 4 cm^{-1} . A tabela abaixo apresenta as especificações dos equipamentos utilizados para as caracterizações, bem como os laboratórios parceiros onde foram realizadas as análises.

Tabela 8. Equipamentos, especificações e laboratórios envolvidos nas técnicas de caracterizações.

Técnica de caracterização	Especificações do equipamento utilizado	Laboratório
Cromatografia Líquida de Permeação em Gel (GPC)	Equipamento de GPC Shimadzu LC 20, equipado com forno CTO-20A, desgaseificador DGU-20A3R, detector de índice de difração diferencial (RID-20A) e um conjunto de 2 colunas à base de poliestireno-divinilbenzeno Phenogel linear.	Laboratório de Catálise para Polimerização, Reciclagem e Polímeros Biodegradáveis (LCPRB) do Instituto de Macromoléculas professora Eloísa Mano (IMA)/UFRJ
Viscosimetria	Brookfield, LVDV II + P	Laboratório de Reologia, do Centro de Biocombustíveis, Petróleo e seus Derivados da Escola de Química (EQ)/UFRJ

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	Microscópios eletrônicos de varredura Tescan VEGA3 e Versa 3D Dual Beam – FEI	Núcleo Multiusuário de Microscopia do Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais (PEMM)/COPPE/UFRJ
	FEG Quanta 450 e Helios Nanolab Dualbeam G3 CX – FEI	Centro de Caracterização em Nanotecnologia para Materiais e Catálise (CENANO) do Instituto Nacional de Tecnologia (INT)
Microscopia de Fluorescência (MF)	Microscópio Óptico de Fluorescência Leica, DFC310 FX.	Laboratório de Biopolímeros e Bioengenharia do Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais (PEMM)/COPPE/UFRJ
Avaliação de ângulo de contato (Molhabilidade)	Equipamento goniômetro NRL A 100-00 (Ramé-Hart, Alemanha).	Laboratório de Modificação e Caracterização de Superfícies do Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais (PEMM)/COPPE/UFRJ
Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	Espectrômetro Spectrum 100 (Perkin Elmer, Alemanha) equipado com acessório de reflectância total atenuada (ATR), cristal de seleneto de zinco (SeZn).	Laboratório de Engenharia de Superfícies do Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais (PEMM)/COPPE/UFRJ
Espectroscopia no ultravioleta visível (UV-vis), utilizada na medição de absorbância das análises de atividade.	Molecular Devices, SpectraMax M2e	Laboratório de Engenharia de Sistemas Biológicos da Escola de Química (EQ)/UFRJ

4.6 TESTE DE INTUMESCIMENTO

Para avaliar o potencial de intumescimento das mantas produzidas com e sem PEG (*core-shell* PVA/Lipase – PHBV e *core-shell* PVA/Lipase – PHBV/PEG), foi realizada avaliação de diferença de massa durante o processo de inchamento de três amostras de cada condição, em intervalos regulares durante 4 horas e 30 minutos. Para isso, foram utilizadas amostras de aproximadamente 20 mg, incubadas em solução tampão fosfato 100 mM, pH 7, à 37°C. A massa das amostras inchadas foi relacionada à massa das mesmas amostras quando secas. O excesso de líquido na superfície das amostras foi retirado por capilaridade com o auxílio de um papel filtro absorvente antes de cada pesagem. A equação que representa o grau de intumescimento (GI) está apresentada a seguir.

(1)

$$GI = 100 \times \frac{Mi - Ms}{Mi}$$

Onde, M_i é a massa da amostra intumescida em cada intervalo de tempo e M_s é a massa da amostra seca pesada antes do ensaio (t_0).

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E REUSO

A atividade enzimática foi avaliada seguindo a metodologia descrita por RIOS *et al.* (2022), com modificações necessárias. Para a solução substrato, 9 mg de Laurato de 4-Nitrofenila (*p*NPL) foi solubilizado em 1 mL de sufóxido de dimetila (DMSO) e adicionado a 50 mL de tampão fosfato (PBS) pH 7 a 50 mM. A solução foi mantida a 37°C para atingir a temperatura reacional.

A atividade da enzima livre foi realizada incubando 1,8 mL de solução substrato com 0,2 mL de solução mãe de enzima diluída 100 vezes. As leituras foram tomadas a cada 2 segundos durante um tempo reacional de 5 minutos. O mesmo volume de solução substrato com 0,2 mL de água destilada foi usado com branco e repetido o procedimento.

Para avaliar a atividade das enzimas imobilizadas, foram utilizadas amostras de 20 mg das mantas com e sem PEG (*core-shell* PVA/Lipase – PHBV e *core-shell* PVA/Lipase – PHBV/PEG), incubadas com 3 mL da solução substrato, à 37°C e sob agitação de 600 rpm. A cinética da reação foi monitorada durante aproximadamente 1h, com leituras a cada 90 segundos na faixa de absorvância de 410 nm. Como branco da reação (controle), foram utilizadas 20 mg das respectivas mantas produzida sem enzima. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Para avaliar o reuso, após o tempo reacional de 1h, as mantas foram coletadas do meio e lavadas com 10 mL de tampão fosfato (PBS) pH 7 a 100 mM e retornadas a um novo meio reacional fresco. O desenho experimental utilizado para estes ensaios está esquematizado na Figura 8 a seguir.

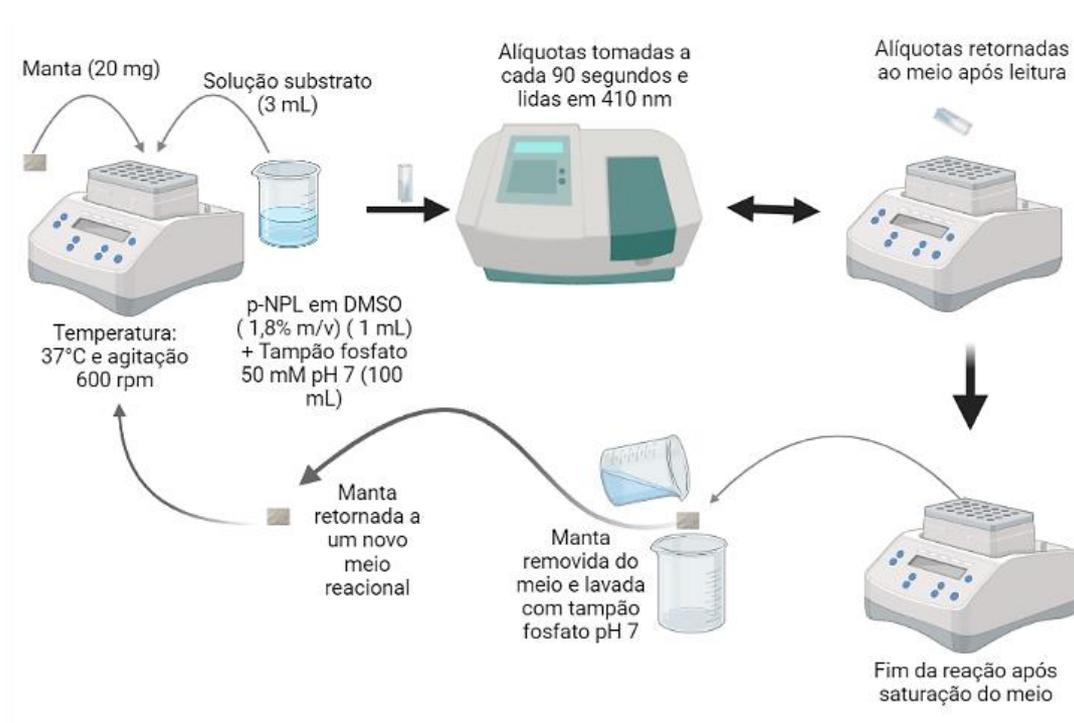


Figura 8. Esquema experimental da metodologia utilizada para os testes de atividade e reuso.

A eficiência de imobilização foi avaliada por meio do cálculo da atividade relativa (AR), de acordo com o descrito por DOS SANTOS (2017). Este fator determina o sucesso do processo

de imobilização por meio da comparação entre as atividades enzimáticas de enzimas livres e imobilizadas. Também foram calculadas as atividades relativas entre as mantas (com e sem PEG). Para encontrar a atividade das amostras analisadas, inicialmente foram determinadas as unidades de enzimas livre e presentes nas mantas. Uma unidade (U) de atividade enzimática hidrolítica é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de produto (neste caso *p*-nitrofenol) por minuto nas condições do ensaio. A atividade da enzima livre foi inicialmente expressa em (U/L) e é calculada de acordo com a seguinte equação:

(2)

$$A (U/L) = \frac{(\Delta A) * D * f * VR}{(\Delta t) * Vs}$$

Onde:

ΔA = a diferença na absorbância em diferentes pontos de tempos da região linear;

D = a diluição da solução enzimática;

VR = volume reacional, que é o volume da solução de *p*-NFL em tampão e o volume da amostra (em litros);

Vs = o volume da solução enzimática utilizada no ensaio (em litros);

f = fator de conversão (245 $\mu\text{mol/L}$) em cubeta de acrílico, obtido através da construção de uma curva padrão de *p*-NFL em concentração variando entre 0,01 e 0,2 $\mu\text{mol/mL}$.

Δt = o intervalo de tempo da região linear da curva (em minutos).

A atividade operacional das enzimas imobilizadas foi expressa em unidades por grama de suporte (U/g). Esta atividade é dada pela equação:

(3)

$$A (U/g) = \frac{(\Delta A) * D * f * VR}{(\Delta t) * MA}$$

Onde:

ΔA = a diferença na absorvância em diferentes pontos de tempos da região linear;

D = a diluição da solução enzimática;

f = fator de conversão (245 $\mu\text{mol/L}$) em cubeta de acrílico, obtido através da construção de uma curva padrão de p-NFL em concentração variando entre 0,01 e 0,2 $\mu\text{mol/mL}$;

VR = volume do meio reacional (em litros);

Δt = o intervalo de tempo da região linear da curva (em minutos);

MA = Massa da amostra (massa em gramas da manta).

No entanto, para se estabelecer uma relação de comparação entre ambas as enzimas (livre e imobilizada), foram determinadas suas respectivas atividades em função da quantidade de proteína disponível em cada amostra. A atividade em função da disponibilidade de proteína (U/g_p) é dada por:

(4)

$$A (U/g_p) = \frac{(\Delta A) * D * f * VR}{(\Delta t) * MP}$$

Onde:

ΔA = a diferença na absorvância em diferentes pontos de tempos da região linear;

D = a diluição da solução enzimática;

f = fator de conversão (245 $\mu\text{mol/L}$) em cubeta de acrílico, obtido através da construção de uma curva padrão de p-NFL em concentração variando entre 0,01 e 0,2 $\mu\text{mol/mL}$;

VR = volume do meio reacional (em litros);

Δt = o intervalo de tempo da região linear da curva (em minutos);

MP = Massa de proteína disponível em cada amostra (em 20 mg de suporte ou 0,2 mL de solução de enzima livre diluída).

Por fim, a atividade relativa é determinada pela equação a seguir:

$$AR(\%) = \frac{AM}{AE_l} \times 100$$

Onde:

AE_l é a atividade enzimática medida nas enzimas livres;

AE_i é a atividade enzimática medida nas mantas.

4.8 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA E DE pH

A estabilidade térmica e de pH das enzimas livre e imobilizadas foi avaliada de acordo com a metodologia a seguir. Para avaliar a atividade das enzimas em diferentes pHs, as soluções substrato foram preparadas pela metodologia já descrita, porém utilizando tampões PBS com pH 5 ou 9. As condições de reação e leitura seguiram de acordo com o item 4.5.

Para o ensaio de estabilidade de temperatura, a reação de atividade foi conduzida incubando-se o meio reacional em temperatura de 50°C.

Para estes ensaios não foi avaliado o reuso. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A Figura 9 apresenta o esquema do experimento realizado para a análise.

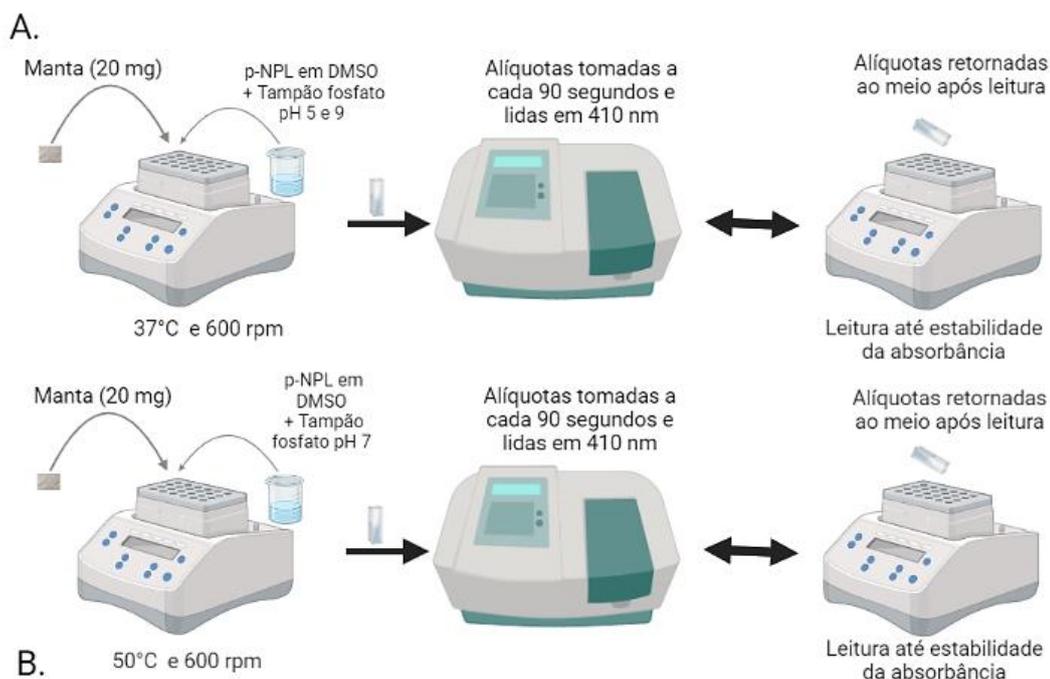


Figura 9. Esquema experimental da metodologia utilizada para os testes de estabilidade em diferentes pHs (A) e em alta temperatura (B).

4.9 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE EM ESTOCAGEM

A estabilidade em estocagem das enzimas imobilizadas nas mantas com e sem PEG foi avaliada realizando a medição da atividade enzimática, como descrito no item 4.5 após estocagem das mantas por 14 dias em temperatura ambiente.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÕES

PARTE I

Este capítulo apresentará os resultados obtidos no presente trabalho, sendo esta parte (Parte I) destinada ao estudo do comportamento reológico das soluções dos polímeros utilizados para a casca e seu efeito nas fibras obtidas no processo de fiação. O efeito da variação dos parâmetros na morfologia das fibras foi avaliado.

5.1 PROPRIEDADES REOLÓGICA DAS SOLUÇÕES DE PLA E PHBV

A viscosidade das soluções de PLA e PHBV em regime semidiluído, a 10% (massa/volume) em função da taxa de cisalhamento está apresentada na figura 10 a seguir.

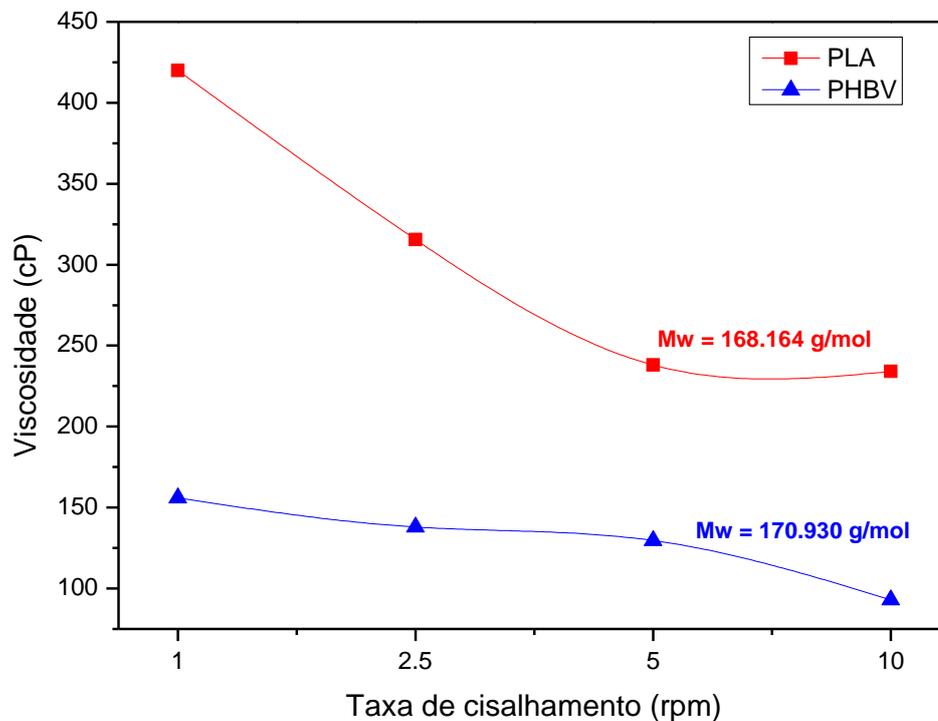


Figura 10. Comportamento reológico das soluções poliméricas utilizadas em função da taxa de cisalhamento.

Com a finalidade de se compreender melhor o comportamento reológico das soluções poliméricas no ensaio de viscosimetria, as massas molares e a polidispersão dos polímeros foram avaliadas por cromatografia de permeação em gel (GPC) e os resultados de massa molar ponderal média (M_w) acompanham o gráfico apresentado.

O comportamento viscoso de uma solução polimérica é dependente de diversos fatores, tais como: concentração de polímero no solvente, afinidade polímero-solvente, massa molar, polidispersão, o grau de enovelamento das cadeias do polímero no solvente e também de fatores externos como temperatura, tempo e taxa de cisalhamento (MAGAZ *et al*, 2018; UM *et al*, 2001).

Uma vez que os ensaios foram realizados nas mesmas condições (temperatura, taxa de cisalhamento, tempo, concentração de polímero na solução e solvente), pôde-se avaliar a influência das propriedades intrínsecas dos polímeros no comportamento reológico da solução.

Embora possuam massa molar e índice de polidispersão muito similares (PLA – M_w : 168.164 g/mol e D: 1,952 e PHBV – M_w : 170.930 g/mol e D: 1,938), quando observamos os comportamentos reológicos do PLA e do PHBV, notam-se comportamentos distintos. A grande redução na viscosidade da solução de PLA em função do aumento da taxa de cisalhamento, sugere um comportamento pseudoplástico para este polímero. Por outro lado, o PHBV apresentou uma redução muito menor de sua viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, sugerindo um comportamento mais próximo de um fluido Newtoniano. Apenas quando a taxa de cisalhamento foi aumentada 10 vezes (de 1 rpm para 10 rpm), foi possível observar uma redução significativa na viscosidade da solução de PHBV (de 150 cP para 100 cP, redução em torno de 67%). A baixa viscosidade e diferente comportamento da solução de PHBV em relação à solução de PLA podem ser atribuídos ao grau de enovelamento das cadeias dos polímeros no solvente. Cadeias bem dispersas apresentam menor resistência ao fluxo que cadeias com conformação enovelada, ao passo que regiões com alto emaranhamento de cadeias

refletem na resposta viscosa do material em baixas taxas de cisalhamento, apresentando alta viscosidade.

O emaranhamento das cadeias está fortemente relacionado à estabilidade da solução (sistema polímero-solvente). Essa interação é um resultado das condições de solubilização (que inclui temperatura e tempo) e também afinidade química e tensão superficial. Neste contexto, a energia coesiva (δ) dos diferentes componentes da solução desempenha um papel importante na solubilização do polímero. O parâmetro de solubilidade generalizada (parâmetro Hansen) assume que três componentes determinar o sucesso da solubilidade do sistema por química afinidade: interações polares (δ_p), ligações de hidrogênio (δ_h), e interações de Van der Waals (δ_d). Estudos anteriores encontraram valores dos parâmetros de Hansen de 21,9, 20,6 e 18,9 $\text{Mpa}^{1/2}$ para PLA, PHBV e clorofórmio, respectivamente (SNOWDON *et al.*, 2017; CHOI & PARK, 2004), indicando que o PHBV tem mais afinidade com o clorofórmio que PLA. Embora os parâmetros pareçam muito próximos, em a nível molecular, a pequena diferença pode refletir na dispersão das cadeias PLA e PHBV em clorofórmio e, conseqüentemente em seu comportamento reológico.

O efeito da viscosidade nos processos de formação de fibras que utilizam soluções poliméricas é bastante conhecido na literatura. Soluções muito concentradas ou com alto emaranhamento de cadeias requerem uma maior força motriz para vencer a tensão superficial e resistência ao estiramento e conseqüentemente formar fibras. Fibras com alto grau de defeitos, carregadas com solvente, formação de gotas e contas ao invés de estrutura fibrilar, fibras heterogêneas (de diferentes diâmetros, enoveladas, rompidas, etc) são alguns dos efeitos da viscosidade das soluções na formação de fibras (MAGAZ *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2014; MIRTIC *et al.*, 2019). O comportamento de cadeias enoveladas apresentado pelo PLA, bem como a baixa viscosidade da solução de PHBV, refletiram significativamente na formação e na morfologia das fibras obtidas, como será apresentado a seguir.

5.2 MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS FIBRAS MONOLÍTICAS DE PLA E PHBV

A solubilidade dos polímeros no solvente teve efeito direto na morfologia das fibras obtidas, como mostra a figura a seguir.

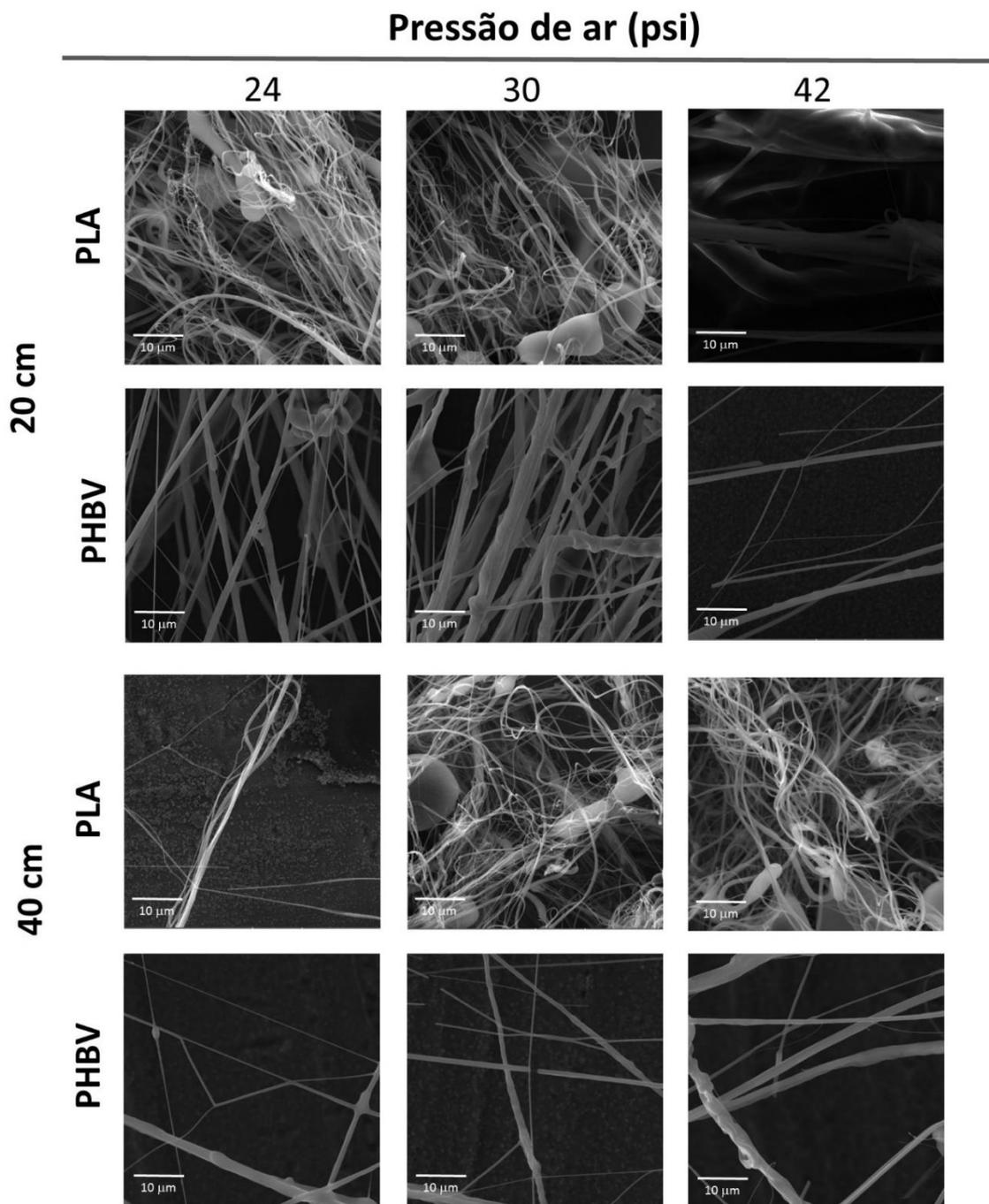


Figura 11. Micrografias de MEV das amostras testadas em diferentes pressões do ar (PSI), com distâncias de trabalho de 20 e 40 cm, aumento de 4000x.

As micrografias apresentadas mostraram que foi possível obter fibras em ambos os polímeros nas condições testadas. As fibras apresentam morfologia heterogênea, com diâmetros variáveis e orientação aleatória. Foi possível observar presença de contas e aglomerados, possivelmente formados pela presença de solvente não evaporado no processo, para ambos os polímeros testados, mas principalmente para os polímeros PLA, sugerindo fluxos turbulentos durante o processo de fiação.

Este resultado mostrou a relação direta do comportamento reológico das soluções de polímeros na morfologia das fibras. REMPEL *et al.* (2019) mostraram que maiores viscosidades favorecem a formação de contas e defeitos em fibras produzidas por SBS. Ao fundo das fibras, nota-se ainda a formação de filme de polímero que pode ser atribuído à percolação das fibras ricas em solvente ao chegar ao alvo, mostrando uma evaporação na eficiente.

A distribuição dos diâmetros das fibras foi obtida utilizando o software SizeMeter. A Figuras 12 apresenta os histogramas da distribuição das medições.

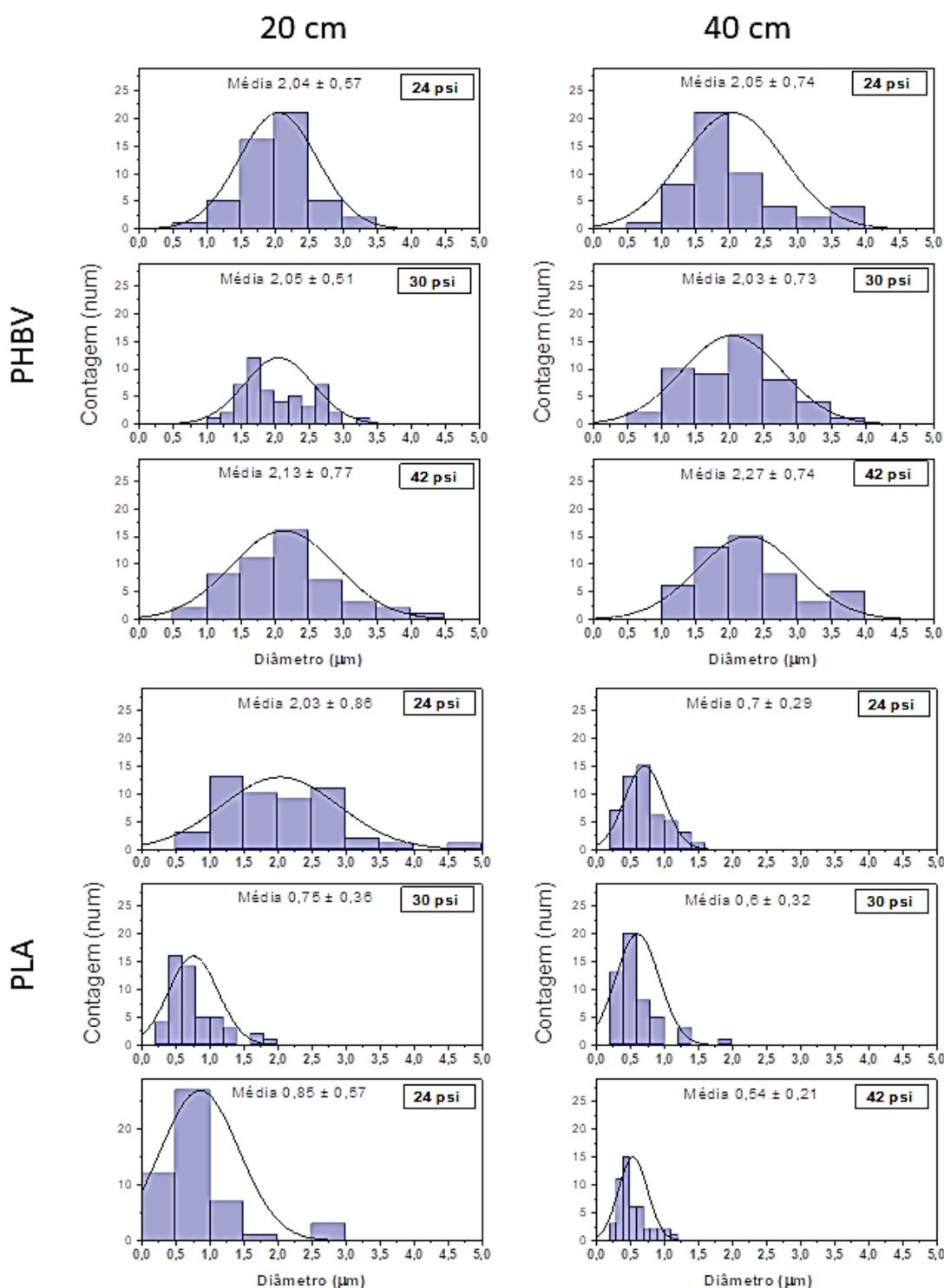


Figura 12. Histogramas de distribuição do tamanho das fibras obtidas com diferentes pressões de ar e distância de trabalho.

Os resultados dos gráficos apresentados sugerem uma tendência de redução da região dos diâmetros das fibras com o aumento da distância de trabalho para as fibras de PLA. Houve redução da faixa de diâmetros de 0 a 5 μm a 24 psi, em distância de 20 cm, para valores entre

0 e 2 μm a 24 psi e distância de 40 cm e redução de 0 a 3 μm a 42 psi e distâncias de 20 cm para valores entre 0 e 1.5 μm a 24 psi e distâncias de 40 cm. Os valores de maior frequência, no entanto, se mantiveram em aproximadamente 0.5 μm para quase todas as condições testadas. Estes resultados sugerem que a maior distância possibilitou um maior tempo de voo para o alinhamento das cadeias e evaporação do solvente. Ao passo que menores distâncias não permitiram tempo adequado para a evaporação do solvente, e com isso depositaram fibras maiores, ricas em solvente, no alvo. A presença de fibras com maiores diâmetros na condição de 24 psi e 20 cm corrobora para tal teoria, uma vez que baixas pressões podem ser insuficientes para forçar o estiramento e evaporação do solvente. Neste caso, pode-se dizer que houve um efeito combinado das duas variáveis na formação das fibras.

Em relação ao PHBV, não houve influência significativa das variações da distância de trabalho e pressão de ar nos diâmetros das fibras. A baixa viscosidade da solução de PHBV facilitou o fluxo da solução e com isso não houve resistência ao estiramento nas condições testadas. A evaporação do solvente também foi mais eficiente para este polímero e pode ser confirmada pelas imagens de micrografias, onde é observado que as fibras de PHBV possuem menos defeitos e contos quando comparadas às fibras de PLA. As fibras de PHBV, no entanto, apresentam uma maior frequência de fibras em torno de 2 μm , sendo significativamente maior que as fibras de PLA. Estudos mostram que fibras de PLA apresentam diâmetros pequenos no geral, sendo uma propriedade intrínseca do material (PARIZE *et al.*, 2016).

Os resultados apresentados sugerem que o PHBV possui uma boa processabilidade no que diz respeito ao processo de fiação por sopro em solução quando comparado ao PLA e, por essa razão, o PHBV foi escolhido para dar continuidade à produção das mantas de fibras, em uma geometria *core-shell*.

Durante esta primeira fase de processo de fiação foi possível observar a formação de uma estrutura de fibras bastante heterogênea com regiões de aglomerados, com grande quantidade de defeitos, ricas em solvente, diâmetros com grandes variações e fibras aleatórias. Além disso,

foi observada presença de fibras por todo o ambiente, indicando o arranque de fibras do alvo pelo fluxo de ar constante necessário durante todo o processo. Esses fatores são inconvenientes já relatados da técnica de SBS e podem ser atribuídos ao baixo controle do fluxo de ar. (DADOL *et al.*, 2020; MEDEIROS *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 2020). Estudos mostram que um maior controle, com redução dos defeitos apresentados, bem como redução dos diâmetros das fibras, pode ser conseguido substituindo um alvo estático por um alvo rotatório que, não apenas tem a geometria que dificulta o arranque das fibras, mas também facilita o estiramento, alinhamento e evaporação dos solventes das fibras (DIAS *et al.*, 2020). Como mencionado no capítulo IV de materiais e métodos, o efeito do tipo e velocidade do alvo foi avaliado e será apresentado na parte II deste capítulo V a seguir.

Conclusões parciais

- Um estudo da viscosidade das soluções de PLA e PHBV foi realizado, embora apresentem valores de M_w e polidispersão similares, seus comportamentos reológicos foram distintos. A baixa viscosidade e diferente comportamento da solução de PHBV em relação à solução de PLA foram atribuídos ao grau de enovelamento das cadeias dos polímeros no solvente pela maior afinidade entre o PHBV e o solvente;
- A processabilidade do PHBV pela técnica de SBS foi comprovada e este se mostrou adequado quando comparado a um polímero vastamente empregado como o PLA;
- Os parâmetros iniciais estudados resultaram em fibras aleatórias ricas em defeitos e contas indicando a necessidade de modificações.

PARTE II

5.3 INFLUÊNCIA DO TIPO DE COLETOR NA MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS FIBRAS *CORE-SHELL*

A Figura 13 mostra a expressiva influência da geometria e da velocidade de operação do coletor no alinhamento das fibras das mantas *core-shell*, bem como na distribuição de tamanho e presença de defeitos. As imagens sugerem que o uso de um coletor rotatório pode gerar menos e menores defeitos, fibras mais orientadas, bem como fibras com uma superfície mais lisa. O efeito do coletor e principalmente da velocidade de rotação no alinhamento da fibra é evidenciada pela análise de orientação (Figura 13a), onde, com o aumento de velocidade, as fibras tendem a ser orientadas em uma direção perpendicular (90°). Este comportamento também foi relatado em fibras de PCL produzidas via Fiação por Sopros em Solução nos estudos de CZARNECKA *et al.* (2021) e SIMBARA *et al.* (2019). Além disso, o uso de um coletor rotatório também reduziu o diâmetro das fibras obtidas em comparação com as coletadas pelo alvo estático. Isso pode ser observado examinando o gráfico apresentado na Figura 13c. Na figura, círculos vermelhos e triângulos azuis, que representam o diâmetro das fibras coletadas a 300 rpm (baixa velocidade, velocidade tangencial de 1,57 m/s) e 600 rpm (alta velocidade, velocidade tangencial de 3,14 m/s), respectivamente, concentram-se na região de menores diâmetros do gráfico, enquanto os quadrados pretos, que são relacionadas às fibras coletadas com alvo estático, estão espalhadas por toda a faixa de diâmetro do gráfico. Essa dispersão também indica que o coletor estático levou a um diâmetro de fibra maior distribuição. Não há diferenças significativas nos diâmetros das fibras em função da velocidade do coletor, mas as fibras produzidas com maior velocidade mostraram-se mais alinhadas e apresentam uma distribuição de diâmetros mais estreita.

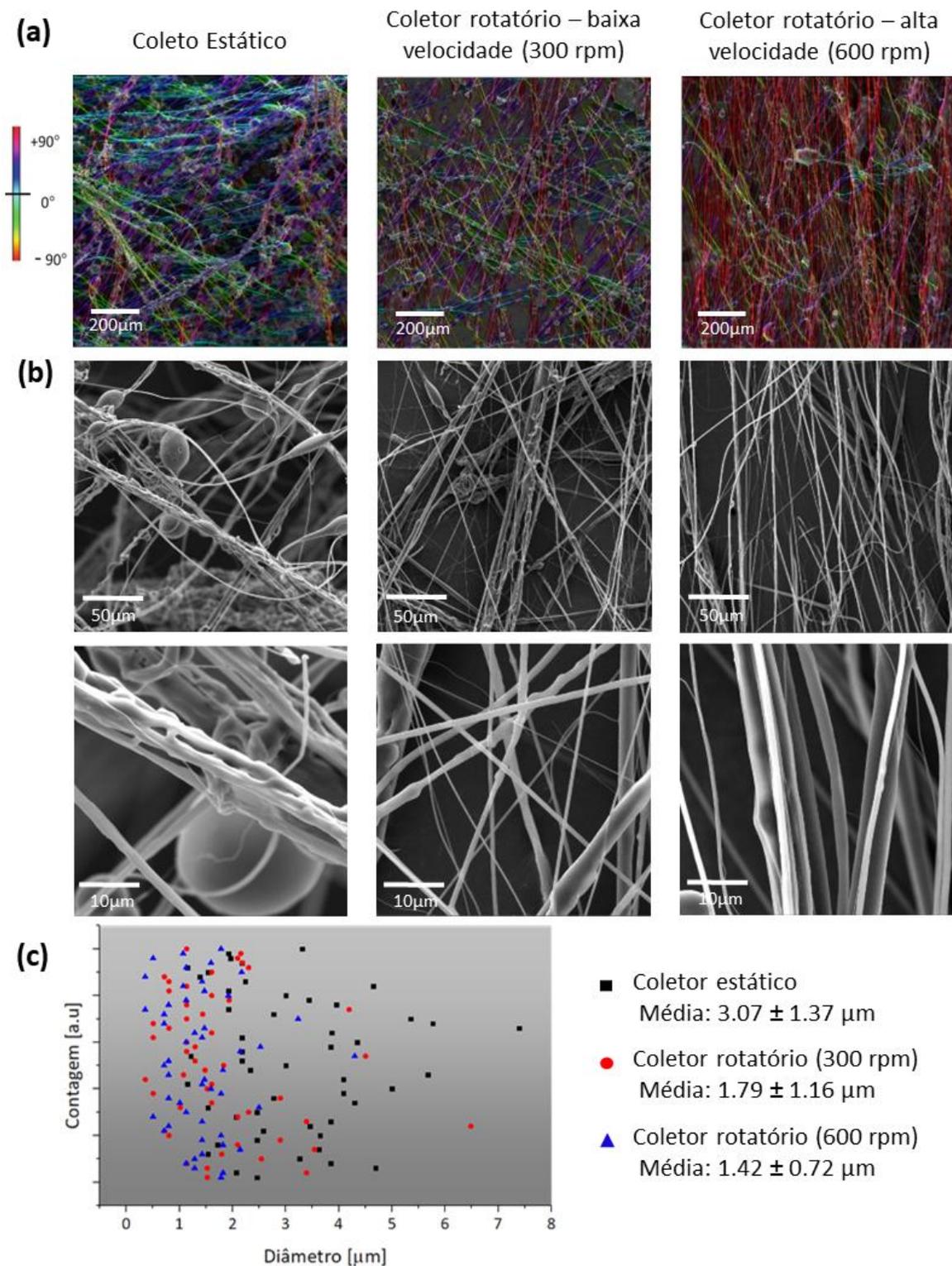


Figura 13. Análise qualitativa da orientação das fibras obtida via Orientation J, plug-in do software image J (mapa de cores de acordo com os ângulos adaptado de Rezakhaniha *et al.* 2012), com micrografias de MEV, aumento de 200x (a); Micrografias de MEV obtidas com aumentos de 1000 e 5000 x (b) e avaliação de distribuição de tamanho (c) de mantas de fibras core-shell produzidas com coletor estático e coletor rotativo (baixa e alta velocidade).

Fazendo um paralelo com a técnica de eletrofiação, propõe-se que o coletor rotatório exerce uma força de alongamento sobre às fibras durante sua deposição, resultando no alinhamento das fibras no sentido de sua deformação, resultando na redução do diâmetro em relação às fibras depositadas no coletor estático. BEACHLEY *et al.* (2012) destacaram que a interação do coletor giratório com as fibras eletrofiadas e, conseqüentemente, a microestrutura da fibra, é altamente influenciada pela velocidade tangencial e elasticidade do material. Assim, o grau de alinhamento e a extensão das fibras em relação ao coletor estático geralmente aumenta com o aumento da velocidade tangencial do coletor, podendo variar de sistema para sistema. Considerando fibras de PCL produzidas por eletrofiação, Edward *et al.* (2010) observaram que em coletores com velocidades tangenciais abaixo de 2 m/s o efeito no diâmetro das fibras é pequeno, enquanto velocidades tangenciais altas acima de 2 m/s exercem bastante influência na redução dos diâmetros das fibras.

JIA *et al.* (2021) produziram fibras de PCL via SBS com coletores estático e rotatório nas velocidades de 150 e 300 rpm (0,78 e 1,57 m/s). Os resultados mostraram que, embora houvesse a influência no alinhamento das fibras, as velocidades aplicadas não afetaram os diâmetros das mesmas. Comparando ambas as técnicas, é possível assumir que velocidades tangenciais altas são necessárias para gerar a tensão suficiente para a deformação adequada que irá influenciar os diâmetros das fibras obtidas, quando utilizada a técnica de SBS. Em um estudo de CHAN *et al.* (2009), os autores avaliaram o efeito do coletor na morfologia e diâmetro de fibras de PHBV/nanotubos de carbono produzidas por eletrofiação. Foi observado que, quando utilizada uma alta velocidade tangencial no alvo (7,8 m/s), pôde-se obter fibras altamente alinhadas e com diâmetros 10 vezes menores quando comparados às fibras coletadas no coletor estático. Apesar da presença da carga de nanotubos no trabalho de Chan e seus colaboradores, o comportamento do PHBV se mostrou similar ao comportamento apresentado neste trabalho, onde obtivemos uma redução nos diâmetros das fibras quando aplicada a velocidade tangencial alta (3,14 m/s).

5.4 CONFIRMAÇÃO DA ESTRUTURA *CORE-SHELL*

Uma análise de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para confirmar a estrutura núcleo-casca das mantas de fibras produzidas nessa etapa do trabalho. Para isso, foi utilizado o modo transmissão no microscópio eletrônico de varredura. A micrografia obtida está apresentada na Figura 14.

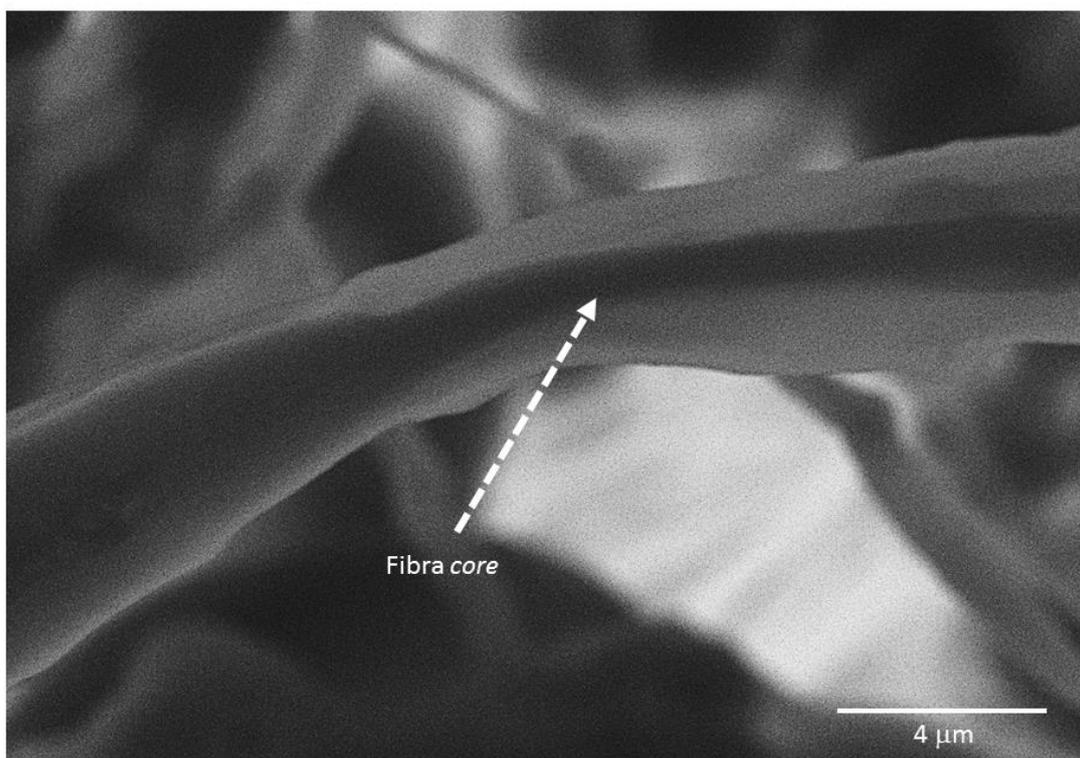


Figura 14. Micrografia de MEV no modo STEM de fibras core-shell PVA/Lipase-PHBV produzidas.

A imagem apresentada evidencia a formação de uma estrutura núcleo-casca para o material produzido. A fibra shell se mostra transparente ao feixe do elétron de transmissão e por isso foi possível atravessá-la e observar em seu interior a fibra core que aparece completamente envolta pela shell. Uma avaliação de microscopia óptica de fluorescência foi utilizada para corroborar com este resultado e a imagem é apresentada na Figura 15 abaixo.



Figura 15. Micrografia de Microscopia Óptica de Fluorescência de fibras core-shell PVA/Lipase-PHBV.

A presença da Lipase marcada com Rodamina nas mantas de fibras core-shell foram avaliadas usando um filtro detector com 505 nm de emissão, expresso pela luz verde. A imagem de fluorescência corrobora com os resultados mostrado na Figura 14, onde é possível observar a estrutura núcleo-casca. Na imagem de fluorescência, uma comparação da intensidade de emissão de luz nas regiões enzimáticas não encapsuladas e o encapsulado mostra a predominância de enzima no núcleo da fibra. Os pontos mais intensos na imagem de fluorescência (circulados em vermelho) correspondem a um possível respingo de solução core durante o processo e foi interessante para elucidar a diferença entre a lipase encapsulada, presente no núcleo das fibras core-shell e a lipase externa apresentado na superfície da manta.

Conclusões parciais

- Foram obtidas mantas com estrutura de fibras *core-shell* PVA/Lipase-PHBV nas condições estudadas;
- A utilização de um coletor rotatório com alta velocidade resultou em fibras altamente alinhadas com menor quantidade de defeitos e menores diâmetros;
- Foi possível imobilizar a enzima Lipase no interior das fibras casca de PHBV.

PARTE III

5.5 INFLUÊNCIA DA MODIFICAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DA CASCA DAS MANTAS DE FIBRAS *CORE-SHELL*: INSERÇÃO DO PEG

Materiais hidrofílicos, como o PVA e o PEG, têm afinidade com água e tendem a adsorvê-la em sua superfície. O PHBV, no entanto, é um material hidrofóbico que tende a repelir as moléculas de água quando em contato com estas. A molhabilidade, que é a capacidade de um líquido molhar uma superfície, pode ser medida pelo ângulo de contato formado na interface líquido-superfície e determinar quanto de afinidade o material tem com o líquido. Quando o líquido utilizado é a água, esta propriedade ajuda a compreender o quão hidrofílico ou hidrofóbico o material pode ser. Desta forma, buscou-se avaliar a molhabilidade das mantas de fibras *core-shell* produzidas com e sem PEG na composição da casca. A Figura 16 apresenta as imagens obtidas na análise de ângulo de contato, bem como os valores de ângulo medidos entre as gotas e as mantas.

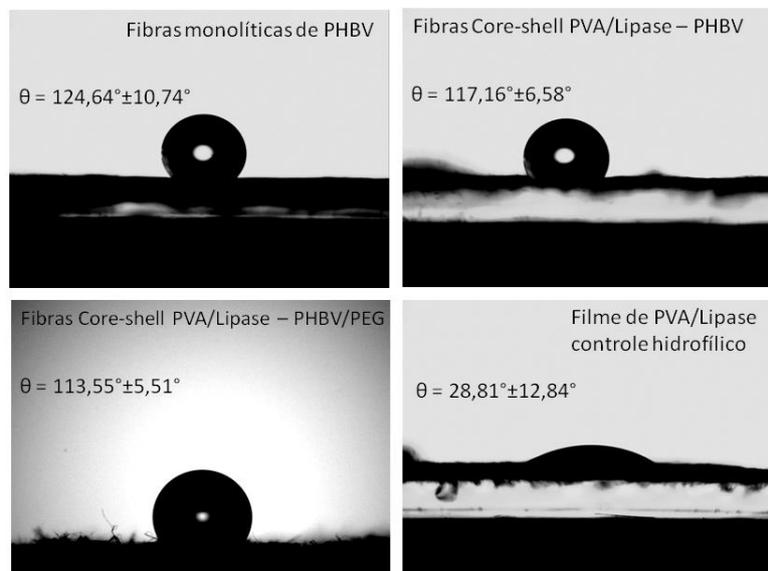


Figura 16. Medidas de ângulo de contato de (a) mantas de fibras monolíticas de PHBV, (b) mantas de fibras core-shell PVA/Lipase- PHBV; (c) mantas de fibras core-shell PVA/Lipase – PHBV/PEG e (d) filme de PVA/Lipase.

Os resultados dos ângulos de contato das mantas foram importantes para indicar o encapsulamento da porção hidrofílica (PVA/Lipase) das fibras *core-shell*. Uma redução significativa no valor de ângulo de contato das mantas de PVA/Lipase – PHBV, quando comparadas ao valor das mantas de fibras monolíticas de PHBV indicaria o não encapsulamento da fase hidrofílica do núcleo. Tal comportamento sugeriria que as fibras da fase *shell* (PHBV) e da fase *core* (PVA/Lipase) poderiam estar sendo formadas por jatos das soluções de forma paralela e não concêntrica, resultando em uma superfície com regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. No entanto, os valores de ângulo de contato, bem como as imagens das gotas formadas nas superfícies das mantas corroboram com os resultados já apresentados que confirmam a formação da estrutura *core-shell*.

O perfil hidrofóbico das fibras monolíticas de PHBV também foi observado nas mantas de fibras *core-shell* PVA/Lipase – PHBV e PVA/Lipase – PHBV/PEG, mostrando a predominância de PHBV como constituinte da casca das fibras, e indicando que toda a fase PVA/Lipase está de fato encapsulada como núcleo, como já mencionado. Este perfil hidrofóbico muda completamente quando um filme de PVA/Lipase foi avaliado. A gota de água foi quase totalmente absorvida pela estrutura PVA/Lipase devido à alta hidrofiliabilidade do PVA. Embora o PEG seja um polímero altamente hidrofílico, não foi observada uma mudança significativa na molhabilidade das mantas produzidas com PEG. Este resultado pode estar relacionado à baixa concentração de PEG nas fibras, indicando domínios pequenos em relação às regiões hidrofóbicas circundantes da superfície das mantas, que não interferiu significativamente na absorção das gotas. O efeito da hidrofiliabilidade do PEG na estrutura das mantas foi avaliado ainda pelo grau de intumescimento das mantas e será apresentado na Figura 17 a seguir.

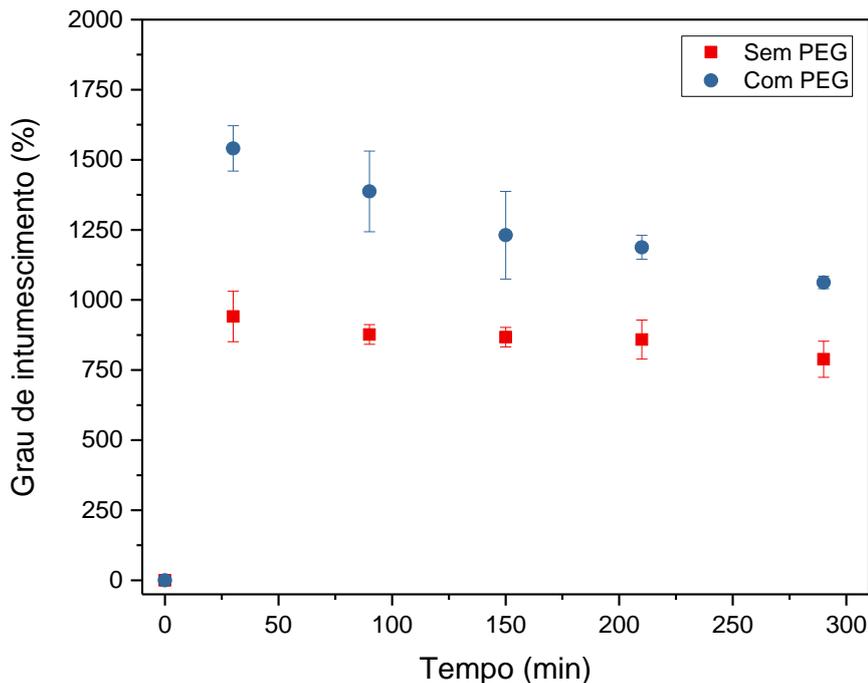


Figura 17. Grau de intumescimento das fibras *core-shell* de PVA/Lipase – PHBV e das fibras *core-shell* de PVA/Lipase – PHBV/PEG.

O grau de intumescimento descreve a propriedade de um material absorver e acumular determinado líquido em sua estrutura sem se dissolver. Essa absorção acontece pelo efeito da penetração do líquido no interior do material, ocupando os interstícios da estrutura deste material (no caso de polímeros entre as cadeias), fazendo com que o material inche, aumentando de tamanho e massa (KANKALA *et al.*, 2018).

No presente estudo, foi observado alto grau de intumescimento para ambas as mantas *core-shell* produzidas: com e sem PEG (PVA/Lipase – PHBV e PVA/Lipase – PHBV/PEG). No entanto, para as mantas produzidas com 1% de PEG na fibra *shell*, foi observado um inchamento muito maior quando comparado às mantas produzidas sem PEG já nos primeiros 30 minutos (aproximadamente 1541% para as mantas com PEG e 941% para as mantas produzidas sem PEG, um aumento de aproximadamente 64%). Nos tempos seguintes, no entanto, foi observada uma redução no grau de intumescimento, chegando a valores próximos

do grau de intumescimento das fibras sem PEG. Este comportamento é justificado pela alta solubilidade do PEG em meio aquoso, fazendo com que seja dissolvido pelo meio e liberado da superfície das fibras, reduzindo a massa das amostras ensaiadas. Um alto grau de inchamento também foi observado nas amostras sem PEG. No entanto, o inchamento se manteve constante ao longo de todo o tempo do ensaio. Este resultado está associado à permeabilidade das fibras que permitem o acesso do meio tampão ao PVA que, por sua vez está confinado no interior de uma estrutura hidrofóbica, resultando em uma limitação de inchamento e evitando a liberação do PVA para o meio.

MANCIPE *et al.* (2022) observaram comportamentos similares quando compararam o grau de intumescimento de mantas eletrofiadas de fibras monolíticas de colágeno tipo I e PVA com fibras *core-shell* de PCL – colágeno/PVA. Os autores observaram acentuada perda de massa nas mantas de fibras monolíticas até a total dissolução desta. Eles destacaram que a redução do grau de inchamento estava sendo acarretada pela dissolução do PVA e do colágeno no meio tampão. Quando fiadas em estrutura *core-shell* como fibras casca das fibras núcleo de PCL, as fibras de PVA/colágeno não foram perdidas para o meio, devido ao efeito da ancoragem mecânica na fase hidrofóbica de PCL. Os autores não observaram nenhuma formação de reticulação ou outras ligações químicas entre as fibras nas análises complementares, reforçando a interação mecânica entre as fibras do material.

Embora em nosso estudo a fase hidrofílica esteja no interior da estrutura *core-shell*, foi observado um alto grau de inchamento favorecido pela alta capacidade de absorção do PVA, como visto no trabalho de MANCIPE *et al.* Em ambos os trabalhos, a interação nas fibras *core-shell* é uma interação mecânica e não há interação química entre as fibras núcleo e casca, como pode ser observado nos espectros de FTIR da Figura 18 a seguir.

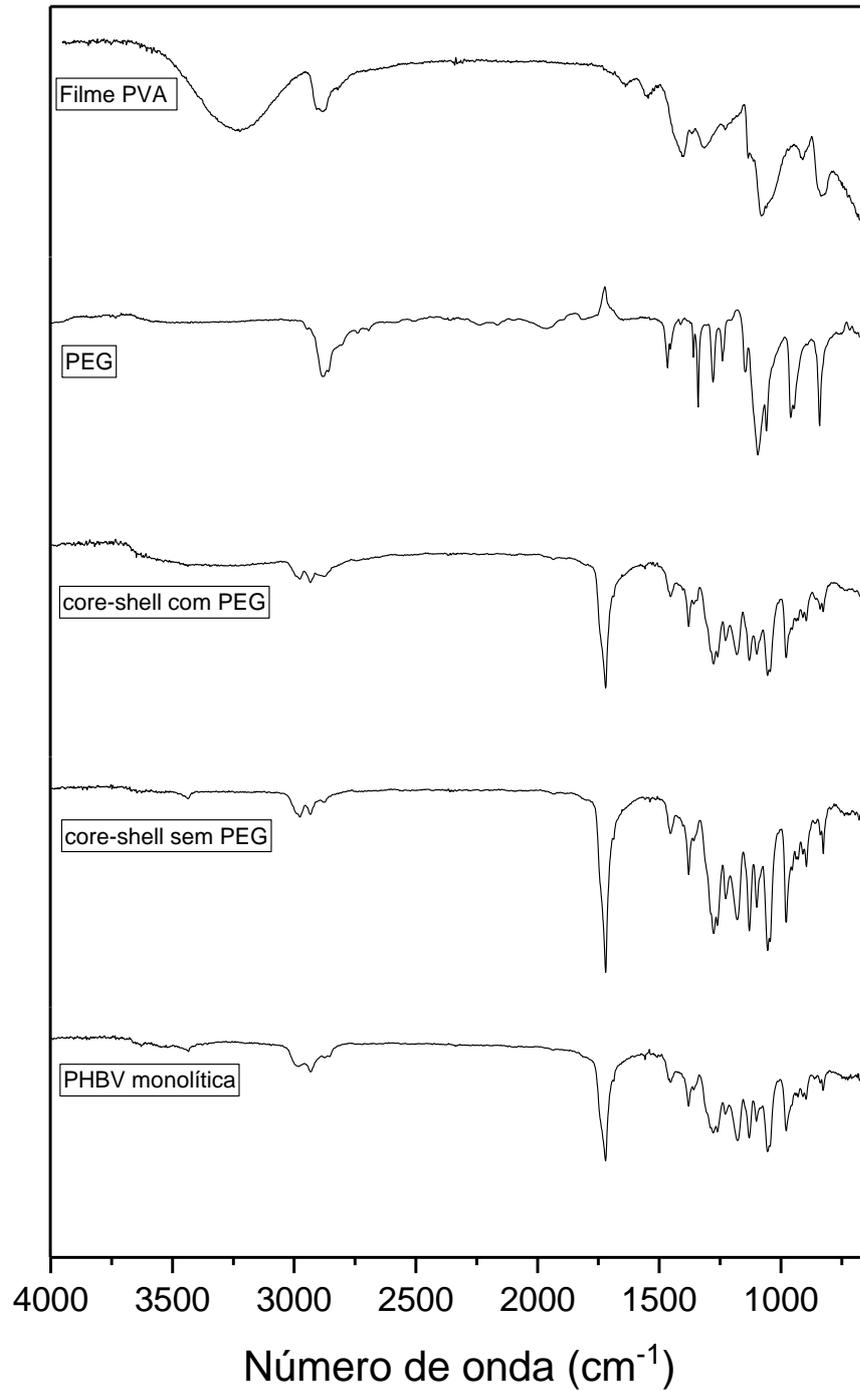


Figura 18. Espectros de FTIR das mantas de fibras monolíticas de PHBV, *core-shell* PVA/Lipase – PHBV e *core-shell* PVA/Lipase – PHBV/PEG do filme de PVA, dos grânulos de PEG.

A imagem apresentada na Figura 18 revela a similaridade entre os espectros das mantas de fibras *core-shell* e da manta de fibras monolíticas de PHBV, indicando que não há interação química entre as fases núcleo e casca. Este resultado também corrobora com a micrografia de MEV no modo STEM apresentada na Figura 14, e deixa claro que toda a fase de PVA com a Lipase está presente no interior das fibras (não aparecendo na superfície das mantas), onde o infravermelho não possui alcance para detectar. Esses resultados estão de acordo com resultados descritos na literatura por MALEKI *et al.* (2020). Neste trabalho, os autores produziram mantas de fibras *core-shell* de PVA com nanopartículas de prata na fase núcleo e PLA como casca. Os autores observaram que os espectros de FTIR das fibras *core-shell* de PVA – PLA e PVA/AgNO₃ se apresentaram idênticos ao espectro da fibra monolítica de PLA e divergiram do espectro da fibra monolítica de PVA, tal qual ocorreu em nosso trabalho. Curiosamente, não foi possível evidenciar a presença do PEG na composição das fibras *core-shell* contendo 1% deste polímero na casca (mantas de fibra *core-shell* com PEG). Porém, ao observar o espectro dos grânulos de PEG, podemos notar que muitas das bandas presentes neste polímero coincidem com as regiões das bandas também apresentadas pelo PHBV. Tal característica pode ter dificultado a observação do PEG presente no *bulk* da amostra analisada. Para avaliar a presença do PEG na estrutura da casca, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura. Por se tratar de polímeros, que possuem composição e número atômico muito similares, a diferença na superfície entre as regiões de PHBV e PEG é de difícil detecção. Para contornar tal dificuldade as mantas foram avaliadas antes e após incubação em tampão PBS, a fim de proporcionar a remoção do PEG e revelar poros na superfície das fibras. As micrografias obtidas estão presentes na Figura 19 a seguir.

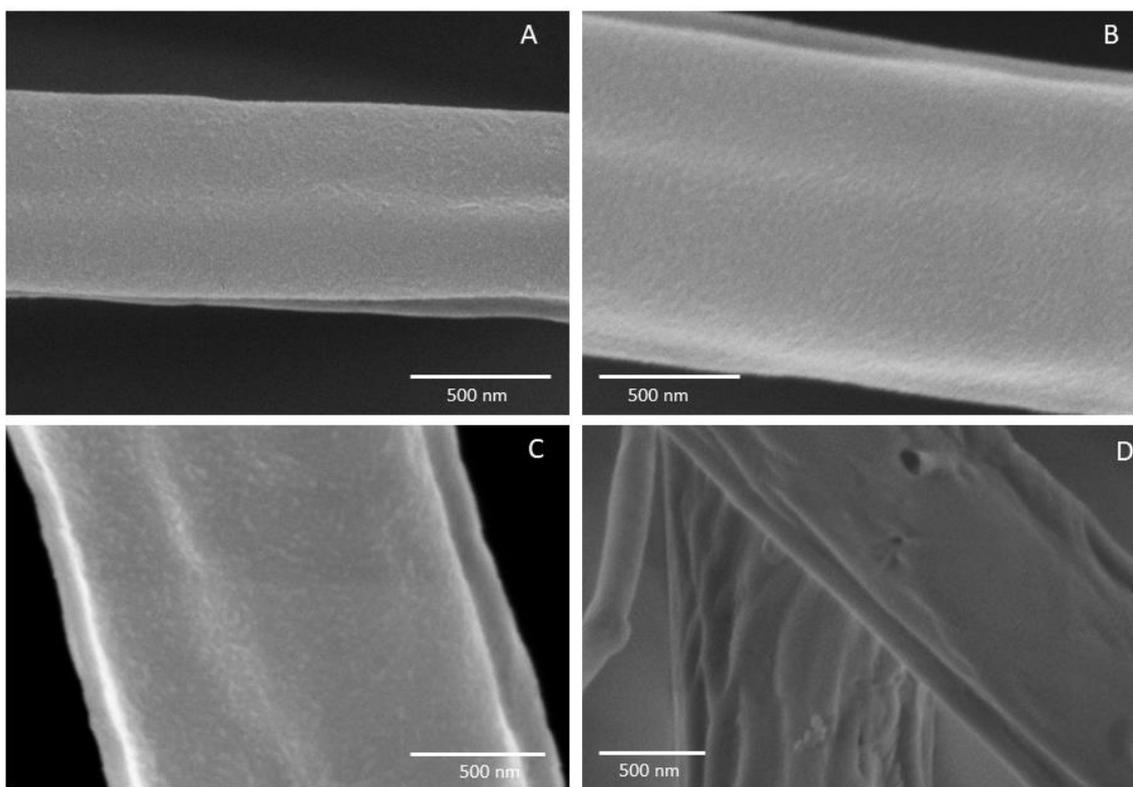


Figura 19. Micrografias de MEV das mantas de fibras monolíticas de PHBV (A), mantas de fibras *core-shell* PVA/Lipase - PHBV (B) e mantas de fibras *core-shell* PVA/Lipase - PHBV/PEG antes (C) e após liberação em tampão PBS pH 7, 37°C por aproximadamente 1h (D) (diâmetro médio das fibras *core-shell* PVA/Lipase - PHBV/PEG $1,04 \pm 0,81$).

Ao comparar as micrografias das mantas de fibras monolíticas de PHBV e de fibras *core-shell* sem e com PEG (A, B e C, respectivamente), o resultado da análise é inconclusivo, devido ao baixo contraste atômico mencionado. No entanto, após ser incubada em tampão PBS, no qual o PEG possui solubilidade, foram reveladas regiões de vazios onde, possivelmente o PEG estava. As fibras apresentam ainda um aspecto rugoso após a sua incubação, revelando uma certa permeabilidade para além das regiões com PEG, o que será corroborado pela atividade, ainda que baixa, das mantas de fibras *core-shell* sem PEG, como veremos no tópico 5.6.

5.6 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DAS MANTAS DE FIBRAS *CORE-SHELL* COM E SEM PEG

A atividade enzimática das mantas e da enzima livre em diferentes condições de pH e temperatura foi avaliada por meio da degradação do substrato Laurato de 4 – Nitrofelina (ρ -NPL) em ρ -nitrofenol. O substrato possui uma coloração branca leitosa, enquanto seu produto de degradação (ρ -nitrofenol) possui uma coloração amarelada. Ao passo que a reação vai ocorrendo, a concentração de substrato no meio vai sendo reduzida, dando lugar ao produto. A medida de absorvância no comprimento de onda adequado para o ρ -NPL (410 nm) permite observar essa transformação do composto em ρ -nitrofenol.

No presente trabalho foi utilizada a atividade relativa (apresentada anteriormente na Equação 5) para comparar o desempenho das enzimas imobilizadas nas mantas com e sem PEG com a enzima livre em cada condição ensaiada. Os gráficos de absorvância em função do tempo para as diferentes amostras e condições serão apresentados a seguir. As absorvâncias apresentadas nos gráficos tratam-se das absorvâncias normalizadas, já descontando os brancos ponto a ponto das absorvâncias lidas no espectrofotômetro.

Dados de massas e concentrações foram utilizados para os ajustes necessários a fim de garantir uma proporção adequada de enzima para que as atividades pudessem ser comparáveis. A solução *mãe* de enzima foi diluída 100 vezes para garantir uma quantidade de enzima disponível no meio próxima às quantidades estimadas nas amostras das mantas. A Tabela 9 apresenta os dados relativos aos valores utilizados.

Tabela 9. Massas e quantidades utilizadas nos cálculos comparativos.

Manta	Massa total injetada	Quantidade de Lipase em toda a manta	Quantidade de Lipase em 20 mg de amostra	Quantidade de Lipase em 0,2 mL de solução diluída 100 vezes
Sem PEG	1635,3 mg	0,273 mg (273 µg)	3,3µg	
Com PEG	1785,3 mg	0,273 mg (273 µg)	3,1µg	3,64µg

5.6.1 Atividades das mantas a 37°C e pH 7 (ciclo 1 e ciclo 2 – reuso)

As curvas de absorbância em função do tempo para as amostras com e sem PEG ilustram o perfil de atividade das duas condições de imobilização à 37°C em pH 7 (Figuras 20 e 21). É possível notar que as mantas com a inserção de PEG na composição *shell* apresentaram um desempenho muito maior de atividade enzimática quando comparadas às mantas produzidas sem PEG, indicando uma facilidade do substrato em acessar a enzima.

A Figura 21 descreve o comportamento de ambas as mantas após o primeiro ciclo de atividade e lavagem. Os resultados de atividade comprovam que tanto as mantas produzidas sem PEG quanto as mantas produzidas com PEG na composição da casca ainda mantiveram atividade mesmo após serem submetidas à um ciclo completo de degradação do substrato e lavadas com tampão PBS.

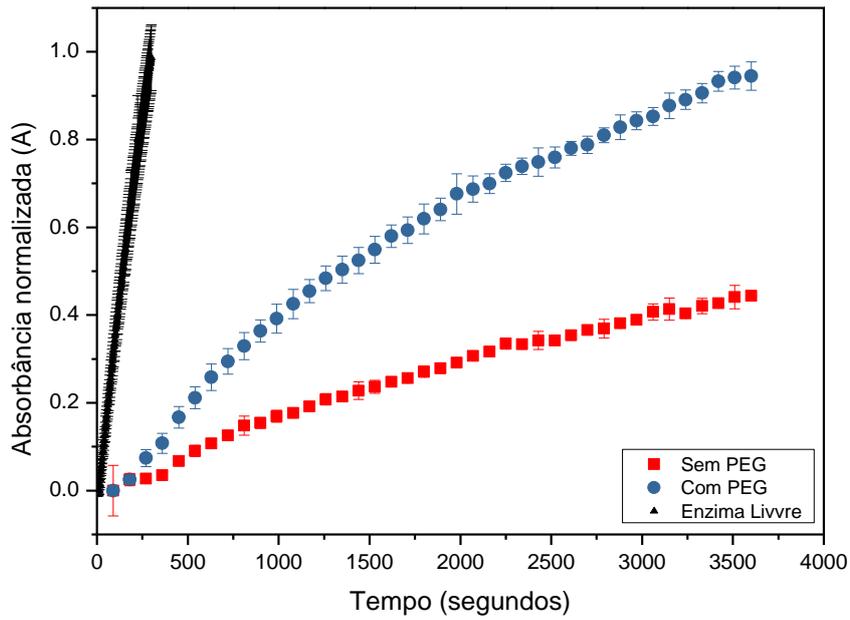


Figura 20. Curvas de absorvância da enzima livre e das mantas de fibras *core-shell* PVA/Lipase - PHBV e *core-shell* PVA/Lipase - PHBV/PEG (Sem PEG e Com PEG) incubadas à 37°C e pH 7 – ciclo 1.

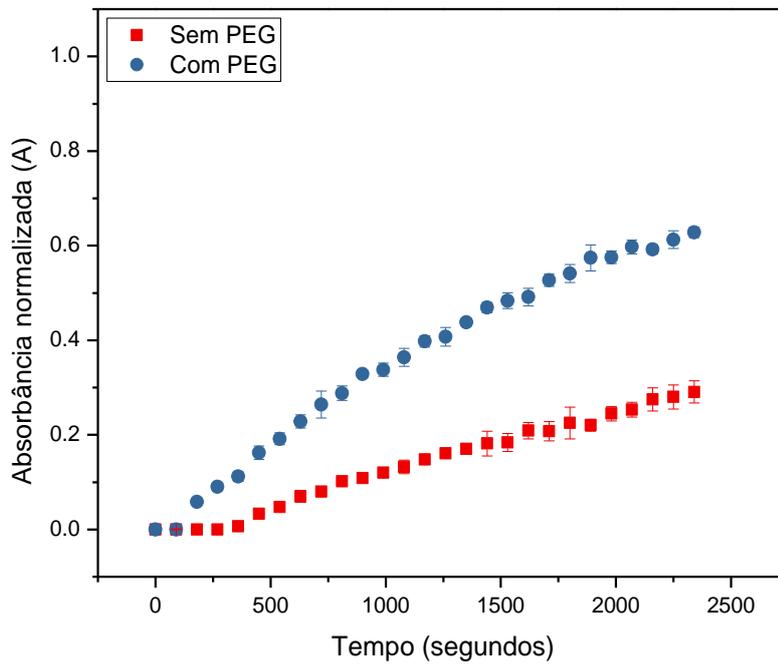


Figura 21. Curvas de absorvância das mantas de fibras *core-shell* PVA/Lipase - PHBV e *core-shell* PVA/Lipase - PHBV/PEG (Sem PEG e Com PEG) incubadas à 37°C e pH 7 – segundo ciclo (ciclo 2 - reuso).

Os valores de atividade presentes na Tabela 10 indicam um aumento nas atividades de ambas as mantas no reuso (ciclo 2).

Tabela 10. Atividades operacional e em função da disponibilidade de proteína das enzimas imobilizadas nas mantas com e sem PEG e enzima livre em pH 7, a 37°C.

ATIVIDADE	37°C pH 7 (ciclo 1)	37°C pH 7 (ciclo 2)
SEM PEG (U/g)	0,033	0,035
COM PEG (U/g)	0,065	0,075
ENZIMA LIVRE (U/L)	5,86	NA
SEM PEG (U/g _p)	198,83	211,26
COM PEG (U/g _p)	421,23	483,87
ENZIMA LIVRE (U/g _p)	322,01	NA

NA: não se aplica.

Pode-se observar um aumento da atividade no segundo ciclo de 6 e 15 % para as mantas sem e com PEG, respectivamente. Tal resultado indica a permeabilidade de ambas as mantas, uma vez que o fato de já estarem em contato com o meio anteriormente favoreceu a difusão da solução substrato entre as fibras da manta, aumentando assim a atividade em ambas.

Por se tratar de um polímero hidrossolúvel, o PEG inserido na casca poderia estar facilitando a liberação da enzima do interior das fibras para o meio externo ao invés de manter as enzimas imobilizadas em sua estrutura. Para estudar essa hipótese, foram incubadas mantas de fibras *core-shell* com PEG em tampão PBS 50 mM sem substrato nas condições de ensaio de atividade. Durante a incubação, foram retirados pontos em diferentes tempos de ensaio (t0, referente ao ponto de contato instantâneo das mantas com o tampão; t20 referente ao tempo da vigésima leitura, correspondente à metade do tempo de ensaio e t40 referente a última leitura, correspondente ao final do ensaio). Destes sobrenadantes foram retiradas alíquotas de 0,2 mL

que foram submetidas à análise de atividade com a mesma metodologia utilizada para medir a atividade da enzima livre (como descrito no item 4.7).

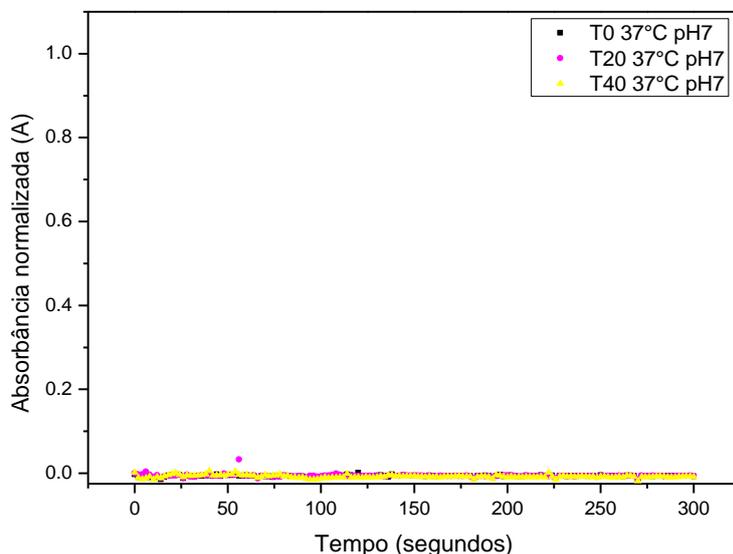


Figura 22. Curvas de absorvância dos sobrenadantes das mantas *core-shell* PVA/Lipase - PHBV/PEG (Com PEG) incubadas à 37°C e pH 7 nos tempos t0, t20 e t40.

Os resultados da análise de atividade dos sobrenadantes submetidos às mesmas condições de incubação com substrato (Figura 22) mostraram que, ainda que tenha ocorrido liberação de enzima para o meio, esta quantidade não foi significativa para que afetasse os resultados de atividade da manta e, portanto, o fenômeno responsável pela atividade das mantas de fibras com PEG é de fato uma imobilização e não a liberação da enzima para o meio. No estudo de DROR *et al.* (2008) uma análise similar foi realizada. Os autores produziram mantas de fibras *core-shell* de PEG/Enzima – PCL e PEG/Enzima – PCL/PEG, com 1% de PEG na composição casca. Foram utilizadas duas enzimas de diferentes tamanhos: Fosfatase Alcalina (AP – 40 kDa) e β -galactosidade (β -GAL – 465 kDa). As mantas produzidas com 1% de PEG na casca foram incubadas em tampões e alíquotas de três tempos diferentes (0, 24 e 72h) foram analisadas para avaliar a possibilidade de migração da enzima para o meio externo. Os autores encontraram cinéticas diferentes quando compararam os dois tipos de fibras e as duas enzimas imobilizadas. No caso da enzima AP, foi possível observar que houve uma difusão da enzima para fora das

fibras durante a incubação e as fibras funcionaram, portando, como um sistema de liberação controlada da enzima. No entanto, para a enzima β -GAL, as atividades lidas dos sobrenadantes foram muito inferiores (e quase nulas) quando comparadas à atividade da manta, que atuaram como um suporte reator para a enzima. Este resultado condiz com o encontrado em nosso trabalho.

Além desta evidência, baseado nos dados da Tabela 9, podemos constatar que uma liberação da enzima para o meio externo reduziria a quantidade de lipase presente em 20 mg de amostra no segundo ciclo. Como as quantidades estimadas de enzima nas amostras, calculadas com base na concentração das soluções utilizadas, são equivalentes para ambas as mantas (3,3 μ g nas mantas sem PEG e 3,1 μ g com PEG), uma perda de enzima para o meio resultaria possivelmente numa atividade menor das mantas com PEG quando comparadas às mantas sem PEG no segundo ciclo, o que não ocorreu.

5.6.2 Atividades das mantas a 37°C, pHs 5 e 9

O ambiente em que a enzima se encontra afeta diretamente sua atividade enzimática. As enzimas possuem grupamentos carboxila e amino que são ionizáveis. A carga que esses grupamentos vão adquirir é fundamentalmente dependente do pH do meio. O pH de uma solução desempenha um papel essencial na obtenção de uma quantidade ótima de ácidos graxos disponíveis durante a reação de hidrólise, pois a estrutura terciária da proteína é controlada pelas ligações de hidrogênio entre os grupos R dos aminoácidos. A ionização desses grupos R pode ser alterada por uma pequena variação no valor do pH, modificando a conformação da enzima, resultando assim na perda ou aumento de sua atividade. Assim, toda enzima tem uma faixa de pH adequada que preserva a conformação estrutural e favorece a ionização dos aminoácidos presentes no sítio catalítico e em torno do mesmo, facilitando a aproximação do substrato. Este pH é denominado pH ótimo de atividade (KAJA *et al.*, 2018; GOSWAMI *et al.* 2009).

As enzimas não necessariamente possuem os mesmos pH ótimos na produção, na utilização (atividade) e na estocagem. Isso se deve a manutenção da estrutura proteica em diferentes condições ambientais e finalidades. Quando a enzima é produzida, o pH ótimo de produção está associado ao microrganismo (ou célula) que a produz, mais do que a sua atividade no meio de produção. Quando em operação, é preciso manter o pH ideal para que a ionização dos aminoácidos favoreça a exposição do sítio ativo para ocorrer a catálise. E, quando a enzima é estocada, o mais importante é manter a sua estrutura terciária para não haver desnaturação (modificação ou destruição da conformação espacial da proteína). Embora os pHs ótimos de operação e estocagem possam ser diferentes, quando o pH do meio se desvia muito do pH fisiológico da enzima, a interação eletrostática é interrompida e a enzima pode sofrer desnaturação, sendo completamente inativada. De modo geral, a imobilização de uma enzima, por muitas vezes favorecer determinada conformação e proteger regiões de grupos de aminoácidos (KAJA *et al.*, 2018; GOSWAMI *et al.* 2009).

A influência do pH do meio na atividade das enzimas livre e imobilizadas foi avaliada variando o pH da solução substrato para ácido (pH 5) e básico (pH 9). Os valores de atividade para as enzimas livre e imobilizadas nos diferentes pHs estão apresentados na Tabela 11 a seguir.

Tabela 11. Atividades operacional e em função da disponibilidade de proteína das enzimas imobilizadas nas mantas com e sem PEG e enzima livre em diferentes pHs 5, 7 e 9, a 37°C.

ATIVIDADE	37°C pH 5 (pH ácido)	37°C pH 7 (pH neutro)	37°C pH 9 (pH básico)
SEM PEG (U/g)	Sem atividade	0,033	0,057
COM PEG (U/g)	Sem atividade	0,065	0,057
ENZIMA LIVRE (U/L)	Sem atividade	5,860	7,071
SEM PEG (U/g _P)	Sem atividade	198,83	347,60
COM PEG (U/g _P)	Sem atividade	421,23	370,02
ENZIMA LIVRE (U/g _P)	Sem atividade	322,01	388,51

O pH ótimo encontrado para a enzima livre a 37°C foi de 9, como pode ser visualizado de forma clara na Figura 23. Este pH também se mostrou o mais adequado para as enzimas imobilizadas nas mantas de fibras *core-shell* sem PEG. O resultado mostra que, quando submetida ao substrato em pH 9, as enzimas imobilizadas nas mantas sem PEG possuem uma atividade similar às enzimas imobilizadas nas mantas com PEG (Figura 24). O fato de a atividade da enzima livre também ter sido maior no pH 9 sugere que o processo de fixação e imobilização não alterou significativamente a conformação nativa da lipase (PEREIRA *et al.*, 2023). Em relação ao método de imobilização por ligação covalente, o método de imobilização por encapsulamento possui a conhecida vantagem manter a conformação original da enzima, já que não há ligação química entre a enzima e o suporte (VANLEEuw *et al.*, 2019; BRENA *et al.*, 2013).

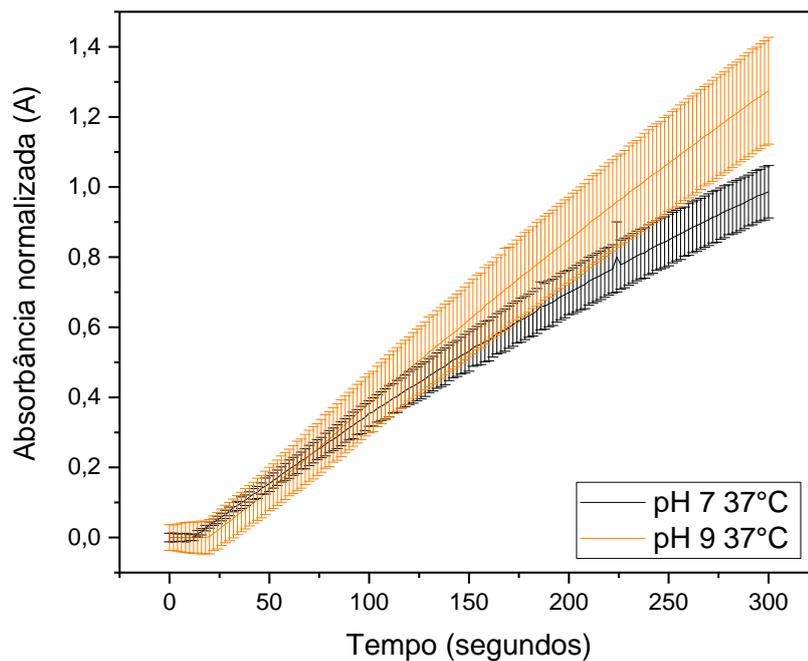


Figura 23. Curvas de absorbância da cinética de reação da Lipase livre incubada a 37°C e em pH 7 e pH 9.

A solubilidade do Polietilenoglicol (PEG) é altamente afetada pelo pH do meio. É conhecido que esse polímero possui uma excelente solubilidade em soluções aquosas em pH ácido e neutro. No entanto, em meio alcalino, sua solubilidade é drasticamente reduzida, gerando regiões de cadeias altamente emaranhadas entre si, dificultando a permeação do polímero pelo solvente do meio (CAO *et al.*, 2022). Tal fenômeno afeta diretamente a dissolução e liberação do PEG para fora da estrutura da casca. Dessa forma, o comportamento da manta com o PEG se torna muito similar ao comportamento da manta sem PEG, como pode ser observado na Figura 24.

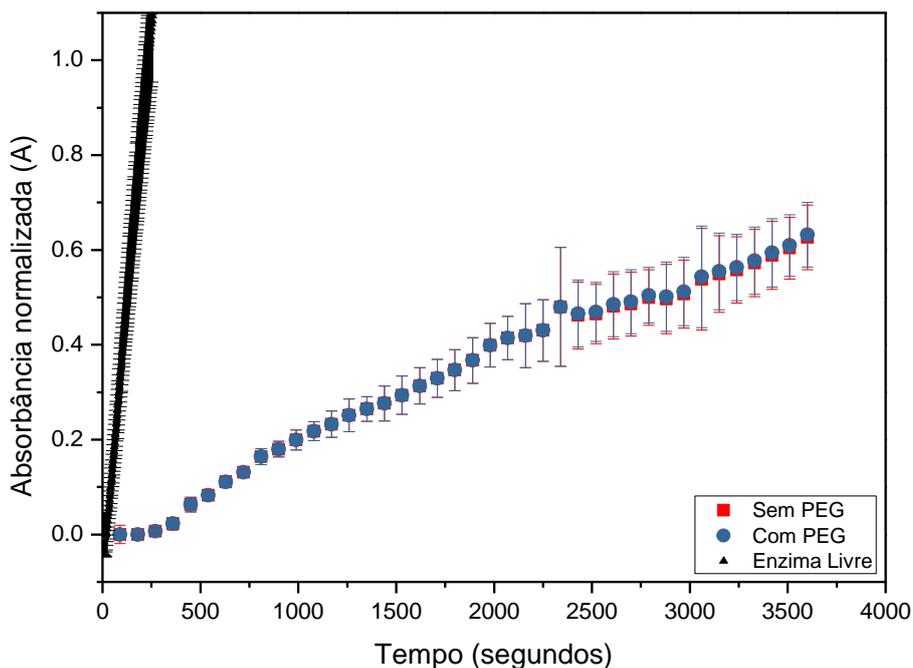


Figura 24. Curvas de absorvância da enzima livre e das mantas de fibras *core-shell* PVA/Lipase - PHBV e *core-shell* PVA/Lipase - PHBV/PEG (Sem PEG e Com PEG) incubadas a 37°C e pH 9.

O pH do meio influencia significativamente a liberação de agentes encapsulados, quando em solução. Por se tratar de uma imobilização via encapsulamento, neste trabalho também foi avaliado o efeito do pH nas mantas de fibras *core-shell* com PEG, como realizado para o pH 7, mencionado no item 5.6.1. As amostras foram incubadas em tampão PBS 50 mM pH 9 sem substrato nas condições de ensaio de atividade. Durante a incubação, foram retirados pontos em diferentes tempos de ensaio (t_0 , referente ao ponto de contato instantâneo das mantas com o tampão; t_{20} referente ao tempo da vigésima leitura, correspondente à metade do tempo de ensaio e t_{40} referente a última leitura, correspondente ao final do ensaio). Destes sobrenadantes foram retiradas alíquotas de 0,2 mL que foram submetidas à análise de atividade com a mesma metodologia utilizada para medir a atividade da enzima livre (como descrito no item 4.7). De acordo com a Figura 25 é possível notar que não houve liberação significativa de enzima para o meio externo que pudesse influenciar no aumento da atividade das mantas. Desse modo, é

possível afirmar que as enzimas seguem imobilizadas nas mantas com a mudança de pH, sem haver liberação para o meio.

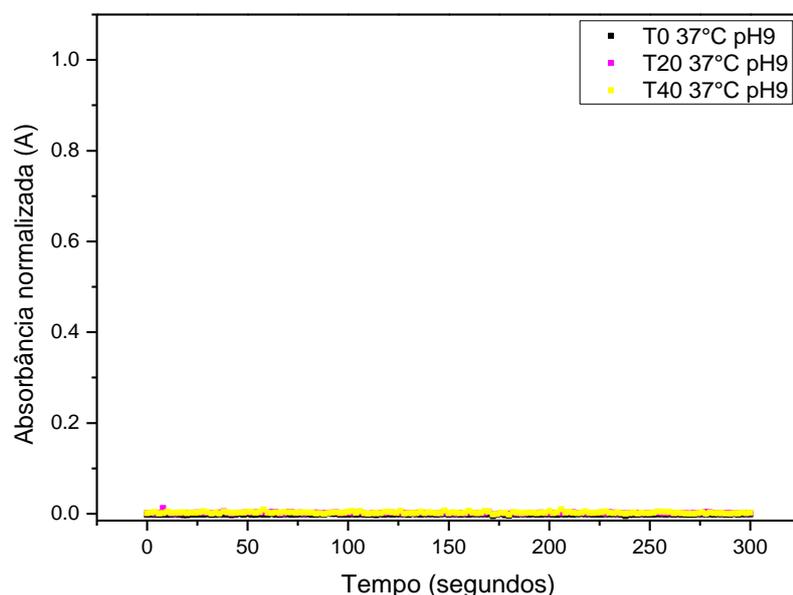


Figura 25. Curvas de absorvância dos sobrenadantes das mantas *core-shell* PVA/Lipase - PHBV/PEG (Com PEG) incubadas à 37°C e pH 9 nos tempos t0, t20 e t40.

Como discutido anteriormente, é possível fazer uma correlação entre a conformação da enzima livre e da enzima imobilizada nas mantas, sendo viável assumir que o processo de imobilização preservou a conformação nativa da enzima livre. Quando submetidas à condição de pH ácido (pH 5), não foi observada atividade para as enzimas livre e imobilizadas em ambas mantas. Neste caso, é correto afirmar que nesta condição de pH houve a desnaturação da enzima pela alteração na conformação do sítio ativo em todas as suas formas (livre e imobilizadas em mantas com e sem PEG).

5.6.3 Atividades das mantas a 50°C e pH 7

A temperatura afeta significativamente a atividade de uma enzima. Proteínas são sensíveis a altas temperaturas e podem desnaturar quando submetidas a elas. No entanto, um aumento expressivo da atividade da Lipase foi observado nessa temperatura quando imobilizada em mantas de fibras *core-shell* com e sem PEG (aumentos de aproximadamente 440% e 107%, respectivamente), ao passo que uma redução de aproximadamente 17% foi observada na atividade da enzima livre, quando comparada à condição de 37°C (Tabela 12).

Tabela 12. Atividades operacional e em função da disponibilidade de proteína das enzimas imobilizadas nas mantas com e sem PEG e enzima livre em pH 7 a 37 e 50°C.

ATIVIDADE	37°C pH 7	50°C pH 7
SEM PEG (U/g)	0,033	0,068
COM PEG (U/g)	0,065	0,351
ENZIMA LIVRE (U/L)	5,860	4,859
SEM PEG (U/g _p)	198,83	414,63
COM PEG (U/g _p)	421,23	2266,31
ENZIMA LIVRE (U/g _p)	322,01	266,99

Em biocatálise, diversos fatores podem interferir na reação, como, por exemplo, concentração da enzima e/ou substrato, conformação da enzima, pH, temperatura e ainda a solubilidade do substrato (SHELDON e VAN PELT, 2013; ILLANES, 2008). Tendo em vista que as concentrações de enzima foram mantidas conforme apresentado anteriormente na Tabela 8, que as condições de reação são mantidas para todas as enzimas ensaiadas (livre e imobilizada em mantas de fibras *core-shell* com e sem PEG) e supondo que a imobilização não alterou a conformação nativa da enzima, é possível observar um efeito da temperatura na difusão do substrato. Embora tenha ocorrido uma redução da atividade da enzima livre na temperatura de 50°C, não é possível afirmar que a temperatura foi suficiente para causar a desnaturação da

proteína, principalmente devido ao fato de em maiores tempos de contato da enzima com o substrato nessa temperatura, os valores de absorvância serem estatisticamente iguais aos valores encontrados a 37°C. Em relação às mantas com PEG na composição da casca, é possível supor que a temperatura também favoreceu o processo de inchamento da manta e dissolução do PEG, facilitando ainda mais o acesso do substrato à enzima. O efeito da temperatura atuante diretamente como catalisador do substrato laurato de 4 – nitrofenila também foi estudado para avaliar uma possível degradação térmica e interferência nas atividades encontradas para as enzimas. Para tanto, o substrato foi submetido às mesmas condições de ensaio que às amostras, sem a presença da Lipase. A absorvância do substrato foi acompanhada durante toda a análise e foi encontrada uma absorvância constante do início ao fim (Absorvância do substrato igual a 0.222) As Figuras 26 e 27 apresentam os perfis de atividade das enzimas.

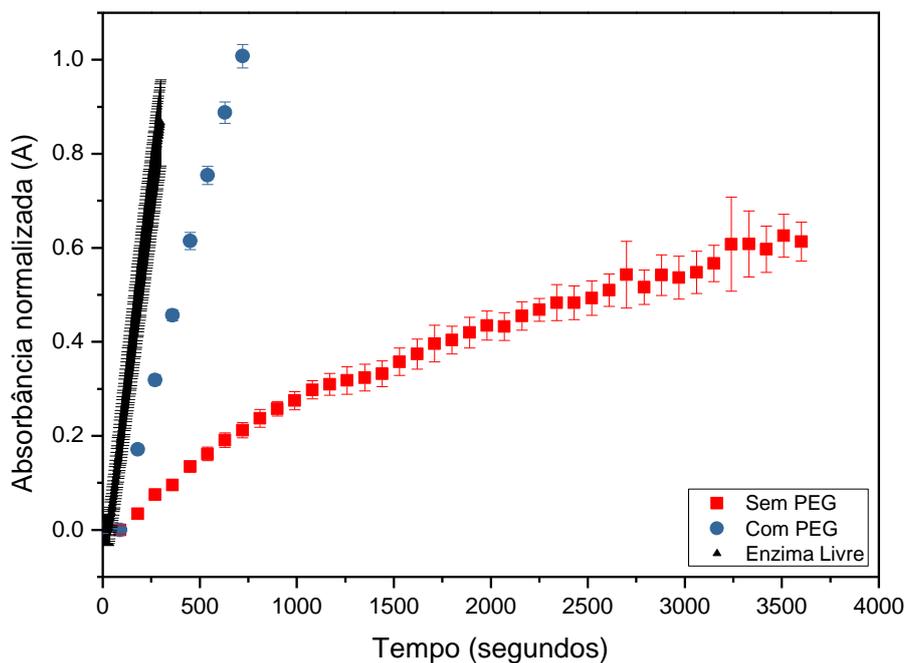


Figura 26. Curvas de absorvância da enzima livre e das mantas de fibras *core-shell* PVA/Lipase - PHBV e *core-shell* PVA/Lipase - PHBV/PEG (Sem PEG e Com PEG) incubadas a 50°C e pH 7.

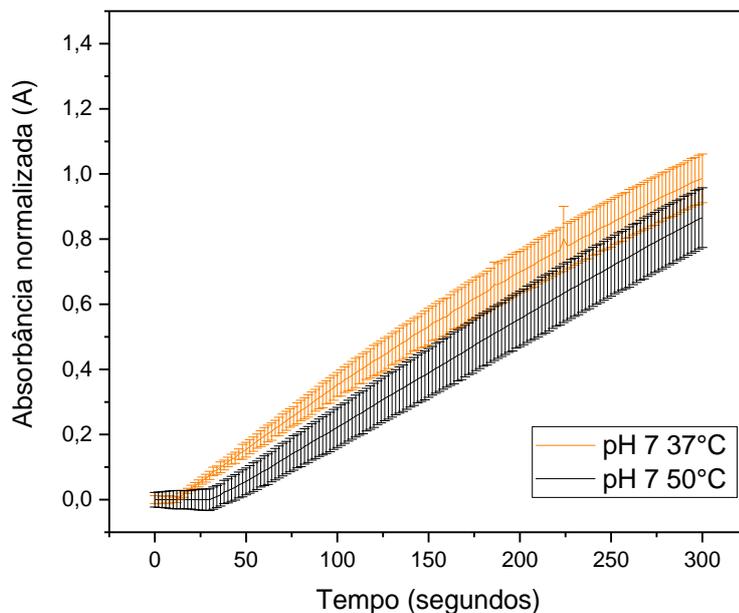


Figura 27. Curvas de absorvância da cinética de reação da Lipase livre incubada a 37°C e 50°C em pH 7.

Como realizado para as outras condições de ensaio, a possibilidade de migração das enzimas imobilizadas para o meio foi estudada e foi observado que não houve liberação significativa que pudesse interferir na atividade, como mostra a leitura dos sobrenadantes (Figura 28).

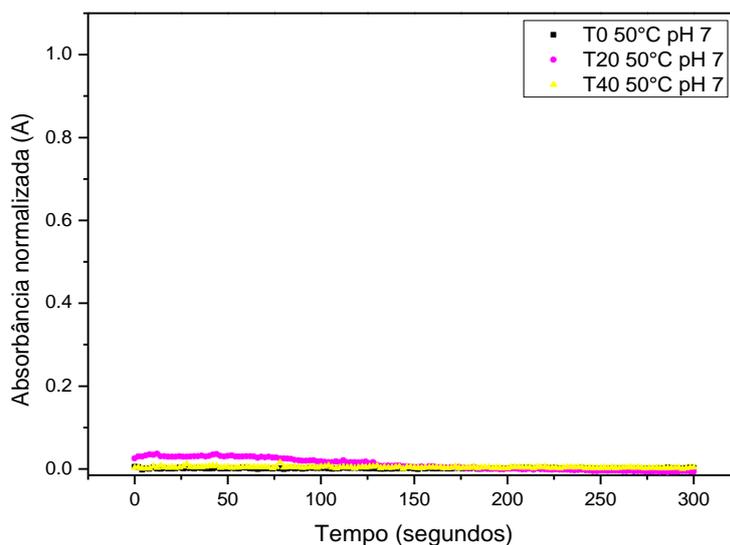


Figura 28. Curvas de absorvância dos sobrenadantes das mantas *core-shell* PVA/Lipase - PHBV/PEG (Com PEG) incubadas à 50°C e pH 7 nos tempos t0, t20 e t40.

5.6.4 Atividades das mantas após estocagem (14 dias em temperatura ambiente)

Enzimas livres podem perder significativamente sua atividade catalítica, devido ao processo de desnaturação precoce quando armazenadas em temperatura ambiente. A imobilização, no entanto, pode promover a preservação dessa enzima, evitando sua desnaturação e mantendo sua atividade catalítica (ABROL *et al.*, 2007).

ÇAKMAK *et al.*, (2020) avaliaram o efeito da imobilização via ligação covalente da Lipase comercial de *Candida rugosa* tipo VII em nanopartículas magnéticas funcionalizadas na atividade pós estocagem. As enzimas foram estocadas na temperatura recomendada pelo fabricante (4°C, de acordo com a Sigma-Aldrich) durante 30 dias. A atividade da enzima foi verificada periodicamente e comparada à atividade da enzima imobilizada no primeiro dia. Após o tempo de estocagem foi verificado que a enzima manteve 50% de sua atividade inicial. Na metade deste tempo (15 dias), foi observada uma atividade relativa de 60% da atividade catalítica inicial.

Em um estudo de ONOJA *et al.* (2018) os autores imobilizaram a mesma enzima em nanosilica magnetizada em temperatura ambiente por 56 dias. Após o tempo total de estocagem (56 dias), observou-se que a enzima imobilizada reteve 45% de sua atividade inicial, em comparação com apenas 5% de agregados de enzimas livres. Em 15 dias de análise, a enzima imobilizada reteve quase 100% de sua atividade inicial.

Em nosso estudo, foi observado que após 14 dias de estocagem em temperatura ambiente as mantas com PEG preservaram aproximadamente 94% de sua atividade inicial, corroborando com os resultados encontrados na literatura. Enquanto isso, as mantas sem PEG tiveram um aumento de aproximadamente 60% em sua atividade inicial, mantendo uma atividade próxima à atividade observada para as mantas com PEG, como mostra a Tabela 13.

Tabela 13. Atividades operacional e em função da disponibilidade de proteína das enzimas imobilizadas nas mantas com e sem PEG antes e após estocagem por 14 dias em temperatura ambiente.

ATIVIDADE	Atividade enzimática a 37°C, pH 7, dia 01	Atividade enzimática a 37°C, pH 7 pós estocagem durante 14 dias em Temperatura ambiente
SEM PEG (U/g)	0,033	0,053
COM PEG (U/g)	0,065	0,061
ENZIMA LIVRE (U/L)	5,860	NA
SEM PEG (U/g _p)	198,83	323,00
COM PEG (U/g _p)	421,23	392,44
ENZIMA LIVRE (U/g _p)	322,01	NA

NA: não se aplica.

O PHBV é um copolímero que possui a temperatura de transição vítrea (T_g) em aproximadamente -2°C (THIRÉ *et al.*, 2011). Acima da T_g , o material polimérico possui mobilidade suficiente para que ocorra a relaxação de suas cadeias. Tal relaxação pode ser favorecida pelo tempo de estocagem a temperatura ambiente. Esse resultado, pode ter sido responsável pela proximidade da enzima com a região externa, facilitando uma aproximação do substrato, aumentando a atividade nesse caso, mantendo o comportamento de atividade de ambas as mantas bem similar (Figura 29).

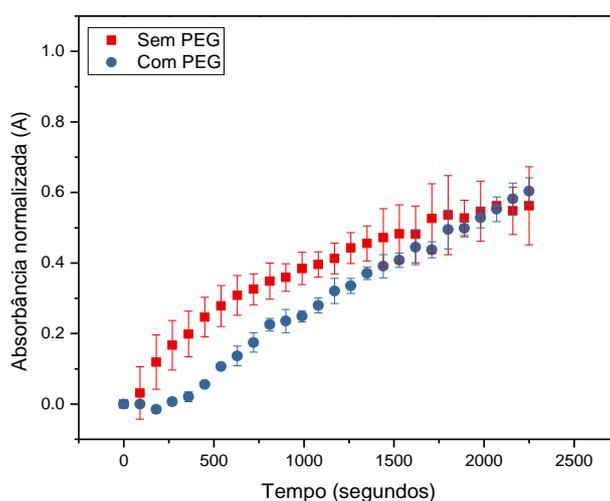


Figura 29. Curvas de absorvância da enzima livre e das mantas de fibras core-shell PVA/Lipase - PHBV e core-shell PVA/Lipase - PHBV/PEG (Sem PEG e Com PEG) incubadas a 37°C e pH 7 pós estocagem por 14 dias em temperatura ambiente.

5.6.5 Atividades relativas entre as mantas com e sem PEG e enzima livre nas condições

analisadas.

As atividades relativas entre a enzima imobilizada nas mantas com e sem PEG e a enzima livre foram avaliadas em função da disponibilidade de proteína nas amostras. Os resultados dos cálculos são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Atividades relativas entre as enzimas imobilizadas nas mantas com e sem PEG e enzima livre em função da disponibilidade de proteína.

ATIVIDADE RELATIVA	SEM PEG – ENZIMA LIVRE (%)	COM PEG – ENZIMA LIVRE (%)	COM PEG – SEM PEG (%)
37°C pH 7 (ciclo 1)	61,75	130,81	211,86
37°C pH 7 (ciclo 2)	65,61 *	150,27 *	229,04
37°C pH 9	89,47	95,24	106,45
37°C pH 5	Sem atividade	Sem atividade	Sem atividade
50°C pH 7	155,29	848,82	546,59
Estocagem	100,31*	121,87*	121,50

* Atividade comparada à atividade da enzima livre a 37°C em pH 7.

Observou-se uma maior atividade enzimática para as enzimas imobilizadas nas mantas com PEG, com exceção para a condição pH 9, onde o mecanismo de liberação do PEG foi influenciado pelo pH. As mantas sem PEG apresentaram uma atividade menor quando comparada à enzima livre nas condições de pH 7 e 9 a 37°C. No entanto, quando submetida a 50°C, a enzima imobilizada na manta sem PEG também apresentou uma maior atividade em relação à enzima livre. Na condição de pH ácido (pH 5) houve completa desativação da enzima Lipase de *Candida rugosa* tipo VII. A Figura 30 ilustra de forma clara a comparação entre os valores de atividade relativa.

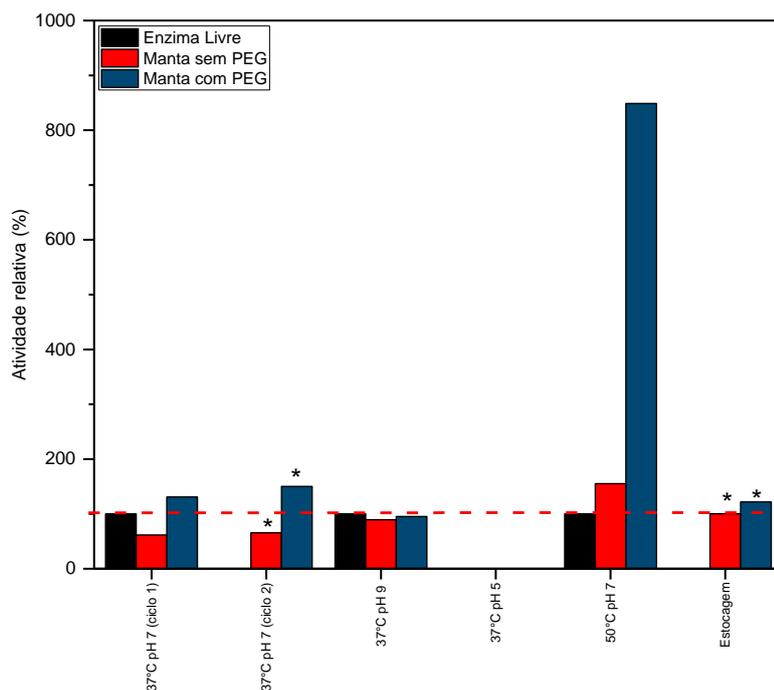


Figura 30. Atividades relativas entre as mantas com e sem PEG e enzima livre.

Diante dos resultados, é possível assumir que a imobilização por encapsulamento da enzima nas mantas sem PEG gerou uma barreira de difusão que dificultou o acesso do substrato à enzima, mas por outro lado, resultou em uma proteção da enzima contra altas temperaturas por se tratar de um material com baixa condutividade térmica, permitindo a perda de calor da solução substrato antes do contato com a enzima. Os resultados sugerem o efeito de um mecanismo “tampa” gerado pela incorporação do PEG, visto que em condições desfavoráveis à sua liberação (pH 9), os valores de atividade se mostraram bem próximos aos valores de atividade das mantas sem PEG. O mecanismo proposto ocorre pela liberação do PEG para o meio, quando em condições favoráveis, gerando uma abertura onde o substrato tem acesso livre

à enzima. Desse modo, mesmo protegida no interior das fibras de PHBV, a enzima se torna acessível ao meio externo pela remoção da “tampa” de PEG.

A alta atividade das mantas com PEG comparadas à enzima livre em termos de quantidade de proteína mostrou uma melhor disposição da enzima no meio pela alta área superficial do material.

5.7 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE INTERAÇÃO DA ENZIMA IMBOLIZADA NAS MANTAS DE FIBRAS *CORE-SHELL* PVA/LIPASE – PHBV/PEG COM O MEIO DURANTE AS ANÁLISES DE ATIVIDADE

Os resultados apresentados no item 5.6 revelaram padrões que nos levam a chegar a algumas hipóteses sobre a imobilização da enzima Lipase. A primeira hipótese é a da não modificação da conformação da enzima durante o processo de imobilização. Essa hipótese está baseada no fato do pH ótimo para a enzima livre (pH 9) não ter sido alterado no processo de imobilização, além do pH 5 ter desativado as enzimas em todas as suas condições (livre e imobilizada).

A segunda hipótese é que o mecanismo que está atuante na atividade é o mecanismo de difusão. Desta forma, presume-se que haja a barreira física do polímero casca que encapsula a enzima e dificulta o acesso do substrato e pode ser contornado com a inserção de poros pela remoção do PEG.

Diante dessas teorias, a microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar a microestrutura das mantas de PVA/Lipase – PHBV/PEG após o processo de incubação em tampão (nas mesmas condições do ensaio de atividade). As micrografias estão apresentadas a seguir.

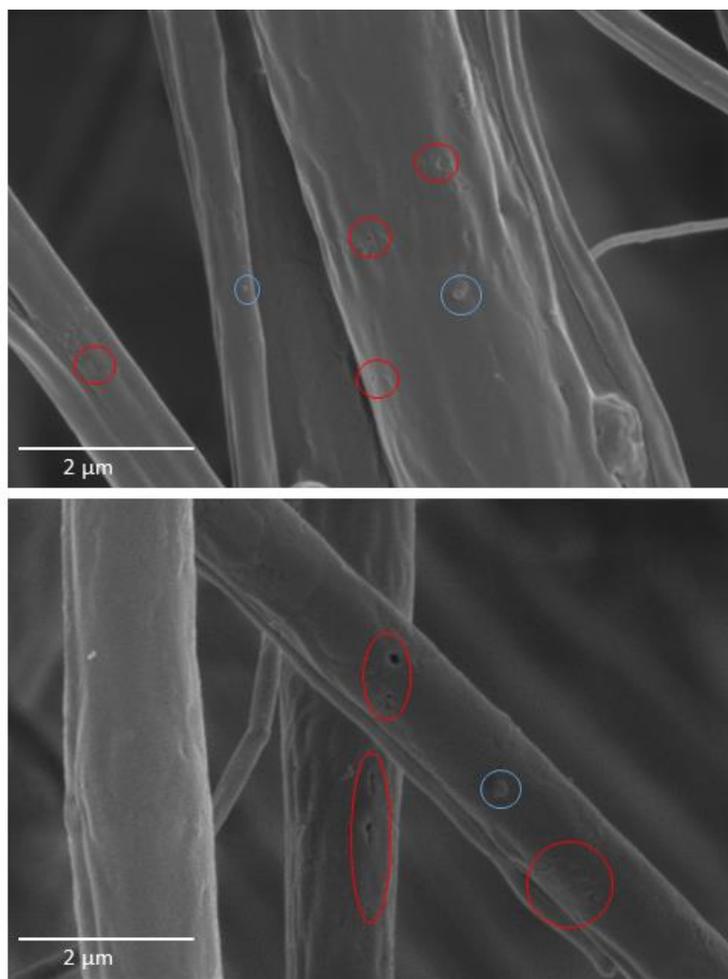


Figura 31. Micrografias de MEV das mantas de fibras *core-shell* PVA/Lipase - PHBV/PEG incubadas a 37°C e pH 7, durante ensaio de atividade.

É possível observar nas imagens apresentadas acima a presença de poros na superfície das fibras (círculos vermelhos), possivelmente referentes à saída do PEG e regiões “distendidas” que indicam um possível inchamento desse polímero anterior à sua remoção por completa solubilização (círculos azuis). Essa remoção do PEG, comprovada ainda no ensaio de intumescimento (item 5.5), favoreceu o acesso do substrato à enzima, levando ao aumento da atividade quando comparadas às mantas sem PEG. Portanto, pode-se relacionar o aumento da atividade nas mantas com a remoção do PEG da superfície das fibras.

Em relação às mantas incubadas em pH 9, observamos nos resultados de atividade que a atividade se manteve equivalente à encontrada na manta sem PEG e foi menor que a atividade encontrada para o pH 7 da própria manta com PEG. Essa atividade reduzida foi atribuída à já

mencionada baixa solubilidade do PEG em pH básico. As micrografias mostram algumas regiões de vazios (ou poros) na superfície das fibras. No entanto, é possível observar uma maior quantidade de regiões referentes ao provável inchamento do PEG, relevado durante a incubação.

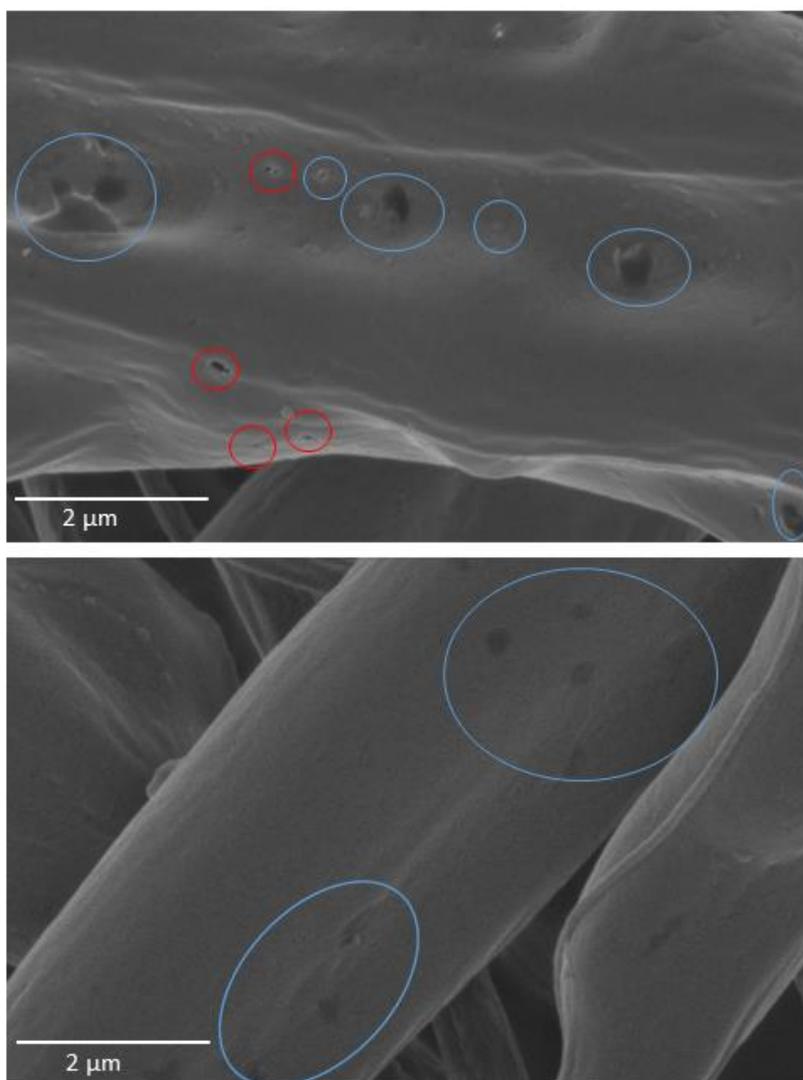


Figura 32. Micrografias de MEV das mantas de fibras *core-shell* PVA/Lipase - PHBV/PEG incubadas a 37°C e pH 9, durante ensaio de atividade.

As micrografias apresentadas na Figura 33 retratam o comportamento das mantas quando incubadas em pH 7, à 50°C. Embora as imagens mostrem que existe poro formado na fibra (círculo vermelho preenchido), podemos observar predominância de regiões de “bolhas” expostas ao longo de toda superfície das fibras (círculos vermelhos pontilhados). A presença

do poro, associada aos resultados obtidos no ensaio de intumescimento e os valores de atividade das mantas a 50°C corroboram juntos para a hipótese de que a temperatura facilitou a solubilização e remoção do PEG e ainda favoreceu o inchamento da região interna das fibras. Desta forma, pode-se propor que o PEG presente na superfície das fibras casca tenha sido solubilizado, gerando poros que foram posteriormente preenchidos pelo PVA inchado após absorver o meio tampão. A fase de inchamento é uma etapa conhecida do processo de solubilização de polímeros e pode a solubilidade pode ser favorecida pela temperatura, reduzindo o tempo de solubilização (MILLHER-CHOU & KOENIG, 2003; SPERLING, 2006). Desta forma, é provável que o tempo de incubação das mantas em pH 7 a 37°C tenha sido suficiente para inchar e solubilizar totalmente o PEG, mas sem ter tempo para inchar significativamente o PVA da fase interna. Foi discutido no ensaio de intumescimento que as mantas sem PEG na superfície também tiveram um grau de inchamento devido à permeabilidade das fibras. No entanto, o PVA inchou de forma limitada por estar confinado na estrutura hidrofóbica da casca de PHBV. No caso de haver poros gerados pela remoção do PEG, e com o processo de solubilidade sendo catalisado pelo aumento da temperatura para 50°C, o PVA teve um aumento no seu grau de inchamento, favorecendo que esse material expandisse para fora das fibras. Tal fenômeno pode ter sido responsável pelo aumento expressivo na atividade da enzima, uma vez que a enzima dispersa no PVA pôde ser exposta ao meio mais facilmente.

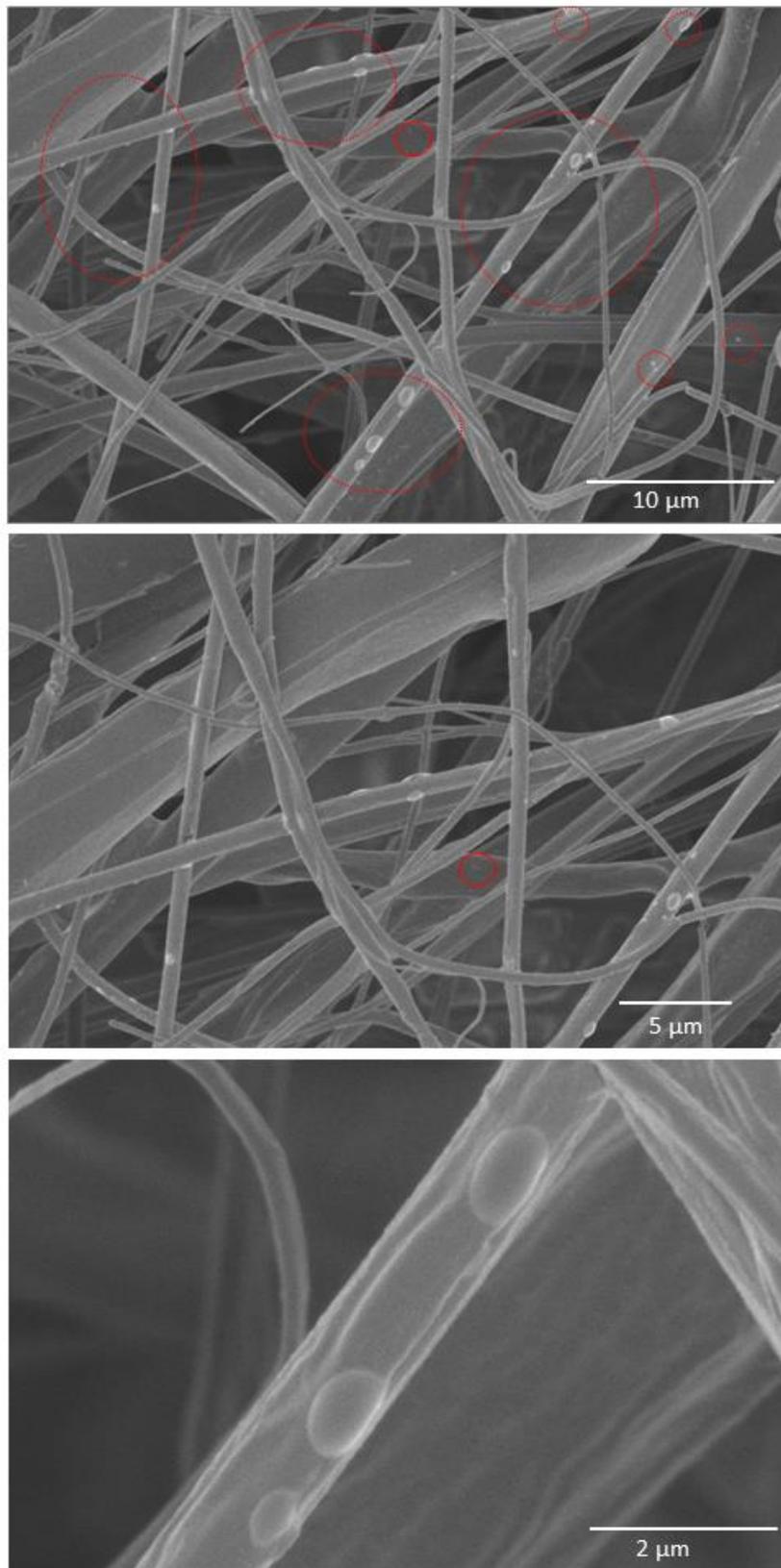


Figura 33. Micrografias de MEV das mantas de fibras *core-shell* PVA/Lipase - PHBV/PEG incubadas a 50°C e pH 7, durante ensaio de atividade.

Conclusões parciais

- Os resultados comprovaram a incorporação do PEG na superfície das fibras *shell* de PHBV;
- Foi possível observar que as fibras contendo PEG possibilitaram um maior inchamento das mantas. Foi constatada a liberação do PEG para o meio em tempos inferiores a 1 h. Tal inchamento seguido da liberação pode ter sido responsável pelo aumento da atividade das mantas;
- O método utilizado para a imobilização da enzima lipase foi eficiente em manter a enzima retida no suporte sem ocorrer liberação da enzima para o meio;
- Um mecanismo tipo “tampa” pode ter sido criado com a inserção do PEG que, ao entrar em contato com o meio, gerou poros responsáveis pelo maior acesso do substrato à enzima;
- A boa dispersão da enzima por toda extensão das fibras, associada à incorporação do PEG favoreceu o acesso do substrato à enzima, resultando no aumento da atividade.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

6.1 CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho comprovou a processabilidade competitiva do copolímero biodegradável PHBV quando comparado ao PLA, um polímero biodegradável vastamente aplicado para produção de mantas via Fiação por Sopros em Solução.

A fiação por sopros em solução se mostrou uma tecnologia adequada para a imobilização da enzima lipase por encapsulamento. Uma estrutura núcleo-casca (*core-shell*) foi eficientemente obtida. Ajustes microestruturais como: redução no diâmetro das fibras, diminuição de contos e defeitos e maior alinhamento foram alcançados com a modificação do tipo de coletor (rotatório) operando com velocidade tangencial de 3,14 m/s (ou 600 rpm).

Embora a imobilização da enzima pelo método de encapsulamento tenha resultado numa redução da atividade enzimática, houve uma proteção térmica da enzima, quando aplicada em alta temperatura (50°C). Para além disso, a incorporação de PEG na composição da casca resultou em um mecanismo “tampa”, facilitando o acesso do substrato à enzima ao mesmo tempo que a manteve imobilizada.

Apesar da atividade operacional das mantas (a atividade das enzimas imobilizadas por grama de suporte) significativamente baixa, quando comparadas as atividades da enzima

expressas por grama de proteína, as mantas possuíram desempenho satisfatório, sendo até superior ao desempenho da enzima livre.

Para além disso, outras vantagens como a possibilidade de reuso e a recuperação da enzima do meio após a reação, foram comprovadas, provando que o método de imobilização da enzima lipase estudada via SBS foi eficiente.

A imobilização de enzimas é um tema de alto interesse que se mantém atual e em constante estudo. Diversos autores comprovam que a imobilização confere estabilidade e, muitas das vezes, aumento do desempenho da enzima, quando comparada à enzima livre. Outra vantagem bastante conhecida é a possibilidade de reuso do biocatalisador. No entanto, embora materiais dos mais diversos (polímeros, cerâmicos, resíduos agroindustriais, entre outros) venham sendo explorados como suportes e produzidos pelas mais diversas técnicas (como por exemplo, *spray dryer*, nanoprecipitação, impressão 3D, eletrofição, etc.), ainda são empregadas muitas etapas em seus processos de produção e imobilização. Esses processos em sua maioria demandam a utilização de reagentes tóxicos, de alto custo e necessitam de uma etapa de remoção desses produtos não reagidos. A tabela 15 apresenta alguns estudos atuais de imobilização da lipase de *Candida rugosa* utilizada no presente trabalho, incluindo seus principais resultados e número de etapas. No presente trabalho, no entanto, foi possível obter um sistema enzima-suporte de baixo custo, em uma única etapa, utilizando polímeros biodegradáveis sustentáveis.

Tabela 15. Trabalhos atuais disponíveis em imobilização de lipase de *Candida rugosa*.

MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO	SUPORTE	PRINCIPAIS RESULTADO	ETAPAS	REFERÊNCIA
Ligação covalente com glutaraldeído	Casca de arroz, bagaço de cana de açúcar, fibra de coco verde	A lipase imobilizada na casca de arroz ativada com glutaraldeído apresentou o maior desempenho, retendo 94,1% da atividade inicial, seguida pelo bagaço de cana (90,3%) e fibra de coco verde (89,3%). Após armazenamento por seis meses a 5 °C, os sistemas enzimáticos imobilizados retiveram pelo menos 70,0% de sua atividade inicial (vs. 18,3% de atividade retida para a lipase livre). Após dez ciclos de reutilização, a enzima imobilizada em carreadores lignocelulósicos reteve em média 72,7% de sua atividade inicial.	Etapa 1: funcionalização dos suportes com glutaraldeído, Etapa 2: secagem; Etapa 3: imobilização da lipase purificada Etapa4: secagem.	Costa-Silva <i>et al.</i> , 2022
Ligação covalente com glutaraldeído	Geopolímero (aluminossilicatos nanoestruturados ativados por álcali) produzidos por impressão 3D	A imobilização conferiu a possibilidade de reuso da enzima, que manteve 91% de sua atividade após o primeiro ciclo. A reação de hidrólise utilizando resíduo de óleo de cozinha, apresentou um nível de conversão em ácidos graxos livres de 75% para a enzima imobilizada em comparação a 94% da enzima livre.	Etapa 1: produção do material por impressão 3D; Etapa 2: modificação iônica da superfície; Etapa 3: funcionalização da superfície com glutaraldeído; Etapa 4: imobilização Etapa 5: lavagem e secagem	Dos Santos <i>et al.</i> , 2021

Ligação covalente com epícloridrina	Cloisite 30B ativada com epóxi	A imobilização aumentou a estabilidade em diferentes pHs e de estocagem da enzima livre. No entanto, o maior efeito se deu na estabilidade térmica, onde foi possível preservar 30% de atividade da enzima imobilizada em temperatura operacional de 80°C, enquanto a enzima livre teve completa desativação. O estudo comprovou uma atividade acima de 60% das enzimas imobilizadas, mesmo após 9 ciclos.	Etapa 1: secagem da cloisite; Etapa 2: modificação da cloisite; Etapa 3: imobilização da enzima	Aghaei <i>et al.</i> , 2021
Imobilização por adsorção via interações iônicas	Carvão ativado	Foi observado um aumento de 80% da atividade da enzima imobilizada à 40°C. A imobilização conferiu maior estabilidade da enzima ao solvente orgânico terc-butanol.	Etapa 1: produção do suporte; Etapa 2: Imobilização; Etapa 3: Filtração e lavagem.	Cea <i>et al.</i> , 2019

6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com o intuito de aprimorar os resultados obtidos no presente trabalho, propõem-se realizar os seguintes estudos:

- Estudo da conformação da enzima antes e após o processo de fixação;
- Avaliação da atividade enzimática em maior variedade de pH (de 2 a 10, por exemplo);
- Avaliação da atividade enzimática em maior variedade de temperatura (em condições de refrigeração e em condições de temperaturas extremas $\geq 70^{\circ}\text{C}$);
- Estudo da atividade enzimática com diferentes concentrações de enzima, a fim de se chegar a valores de atividade operacional aplicáveis;
- Avaliação da atividade biocatalítica das mantas em condições reacionais aplicadas.

CAPÍTULO VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAZARI, M. F., KARIZI, S.Z., HAJATI-BIRGANI, N., *et al.*, 2021, "PHBV nanofibers promotes insulin-producing cells differentiation of human induced pluripotent stem cells", *Gene*, v. 768, n. 5, pp.145333.

ABROL, K.; QAZI, G. N.; GHOSH, A. K., 2007, "Characterization of an anion-exchange porous polypropylene hollow fiber membrane for immobilization of ABL lipase", *Journal of Biotechnology*, v.4, n.128, pp. 838–848.

AGHAEI, H., YASINIAN, A., TAGHIZADEH, A., 2021, "Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* on epoxy-activated cloisite 30B as a new heterofunctional carrier and its application in the synthesis of banana flavor and production of biodiesel", *International Journal of Biological Macromolecules*, v.178, p.569-579.

AHMED, A. S., MANDAL, U. K., TAHER, M., *et al.*, 2018, "PVA-PEG physically cross-linked hydrogel film as a wound dressing: Experimental design and optimization", *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 23, n. 8, pp. 751-760.

ALHARBI, H.F., LUQMAN, M., KHALIL, K.A, *et al.*, 2018, "Fabrication of core-shell structured nanofibers of poly (lactic acid) and poly (vinyl alcohol) by coaxial electrospinning for tissue engineering", *European Polymer Journal*, v.98, pp. 483-491.

ALMANY, L., SELIKTAR, D., 2005,"Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures", *Biomaterials*, v.26, pp. 2467-2477

ALMETWALLY, A.; AHMED, EL-SAKHAWY M.; ELSHAKANKERY M. H., *et al.* 2017, "Technology of nano-fibers: Production techniques and properties-Critical review." *J. Text. Assoc.*, v.78, n. 1, pp.5-14.

ALONSO-LÓPEZ, O., LÓPEZ-IBÁÑEZ, S., BEIRAS, R., 2021, "Assessment of Toxicity and Biodegradability of Poly(vinyl alcohol)-Based Materials in Marine Water", *Polymers*, v. 13, n.21, pp.3742

ASADUZZAMAN, F., SALMON, S., 2022, "Protease Immobilization in Solution-Blown Poly(ethylene oxide) Nanofibrous Nonwoven Webs", *Applied Engineering Materials*, acsaenm.2c00111.

BARHOUM, A.; PAL, K.; RAHIER, H.; *et al.*, 2019, "Nanofibers as new-generation materials: From spinning and nano-spinning fabrication techniques to emerging applications." *Applied Materials Today*, v.17, n.1, pp. 1-35.

BEACHLEY V., KATSANEVAKIS E., ZHANG N., *et al.*, 2012 "Highly aligned polymer nanofiber structures: Fabrication and applications in tissue engineering", *Advances in Polymer Science*. v.246, pp. 171-212.

BILAL M, ASGHER M, CHENG H, YAN Y, IQBAL HMN., 2018, "Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design", *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 39, n.2, pp. 202–219.

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIEIRA, F. 2013, "Immobilization of enzymes: a literature survey.", *Methods in molecular biology*, v.1051, n.2013, pp. 15-31.

CAO, N.; ZHAO, Y.; CHEN, H.; *et al.* 2022, "Poly(ethylene glycol) Becomes a Supra-Polyelectrolyte by Capturing Hydronium Ions in Water", *Macromolecules*, v.55, n.11, pp. 4656-4664.

CARLOS, A.L.M, MANCIPE, J.M.A, DIAS, M.L., *et al.*,2021, "Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) core-shell spun fibers produced by solution blow spinning for bioactive agent's encapsulation", *Journal of Applied Polymer Science*, v.139, n.18, 52081.

CEA, M., GONZÁLEZ, M.E., ABARZÚA, M. *et al.*, 2019, "Enzymatic esterification of oleic acid by *Candida rugosa* lipase immobilized onto biochar", *Journal of Environmental Management*, v.242, p.171-177.

CHAN, K.H.K., WONG, S.Y., TIJU, W.C.,*et al.*, 2009, "Morphologies and electrical properties of electrospun poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate]/ multiwalled carbon nanotubes fibers", *Journal of Applied Polymer Science*, v.116, n.2, pp. 1030-1035.

CHOI, J.S., PARK, W.H., 2004, "Effect of biodegradable plasticizers on thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate)", *Polymer Testing*, v.23, n.4, pp. 455-460.

COSTA-SILVA, T.A., CARVALHO, A.K.F., SOUZA, C.R.F., et al., 2022, "Highly effective *Candida rugosa* lipase immobilization on renewable carriers: Integrated drying and immobilization process to improve enzyme performance", *Chemical Engineering Research and Design*, v.183, p.41-55.

CZARNECKA, K., WOJASINSKI, M., CIACH, T., et al., 2021, "Solution Blow Spinning of Polycaprolactone - Rheological Determination of Spinnability and the Effect of Processing Conditions on Fiber Diameter and Alignment", *Materials*, v.14, n.6, pp.1463.

ÇAKMAK, R.; TOPAL,G.; ÇINAR, E., 2020, "Covalent Immobilization of *Candida rugosa* Lipase on Epichlorohydrin-Coated Magnetite Nanoparticles: Enantioselective Hydrolysis Studies of Some Racemic Esters and HPLC Analysis", *Applied Biochemistry Biotechnology*, v.191, pp.1411–1431.

DADOL, G. C., KILIC, A., TIJING, L. D., et al., 2020, "Solution blow spinning (SBS) and SBS-spun nanofibers: Materials, methods, and applications", *Materials Today Communication*, v. 25, 101656.

DARISTOTLE, J. L., BEHRENS, A. M., SANDLER, A. D., et al., 2016, "A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning", *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 8, n.51, pp. 34951–34963.

DI,Y.; WANG, W.; ZHAO, Z.; et al., 2017, "Solution-blown nylon 6–chitosan core–shell nanofiber for highly efficient affinity adsorption", *Polymers Advanced Technologies*, v.28, n.7, pp.905-908.

DIAS, F. T. G., REMPEL, S. P., AGNOL, L. D., et al., 2020, "The main blow spun polymer systems: processing conditions and applications", *Journal of Polymer Research*, v. 27, n. 205, pp. 1-23.

DING, J.; ZHANG, J.; LI, J.; et al., 2019,"Electrospun polymer biomaterials", *Progress in Polymer Science*, v.90, pp.1-34.

DOS SANTOS, T.C., 2017, *Imobilização de lipase em nanoparticulas magnéticas e sua aplicação na extração de carotenoides e ácido graxos do óleo de palma (Elaeis Guineenses)*. Tese* de D.Sc., Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

DOS SANTOS, L.K., BOTTI, R.F., INNOCENTINI, M.D.M., et al., 2021, "3D printed geopolymer: An efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase", *Chemical Engineering Journal*, v.414, p.128843.

DOS SANTOS, D.M., CORREA, D. S., MEDEIROS, E.S., et al., 2020, "Advances in Functional Polymer Nanofibers: From Spinning Fabrication Techniques to Recent Biomedical Applications", *ACS Applied Materials Interface*, v. 12, n. 41, pp. 45673-45701.

DROR, Y., KUHN, J., AVRAHAMI, R., et al., 2008, "Encapsulation of Enzymes in Biodegradable Tubular Structures", *Macromolecules*, v.41, n.12, pp. 4187-4192.

D'SOUZA, A. A., SHEGOKAR, R., 2016, "Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications", *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 13, n.9, pp. 1257-1275.

EDWARDS, M. D., MITCHELL, G. R., MOHAN, S. D. et al., 2010, "Development of orientation during electrospinning of fibres of poly(ϵ -caprolactone)", *European Polymer Journal*, v. 46, n.6, pp. 1175-1183.

EL-AASSAR, M. R., 2013, "Functionalized electrospun nanofibers from poly (AN-co-MMA) for enzyme immobilization" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 85, n.86, pp. 140–148.

EL-AASSAR, M. R., SHIBRAEN, M.H.M.A., ABDEL-FATTAH, Y.R., et al., 2019, "Functionalization of Electrospun Poly(Acrylonitrile-co-Styrene/Pyrrole) Copolymer Nanofibers for Using as a High-performance Carrier for Laccase Immobilization", *Fibers and Polymers*, v. 20, n. 11, pp. 2268-2279.

ELMOWAFY, E., ABDAL-HAY, A., SKOURAS, A., et al., 2019, "Polyhydroxyalkanoate (PHA): applications in drug delivery and tissue engineering", *Expert Review of Medical Devices*, v. 16, n. 6.

EŞ, I., VIEIRA, J. D. G., AMARAL, A. C., 2015a, "Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 5, pp. 2065–2082.

EŞ, I., VIEIRA, J. D. G., AMARAL, A. C., 2015b, "Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 5, pp. 2065–2082.

EUROPEAN BIOPLASTICS, 2022. "Global bioplastics production defies challenges by showing significant increase." Disponível em: <<https://www.european-bioplastics.org/global-bioplastics-production-defies-challenges-by-showing-significant-increase/>>

FERREIRA, T. P.M., NEPOMUCENO, N. C., MEDEIROS, E. L. G. *et al.*, 2019, "Antimicrobial coatings based on poly(dimethyl siloxane) and silver nanoparticles by solution blow spraying", *Progress in Organic Coatings*, v. 113, pp. 19-26.

GAO, Y.; XIANG, H.F.; WANG, X.X.; *et al.*, 2020, "A portable solution blow spinning device for minimally invasive surgery hemostasis.", *Chemical Engineering Journal*, v.387, n.1, 124052.

GAO, Y., ZHANG, J., SU, Y., *et al.*, 2020, "Recent progress and challenges in solution blow spinning", *Materials Horizons*, v. 8, pp. 426-446.

GARCIA-GALAN, C., BERENGUER-MURCIA, A., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., *et al.*, 2011, "Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance", *Advanced Synthesis & Catalysis*, v. 353, n. 16, pp. 2885-2904.

GHOSAL, K., AGATEMOR, C., ŠPITÁLSKY, Z., *et al.*, "Electrospinning tissue engineering and wound dressing scaffolds from polymer-titanium dioxide nanocomposites", *Chemical Engineering Journal*, v.358, pp.1262-1278.

GONÇALVES, I. M. F., ROCHA, I. M., PIRES, E. G., *et al.*, 2020, "Effectiveness of Core-Shell Nanofibers Incorporating Amphotericin B by Solution Blow Spinning Against Leishmania and Candida Species", *Frontiers in Bioengineering. Biotechnology*, v. 8, pp. 571821.

GOSWAMI, D., BASU, J.K., DE, S., 2009, "Optimization of process variables in castor oil hydrolysis by *Candida rugosa* lipase with buffer as dispersion medium," *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 14, n. 2, pp. 220–224.

GUERRAND, D., 2017, "Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries" *Oilseeds & fats Crops and Lipid*, v. 24, n. 4, pp. D403.

HAGHJU, S., BARI, M. R., KHALED-ABAD, M. A., 2018, "Affecting parameters on fabrication of β -D-galactosidase immobilized chitosan/poly (vinyl alcohol) electrospun nanofibers", *Carbohydrate Polymers*, v. 200, n. 15, pp. 137-143.

HOMAEI, A.A., SARIRI, R., VIANELLO, F. et al., 2013, "Enzyme immobilization: an update." *Journal of Chemical Biology*, v. 6, pp. 185–205.

ILLANES, A., WILSON, L. VERA, C., 2008, *Enzyme Biocatalysis. Comprehensive Biotechnology*, 2 ed. Chile, John Wiley and Sons.

JIA, C., LI, L., SONG, J., et al., 2021, "Mass Production of Ultrafine Fibers by a Versatile Solution Blow Spinning Method", *Accounts of Materials Research*, v.2, n. 6, pp. 432-446.

JIANG, H., HU, Y., LI, Y., et al., 2005, "A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents", *Journal of Controlled Release*, v. 108, pp. 237–243.

JIANG, H., WANG, L., ZHU, K., 2014, "Coaxial electrospinning for encapsulation and controlled release of fragile water-soluble bioactive agents", *Journal of Controlled Release*, v. 193, pp. 296–303.

JIAO, H., SONG, S., ZHAO, K., et al., 2020, "Synthesis and properties of porous piezoelectric BT/PHBV composite scaffold", *Journal of Biomaterials Science*, v. 31, n. 12, pp. 1552-1565.

KAJA, B.S., LUMOR, S., BESONG, S. et al., 2018, "Investigating Enzyme Activity of Immobilized *Candida rugosa* Lipase", *Journal of Food Quality*, v.2018, 1618085.

KANIUK, Ł, KRYSIAK, Z.J., METWALLY, S., et al., 2020, "Osteoblasts and fibroblasts attachment to poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydrovaleric acid) (PHBV) film and electrospun scaffolds", *Materials Science and Engineering: C*, v. 110, pp. 110668.

KANKALA, R.K., WANG, S., CHEN, A., et al., "Self-Assembled Nanogels: From Particles to Scaffolds and Membranes". In: João Conde (eds), *Handbook of Nanomaterials for Cancer Theranostics*, 1 ed, chapter 2, USA, Elsevier, 2018.

KAUSHAL, J., MEHANDIA, S., SINGH, G., et al., 2018, "Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 16, pp. 192–199.

KHALAJI, S.; EBRAHIMI, N. G.; HOSSEINKHANI, H., 2021, "Enhancement of biocompatibility of PVA/HTCC blend polymer with collagen for skin care application", *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, v.70, n.7, pp.459.

KHARAGHANI, D., GITIGARD, P., OHTANI, H., *et al.*, 2019, "Design and characterization of dual drug delivery based on in-situ assembled PVA/PAN core-shell nanofibers for wound dressing application", *Scientific Reports*, v.9, 12640.

KOLBASOV, A., SINHA-RAY, S., JOIJODE, A., *et al.*, 2016, "Industrial-Scale Solution Blowing of Soy Protein Nanofibers", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.55, n.1, 323-333.

KOLAK, S., BIRHANLI, E., BORAN, F., *et al.*, 2023, "Tailor-made novel electrospun polycaprolactone/polyethyleneimine fiber membranes for laccase immobilization: An all-in-one material to biodegrade textile dyes and phenolic compounds", *Chemosphere*, v. 313, 137478.

KOLLER, M., MUKHERJEE, A., 2020, "Polyhydroxyalkanoates – Linking Properties, Applications and End-of-life Options", *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 34, n. 3, pp. 115-129.

LEHNINGER, NELSON, D. L., COX, M. M., 2013, *Principles of Biochemistry*. 7 ed., Reino Unido, Artmed.

LIU, R., XU, X., ZHUANG, X., *et al.*, 2014, "Solution blowing of chitosan/PVA hydrogel nanofiber mats", *Carbohydrate Polymers*, v.10, pp. 1116-1121.

LOMBARDO, D., CALANDRA, P., PASQUA, L., *et al.*, 2020, "Self-Assembly of Organic Nanomaterials and Biomaterials: The Bottom-Up Approach for Functional Nanostructures Formation and Advanced Applications", *Materials*, v.13, n.5, pp. 1048-1090.

MAGAZ, A., ROBERTS, A.D., FARAJI, S., *et al.*, 2018, "Porous, Aligned, and Biomimetic Fibers of Regenerated Silk Fibroin Produced by Solution Blow Spinning", *Biomacromolecules*, v. 19, n. 12, pp. 4542-4553.

MALEKI, H., MATHUR, S., KLEIN, A., 2020, "Antibacterial Ag containing core-shell polyvinyl alcoholpoly (lactic acid) nanofibers for biomedical applications", *Polymer Engineering and Science*, v.60, n.6, pp.1221-1230.

MANCIPE, J.M.A., L.C.P, BOLDRINI, BORCHIO, P.G.M., *et al.*, 2022, "Novel polycaprolactone (PCL)-type I collagen coreshell electrospun nanofibers for wound healing applications", *J Biomed Mater Res.*, v. 111, n.2, pp. 366-381.

MANCIPE, J.M.A., LOBIANCO, F.A., DIAS, M.L., *et al.*, 2022, "Electrospinning: New

Strategies for the Treatment of Skin Melanoma”, *Mini Rev Med Chem*. v. 22, n. 4, pp. 564-578.

MASOOD, N., AHMED, R., TARIQ, M., et al, 2019, “Silver nanoparticles impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes induced rabbit”, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 559, pp. 23-36.

MEDEIROS, E. S., MATTOSO, L. H. C., 2009, “Solution Blow Spinning: A New Method to Produce Micro- and Nanofibers from Polymer Solutions”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 113, pp. 2322–2330.

MEHTA, A. *et al.*, "The lipases and their applications with emphasis on food industry". In: Ray,R. C.(eds), *Microbial Biotechnology in Food and Health*, 1 ed., chapter 6, Odisha, India, Academic Pres, 2020.

MICKOVA, A., BUZGO, M., BENADA, O., et al., 2012, "Core/Shell Nanofibers with Embedded Liposomes as a Drug Delivery System", *Biomacromolecules*, v.13, pp. 952-962.

MILLER, C.L., STAFFORD, G., SIGMON, N., *et al.*, 2019, “Conductive Nonwoven Carbon Nanotube-PLA Composite Nanofibers Towards Wound Sensors via Solution Blow Spinning”, *Transactions on NanoBioscience*, v. 18, n.2, pp. 244-247.

MILLER-CHOU, B. A. & KOENIG, J. L., 2003, “A review of polymer dissolution”, *Progress in Polymer Science*, v.28, pp.1223–1270.

MIRANDA, K. W. E., BRESOLIN, J. D., NATARELLI, C. V. L., *et al.*, 2021, “Potential use of poly(lactic acid) nanofibers mats as Nano-sachets in postharvest of climacteric fruits and vegetables”, *Journal of Applied Polymers Science*, v. 138, n. 30.

MIRANDA, K. W. E., NATARELLI, C. V. L., THOMAZI, A. C., FERREIRA, *et al.*, 2020, “Halochromic Polystyrene Nanofibers Obtained by Solution Blow Spinning for Wine pH Sensing”, *Sensors*, v. 20, n. 417, pp. 2-16.

MIRTIČ, J., BALAŽIĆ, H. H., ZUPANČIČ, Š., *et al.*, 2019, “ Effect of Solution Composition Variables on Electrospun Alginate Nanofibers: Response Surface Analysis”, *Polymers*, v. 11, n.4.

NGUYEN, H. H., KIM, M., 2017, "An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization", *Applied Science and Convergence Technology*, v. 26, n. 6, pp. 157-163.

OLIVEIRA, J., BRICHI, G. S., MARCONCINI, J. M., *et al.*, 2014, "Effect of Solvent on the Physical and Morphological Properties of Poly(Lactic Acid) Nanofibers Obtained by Solution Blow Spinning" *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, v. 9, n. 4, pp. 117-125.

ONOJA, E.; CHANDREN, S.; RAZAK, F.I.A.; *et al.*, 2018, "Enzymatic synthesis of butyl butyrate by *Candida rugosa* lipase supported on magnetized-nanosilica from oil palm leaves: Process optimization, kinetic and thermodynamic study", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v.91, pp. 105-118.

PARIZE, D. D. S., FOSCHINI, M. M., DE OLIVEIRA, J. E., *et al.*, 2016, "Solution blow spinning: Parameters optimization and effects on the properties of nanofibers from poly(lactic acid)/dimethyl carbonate solutions" *Journal of Materials Science*, v. 51, pp. 4627–4638.

PARIZE, D. D. S., OLIVEIRA, J. E., FOSCHINI, M. M., *et al.*, 2016, "Poly(lactic acid) fibers obtained by solution blow spinning: Effect of a greener solvent on the fiber diameter", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 113, n.18.

PARK, S. C., KIM, M. J., CHOI, K., *et al.*, 2018, "Influence of shell compositions of solution blown PVP/PCL core–shell fibers on drug release and cell growth", *Royal Society of Chemistry*, v. 8, pp. 32470-32480.

PEREIRA, A.D.S., DE SOUZA, A.H., FRAGA, J.L., *et al.*, 2022, "Lipases as Effective Green Biocatalysts for Phytosterol Esters's Production: A Review. *Catalysts*, v. 12, n.1, pp.88-112.

PEREIRA, A.D.S., FRAGA, J.L., SOUZA, C.P.L., *et al.*, 2023, "β-Sitosterol Oleate Synthesis by *Candida rugosa* Lipase in a Solvent-Free Mini Reactor System: Free and Immobilized on Chitosan Alginate Beads. *Catalysts*, v.13, n.4, pp.780- 796.

PERVEEN, K., MASOOD, F., HAMEED, A., 2019, "Preparation, characterization and evaluation of antibacterial properties of epirubicin loaded PHB and PHBV nanoparticles", *International Journal of Biological Macromolecules*, v.14, pp. 259-266.

PÉREZ, B., COLETTA, A., PEDERSEN, J.N., *et al.*, 2018, "Insight into the molecular mechanism behind PEG-mediated stabilization of biofluid lipases", *Scientific Reports*, v.8, p. 12293.

REMPEL, S. P., ENGLER, L. G., SOARES, M. R. F., *et al.*, 2019, "Nano/microfibers of EVA copolymer obtained by solution blow spinning: Processing, solution properties, and pheromone release application", *Journal of Applied Polymers Science*, v. 136, n.42, 476647.

REZAKHANIHA, R., AGIANNIOTIS, A., SCHRAUWEN, J.T.C., *et al.*, 2012, "Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy", *Biomechanics and Modeling in mechanobiology*, v.11, pp. 461-473.

RIOS, N.S., HONORATO, T.L., CECILIA, J.A., *et al.*, 2022, "Applicability of mesoporous silica type SBA-15 as feasible support for the immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase and *Candida antarctica* lipase B", *Brazilian. Journal of Chemical. Engineering*, v. 39, pp. 1013–1021.

SALES, J.C.S., CASTRO, A.M., RIBEIRO, B.D., COELHO, M.A.Z., 2020, "Supplementation of watermelon peels as an enhancer of lipase and esterase production by *Yarrowia lipolytica* in solid-state fermentation and their potential use as biocatalysts in poly(ethylene terephthalate) (PET) depolymerization reactions" *Biocatalysis and Biotransformation*, v.38, n.6, pp. 457-468.

SANTOS, A.M.C., MEDEIROS, E.L.G, BLAKER, J.J., *et al.*, 2016, "Aqueous solution blow spinning of poly(vinyl alcohol) micro- and nanofibers", *Materials Letters*, v.176, pp. 122-126.

SEDGHI, R., SAYYARI, N., SHAABANI, A., *et al.*, 2018, "Novel biocompatible zinc-curcumin loaded coaxial nanofibers for bone tissue engineering application", *Polymer*, v.142, pp. 244-255.

SHARMA, R., CHITSI, Y., BANERGEE, U.C., 2001, "Production, purification, characterization and applications of lipases", *Biotechnology Advances*, v.19, pp. 627-662.

SHARMA, V., TSAI, M., NARGOTRA, P., *et al.*, 2022, "Agro-Industrial Food Waste as a Low-Cost Substrate for Sustainable Production of Industrial Enzymes: A Critical Review", *Catalysts*, v. 12, n. 11, pp. 1373-1396.

SHELDON, R. A., VAN PELT, S., 2013, "Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how", *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, pp. 6223–6235.

SIMBARA, M.M.O., SANTOS Jr, A.R.ANDRADE, A.J.P., *et al.*, 2018, "Comparative study of aligned and nonaligned poly(ϵ -caprolactone) fibrous scaffolds prepared by solution blow spinning", *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 107, n. 5, pp. 1462-1470.

SNOWDON, M.R., MOHANTY, A.K., MISRA, M., 2017, "Miscibility and Performance Evaluation of Biocomposites Made from Polypropylene/Poly(lactic acid)/Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) with a Sustainable Biocarbon Filler", *ACS Omega*, v.2, n.10, 6446-6454.

SONG, J., LI, Z., WU, H., 2020, "Blowspinning: A news choice for nanofibers" *ACS Applied Materials Interfaces*, v. 12, n. 30, pp. 33447-33464.

SOUZA, M.A., SAKAMOTO, K.Y., MATTOSO, L.H.C., 2014, "Release of the Diclofenac Sodium by Nanofibers of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Obtained from Electrospinning and Solution Blow Spinning", *Journal of Nanomaterials*, v.2014, 129035.

SPERLING, L. H., 2006, *Introduction to Physical Polymer Science*. 4 ed., Nova Jersey, EUA, John Wiley & Sons, Inc.

SUN, M., LEE, J., CHEN, Y., *et al.*, 2020, "Studies of nanoparticle delivery with in vitro bio-engineered microtissues", *Bioactive Materials*, v.5, n.4, pp. 924-937.

SUN, Y., CHENG, S., LU, W., *et al.*, 2019, "Electrospun fibers and their application in drug controlled release, biological dressings, tissue repair, and enzyme immobilization", *Royal Society of Chemistry Advanced.*, v.9, pp. 25712-25729.

THIRÉ, R.M.S.M.; ARRUDA, L.C.; BARRETO, L.S., 2011, "Morphology and thermal properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/attapulгите nanocomposites", *Materials Research*, v.14, n.3, pp.340-344.

TOLEDO, A. L. M. M.; Ramalho, B. S.; Picciani, P. H. S., *et al.*, 2020, "Effect of three different amines on the surface properties of electrospun polycaprolactone mats", *Int. Polym. Mater.* v.70, n.17.

TONG, J., XU, X., WANG, H., *et al.*, 2015, "Solution-blown core-shell hydrogel nanofibers for bovine serum albumin affinity adsorption", *RSC Advances*, v.5, pp. 83232-83238.

TOSSI, S.; NADERI-MESHKIN, H.; KALALINIA, F.; *et al.*, 2029, "Bone defect healing is induced by collagen sponge/polyglycolic acid." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.30, pp.1-10.

UM, I. C., KWEON, H. Y., PARK, Y. H, *et al.*, 2001, "Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid", *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 29, n. 2, pp. 91-97.

VANLEEuw, E.; WINDERICKX, S.; THEVISSen, K. *et al.* 2019, "Substrate-Specificity of *Candida rugosa* Lipase and Its Industrial Application", *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v.7, n.19, pp.15828-15844.

VASILE, C., 2018a, "Polymeric nanocomposites and nanocoatings for food packaging: A review" *Materials*, v. 11, n.10.

VASILE, C., 2018b, "Polymeric Nanocomposites and Nanocoatings for Food Packaging: A Review", *Materials*, v. 11, n.10.

WOLFENDEN, R., SNIDER, M. J., 2001, "The Depth of Chemical Time and the Power of Enzymes as Catalysts", *Accounts of Chemical Research*, v. 34, n. 12, pp. 938-945.

XIE, J.,ZHANG, Y., SIMPSON, B., "Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications", 2022, *Current Opinion in Food Science*, v. 43, pp. 27-35.

YANG, Y., XIA, T., ZHI, W., *et al.*,2011,"Promotion of skin regeneration in diabetic rats by electrospun core-sheath fibers loaded with basic fibroblast growth factor", *Biomaterials*, v.32, n.18, pp. 4243-4254.

ZDARTA, J., DEGÓRSKA, O., JANKOWSKA, K., *et al.*, 2022, "Removal of Persistent Sulfamethoxazole and Carbamazepine from Water by Horseradish Peroxidase Encapsulated into Poly(Vinyl Chloride) Electrospun Fibers", *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n.1, 272.

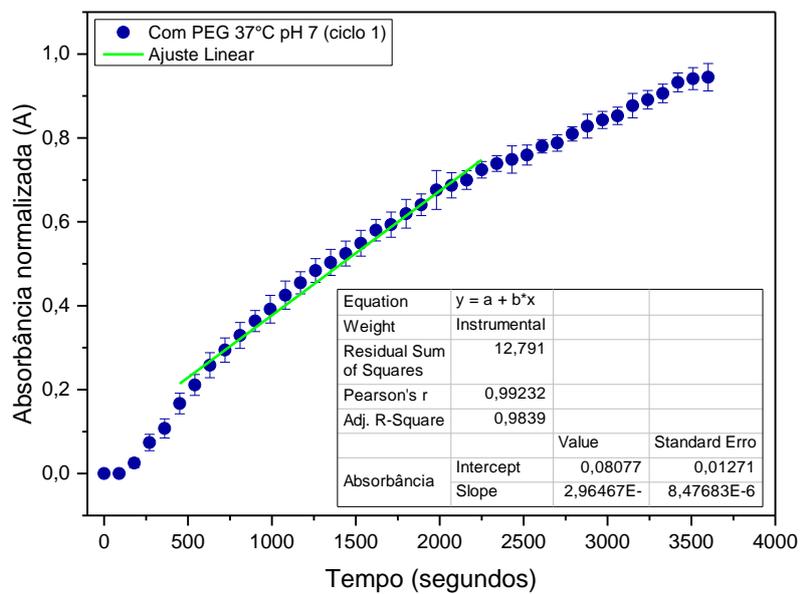
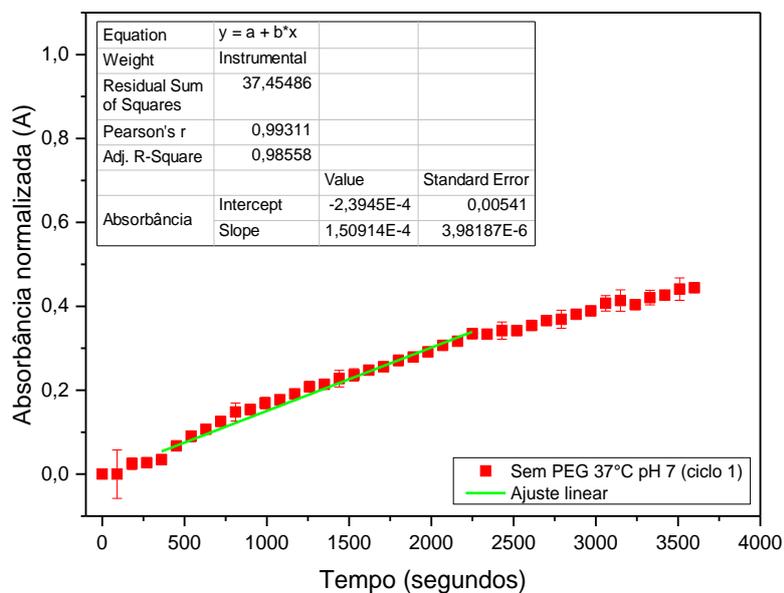
ZDARTA, J., MEYER, A., JESIONOWSKI, T., *et al.*, 2018, "A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility", *Catalysts*, v. 8, n. 2.

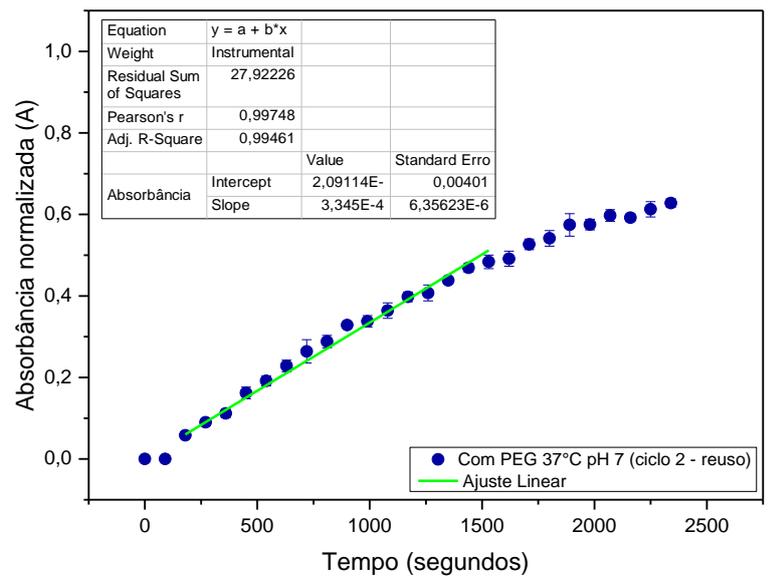
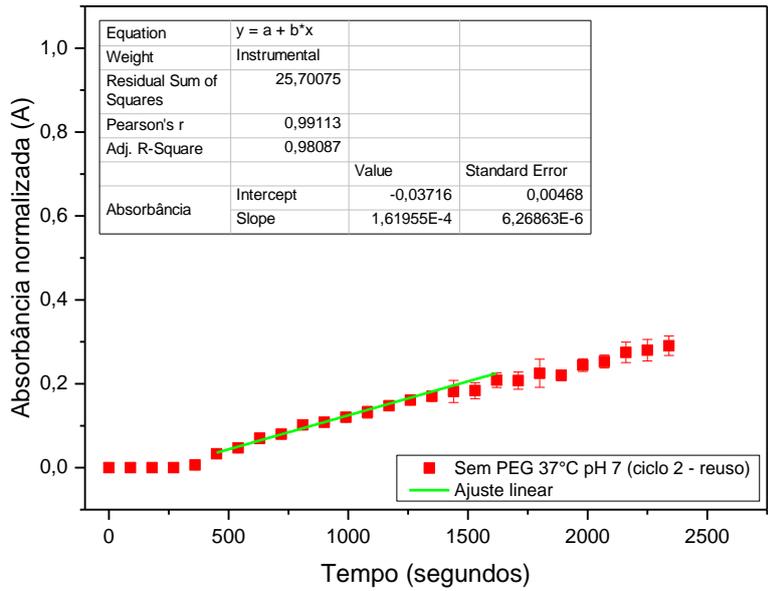
ZDARTA, J., STASZAK, M., JANKOWSKA, K., *et al.*, 2020, "The response surface methodology for optimization of tyrosinase immobilization onto electrospun polycaprolactone–chitosan fibers for use in bisphenol A removal", *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 165 parte b, pp. 2049-2059.

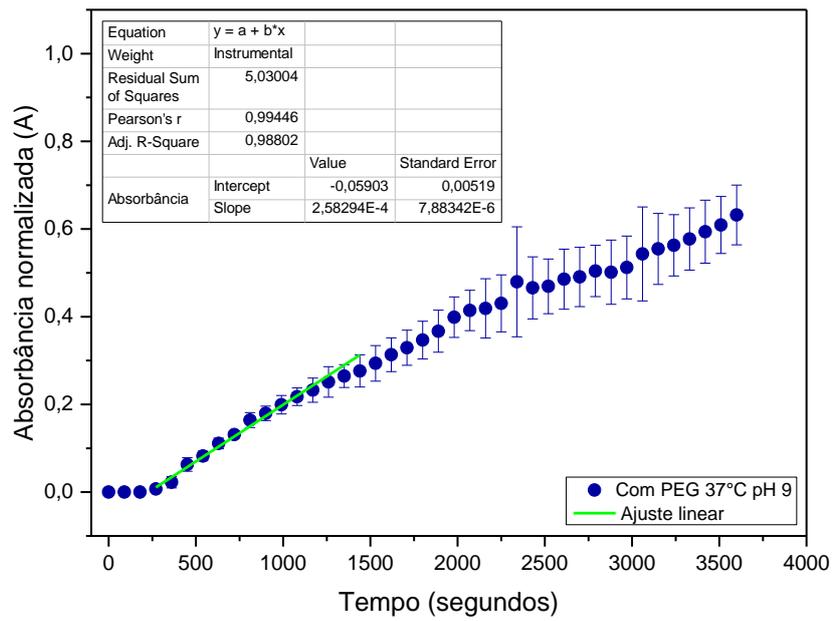
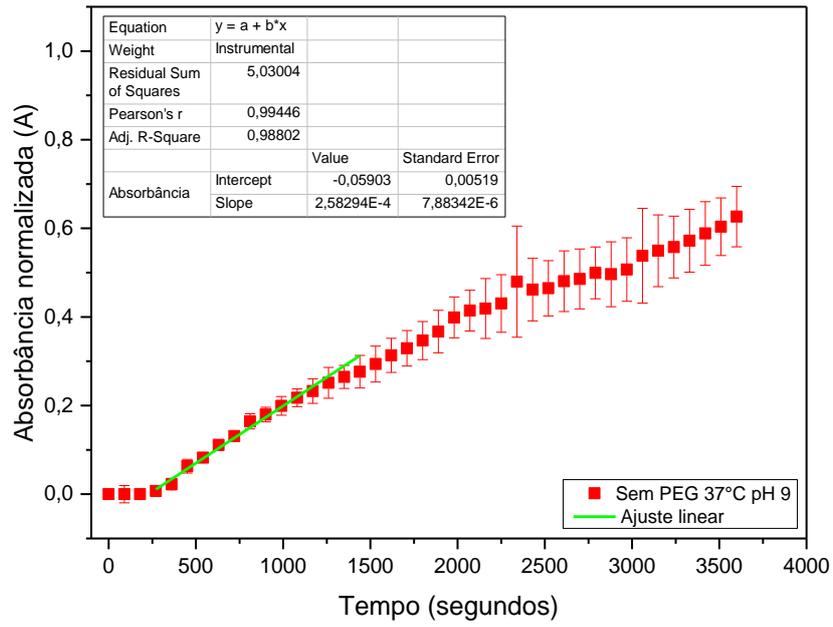
ZHUANG, X., XIAO, C., CHEN, X., *et al.*, 2019, "Electrospun polymer biomaterials", *Progress in Polymer Science*, v. 90, pp. 1–34.

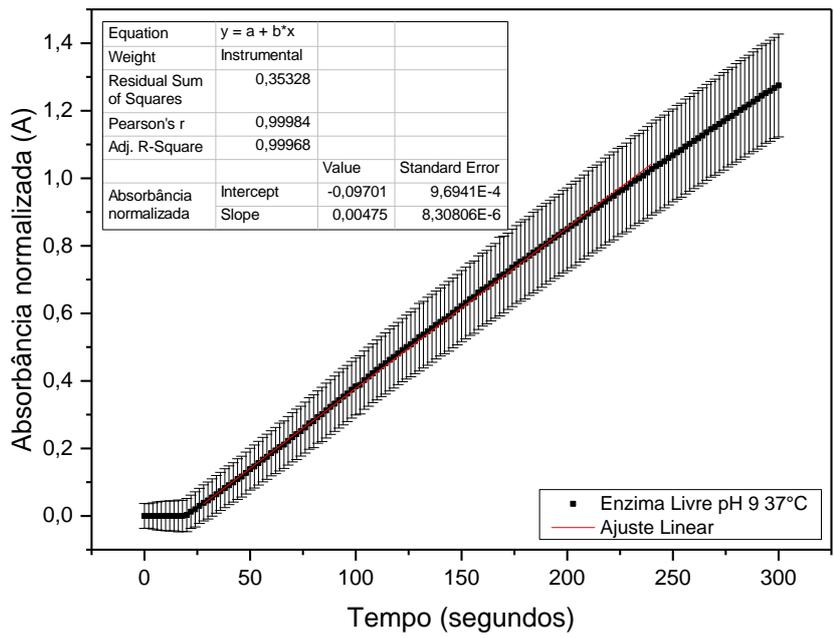
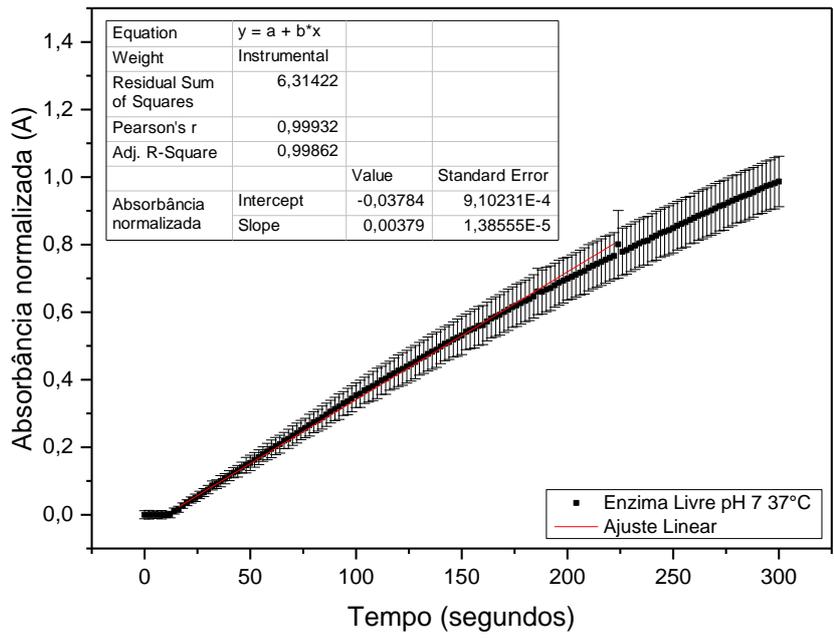
APÊNDICE

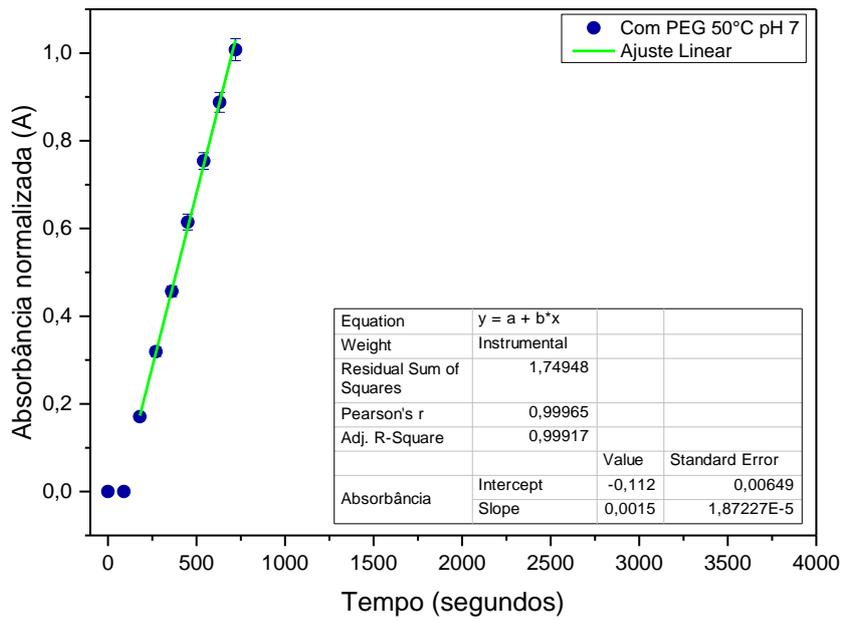
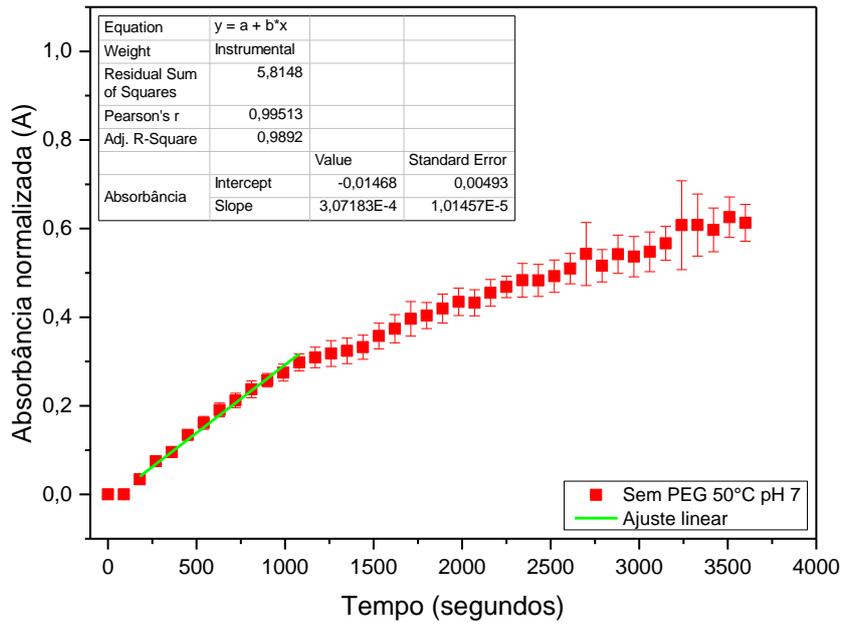
I - AJUSTES LINEAR DAS CURVAS DE ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DO TEMPO

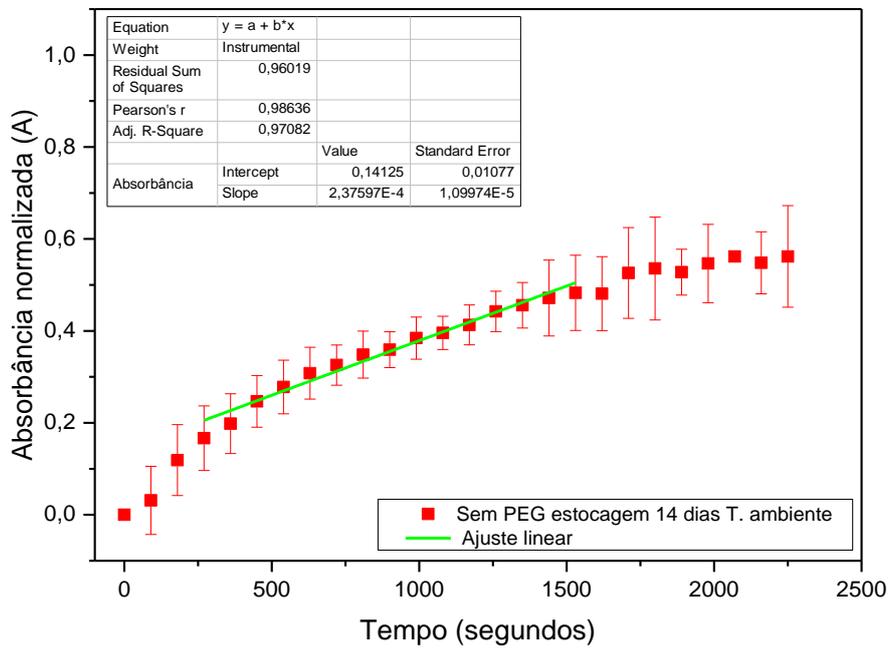
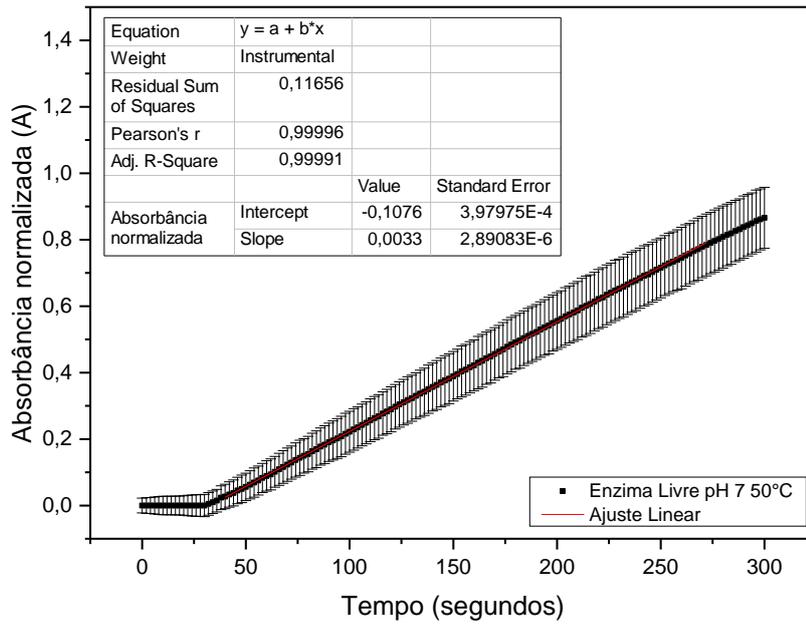


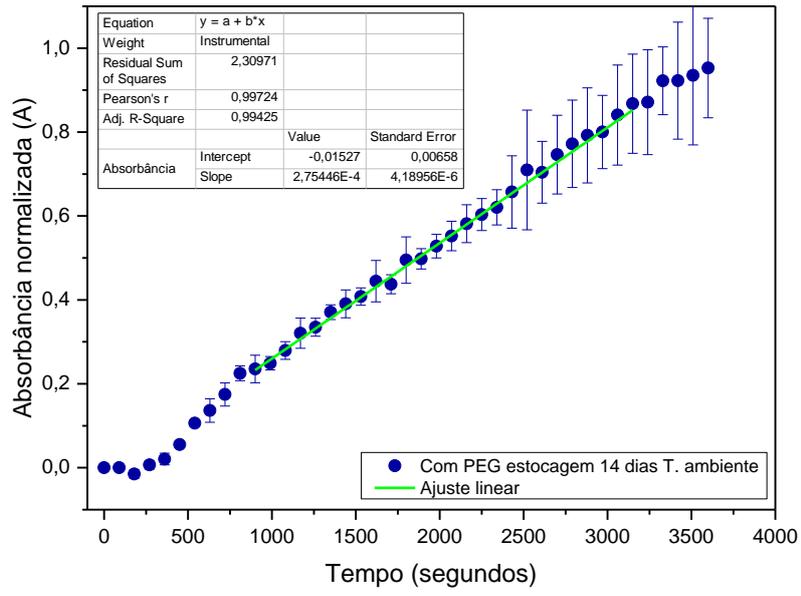












II – PUBLICAÇÕES

Resumo publicado em anais de congresso:

- CARLOS, A. L. M.; DIAS, M.L. ; THIRÉ, R.M. Production and characterization of polymeric nanospun fibers by Solution Blow Spinning for bioactive compounds encapsulation. In: XVIII Brazil MRS Meeting, 2019, Balneário Camburiú. XVIII Brazil MRS Meeting - Proceedings, 2019. p. 224-225.

Artigo completo publicado em periódico:

- CARLOS, A. L. M.; MANCIPE, J. M. A.; Dias, M,L.; Thiré, R.M. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) core-shell spun fibers produced by solution blow spinning for bioactive agent's encapsulation. JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE, v. 139, p. 52081, 2021.

III - LICENÇA TERMOS E CONDIÇÕES JOHN WILEY & SONS PARA USO DE CONTEÚDO DO ARTIGO

17/04/2023 14:59

RightsLink - Your Account

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 17, 2023

This Agreement between Miss. Aline Luiza Carlos ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5531470557039
License date	Apr 17, 2023
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Applied Polymer Science
Licensed Content Title	Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) core-shell spun fibers produced by solution blow spinning for bioactive agent's encapsulation
Licensed Content Author	Aline Luiza M. Carlos, Javier Mauricio Mancipe, Marcos Dias, et al
Licensed Content Date	Dec 24, 2021
Licensed Content Volume	139
Licensed Content Issue	18
Licensed Content Pages	13
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	01
Title	Imobilização de enzima Lipase pelo método de encapsulamento via Fiação por Sopros em Solução
Institution name	Universidade Federal do Rio de Janeiro
Expected presentation date	Jun 2023
Order reference number	Pedido 1 tese
Specific Languages	Português, Inglês
Requestor Location	Miss. Aline Luiza Carlos Estrada do Colégio 144, bl 3, apt 1108 Rio de Janeiro, 21235280 Brazil Attn: Miss. Aline Luiza Carlos
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.

<https://s100.copyright.com/MyAccount/web/jsp/viewprintablelicensefrommyorders.jsp?ref=63d4a4c9-2000-4563-8331-9c8a6a1ab271&email=>

1/3

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts**, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes. (see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License \(CC-BY-NC-ND\)](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? E-mail us at customer-care@copyright.com.